

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Exposición y bioaccesibilidad de acrilamida en el ámbito industrial, de la
restauración colectiva y de la cocina tradicional

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Lucía González Mulero

DIRIGIDA POR

Marta Mesías García

Cristina Delgado Andrade

Francisco José Morales Navas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA



TESIS DOCTORAL

EXPOSICIÓN Y BIOACCESIBILIDAD DE ACRILAMIDA EN EL
ÁMBITO INDUSTRIAL, DE LA RESTAURACIÓN COLECTIVA Y
DE LA COCINA TRADICIONAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Lucía González Mulero

DIRECTORES

Marta Mesías García

Cristina Delgado Andrade

Francisco José Morales Navas

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Esta obra está bajo una licencia
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

FINANCIACIÓN

La presente tesis doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, la Agencia Estatal de Investigación (<https://doi.org/10.13039/501100011033>) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (“FEDER”) “Una manera de hacer Europa” (proyecto ACRINTAKE (RTI2018-094402-B-I00) y por la Comunidad de Madrid y financiación europea de los programas FSE y FEDER (proyecto S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM).

La dirección de esta Memoria de tesis doctoral ha sido llevada a cabo por las doctoras Marta Mesías García y Cristina Delgado Andrade y el doctor Francisco José Morales Navas, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Agradecimientos

Aquí me encuentro después de cinco años, intentando dilucidar por dónde empezar a escribir los agradecimientos de mi tesis doctoral. Ha sido una experiencia con muchos altibajos, con muchas cosas buenas, desafíos, dudas, incertidumbres y a ratos penurias, pero sobre todo de mucho disfrute y crecimiento personal.

Durante todo el proceso he conocido a personas maravillosas que me han abierto las puertas al mundo de la investigación y me han permitido formar parte de él. Por ello, quiero empezar agradeciendo en primer lugar a mi director y directoras de tesis por haber apostado por mí para hacer este doctorado. A Fran por darme la primera oportunidad con aquella beca de Garantía Juvenil y acogerme en tu grupo como una más, por el apoyo, el cariño y la confianza que siempre has depositado en mí, por ayudarme a crecer como investigadora y por enseñarme que un grupo de investigación funciona mejor cuando está unido. A Martita, mi mentora y guía en este arduo proceso, no puedo agradecerte suficiente todas las cosas que me has enseñado no solo a nivel profesional sino también a nivel personal, muchas gracias por el cariño y tener siempre la disposición de ayudar en todo. A Cris, que me acogiste desde el principio con una facilidad y un cariño que siempre me ha fascinado, por tus sonrisas y alegría, por todo lo que me has enseñado, mil gracias por acogerme también en Granada y enseñarme otra forma de “hacer ciencia”, ha sido todo un placer trabajar contigo. Muchísimas gracias a los tres por la paciencia infinita y el apoyo incondicional.

A mis compañeras. A Paquita, por tu energía positiva, tus enseñanzas en el laboratorio, tus consejos, tu cariño y apoyo, por preocuparte siempre y escucharme cuando lo he necesitado, muchas gracias por estar siempre dispuesta a todo. A Elena por ser ese apoyo, no sólo a la hora de sacar trabajo adelante, sino también para sacar ideas y preparar cualquier poster, charla o concurso, por hacer que las cosas fueran siempre más divertidas y por soportar mis intensos desahogos sin rechistar.

A toda la gente del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición que ha contribuido a hacer cada día un poco más llevadero. A Elena porque empezamos este camino juntas, por las charlas, las risas y las cervezas. A Bea por sus sonrisas diarias. A Irene, porque, aunque llegaste ya al final del proceso, has resultado ser un apoyo muy importante, sobre todo por esos consejos finales tan necesarios. Muchas gracias en especial a Inma, de la USTA, por el análisis de las miles de muestras y la disposición a ayudar siempre que surgía un problema con alguna.

A José Ángel y a Beatriz por acogerme en Granada y enseñarme las maravillas de la fermentación, gracias por una experiencia super enriquecedora.

A Montaña, por el asesoramiento burocrático y hacerlo más fácil durante todo el proceso.

A mis amigos, por estar siempre ahí para apoyarme y para recordarme lo mucho que valgo, por aguantar mis chapas doctoriles, por celebrar conmigo y por darme todos los ánimos del mundo. A mis amigas, porque son los pilares que me sustentan. A Laura por tu locura, por enseñarme a echarle más morro a la vida, por el apoyo y el amor que me das, las charlas sobre nuestros vicios televisivos y los planes de viajes maravillosos. A Sara, por estar desde que tengo memoria, por celebrar mis triunfos y sobrellevar mis penas, porque eres mi compañera de vida, mi ídola, y sin ti jamás habría llegado tan lejos. A Raquel y Adri por seguir siempre conmigo y por animarme a perseguir mis metas, por quererme y aceptarme como soy y ayudarme a reírme a carcajadas de la vida, sois indispensables. A Clara, por demostrarme que aun viviendo a 400 km y viéndonos de pascuas a ramos se puede estar muy presente en el día a día de una persona, porque eres un pilar fundamental en mi vida y me acompañas en cada paso, por escucharme, por tus consejos, tus mimos y por ser tan auténtica.

A Rubén, por existir, por encontrarme, por quererme, por cuidarme y por acompañarme siempre en todo. Por ser mi rayo de luz y positividad en la vida y

todo un ejemplo a seguir en cuanto a responsabilidad, constancia y motivación. Por enseñarme que los logros son mayores cuando son compartidos y las cargas pesan menos cuando se llevan entre dos. Por ser mi apoyo incondicional, por sacarme sonrisas cuando estoy triste y por darme siempre tu opinión sincera. Por enseñarme lo bonito que puede ser compartirlo todo con alguien. Por todo lo que hemos vivido y lo que nos queda por vivir. You are the love of my life.

A mi familia, porque estáis siempre presentes, apoyando y animando. A mi tía Mamen por los ánimos incansables y ayudarme con el inglés. Y, cómo no, a mi abuelito Alfonso por alegrarte tanto de mis logros.

A mi hermana Ángela, por estar siempre ahí, para cualquier cosa, por las charlas y el apoyo y porque ves siempre lo bueno que hay en mí. A mis sobrinos, Leo y Alex, por ser ese soplo de energía y terremoto que a veces necesito, por ser tan divertidos y cariñosos.

A mis padres, sobre todo a ellos. Porque todo lo que he alcanzado ha sido gracias a ellos. A mi madre por quererme tanto, por ser tan atenta, detallista y cuidadosa, por enseñarme a ser valiente y a afrontar la vida con buena cara, por ser un modelo y por entenderme siempre. A mi padre por enseñarme a pensar por mí misma, a tomar mis propias decisiones y por apoyarme siempre en todas ellas, por tu comprensión, paciencia y perseverancia, por todo el amor que me das.

A todas las personas de mi vida, os doy las gracias por valorarme y quererme tanto y por acompañarme en mi camino a cada pasito que doy. Porque os quiero más que a nada en este mundo. ¡Esto va por vosotros!

Trabajo derivado de la tesis doctoral

Los resultados expuestos en la presente tesis doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos:

- Delgado-Andrade C, Mesías M, **González-Mulero L**, Morales FJ. “Acrilamida en galletas comercializadas en España. Evolución del mercado desde 2007-2019”. *IV Congreso FESNAD 2020*. Modalidad online, 2020. Presentación oral.
- Mesías M, Delgado-Andrade C, Holgado F, **González-Mulero L**, Morales FJ. “Contenido de acrilamida en patatas fritas elaboradas en servicios de restauración”. *IV Congreso FESNAD 2020*. Modalidad online, 2020. Póster.
- Mesías M, **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Holgado F, Morales FJ. “La aplicación para dispositivos móviles “Safefrying, el color de tus patatas” promueve hábitos saludables durante la fritura de patatas”. *XXIV Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica*. Madrid, 2020. Póster. *Publicación: Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 40, S1: 102, 2020.
- Mesías M, **González-Mulero L**, Morales FJ, Delgado-Andrade C. “Contenido de furosina e hidroximetilfurfural en cereales de desayuno. Evolución en productos comercializados en España entre 2006-2018”. *XXIV Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica*. Madrid, 2020. Póster. *Publicación: Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 41, S1: 37, 2021.
- **González-Mulero L**, Mesías M, Morales FJ, Delgado-Andrade C. “Bioaccesibilidad de la acrilamida en galletas y cereales de desayuno”. *XXV Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica*. Madrid, 2021. Póster.
- **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Mesías M. “Contenido de acrilamida en alimentos procesados comúnmente consumidos por la población española. Influencia del ámbito de su preparación”. *XXV Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica*. Madrid, 2021. Póster. *Publicación: Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 41, S1: 104, 2021.
- Mesías M, Delgado-Andrade C, Holgado F, **González-Mulero L**, Morales FJ. “Consumer’s decisions on the selection of the end-point in a controlled potato frying process influence the exposure to acrylamide”. *XXI EuroFoodChem*. Online, Noviembre 2021. Póster

- **González-Mulero L**, Mesias M, Morales FJ, Delgado-Andrade. “Acrylamide content in common Spanish culinary preparations and exposure from household, catering and industrial settings”. *XXI EuroFoodChem*. Modalidad Online, 2021. Póster.
- Mesías M, Olombrada E, **González-Mulero L**, Morales FJ, Delgado-Andrade C. “Investigation of heat-induced chemical indexes in traditional and reformulated biscuits”. *XXI EuroFoodChem*. Modalidad online, 2021. Póster.
- **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Mesias M. “Exposición a acrilamida en la dieta de comedores de centros escolares”. *XXVI Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica. XV Congreso Internacional SEDCA*. Madrid, 2022. Póster. Obtención de un Premio Accésit. *Publicación: Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 42, S1: 52-53, 2022.
- **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Olombrada E, Mesías M. “Influencia del ámbito de preparación en el contenido de hidroximetilfurfural y furfural en alimentos procesados comúnmente consumidos por la población española”. *II Congreso de Investigación PTS Granada*. Granada, 2022. Póster.
- **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Mesias M. “Exposición a acrilamida en la dieta de comedores universitarios”. *XI Congreso Nacional CyTA-CESIA*. Zaragoza, 2022.
- **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Álvarez Acero I, Mesias M. “Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method (LC-ESI-MS/MS) for the acrylamide determination in foods after a standardized *in vitro* digestion process”. *XXXVIII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ)*. Granada, 2022.
- **González-Mulero L**, Mesias M, Morales FJ, Delgado-Andrade C. “Bioaccessibility of acrylamide in cereal and potato-based products. Study on isolated foods and combined meals”. *7th International Conference on Food Digestion*. Cork (Ireland), 2022.
- **González-Mulero L**, Mesias M, Morales FJ, Delgado-Andrade C. “Bioaccesibilidad de la acrilamida en snacks fritos de patata y de otros vegetales”. *XXVII Jornadas internacionales de Nutrición práctica/XVI Congreso*

Internacional de SEDCA. Madrid, 2023. *Publicación*: Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria 43, S1: 122-123, 2023.

- **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Mesias M. “Estimación de la exposición diaria a acrilamida en residencias de mayores mediante un estudio de dieta total”. *XXVII Jornadas internacionales de Nutrición práctica/XVI Congreso Internacional de SEDCA*. Madrid, 2023. Póster. Obtención de un Premio Accésit.
- **González-Mulero L**, Mesias M, Morales FJ, Delgado-Andrade C. “Acrylamide bioaccessibility in cereals, potatoes and chips. Effect of the food matrix and colonic fermentation”. XXII EuroFoodChem Congress. Belgrado (Serbia), 2023. Presentación Oral.
- **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Mesias M. “Influencia de la elección de alimentos por parte del consumidor sobre la exposición diaria a acrilamida en comedores de centros de trabajo”. XXVIII Jornadas internacionales de Nutrición práctica/XVII Congreso Internacional de SEDCA. Madrid, 2024. Póster.

Además de las publicaciones que articulan esta tesis doctoral, se detallan a continuación otros méritos realizados y obtenidos durante el desarrollo de la misma:

PUBLICACIONES

- Mesias M, Delgado-Andrade C, Holgado F, **González-Mulero L**, Morales FJ. 2021. Effect of consumer's decisions on acrylamide exposure during the preparation of French fries. Part 1: Frying conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 147, 111857.
- Mesias M, Delgado-Andrade C, Holgado F, **González-Mulero L**, Morales FJ. 2021. Effect of consumer's decisions on acrylamide exposure during the preparation of French fries. Part 2: Color analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 154, 112321.
- Mesias M, Olombrada E, **González-Mulero L**, Morales FJ, Delgado-Andrade C. 2021. Investigation on heat-induced chemical indexes in traditional and reformulated biscuits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 101, 103963.

- **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Olombrada E, Mesias M. 2022. Study of furanic compound content in common Spanish culinary preparations. Influence of the food preparation setting. *Journal of Food Composition and Analysis*, 110, 104532.

CAPÍTULOS DE LIBRO

- Mesias M, Delgado-Andrade C, Holgado F, **González-Mulero L**, Morales FJ. 2021. Capítulo 18. Nuevos contaminantes químicos generados durante el procesado. 337-355. In: “En Estrategias avanzadas para la mejora de la calidad, la seguridad y la funcionalidad de los alimentos”, Editoras: María Luisa Marina Alegre, María Castro Puyana; Merichel Plaza del Moral. Editorial Universidad de Alcalá. ISBN-978-84-00000-00-0.

PREMIOS

- Accesit a la comunicación presentada a las XXIV Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica: Mesías M, **González-Mulero L**, Delgado Andrade C, Holgado F, Morales FJ. “La aplicación para dispositivos móviles “Safefrying, el color de tus patatas” promueve hábitos saludables durante la fritura de patatas”. Madrid, 2020.
- Accesit a la comunicación presentada a las XXVI Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica: **González-Mulero L**, Morales FJ, Delgado-Andrade C, Mesías M “Exposición a acrilamida en la dieta de comedores de centros escolares”. Madrid, 2022.
- Premio a la mejor comunicación presentada en el II Congreso Investigación PTS Granada: **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ, Olombrada E, Mesias M. “Influencia del ámbito de preparación en el contenido de HMF y furfural en alimentos procesados comúnmente consumidos por la población española”. Granada, 2022.
- Premio a la mejor comunicación presentada a las XXVII Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica: **González-Mulero L**, Delgado-Andrade C, Morales FJ,

Mesías M. “Estimación de la exposición diaria a acrilamida en residencias de mayores mediante un estudio de dieta total”. Madrid, 2022.

ACTIVIDAD DOCENTE

- Docente en las VII Jornadas “Agrodiversidad, cultura y salud”. Seminario impartido: “Exposición y bioaccesibilidad de acrilamida en la restauración colectiva y la cocina tradicional”. Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Modalidad online, 2021.
- Docente en el curso “Controlando y mejorando la calidad, seguridad y la funcionalidad de los alimentos” (3ª Ed.). Taller/Caso práctico impartido: “Estimación de la exposición a contaminantes químicos del procesado. Caso práctico sobre exposición a acrilamida”. Modalidad online. Universidad de Alcalá, 2021.
- Docente en el curso “Controlando y mejorando la calidad, seguridad y la funcionalidad de los alimentos” (4ª Ed.). Taller/Caso práctico impartido: “Estimación de la exposición a contaminantes químicos del procesado. Caso práctico sobre exposición a acrilamida”. Universidad de Alcalá, 2022.
- Docente en el curso “Controlando y mejorando la calidad, seguridad y la funcionalidad de los alimentos” (5ª Ed.). Taller/Caso práctico impartido: “Estimación de la exposición a contaminantes químicos del procesado. Caso práctico sobre exposición a acrilamida”. Universidad de Alcalá, 2023.

ACTIVIDAD DIVULGATIVA

- Participación en el Proyecto de Divulgación “Jóvenes Científicos” financiado por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT, MINECO). FCT-17-12206. 2018-2019.
- Participación en el “Elevator Pitch” organizado por el Departamento de Posgrado y Especialización del CSIC. II Jornadas para doctorandos del CSIC. Modalidad online, 2020.
- Participación en el Concurso “Tesis en 3 minutos” organizado en el marco del Programa AVANSECAL-II-CM, con el trabajo “Exposición y bioaccesibilidad

de acrilamida en la restauración colectiva y la cocina tradicional”. Modalidad online, 2020. Premio Accésit.

- Ponente en la actividad formativa “Visita al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN)” organizado por la Universidad de Córdoba. Modalidad online, 2020.
- Participación en el II Concurso “Yo investigo. Yo soy CSIC” organizado por el Departamento de Posgrado y Especialización del CSIC. Modalidad online, 2021.
- Participación en el Concurso “Tesis en 3 minutos” organizado por la Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2021.

Índice de contenidos

Abreviaturas / **1**

Índice de tablas / **7**

Índice de figuras / **11**

Resumen / **15**

Summary / **19**

Diseño experimental / **23**

Introducción y objetivos / 29

Revisión bibliográfica / 33

1. Reacción de Maillard / **35**

1.1. Descripción y aspectos generales / **35**

1.2. Química de la reacción / **37**

1.3. Consecuencias de la reacción / **40**

1.4. Inhibición de la reacción / **47**

2. Acrilamida / **49**

2.1. Generalidades e historia / **49**

2.2. Química de formación / **52**

2.3. Absorción y metabolismo / **57**

2.4. Toxicidad / **64**

2.5. Exposición a acrilamida a través de la dieta / **66**

2.5.1. Niveles en alimentos y principales fuentes de exposición / **66**

2.5.2. Niveles de exposición en la población / **70**

2.5.3. Métodos para evaluar la exposición dietética / **71**

2.6. Evaluación del riesgo asociado a la exposición a acrilamida / **77**

2.7. Actividades de regulación / **78**

2.8. Estrategias de mitigación / **81**

Metodología / 85

Capítulo 1. Contenido de acrilamida en preparaciones culinarias representativas de la dieta española procedentes del entorno doméstico, la restauración colectiva y la industria alimentaria. Estudio 1 / **87**

- 1.1. Diseño experimental / **87**
- 1.2. Determinación de acrilamida por LC-ESI-MS/MS / **89**
- 1.3. Ingesta de acrilamida en diferentes ámbitos culinarios / **90**
- 1.4. Análisis estadístico / **90**

Capítulo 2. Evaluación de la exposición a acrilamida en diferentes entornos de restauración colectiva mediante estudios de dieta duplicada. Estudios 2-5 / **92**

- 2.1. Diseño experimental / **92**
- 2.2. Tratamiento de las muestras / **94**
- 2.3. Determinación de acrilamida por LC-ESI-MS/MS / **96**
- 2.4. Evaluación de la ingesta de acrilamida y la exposición diaria / **96**
- 2.5. Caracterización del riesgo asociado a la exposición a acrilamida / **98**
- 2.6. Análisis estadístico / **98**

Capítulo 3. Estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de la acrilamida y efecto de la fermentación colónica. Estudios 6 y 7 / **100**

- 3.1. Diseño experimental de la evaluación de la bioaccesibilidad gastrointestinal de la acrilamida en alimentos individuales y comidas completas en las distintas etapas de la digestión gastrointestinal. Estudio 6 / **100**
- 3.2. Diseño experimental de la evaluación de la bioaccesibilidad total de la acrilamida en snacks fritos mediante digestión gastrointestinal acoplada a fermentación colónica *in vitro*. Estudio 7 / **107**
- 3.3. Determinación de acrilamida por LC-ESI-MS/MS / **111**
- 3.4. Cálculos de bioaccesibilidad gastrointestinal y total / **112**
- 3.5. Estimación de la exposición a acrilamida a través del consumo de snacks vegetales. Estudio 7 / **113**
- 3.6. Análisis estadístico / **113**

Resultados / 115

Capítulo 1. Contenido de acrilamida en preparaciones culinarias representativas de la dieta española procedentes del entorno doméstico, la restauración colectiva y la industria alimentaria. Estudio 1 / **117**

- Artículo 1 / **117**

Capítulo 2. Evaluación de la exposición a acrilamida en diferentes entornos de restauración colectiva mediante estudios de dieta duplicada. Estudios 2-5 / **143**

- Estudio 2: Artículo 2 / **143**
- Estudio 3: Artículo 3 / **173**
- Estudio 4: Resultados inéditos / **195**
- Estudio 5: Resultados inéditos / **211**

Capítulo 3. Estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de la acrilamida y efecto de la fermentación colónica. Estudios 6 y 7 / **228**

- Estudio 6: Artículo 4 / **228**
- Estudio 7: Artículo 5 / **255**

Discusión integradora / 285

Conclusiones / 301

Referencias bibliográficas / 307

Abreviaturas

3-APA

3-aminopropionamida

3-MCPD

3-monocloropropano-1,2-diol

AAMA

N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil)-
cisteína

AESAN/AECOSAN

Agencia Española de Seguridad
Alimentaria y Nutrición / Agencia
Española de Consumo, Seguridad
Alimentaria y Nutrición

AGEs

Producto de glicación avanzada

APPCC

Análisis de peligros y puntos de
control crítico

BMDL₁₀

Límite mínimo de confianza para la
dosis de referencia

CCFAC

Comisión del Codex Alimentarius

CE

Comisión Europea

CML

Carboximetil-lisina

CSIC

Consejo Superior de Investigaciones
Científicas

CYP2E1

Citocromo-P₄₅₀-2E1-monooxigenasa

EFSA

European Food Safety Authority
(Autoridad Europea de Seguridad
Alimentaria)

ENPE

Estudio Nutricional de la Población
Española

FDA

Food and Drug Administration

FDE

FoodDrinkEurope

GAMA

N-acetil-S-(3-amino-2-hidroxi-3-
oxopropil)-cisteína

GST

Glutación-S-transferasa

HMF

Hidroximetilfurfural

IARC

International Agency for Research on
Cancer (Agencia Internacional de
Investigación sobre el Cáncer)

ICTAN

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición

iso-GAMA

N-acetil-S-(1-carbamoil-2-hidroxietyl)-cisteína

LB

Lower Bound (Límite inferior de exposición)

LC-ESI-MS/MS

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray

LOAEL

Lowest observed adverse effect level (Nivel más bajo con efecto adverso observado)

LOD

Limit of detection (Límite de detección)

LOQ

Limit of quantitation (Límite de cuantificación)

MAPA

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

MOE

Margin of exposure (Margen de exposición)

NOAEL

No observed adverse effect level (Nivel sin efectos adversos observados)

OMS

Organización Mundial de la Salud

Pc

Peso corporal

PDA

Personal digital assistant

PRM

Productos de la Reacción de Maillard

RM

Reacción de Maillard

SD

Standard Deviation (Desviación estándar)

SGF

Simulated gastric fluid (Fluido gástrico simulado)

SIF

Simulated intestinal fluid (Fluido intestinal simulado)

SNFA

Swedish National Food Agency (Agencia Nacional de Alimentos de Suecia)

SSF

Simulated salivary fluid (Fluido salival simulado)

UE

Unión Europea

UB

Upper Bound (Límite superior de exposición)

Índice de tablas

Revisión bibliográfica

- Tabla 1. Solubilidad de la acrilamida en diferentes solventes / **49**
- Tabla 2. Niveles medios de acrilamida en alimentos expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ / **70**
- Tabla 3. Exposición media alimentaria a acrilamida en población adulta / **71**
- Tabla 4. Valores de peso corporal (kg) por franjas de edad según organismos oficiales y estudios epidemiológicos / **78**
- Tabla 5. Niveles de referencia del contenido de acrilamida en alimentos / **80**

Metodología

- Tabla 6. Menús recogidos en los comedores de cada colectividad / **92**
- Tabla 7. Pesos estimados para los usuarios de los comedores de centros escolares / **97**
- Tabla 8. Pesos estimados para los usuarios de los comedores de las distintas colectividades / **98**
- Tabla 9. Proporciones de cada alimento individual en las comidas completas / **101**
- Tabla 10. Volúmenes de las soluciones stock de electrolitos utilizadas para preparar los fluidos digestivos simulados en un volumen de 400 mL diluidos en agua y con una concentración 1.25x / **103**

Resultados

- Tabla 11. Descripción de los menús elaborados en el centro de trabajo 1 durante las dos semanas de estudio / **200**
- Tabla 12. Descripción de los menús elaborados en el centro de trabajo 2 durante las dos semanas de estudio / **202**
- Tabla 13. Contenido de acrilamida, porción comestible y aporte de acrilamida de los alimentos y las comidas del centro de trabajo 1 / **203**
- Tabla 14. Contenido de acrilamida, porción comestible y aporte de acrilamida de los alimentos y las comidas del centro de trabajo 2 / **204**

- Tabla 15. Porción comestible y aporte de acrilamida de alimentos y comidas procesadas en el centro de trabajo 1 con niveles inferiores al LOQ (escenario de mayor exposición, UB) / **205**
- Tabla 16. Porción comestible y aporte de acrilamida de alimentos y comidas procesadas en el centro de trabajo 2 con niveles inferiores al LOQ (escenario de mayor exposición, UB) / **207**
- Tabla 17. Exposición diaria a acrilamida a través de los menús consumidos en los comedores de centros de trabajo y evaluación del riesgo asociado / **208**
- Tabla 18. Menús elaborados en el centro de mayores 1 (semana 1) / **216**
- Tabla 19. Menús elaborados en el centro de mayores 1 (semana 2) / **217**
- Tabla 20. Menús elaborados en el centro de mayores 2 (semana 1) / **218**
- Tabla 21. Menús elaborados en el centro de mayores 2 (semana 2) / **219**
- Tabla 22. Contenido de acrilamida, porción comestible y aporte de acrilamida de los alimentos y las comidas del centro de mayores 1 / **220**
- Tabla 23. Contenido de acrilamida, porción comestible y aporte de acrilamida de los alimentos y las comidas del centro de mayores 2 / **221**
- Tabla 24. Porción comestible y aporte de acrilamida de alimentos y comidas procesadas en el centro de mayores 1 con niveles inferiores al LOQ (escenario de mayor exposición) / **222**
- Tabla 25. Porción comestible y aporte de acrilamida de alimentos y comidas procesadas en el centro de mayores 2 con niveles inferiores al LOQ (escenario de mayor exposición) / **223**
- Tabla 26. Ingesta de acrilamida a través del consumo de menús elaborados en comedores de centros de mayores. Escenario de menor exposición / **225**
- Tabla 27. Ingesta de acrilamida a través del consumo de menús elaborados en comedores de centros de mayores. Escenario de mayor exposición / **225**
- Tabla 28. Exposición dietética a acrilamida en los comedores de los centros de mayores y evaluación del riesgo asociado / **226**

Índice de figuras

Revisión bibliográfica

- Figura 1. Esquema general de la Reacción de Maillard / **39**
- Figura 2. Ejemplos de contaminantes químicos de procesado / **44**
- Figura 3. Estructuras químicas del glioxal, metilglioxal y diacetilo / **44**
- Figura 4. Esquema de las vías de formación de AGEs / **46**
- Figura 5. Fórmula química de la acrilamida / **49**
- Figura 6. Formación de acrilamida a través de la reacción de Maillard / **53**
- Figura 7. Otras vías minoritarias de formación de acrilamida / **54**
- Figura 8. Metabolismo de la acrilamida / **59**
- Figura 9. Definición de biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad, y la metodología utilizada en su evaluación / **61**
- Figura 10. Esquema de las medidas de mitigación para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos / **85**

Metodología

- Figura 11. Diseño experimental de la recogida de alimentos procesados de distintos entornos culinarios / **88**
- Figura 12. Diseño experimental de la recogida de menús en las distintas colectividades / **95**
- Figura 13. Esquema de los sistemas de alimentos utilizados para el ensayo de bioaccesibilidad / **102**
- Figura 14. Esquema del procedimiento de la digestión *in vitro* de alimentos individuales y comidas completas / **106**
- Figura 15. Snacks vegetales seleccionados para el estudio de bioaccesibilidad total de acrilamida acoplada a fermentación colónica / **108**
- Figura 16. Esquema del procedimiento de la digestión *in vitro* de snacks vegetales acoplada a fermentación colónica / **109**

Resultados

- Figura 17. Porcentaje de alimentos y comidas con niveles de acrilamida superiores al LOQ y su distribución en los platos que componen el menú diario del almuerzo en ambos centros de trabajo / **209**
- Figura 18. Ingesta diaria de acrilamida en los centros de trabajo evaluados. (A) Escenario de menor exposición (LB); (B) Escenario de mayor exposición (UB) / **210**
- Figura 19. Porcentaje de alimentos y comidas con niveles de acrilamida superiores al LOQ y su distribución en el desayuno, el almuerzo, la merienda y la cena en ambos centros de mayores / **227**

Discusión integradora

- Figura 20. Ingesta diaria de acrilamida en las distintas colectividades / **292**
- Figura 21. Intervalos de exposición a acrilamida en distintas franjas de edad descritos en la bibliografía / **295**

Resumen

La acrilamida es un contaminante químico generado durante el procesado de los alimentos a altas temperaturas. Diversos estudios han evaluado la ingesta de acrilamida a través de la dieta debido al riesgo asociado a su toxicidad. Sin embargo, esta evaluación se ha centrado fundamentalmente en alimentos de origen industrial, sin considerar los niveles del contaminante en alimentos elaborados en el ámbito doméstico y en la restauración colectiva. Por otra parte, investigaciones previas han demostrado cómo la composición de la matriz alimentaria puede interferir en la bioaccesibilidad de la acrilamida durante el proceso digestivo. Estas investigaciones se han desarrollado mayoritariamente en alimentos digeridos de forma aislada y sin tener en cuenta la fermentación a nivel colónico, siendo necesario evaluar qué ocurre durante la digestión de comidas completas, así como el papel de la microbiota en la bioaccesibilidad final del contaminante.

En este contexto, el objetivo de esta tesis doctoral ha sido evaluar la exposición a acrilamida en el ámbito industrial y los entornos doméstico y de restauración colectiva, determinando la ingesta real del contaminante a través del consumo de menús dirigidos a distintos sectores de la población mediante estudios de dieta duplicada. De forma complementaria, se ha evaluado la bioaccesibilidad de la acrilamida en las distintas etapas del proceso digestivo, tanto en alimentos aislados como en comidas completas, incluyendo una etapa de fermentación colónica para estudiar el efecto de la microbiota sobre la fracción no bioaccesible del compuesto.

Los resultados muestran que los distintos grupos de alimentos de origen industrial incluidos en el estudio presentan menores niveles de acrilamida, sugiriendo un control más estricto en este sector tanto en la selección de las materias primas, como en su manipulación y cocinado. Las mayores concentraciones observadas en los alimentos procedentes del ámbito doméstico y de restauración colectiva señalan la necesidad de implementar un mayor control de los procesos en estos sectores, promoviendo la educación sobre seguridad alimentaria entre los manipuladores de alimentos. Los estudios de dieta duplicada revelan que, a pesar de que los menús ofertados en las colectividades sean variados y nutricionalmente equilibrados, la presencia de acrilamida en ellos puede asociarse con el riesgo de desarrollar efectos neoplásicos, siendo las mujeres en la población adulta y los niños de menor edad los

grupos poblacionales más vulnerables debido a su menor peso corporal. La bioaccesibilidad de la acrilamida durante el proceso de digestión gastrointestinal se ve notablemente afectada por la composición de la matriz alimentaria. Este hecho subraya la importancia de considerar la interacción entre los componentes alimentarios para establecer la bioaccesibilidad del contaminante, tanto al ingerir alimentos individuales como, especialmente, tras el consumo de una comida completa. Los estudios *in vitro* de la bioaccesibilidad total de acrilamida sugieren que la fermentación colónica puede desencadenar la liberación de acrilamida no bioaccesible tras el proceso digestivo, permitiendo su acción *in situ* o su absorción en los tramos finales del intestino.

En conclusión, considerar la ingesta combinada de alimentos y el efecto de la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad total del contaminante es esencial para evaluar de manera realista el impacto sobre la salud de la exposición dietética a acrilamida.

Summary

Acrylamide is a chemical contaminant generated during the processing of food at high temperatures. Various studies have assessed the risk associated to the dietary acrylamide exposure due to its toxicity. However, this assessment has primarily focused on industrially produced foods, neglecting the levels of the contaminant in foods prepared in domestic settings and in collective catering. Additionally, previous studies have shown how the food matrix composition can interfere with the bioaccessibility of acrylamide during the digestive process. These investigations have mostly been conducted on isolated foods digested and without considering colonic fermentation. Therefore, it is necessary to evaluate what occurs during the digestion of complete meals and the role of the microbiota in the final bioaccessibility of the contaminant.

In this context, the objective of this doctoral thesis was to evaluate the acrylamide exposure in industrial, domestic, and collective catering settings, determining the real intake of the contaminant through duplicate diet studies of menus consumed by different population segments. Additionally, the bioaccessibility of acrylamide was examined at different stages of the digestive process, both in isolated foods and in complete meals, including a colonic fermentation stage to study the effect of the microbiota on the non-bioaccessible fraction of the compound.

The results show that the different groups of industrially produced foods included in the study exhibited lower acrylamide levels, suggesting stricter control in this sector concerning the raw material selection, handling and cooking. Conversely, higher concentrations observed in foods from domestic and collective catering environments indicate the need for enhanced control during the food processing in these sectors through the promotion of educational initiatives on food safety among food handlers. Duplicate diet studies reveal that despite the fact that menus offered in collective settings are varied and nutritionally balanced, the presence of acrylamide in them may be associated with the risk of developing neoplastic effects, with women in the adult population and younger children being the most vulnerable collectives due to their lower body weight. The bioaccessibility of acrylamide during the gastrointestinal digestion process is significantly affected by the composition of the food matrix. This underscores the importance of considering the interaction between

food components to establish the bioaccessibility of the contaminant, both when ingesting individual foods and, especially, after consuming a complete meal. *In vitro* studies of the total bioaccessibility of acrylamide suggest that colonic fermentation may trigger the release of acrylamide not bioaccessible after the digestive process, allowing its *in situ* action or absorption in the final sections of the intestine.

In conclusion, considering the combined intake of foods and the effect of the food matrix on the total bioaccessibility of the contaminant is essential for a realistic assessment on the impact of dietary exposure to acrylamide on health.

Diseño experimental

Capítulo 1: **Estudio 1**

- ① Recogida de muestras de alimentos preparados en diferentes entornos culinarios

Industrial Doméstico Restauración colectiva



- ② Análisis de acrilamida LC-ESI-MS/MS



- ③ Estimación de ingesta de acrilamida, exposición y riesgo



Artículo 1

Capítulo 2: **Estudios 2, 3, 4 y 5**

- ① Recogida de muestras de alimentos, y bebidas consumidas en distintos ámbitos de la restauración colectiva



- ② Análisis de acrilamida LC-ESI-MS/MS



- ③ Estimación de ingesta de acrilamida, exposición y riesgo



Artículos 2 y 3 + Resultados inéditos

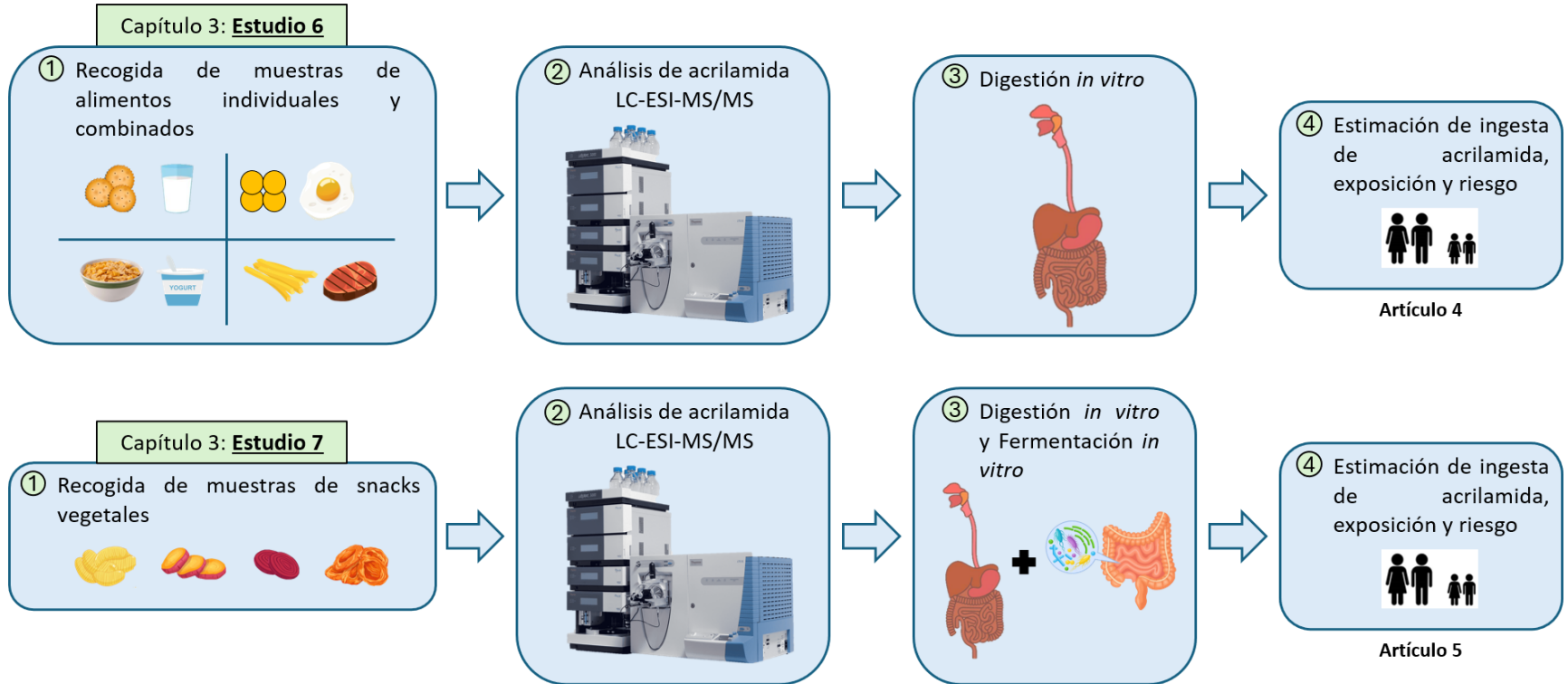


Tabla I. Breve presentación de los capítulos abordados en la tesis doctoral y las publicaciones derivadas

Capítulo	<p>1. Contenido de acrilamida en preparaciones culinarias representativas de la dieta española procedentes del entorno doméstico, la restauración colectiva y la industria alimentaria.</p>	<p>2. Evaluación de la exposición a acrilamida en diferentes entornos de restauración colectiva mediante estudios de dieta duplicada.</p>	<p>3. Estudio <i>in vitro</i> de la bioaccesibilidad de la acrilamida y efecto de la fermentación colónica.</p>
Artículo	<ul style="list-style-type: none"> • Artículo 1: Acrylamide exposure from common culinary preparations in Spain, in household, catering and industrial settings. 	<ul style="list-style-type: none"> • Artículo 2: Assessment of dietary acrylamide exposure in children attending Spanish school canteens using the duplicate diet method. • Artículo 3: Dietary exposure to acrylamide in Spanish university canteens by the duplicate diet method. • Resultados inéditos: Evaluación de la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en comedores de centros de trabajo. • Resultados inéditos: Evaluación de la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en comedores de centros de mayores. 	<ul style="list-style-type: none"> • Artículo 4: Assessment of the acrylamide bioaccessibility in cereal and potato-based foods after <i>in vitro</i> digestion. • Artículo 5: Acrylamide bioaccessibility in potato and veggie chips. Impact of <i>in vitro</i> colonic fermentation on the non-bioaccessible fraction.

Introducción y objetivos

La acrilamida es un contaminante químico de procesado que se encuentra en una gran variedad de alimentos sometidos a altas temperaturas durante el cocinado. La evaluación del riesgo asociado a su exposición ha estado basada en la cuantificación de sus niveles en alimentos mayoritariamente elaborados por la industria alimentaria. Las autoridades en seguridad alimentaria son conscientes de la limitada representatividad y alcance de estos datos, ya que la acrilamida no se produce exclusivamente durante el procesado industrial, sino que también se genera durante el cocinado de los alimentos en el entorno doméstico y en la restauración colectiva. Además, los límites de referencia establecidos y las medidas de mitigación elaboradas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos están dirigidas al ámbito industrial, de forma que en el resto de los entornos culinarios no existe apenas un seguimiento del cumplimiento de los objetivos orientados a reducir la exposición. Dado que en la dieta se consumen una gran variedad de alimentos con diferente manipulación y técnicas de cocinado, que además dependen del entorno culinario en el que se elaboren, la estimación de la ingesta diaria de la acrilamida representa un desafío de gran complejidad.

Por otro lado, es importante tener en cuenta, no sólo el tipo e intensidad del tratamiento térmico aplicado durante el procesado del alimento, sino también la composición de la propia matriz alimentaria, que además va a tener una gran influencia en las posibles interacciones que se den entre los componentes de la dieta durante el proceso digestivo. Estos factores pueden condicionar la bioaccesibilidad y la absorción de la acrilamida contenida en el alimento en el tracto intestinal. En definitiva, la evaluación del riesgo asociado a la exposición diaria de acrilamida a través de la dieta de una población debe considerar estos factores.

En este sentido, el objetivo general de esta tesis doctoral ha sido evaluar, mediante estudios de dieta duplicada, la exposición a acrilamida en el ámbito industrial y los entornos doméstico y de restauración colectiva dirigida a distintos sectores de la población. Para estimar el riesgo real de exposición al contaminante ingerido a través de la dieta, se ha evaluado la bioaccesibilidad del compuesto tanto en alimentos aislados como en comidas completas.

Este objetivo general se ha desglosado en los siguientes objetivos específicos:

- 1) Establecer el rango de exposición a acrilamida en preparaciones culinarias habituales que forman parte de la dieta de la población general, considerando para una misma receta preparaciones domésticas, de restauración colectiva e industriales.
- 2) Estimar la exposición a acrilamida mediante estudios de dieta duplicada y el riesgo asociado a su consumo en entornos de restauración colectiva. Para abarcar distintos grupos de edad dentro de la población se consideraron comedores escolares, de centros universitarios, de centros de trabajo y de centros de mayores.
- 3) Evaluar, mediante ensayos de digestión gastrointestinal *in vitro*, el efecto de la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida a lo largo del tracto digestivo, ya sean alimentos aislados o comidas completas. El propósito fue conocer si las interacciones entre los nutrientes afectan a la fracción bioaccesible del compuesto, modificando por tanto el riesgo asociado a su exposición.
- 4) Investigar la posible acción de la microbiota intestinal de distintos grupos poblacionales (niños, adolescentes y adultos) en la liberación de la acrilamida no bioaccesible tras la digestión gastrointestinal del alimento. Evaluar la bioaccesibilidad total de la acrilamida mediante ensayos de digestión gastrointestinal acoplados a fermentación colónica *in vitro*.

Revisión Bibliográfica

1. Reacción de Maillard

1.1. Descripción y aspectos generales

Los tratamientos térmicos en los alimentos se han empleado tradicionalmente para mejorar su conservación y su palatabilidad. La acción del calor tiene un efecto beneficioso sobre la estabilidad biológica, ya que inactiva o retrasa el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes, destruye toxinas e inhibe enzimas implicadas en el deterioro del mismo y, en consecuencia, se mantiene la seguridad biológica durante la vida útil del producto. Además, puede mejorar la digestibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes, al mismo tiempo que sus características organolépticas (Van Boekel y col., 2010). Tratamientos térmicos como la fritura, el asado, el horneado, la esterilización o la pasteurización son habitualmente empleados para la elaboración de los alimentos en el ámbito industrial, de la restauración colectiva y el doméstico. Durante el desarrollo de estos procesos tecnológicos tienen lugar diversas reacciones químicas donde la temperatura es el principal catalizador. Entre ellas destacan las reacciones de pardeamiento no enzimático, que en su etapa final conducen a la formación de estructuras químicas coloreadas de alto peso molecular. En la elaboración de los alimentos procesados térmicamente, la industria alimentaria persigue el desarrollo controlado de estas reacciones para dotar al producto final de aromas, sabores y colores únicos y apreciados por el consumidor, como ocurre durante el horneado del pan, el tostado de granos de café o la elaboración de las patatas fritas. Sin embargo, en otros alimentos, el desarrollo excesivo del pardeamiento no enzimático afecta negativamente a los atributos sensoriales, como ocurre en los tratamientos aplicados a la leche, zumos de fruta y bebidas en general (Ames, 2003).

En el pardeamiento no enzimático se distinguen principalmente tres reacciones:

- Degradación de ácido ascórbico: puede ocurrir en presencia o en ausencia de oxígeno, y conduce a la formación de intermediarios α -dicarbonílicos que dan lugar a la aparición de compuestos pardos. Este tipo de pardeamiento es frecuente en zumos de frutas y produce la pérdida de vitaminas esenciales y de sus características organolépticas (Smuda y Glomb, 2013).

- Caramelización de azúcares: ocurre cuando éstos son calentados por encima de su punto de fusión, dando lugar a la aparición de reacciones de enolización, deshidratación y fragmentación, que provocan la formación de derivados furánicos y de estructuras de alto peso molecular de color pardo. En la reacción de caramelización no intervienen proteínas, aminoácidos ni otros compuestos con grupos amino. Este tipo de reacciones requieren de energías de activación elevadas y el pH es un importante modulador de la reacción (Fadel y Farouk, 2002).
- Reacción de Maillard (RM): se produce mediante la condensación entre un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína y un grupo carbonilo procedente de azúcares reductores o de lípidos oxidados. Se ve favorecida en sistemas de contenido intermedio de humedad, temperaturas a partir de 50°C y pH entre 5-7. A diferencia de la caramelización, la reacción de Maillard puede continuar desarrollándose durante el almacenamiento del alimento. Los productos de la reacción de Maillard (PRM) tienen una gran relevancia en la industria alimentaria debido a que modifican las características organolépticas del alimento, contribuyen al color y al aroma, y aportan estabilidad oxidativa y microbiológica durante el procesado y el almacenamiento (Chawla y col., 2009; Habinshuti y col., 2019). Desde un punto de vista nutricional, la formación de los PRM puede condicionar la calidad del alimento, impactando en su valor nutritivo positiva o negativamente. Su desarrollo puede deteriorar la calidad proteica pero, al mismo tiempo, se ha demostrado la funcionalidad biológica de algunos productos finales de la reacción. Por otra parte, es importante considerar la vertiente toxicológica de la RM, ya que algunos PRM pueden ser potencialmente perjudiciales para la salud humana (O'Brien y Morrissey, 1989). Dada su importancia en esta memoria de tesis doctoral, se profundizará específicamente en la RM en los siguientes epígrafes.

Los PRM están ampliamente distribuidos en la dieta occidental debido al incremento en el consumo de alimentos procesados térmicamente. En las últimas décadas, distintos factores económicos y socioculturales, así como un estilo de vida nómada y urbanita han motivado un cambio en el patrón alimentario. La escasez de tiempo para comprar y cocinar, la creciente oferta de restaurantes de comida rápida, y la comodidad y menor precio de los productos precocinados, así como su buena

presentación y atractivas características, como el color, la textura o el sabor (Moliní Cabrera, 2007), hacen de este tipo de alimentos una alternativa muy tentadora frente a la elaboración tradicional de alimentos en el hogar, que requiere de mayor planificación, tiempo y experiencia culinaria. Este nuevo patrón alimentario conduce a un incremento del consumo de alimentos procesados, particularmente ricos en PRM, y por tanto el estudio de su ingesta y sus implicaciones sobre la salud son de creciente interés para la comunidad científica (Fardet y col., 2018).

1.2. Química de la reacción

La reacción de Maillard se describió por primera vez en 1908 como una reacción entre azúcares reductores y grupos aminos que se daba durante la formación de color en el proceso de elaboración de la cerveza (Ling, 1908). En 1912, el químico francés Louis Camille Maillard, de quien tomó su nombre esta reacción, describió la formación de compuestos coloreados durante el calentamiento de azúcares reductores y aminoácidos (Maillard, 1912). Pero no fue hasta 1953 cuando se propuso por primera vez un esquema coherente de las principales etapas de esta reacción, dividiéndolas en inicial, intermedia y final (Hodge, 1953). Posteriormente, en 1981, el Dr. Jean Mauron renombró estas etapas como temprana, avanzada y final, destacando las implicaciones nutricionales de la reacción (Mauron, 1981). Finalmente, en 1986 se incluyó una nueva vía de degradación de compuestos intermediarios por acción de radicales (Nursten, 1986). Las tres etapas de las que se compone esta reacción se describen en la **Figura 1**.

- Etapa temprana: la reacción comienza con la condensación del grupo carbonilo de un azúcar reductor (ej. glucosa, fructosa, lactosa o maltosa), de un compuesto carbonílico generado en la propia RM o de un producto de la oxidación lipídica, y un grupo amino libre procedente de un aminoácido, péptido o proteína (Friedman, 1996). El primer producto de condensación es una base de Schiff que, tras una rápida ciclación, se transforma en un compuesto inestable llamado glicosilamina-N-sustituida. Si el azúcar reactante es una aldosa, mediante la reorganización de Amadori, se formará la 1-amino-1-deoxi-2-cetosa (siendo este paso irreversible). En

cambio, si el azúcar reactante es una cetosa, se formará una 2-amino-2-deoxi-2-cetosa mediante la reorganización de Heyns (Ames, 1992).

- Etapa avanzada: esta etapa se caracteriza por requerir unas condiciones térmicas más intensas para desarrollarse y está muy influenciada por factores como el pH, la actividad de agua o la presencia de metales divalentes. Dependiendo de estos factores, los productos de Amadori y Heyns se van a descomponer formando compuestos intermedios responsables del aroma y sabor característico de los alimentos cocinados (Friedman, 1996; Henle, 2005):

- A pH neutro o ligeramente ácido y baja actividad de agua en el medio de reacción se favorece la enolización-1,2, dando lugar a compuestos como el furfural cuando el reactante inicial es una pentosa; o el hidroximetilfurfural, cuando el reactante inicial es una hexosa (Davidek y Davidek, 2004).

- A pH levemente básico e hidratación moderada se produce una enolización-2,3 que va a formar productos de fisión de bajo peso molecular, como reductonas, α -dicarbonilos y aldehídos. La alta reactividad del acetol, piruvaldehído, diacetilo, metilglioxal o glioxal es responsable de su participación en nuevas reacciones paralelas con otros productos intermedios (Nursten, 2005).

- Etapa final: como consecuencia del avance de la RM se producen numerosas reacciones incluyendo ciclaciones, reorganizaciones, deshidrataciones y condensaciones que darán lugar a la formación, por un lado, de compuestos aromáticos volátiles (mediante la degradación de Strecker) y, por otro, de compuestos pardos de alto peso molecular llamados melanoidinas (Fogliano y Morales, 2011; Wang y col., 2011; Murata, 2021).

Una característica particular de esta compleja reacción es que es concomitante, es decir, en un mismo alimento pueden coexistir las tres etapas de la reacción con diferente intensidad (Lertittikul y col., 2007; Pieczonka y col., 2021). La RM se diversifica por múltiples vías y los productos que se van originando en sus distintas etapas pueden volver a reaccionar con los reactantes iniciales, por lo que se va retroalimentando.

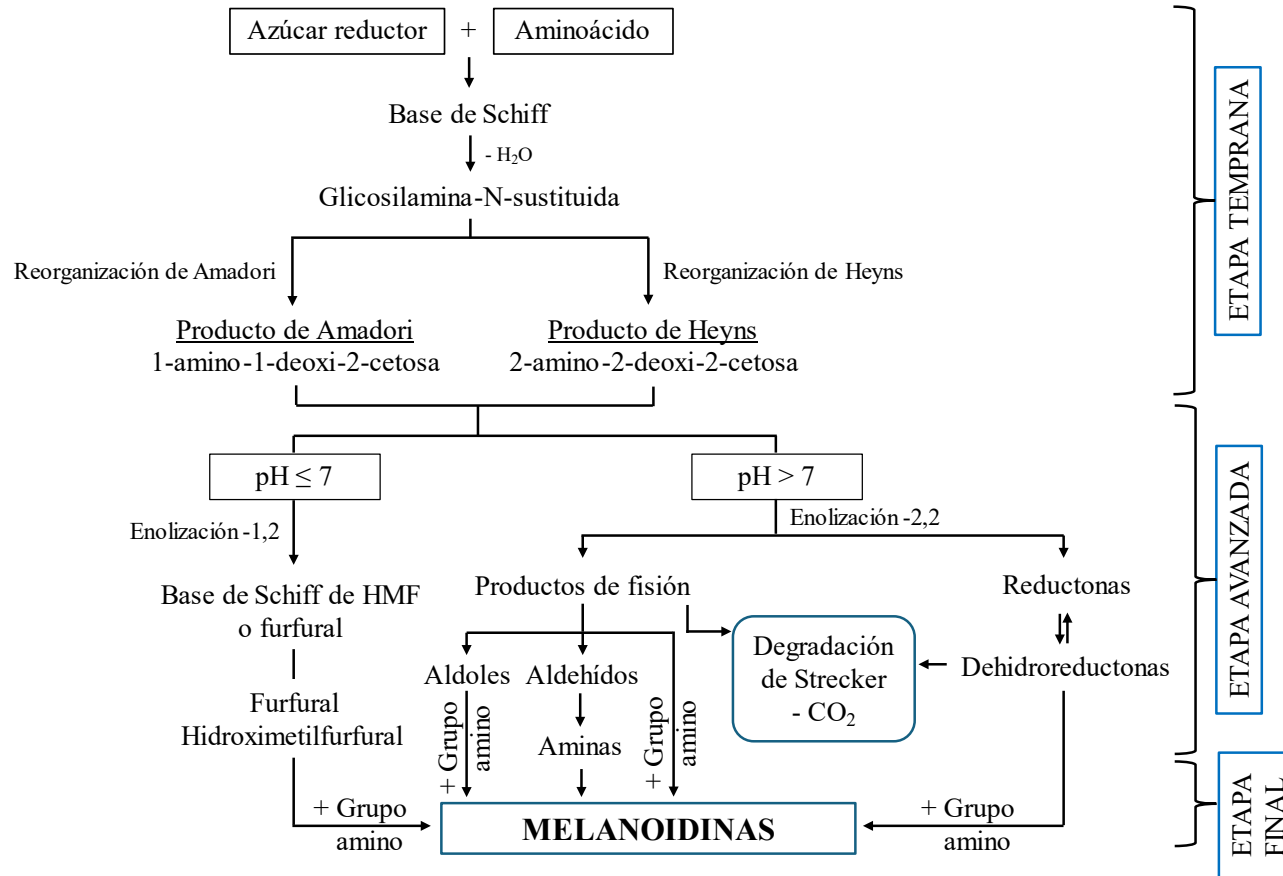


Figura 1. Esquema general de la Reacción de Maillard (Hodge, 1953; Mauron, 1981; Nursten, 1986).

1.3. Consecuencias de la reacción

Aunque el procesado térmico de los alimentos se ha considerado como una herramienta eficaz y segura para alcanzar las características organolépticas deseadas en condiciones de inocuidad microbiológica, puede dar lugar a nuevos compuestos con implicaciones toxicológicas (Friedman, 1996). Los contaminantes químicos del procesado térmico son sustancias potencialmente perjudiciales para la salud que se generan en los alimentos debido a la aplicación de altas temperaturas. Para evitar su formación, durante el procesado industrial se ha puesto el foco en el control de la materia prima, la manipulación, las condiciones del procesado y el almacenamiento de los alimentos. La tendencia actual en la industria es la optimización del procesado de los alimentos para conseguir la preservación de las cualidades sensoriales que los definen y por las que son valorados por los consumidores, pero a la vez, reducir a los máximos niveles técnicamente posible la formación de compuestos considerados nocivos para la salud. Además, está ampliamente descrito en la literatura que el avance incontrolado de la RM no sólo produce un pardeamiento indeseado, sino también aromas y sabores desagradables e incluso la reducción del valor nutricional y el acortamiento de la vida útil de determinados alimentos (Oliver y col., 2006; Lund y Ray, 2017; Kaspchak y col., 2022).

Aspectos tecnológicos y organolépticos

Como ya se ha mencionado, una de las principales consecuencias de la RM es la formación de compuestos responsables del aroma, sabor y color que inciden en las cualidades sensoriales de los alimentos, y que son muy importantes para la industria, ya que influyen en su palatabilidad y aceptación por parte del consumidor (Cerny, 2008). Los principales responsables de la generación del aroma y el color son los α -hidroxicarbonilos, los α -dicarbonilos, los α -aminocarbonilos y el 1-aminoácido-2-carbonilo (Yaylayan, 2003). Los compuestos de Amadori, originados en las etapas tempranas de la reacción, aun siendo incoloros, se consideran en buena medida responsables del color, ya que son los precursores de las melanoidinas, polímeros pardo-negruzcos de alto peso molecular que aparecen en las fases finales de la

reacción (Wang y col., 2011). Otros compuestos que también toman parte en el desarrollo del color son los α -dicarbonilos y el 1-aminoácido-2-carbonilo, así como, la acetilformoína, cuya activación dependerá de la presencia en exceso de aminoácidos primarios o secundarios (Hofmann, 1998).

Durante la RM se generan compuestos volátiles responsables del aroma típico de los alimentos cocinados como consecuencia de la formación de compuestos aromáticos heterocíclicos como las pirazinas, pirroles y oxazoles, a partir de los α -aminocarbonilos (Yaylayan y col., 2005a); así como de la formación de furfurales y reductonas, derivados de la degradación de aminoácidos a través de la denominada degradación de Strecker. Esta reacción está catalizada por compuestos dicarbonilos intermediarios de la RM o procedentes de la degradación de azúcares. Dependiendo de los aminoácidos implicados, los aromas y sabores generados pueden ser más o menos agradables o incluso identificativos del alimento procesado. Por ejemplo, la participación de la cisteína genera el sabor asociado a la carne a la parrilla, mientras que la participación de la prolina en la RM produce el flavor típico del pan, el arroz o las palomitas (Van Boekel, 2006). Además de estos cambios en el aroma y sabor de los alimentos, diversos estudios han relacionado estas modificaciones químicas causadas por el pardeamiento con la mejora de la textura en los productos de panadería (Gerrard y col., 2003) o las propiedades del tofu (Kaye y col., 2001).

En resumen, la RM ha sido tradicionalmente una gran aliada en la industria alimentaria, ya que su comprensión y manipulación ha conducido a la obtención de: i) productos alimenticios con mayor vida útil; ii) productos finales tecnológicamente mejorados debido a la optimización de la textura; iii) alimentos más atractivos para el consumidor, gracias a la posibilidad de producir una amplia gama de aromas y sabores en el alimento.

Aspectos nutricionales

A nivel nutricional, la principal consecuencia de la RM es la reducción de la calidad proteica del alimento debido, principalmente, a la disminución de la disponibilidad de determinados aminoácidos. La lisina es un aminoácido esencial para los humanos que suele estar protonado a pH neutro y, por tanto, facilita el inicio de la RM. La

lisina es el aminoácido más sensible al desarrollo de la RM debido a la participación de su grupo ϵ -amino en la formación del producto de Amadori o de Heyns (Malec y col., 2002). Tras esta reacción, la biodisponibilidad del aminoácido puede llegar a reducirse hasta en un 50% (Rérat y col., 2002). Otros aminoácidos esenciales como la arginina, histidina, triptófano y, en menor medida, los aminoácidos azufrados, pueden participar también en la RM (O'Brien y Morrissey, 1989; Somoza, 2005), lo que supondría, igualmente, una reducción de su digestibilidad proteica (Nursten, 2005; Delgado-Andrade y col., 2007a). Además, se ha observado que el pH ácido estomacal y la acción de la microbiota intestinal pueden revertir, en cierta medida, el producto de Amadori originado desde aminoácidos libres, volviendo a hacer disponible el aminoácido bloqueado. Sin embargo, este proceso es prácticamente inviable cuando el aminoácido forma parte de una proteína. Además, los productos de bajo peso molecular originados pueden incluso acrecentar esa reducción de digestibilidad a través de la inhibición de proteasas. Tal es el caso de los PRM capaces de inhibir a la tripsina y a la aminopeptidasa N (Öste y col., 1986; Malec y col., 2002; Ibarz y col., 2009), o como ocurre con el hidroximetilfurfural (HMF), que inhibiría la acción de la carboxipeptidasa A (Öste y col., 1987; Seiquer y col., 2006). El descenso de la digestibilidad proteica de la dieta puede ser especialmente crítico en algunas etapas de la vida, como es el caso de la adolescencia. Los adolescentes están nutricionalmente en riesgo debido a las altas necesidades fisiológicas del crecimiento y a unos hábitos dietéticos que conducen a un elevado consumo de PRM como resultado de una alta ingesta de snacks y comida rápida. Un estudio de Seiquer y col. (2006) estableció que el consumo de una dieta rica en PRM incrementaba un 47% la eliminación fecal de nitrógeno, conduciendo a un descenso del 12% en su absorción y del 6% en su digestibilidad.

Además de una reducción en la disponibilidad de aminoácidos, el consumo de PRM también se asocia a un descenso de la biodisponibilidad de algunos minerales, aspecto de nuevo especialmente relevante en la dieta del colectivo adolescente. Estudios de Mesías y colaboradores demostraron que la presencia de PRM en la dieta consumida por un grupo de adolescentes varones afectó negativamente a la biodisponibilidad del hierro, del cobre, del fósforo y del zinc, disminuyéndose de

forma significativa en el caso del hierro y del cobre (Delgado-Andrade y col., 2011; Mesías García y col., 2009; 2012). Dado que estos minerales son oligoelementos esenciales implicados en el crecimiento y desarrollo de los adolescentes, la ingesta excesiva de PRM durante esta etapa de la vida podría conducir a posibles deficiencias o trastornos en la edad adulta.

En cuanto a los productos finales de la RM, las melanoidinas son moléculas polianiónicas cuya capacidad quelante les permite formar complejos solubles e insolubles con determinados minerales como el zinc, cobre, hierro, calcio, magnesio, fósforo y sodio, obstaculizando su absorción, metabolismo y excreción y, por tanto, su biodisponibilidad (Delgado-Andrade y col., 2004; 2008; Mesías y col., 2009b). Esto ha sido demostrado en estudios con animales de experimentación, observándose que los PRM modificaban la excreción urinaria del zinc (Navarro y col., 2000) y de otros elementos como el cobre, hierro, magnesio y calcio (Hurrell, 1990; Delgado-Andrade y col., 2007b). Sin embargo, en los últimos años se han evidenciado también propiedades beneficiosas de ciertas melanoidinas, en las que se ha identificado un gran potencial antioxidante gracias a su capacidad antirradicalaria y quelante de iones metálicos, lo cual les permite retrasar los procesos oxidativos en diversos alimentos de base cereal, como las galletas, y productos cárnicos procesados, como el paté o las hamburguesas (Morales y col., 2012).

Aspectos toxicológicos y perjudiciales para la salud

Los contaminantes químicos formados durante el procesado de los alimentos pueden ser potencialmente nocivos para la salud humana. Como muestra la **Figura 2**, entre ellos podemos encontrar los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cloropropanoles, las aminas aromáticas heterocíclicas y el furano, así como el hidroximetilfurfural y la acrilamida. Estas moléculas han sido relacionadas con procesos inflamatorios, disfunción renal, daños vasculares, aumento del estrés oxidativo y complicaciones diabéticas, entre otros efectos (Zhong y col., 2019a).

Además, algunos compuestos intermedios de la RM como los α -dicarbonilos, entre los que encontramos el glioxal, el metilglioxal y el diacetilo (**Figura 3**), pueden inducir citotoxicidad celular e inhibir ciertas enzimas reparadoras del Ácido

Desoxirribonucleico (ADN) humano (Cha y col., 2019; Yan y col., 2023a), así como causar irritación ocular y respiratoria por inhalación o producir congestión gastrointestinal, pulmonar y renal por ingestión oral.

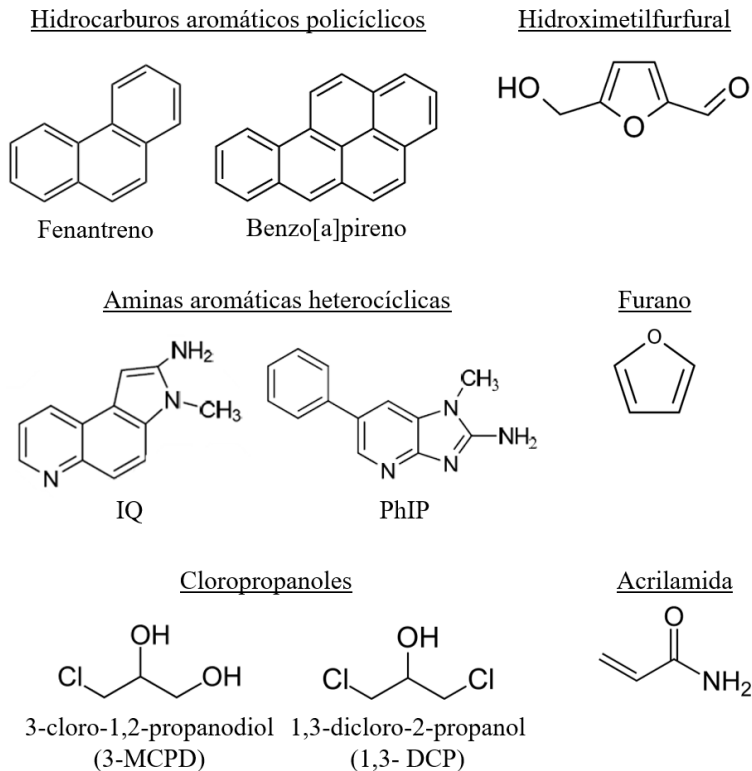


Figura 2. Ejemplos de contaminantes químicos de procesado.

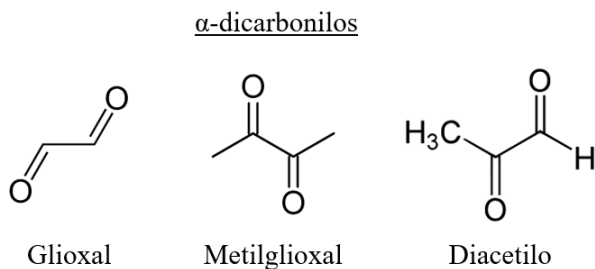


Figura 3. Estructuras químicas del glioxal, metilglioxal y diacetilo.

En la etapa avanzada de la reacción, se forman los denominados productos de glicación avanzada (AGEs), entre los que se encuentran la carboximetil-lisina (CML)

y la pentosidina (Delgado-Andrade, 2016). Estos compuestos pueden formarse *in vivo* a través de otras vías como la peroxidación lipídica, la oxidación del ascorbato o la autooxidación de la glucosa, tal y como se muestra en la **Figura 4**.

Tras su ingestión oral, los AGEs de la dieta se suman a los que se producen a nivel biológico, originando un pool con capacidad para interactuar con muchos tejidos y órganos. La seguridad y el riesgo para la salud de los AGEs en la dieta han atraído una gran atención en los últimos años, ya que su estudio ha puesto de manifiesto la asociación entre la ingesta dietética de AGEs y las complicaciones asociadas al desarrollo de muchas enfermedades crónicas y/o metabólicas, como la diabetes, la enfermedad renal crónica, la osteoporosis y la enfermedad de Alzheimer (Tian y col., 2023), aunque la comunidad científica mantiene aún algunas discrepancias al respecto. Algunas investigaciones recientes apuntan a que estos compuestos avanzados de la RM, como la CML que está presente en los productos lácteos, podrían asociarse a la aparición de determinados tipos de cáncer (Omofuma y col., 2020; Wada y col., 2022).

Entre los compuestos potencialmente nocivos para la salud, mencionados anteriormente, se han descrito efectos carcinogénicos en los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzopireno (en alimentos asados a la parrilla) (IARC, 2010), las aminas aromáticas heterocíclicas (en carnes y pescados) (Felton y col., 2000; Gooderham y col., 2001; Reglamento (UE) 835/2011), el furano y metil-derivados (en el café tostado y los potitos vegetales) (EFSA, 2010a; Kettlitz y col., 2019) o la acrilamida (en patatas fritas y productos de base cereal, entre otros) (EFSA, 2015). La presencia de algunos de estos compuestos en los alimentos está regulada a nivel europeo, estableciéndose contenidos máximos, como en el caso de los 3-MCPD (3-monocloropropano-1,2-diol) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Reglamento (UE) 1881/2006, Reglamento (UE) 2018/290), y niveles de referencia, situación actual de la acrilamida (Reglamento (UE) 2017/2158), o llevando a cabo estudios de evaluación con el objetivo de definir acciones regulatorias más adelante, como en el caso del furano y alquilfuranos (Recomendación (UE) 2022/495).

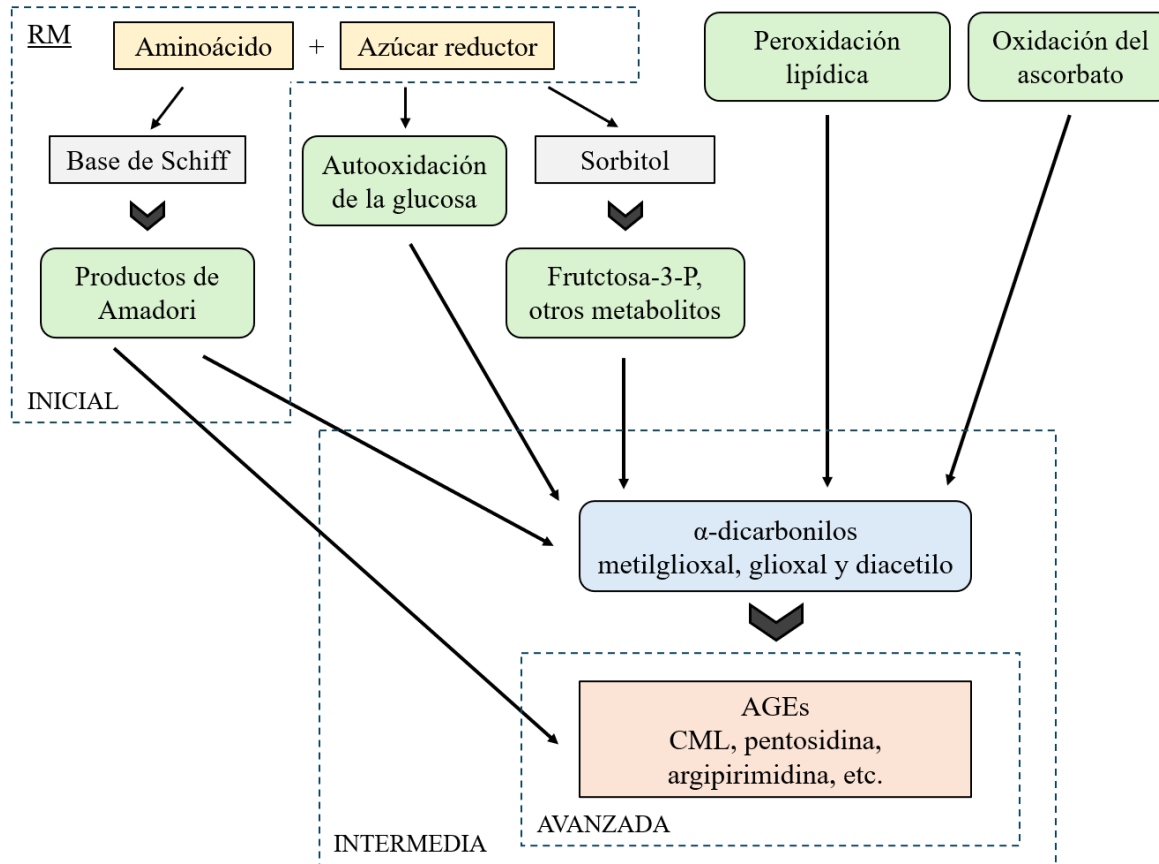


Figura 4. Esquema de las vías de formación de AGEs (Luevano-Contreras y Chapman-Novakofski, 2010).

Aspectos beneficiosos para la salud

Hay que tener en cuenta que los PRM son tan variados y numerosos, como lo son igualmente las acciones que pueden desencadenar *in vivo*. Por ello, a pesar de su vertiente toxicológica, muchos de ellos también han demostrado tener actividades beneficiosas para la salud humana, como la actividad antimicrobiana (bacteriostática y bactericida dependiendo de la concentración, el pH y la temperatura) de ciertas melanoidinas (Rufián-Henares y de la Cueva, 2009; Kukuminato y col., 2021). Algunos autores han demostrado que determinados PRM podrían ejercer incluso actividades antimutagénicas (Wagner y col., 2007; Nooshkam y col., 2020), anticancerígenas (Liu y col., 2020) y antihipertensivas (Patrignani y col., 2016).

1.4. Inhibición de la reacción

El desarrollo de la RM está condicionado por diferentes factores tales como la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico, el pH, la humedad, la actividad de agua o el tipo y la cantidad del azúcar reductor o de la proteína. La reacción se favorece a temperaturas elevadas (a partir de los 140 °C) (Hillman y col., 2019), un máximo del 30% de humedad con una actividad de agua de 0,4-0,8 (Lund y Ray, 2017) y pH ligeramente alcalino; alcanzando una menor velocidad de reacción a pH 3, que va aumentando hasta un máximo a pH 8, siendo el rango óptimo de pH 6-8 (Martins y col., 2000). En cuanto al tipo de azúcar, se ha observado que los monosacáridos originan una reacción más intensa y rápida que los disacáridos, y éstos a su vez mayor que los trisacáridos (Cardoso y col., 2018). Además, aunque todos los aminoácidos presentes en el alimento son susceptibles de participar en la RM, la lisina y la arginina son los más reactivos frente a los azúcares, seguidos de la histidina y el triptófano (Kwak y Lim, 2004; Hemmler y col., 2018; Teodorowicz y col., 2018). Estos factores también se emplean para controlar el avance de la RM. Asimismo, la reacción puede verse modificada en presencia de: i) iones metálicos como el sodio, el calcio, el magnesio o el potasio, y especialmente los polivalentes como el cobre y el hierro (Mesías y col., 2015), o ii) bloqueantes de grupos amino como las quinonas, que son derivados oxidados de compuestos aromáticos como los fenoles que pueden reaccionar a través de la adición de Michael con dichos grupos amino, formando

aductos proteína-quinona (Yin y col., 2014), y con grupos tioles de aminoácidos, péptidos y proteínas para formar aductos quinona-tiol (Li y col., 2016).

Frente a los métodos tradicionales de procesado, la industria ha ido incorporando tecnologías alternativas más innovadoras que han mostrado utilidad en el control del desarrollo de la RM. Entre ellas podemos mencionar el calentamiento óhmico, basado en utilizar la propia conductividad eléctrica de los alimentos para generar calor (Valderrama Gutierrez, 2018; Hradecky y col., 2017); procesamiento por alta presión hidrostática en combinación con alta/baja temperatura (90 a 121 °C y 600 MPa) (Martínez-Monteagudo y Saldaña, 2014); tecnologías de baja presión y vacío en procesos de horneado (Yildiz y col., 2017) y fritura (Belkova y col., 2018); procesado mediante campos eléctricos pulsados, que aplica pulsos eléctricos cortos de alto voltaje (20-80 Kv/cm) a través de una cámara de tratamiento estática o continua, conduciendo a la desintegración de la membrana celular (Cerón-Carrillo, 2010); o microencapsulación de iones metálicos, que consiste en el envasado de compuestos clave en cápsulas selladas, limitando así el contacto entre reactivos en la matriz alimentaria durante el calentamiento convencional (Fiore y col., 2012).

Por otro lado, es importante mencionar el papel de las estrategias bioquímicas en la inhibición de la RM, que pueden actuar sobre los precursores o sobre los compuestos intermedios de la reacción. Entre ellas encontramos la adición de enzimas como la fructosamina oxidasa (Dario y col., 2016), la fructosamina quinasa (Deppe y col., 2011) o la carbohidrato oxidasa (Al-Attabi y col., 2014), que evitan la propagación de la RM; o la adición de compuestos como la aminoguanidina (Thornalley, 2003), la epicatequina (Totlani y Peterson, 2007) o la piridoxamina (Wong y col., 2012), capaces de reaccionar con productos intermedios de la RM reduciendo o inhibiendo su avance. El gran inconveniente que presenta la adición de estos compuestos a los alimentos es la posible alteración de sus cualidades organolépticas, produciendo un sabor o aroma desagradable que conducen al rechazo por parte de consumidor (Lund y Ray, 2017).

2. Acrilamida

2.1. Generalidades e historia

La acrilamida (CAS 79-06-01; EC 201-173-7), también denominada 2-propenamida o vinilamida, es un compuesto orgánico de tipo amida α , β -insaturada muy electrofílico (**Figura 5**). La molécula de acrilamida (C_3H_5NO) es considerada como un monómero bifuncional ya que está constituida por un resto amida y un grupo vinilo que le confiere una alta solubilidad y reactividad química (Saboktakin, 2012), pudiendo participar en reacciones de adición de Michael con compuestos nucleófilos (por ejemplo, aminoácidos con grupos -SH y -NH₂) (Zamora y col., 2010).

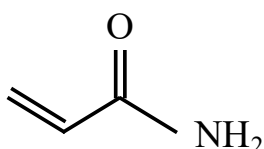


Figura 5. Fórmula química de la acrilamida.

La acrilamida tiene la apariencia de un polvo blanco, cristalino e inodoro que sufre polimerización espontánea a temperaturas superiores a su punto de fusión (84,5 °C) (Friedman, 2003). Tiene una masa molar de 71,08 g/mol, una densidad de 1,127 g/cm³ y un punto de ebullición de 192,6 °C a presión atmosférica (Saboktakin, 2012). La acrilamida es altamente soluble en agua, además de en etanol y cloroformo, entre otros solventes (**Tabla 1**).

Tabla 1. Solubilidad de la acrilamida en diferentes solventes (Eriksson, 2005).

Solvente	Solubilidad (g/100 mL) a 30 °C
Agua	215,5
Metanol	155
Etanol	86,2
Acetona	63,1
Acetonitrilo	39,6
Cloroformo	2,66
Benceno	0,35

Este compuesto ha sido ampliamente utilizado en muy diversos sectores industriales desde mediados del siglo XX. La vía tradicional de producción de la acrilamida en la industria química es mediante la hidratación química del acrilonitrilo utilizando ácido sulfúrico o una sal de cobre como catalizador. La mayor parte de la producción y empleo de acrilamida se concentra en China continental, Estados Unidos y Europa Occidental, siendo el primer responsable de más de la mitad de la capacidad de producción global (S&P Global Commodity Insights, 2021). La producción anual de acrilamida en la Unión Europea se estima entre 80.000 y 100.000 toneladas (Saboktakin, 2012). El principal uso industrial y el más conocido del monómero de acrilamida es en la fabricación de diferentes tipos de homo- y copolímeros, especialmente la poliacrilamida, debido a su capacidad polimerizante. Además, la acrilamida se emplea como dispersante y floculante en el tratamiento de aguas, siendo el contenido máximo residual del monómero libre en aguas destinadas al consumo humano de 0,1 µg/L (Directiva (UE) 2020/2184). Por otro lado, las poliacrilamidas de alto peso molecular se pueden modificar químicamente actuando como espesantes, mejorando la resistencia al desgarro de los distintos derivados de la industria papelera. Entre otros usos, la acrilamida se utiliza también como copolímero en la industria del petróleo crudo (como aditivo del cemento en los pozos de perforación), en la construcción (como aditivo para aglutinantes hidráulicos), en la minería (para clarificar el agua de circulación) y en la industria textil (para la síntesis de colorantes y fibras textiles) (IARC, 1986). Igualmente, la acrilamida es ampliamente utilizada en laboratorios de investigación bioquímica para la producción de geles de poliacrilamida destinados a electroforesis y geles de cromatografía para técnicas moleculares (LoPachin, 2004).

En 1997, se utilizó acrilamida como un aditivo cementante en los trabajos de impermeabilización durante la construcción de un túnel bajo un lago en Suecia. Accidentalmente, se produjo una fuga masiva del material de impermeabilización que contenía el monómero de acrilamida y posteriormente se filtró al agua circundante, contaminando arroyos cercanos y aguas subterráneas. La primera consecuencia apreciable fue la muerte de peces y episodios de parálisis nerviosa en los animales, incluso en mamíferos de gran tamaño que acudían al lago a beber. Además, se

evidenciaron síntomas de neurotoxicidad en los obreros que participaban en la construcción del túnel, así como un aumento de la incidencia de cáncer de páncreas (Marsh y col., 1999, Swaen y col., 2006).

Desde el accidente en el túnel que originó la penetración del compuesto en la capa freática, el sistema sueco de salud realizó un programa de control del riesgo químico de la zona, que incluía un seguimiento exhaustivo de los trabajadores, la población y animales del entorno. Tanto en estos trabajadores como en los animales de las zonas limítrofes se observó un aumento significativo en los niveles de aductos acrilamida-hemoglobina en plasma (Reynolds, 2002). Sin embargo, el hallazgo más sorprendente fue la detección de cantidades inesperadas de estos aductos en individuos cuyos hogares se encontraban fuera de la zona contaminada, siendo incluso los niveles de los aductos superiores a los encontrados en los animales directamente expuestos en el entorno del lago. A partir de este hallazgo se consideró la posibilidad de que hubiese otras fuentes de exposición a acrilamida a las conocidas hasta el momento, que eran la exposición accidental por manipulación inadecuada del producto y el humo del tabaco. Se consideró entonces que podría encontrarse en los alimentos. No fue hasta el 24 de abril de 2002, cuando investigadores de la Universidad de Estocolmo, junto con la Administración Nacional de Alimentos de Suecia (SNFA), anunciaron que la acrilamida se encontraba presente en una gran variedad de alimentos cocinados a temperaturas elevadas (Tareke y col., 2002). Las concentraciones encontradas en los alimentos excedían los límites máximos permitidos por las legislaciones tanto para el agua de bebida (0,1 µg/l), establecido en la Directiva 98/83/EC del Consejo Europeo (Directiva 98/83/CE) y en el Real Decreto 1047/2002 (Real Decreto 1047/2002), como para la migración química a partir de envases plásticos (60 mg/kg alimento), según la legislación europea (Reglamento (UE) 10/2011). Desde entonces, las autoridades gubernamentales con competencias en materia de seguridad alimentaria, la industria agroalimentaria y la comunidad científica han aunado fuerzas para tratar de identificar aquellas categorías de alimentos que suponen una mayor preocupación por sus altos niveles de acrilamida y ampliar así los conocimientos en cuanto a patrones dietéticos y de exposición al

contaminante con el fin de reducir el riesgo para la salud asociado a su exposición (WHO, 2002).

2.2. Química de formación

A continuación, se exponen las posibles vías de formación de acrilamida en los alimentos, los precursores más importantes y los productos intermedios de la reacción.

Reacción de Maillard

El principal mecanismo de formación de acrilamida y el mayoritariamente aceptado por la comunidad científica es a través de la RM. La reacción se inicia con la condensación entre un grupo carbonilo de un azúcar reductor (ej. glucosa o fructosa) con el aminoácido libre asparagina (Mottram y col., 2002; Stadler y col., 2002; Zyzak y col., 2003), para dar lugar al conjugado N-glicosilasparagina (Jin y col., 2013), que, tras deshidratación, formará la base de Schiff correspondiente (**Figura 6**). La base de Schiff puede sufrir una reorganización para dar lugar al compuesto de Amadori y éste avanzar hacia las diferentes etapas de la RM clásica, que incluye también la generación de productos asociados con el color y el aroma. La base de Schiff puede además descarboxilarse hacia el iluro de azometina o base de Schiff descarboxilada (Yaylayan y col., 2003). En este punto, la acrilamida se puede formar por diversas rutas:

- a) Directamente a partir del iluro de azometina por β -eliminación (Lineback y col., 2012).
- b) Por desaminación del intermediario 3-aminopropionamida (3-APA) (Granvogl y col., 2004).
- c) A través de la reacción de Strecker donde pueden participar compuestos de oxidación lipídica como los hidroxialquenos y epoxialquenos, así como los α -dicarbonilos anteriormente mencionados (ej. metilglioxal, glioxal, diacetilo, etc) (Zamora e Hidalgo, 2008; Hidalgo y col., 2009; Zamora y col., 2011).

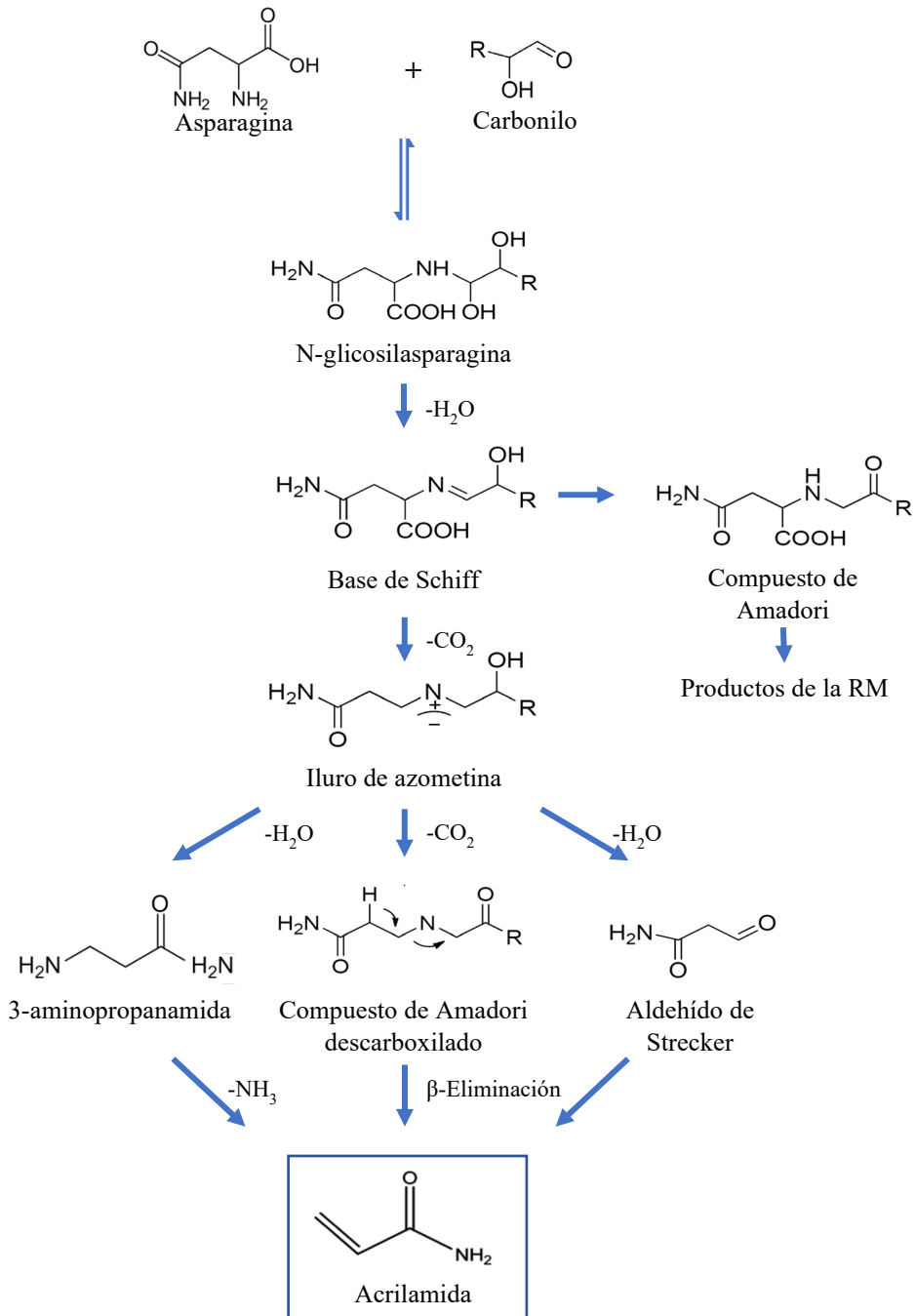


Figura 6. Formación de acrilamida a través de la reacción de Maillard (Jin y col., 2013).

Otras vías minoritarias

Además de la RM, se han identificado otras vías minoritarias de formación de acrilamida (**Figura 7**).

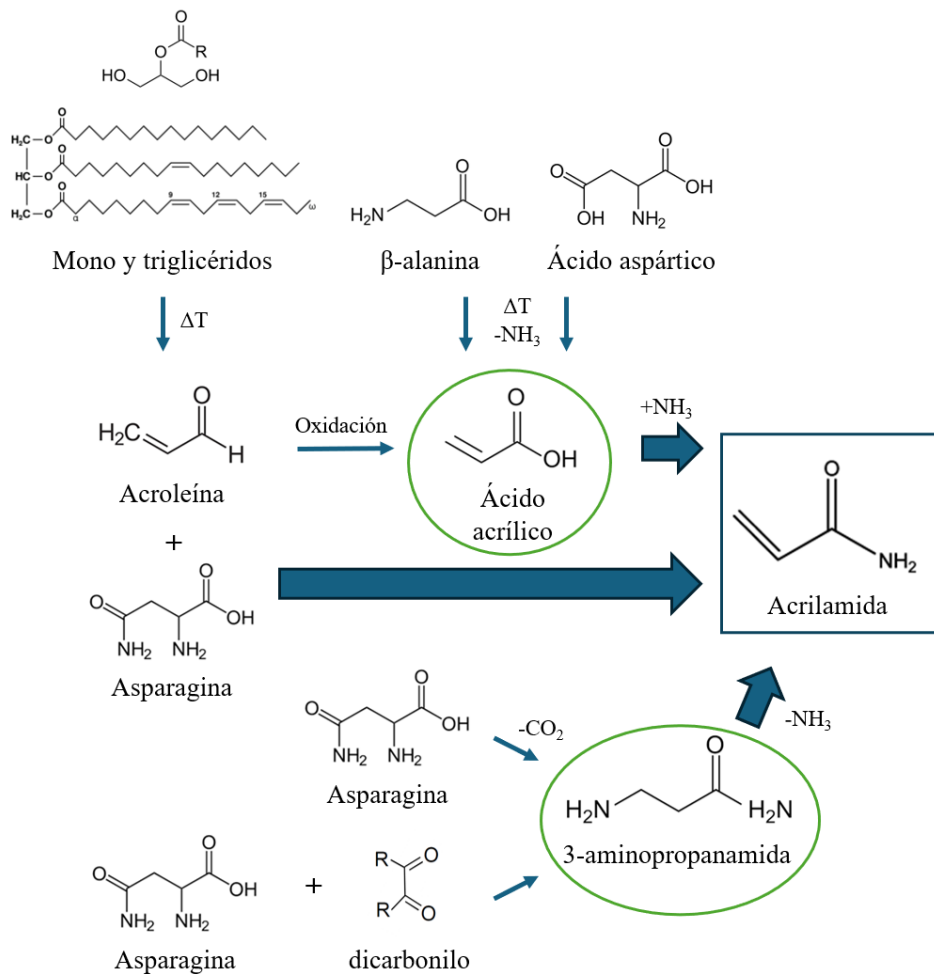


Figura 7. Otras vías minoritarias de formación de acrilamida.

- **Formación a partir de la acroleína:** La acroleína, o 2-propenal, es un aldehído que se puede formar por diferentes rutas como la degradación de lípidos, carbohidratos, aminoácidos y proteínas, y también a través de la reacción de Maillard (Stadler y Studer, 2016). Este compuesto tiene un punto de ebullición relativamente bajo (51 °C) y se volatiliza rápidamente cuando se somete a temperaturas altas, como

las alcanzadas durante la fritura. Cuando la acroleína se oxida a ácido acrílico es capaz de reaccionar con el amoníaco a través de una reacción de amino-dehidroxilación, formando así la acrilamida.

Esta vía de formación es minoritaria en la mayoría de las matrices alimentarias, ya que la acroleína suele reaccionar rápidamente con otros compuestos. Hay que tener en cuenta que la vía del ácido acrílico requiere un paso adicional de conversión del grupo ácido de la amida correspondiente para poder obtener el amoníaco disponible, siendo este paso el limitante de la velocidad de la reacción debido a la alta volatilidad de este compuesto (Stadler y col., 2003). La acroleína, además, puede reaccionar con la asparagina produciendo acrilamida (Maan y col., 2020) (**Figura 7**). La molécula de acroleína puede originarse a través de la oxidación de lípidos, ya sea por degradación del glicerol que forma parte de los triglicéridos o por la oxidación de ácidos grasos hacia compuestos carbonilo diinsaturados (como el 2,4-decadienal) (Katragadda y col., 2010; Das y Srivastav, 2012; Jibril y col., 2022). En el caso de los aceites vegetales utilizados en la fritura de los alimentos, la formación de acrilamida se produce al aumentar el grado de insaturación (Lingnert y col., 2002).

- **Formación a partir de determinados aminoácidos.** La acrilamida también puede generarse a partir de aminoácidos diferentes a la asparagina, como es el caso de la cisteína, serina y aspártico. En el caso del aspártico tiene lugar a partir la formación de β -alanina, que puede liberar ácido acrílico a través de una deaminación termolítica, e incluso su presencia en proteínas o péptidos podría liberar acrilamida (Claus y col., 2006a). La serina o la cisteína pueden convertirse térmicamente en ácido láctico a través del ácido pirúvico y, en presencia de amoníaco, generarán lactamida y acrilamida (Yaylayan y col., 2005b). Diversos estudios han propuesto la formación de acrilamida a partir de la descomposición térmica de la asparagina, por descarboxilación y desaminación en ausencia de grupos carbonilo (Zyzak y col., 2003), que, aunque es un proceso limitado por la intensidad térmica requerida, la velocidad de reacción se ve favorecida por la presencia de carbonilos (Yaylayan y col., 2003). Por otra parte, el 3-APA se puede generar directamente en la materia prima del alimento sin procesar (ej. tubérculo de patata) a partir de la descarboxilación enzimática de la asparagina por acción de la histidina

descarboxilasa y, posteriormente, se transformaría en acrilamida con el tratamiento térmico (Granvogl y col., 2004).

Factores implicados en la formación de acrilamida en los alimentos

En la actualidad, se dispone de gran cantidad de información acerca de los factores que afectan a la formación de acrilamida en los alimentos. Entre ellos destacan la temperatura y el tiempo de calentamiento, el pH, la humedad y la concentración y reactividad de los precursores (Halford y col., 2012a; Pedreschi y col., 2014).

Generalmente, la formación de acrilamida se incrementa con el aumento del tiempo de calentamiento y de la temperatura del tratamiento, aunque depende en gran medida de la composición fisicoquímica de la matriz alimentaria. Por lo general, la formación de acrilamida incrementa moderadamente a partir de los 120 °C, pero significativamente a partir de 175 hasta los 190 °C. A altas temperaturas, la formación neta disminuye al aumentar la tasa de eliminación, aunque depende del tipo de alimento y proceso térmico aplicado (Kita y Lisińska, 2005; Jackson y Al-Taher, 2005). La mayor tasa de formación de acrilamida se ha observado entre los 180 y los 200 °C (Knol y col., 2005), en paralelo a un descenso de la concentración de azúcares precursores en el alimento. A partir de 200 °C la molécula de acrilamida comienza a degradarse, tanto más cuanto mayor es el tiempo de tratamiento térmico. Esta degradación probablemente ocurre debido a su alta reactividad, que propicia su participación en reacciones de adición de Michael con otros componentes de la matriz alimentaria, así como por la volatilización del compuesto (Stadler y col., 2004; Wedzicha y col., 2005).

Dado que el pH óptimo para la formación de acrilamida es alrededor de 8, diversos estudios han demostrado que la reducción del pH no sólo disminuye la formación del compuesto debido a la protonación del grupo amino de la asparagina, que limita su reactividad con los azúcares, sino que además aumenta su degradación (Rydberg y col., 2003; Pedreschi y col., 2014).

En cuanto a la influencia de la humedad del alimento, la formación de acrilamida está favorecida en condiciones de baja actividad de agua (mínimo 0,4) y humedad. El aumento en el contenido de agua libre favorece la movilidad y disminuye la

viscosidad del sistema y, por tanto, los reactantes estarán más dispersos y se dificulta su interacción (De Vleeschouwer y col., 2008).

Por otro lado, el contenido en precursores (azúcares y asparagina) va a condicionar la formación de acrilamida, siendo la glucosa y la fructosa los principales azúcares que van a intervenir en la reacción (Bråthen y col., 2005; Claeys y col., 2005).

2.3. Absorción y metabolismo

El bajo peso molecular de la acrilamida, junto con su alta solubilidad en medios acuosos, hace presuponer que la molécula es capaz de atravesar fácilmente las membranas biológicas y distribuirse por los distintos tejidos del organismo, como ha sido constatado en estudios toxicocinéticos en animales de experimentación con la sustancia pura (IARC, 1994). Sin embargo, para poder evaluar correctamente el riesgo asociado a su exposición, es necesario conocer en detalle el comportamiento y la estabilidad de la acrilamida en el organismo una vez es ingerida en el entorno complejo de un alimento.

Absorción y distribución

La acrilamida puede ser absorbida por las vías respiratorias, dérmica, digestiva e intraperitoneal (Sumner y col., 2003), destacando la vía digestiva. Tras la digestión gastrointestinal, la porción de acrilamida bioaccesible se absorbe rápidamente gracias a su polaridad, solubilidad en agua y bajo peso molecular (Von Mühlendahl y Otto, 2003; Shipp y col., 2006) y se distribuye por los tejidos y órganos donde se metaboliza. En estudios en roedores se ha observado que la acrilamida en solución administrada por vía oral se absorbe por completo a nivel estomacal en 3 horas (Marlowe y col., 1986), y que puede alcanzar una biodisponibilidad del 23-48% tras una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal (pc)/día administrada durante un periodo de 30 minutos (WHO, 2011). Además, se ha observado que el 10-50% de la acrilamida ingerida a través de los alimentos puede pasar al feto a través de la barrera placentaria (Moreno Navarro y col., 2007), hallándose incluso en la leche materna (Sörgel y col., 2002).

Metabolismo

Estudios con animales de experimentación, han demostrado que, una vez absorbida, la acrilamida en la sangre tiene una vida media de 2 horas (Doerge y col., 2005). Aunque los datos farmacocinéticos en humanos son escasos, en un estudio realizado en 11 sujetos sanos de ambos sexos expuestos a acrilamida a través de la dieta se pudo calcular una vida media en sangre de entre 2 y 7 horas (Sörgel y col., 2002). La acrilamida posee dos vías principales de metabolización: por un lado, se produce la conjugación con el glutatión (Luo y col., 2021), catalizada por la enzima hepática glutatión-S-transferasa (GST), y posteriormente es convertida a ácidos mercaptúricos que son excretados vía renal (Ehlers y col., 2013); por otro, puede ser transformada a glicidamida a través de una epoxidación catalizada por la enzima citocromo-P₄₅₀-2E1-monooxigenasa (CYP2E1), que implica la oxigenación del doble enlace de la acrilamida (Friedman, 2003; Olsen y col., 2012) (**Figura 8**).

La participación del CYP2E1 en la conversión de la acrilamida a glicidamida ha sido demostrada en estudios *in vivo* realizados en humanos (Doroshenko y col., 2009). Dado que la acrilamida y la glicidamida son muy hidrofílicas y electrófilas, cuando pasan a la sangre, son capaces de reaccionar con los residuos N-terminal del aminoácido valina y el grupo tiol de la cisteína de la hemoglobina a través de reacciones de adición tipo Michael (Törnqvist y col., 2008), formándose los aductos acrilamida-hemoglobina y glicidamida-hemoglobina. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda utilizar estos aductos como biomarcadores de la exposición a acrilamida, siendo representativos de la exposición durante los últimos cuatro meses de ingesta (EFSA, 2015), ya que ésta es la vida media de los eritrocitos (Capuano y Fogliano, 2011). Asimismo, la acrilamida y la glicidamida pueden unirse también a la albúmina sérica, al ADN y a grupos sulfhidrilo, inactivando las enzimas encargadas de su reparación (Doerge y col., 2005; Exon, 2006; Shipp y col., 2006).

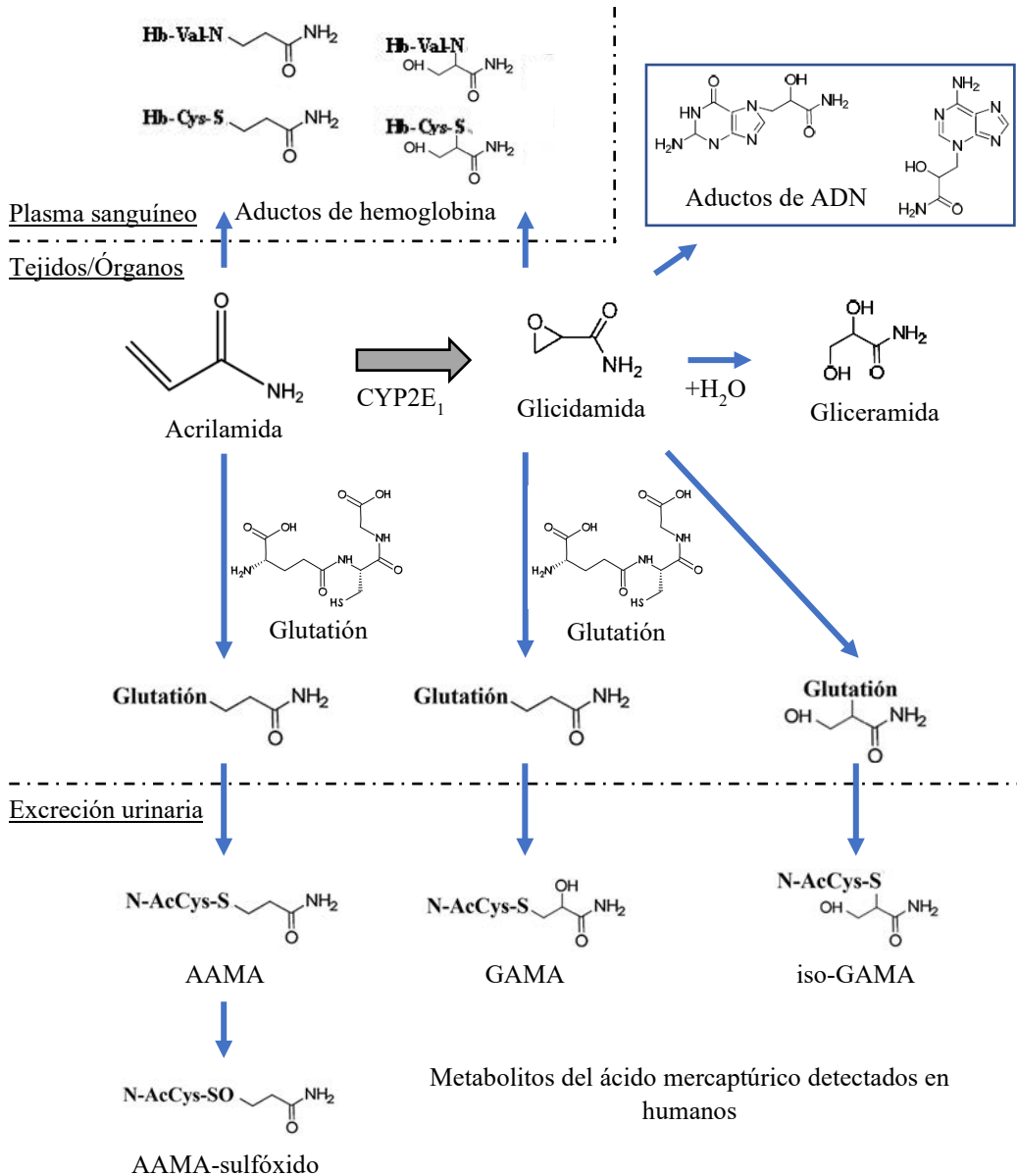


Figura 8. Metabolismo de la acrilamida (Adaptado de Friedman, 2003; Sumner y col., 2003; Dybing y col., 2005; Arribas-Lorenzo y Morales, 2012).

La glicidamida tiene un gran potencial genotóxico, siendo capaz de formar aductos más estables con el ADN y las proteínas que la propia acrilamida (EFSA, 2015) (Figura 8). De ahí que la toxicidad de la acrilamida se deba en gran medida a

su transformación en glicidamida. Además, su conjugación con el glutatión puede incrementar el estrés oxidativo de las células, interfiriendo en la expresión génica e incluso en el proceso de división mediante la inhibición del motor mitótico/meiótico (Capuano y Fogliano, 2011). La glicidamida puede ser hidrolizada a través de la hidrolasa epóxido a 2,3-dihidroxiopropionamida o gliceramida (Sumner y col., 2003). Finalmente, cabe destacar la conversión de este compuesto en derivados del ácido mercaptúrico para ser excretado a nivel renal.

Por último, es necesario mencionar que el metabolismo de la acrilamida en niños puede ser mayor que en adultos ya que su hígado es más grande en relación a su peso corporal y, por tanto, el flujo sanguíneo a través del hígado es también superior. De esta forma, es probable que la biotransformación de la acrilamida en glicidamida se produzca en mayor proporción en la población infantil y que su conjugación con el glutatión se produzca en menor medida debido a que tienen niveles más bajos de este péptido. En consecuencia, es posible que la toxicidad de la acrilamida en niños pueda ser mayor que en adultos (Erkekoğlu y Baydar, 2010).

Bioaccesibilidad y biodisponibilidad

La biodisponibilidad oral de un compuesto se puede definir como la fracción de la dosis oral administrada o su metabolito que llega a la circulación sistémica (Holst y Williamson, 2008), incluyendo los procesos de digestión gastrointestinal, absorción, metabolismo, distribución tisular y bioactividad (**Figura 9**). La biodisponibilidad de un compuesto se determina con metodologías *in vivo* en animales o humanos que consisten en medir la concentración de dicho compuesto en la sangre a lo largo del tiempo. Para ello, se calculan parámetros como: i) el área bajo la curva de concentración-tiempo, que representa la cantidad total de compuesto que se encuentra en la sangre a lo largo del tiempo tras la administración de una dosis aguda o crónica de un compuesto aislado o un alimento que contiene la molécula de interés y refleja la absorción, distribución y eliminación del compuesto (Rein y col., 2013); ii) la concentración máxima, que es la concentración más alta alcanzada en la sangre; y iii) el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima (Carbonel-Capella y col.,

2014). Estos parámetros proporcionan información sobre la velocidad de absorción y la cantidad absorbida del compuesto.

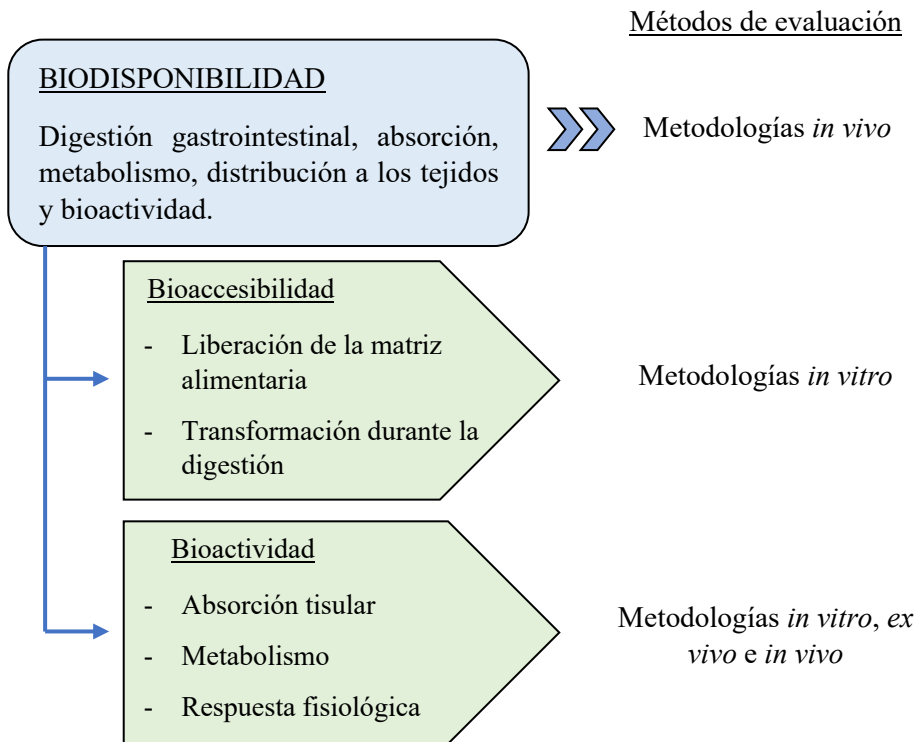


Figura 9. Definición de biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad, y la metodología utilizada en su evaluación (Adaptado de Carbonel-Capella y col. (2014)).

Por otro lado, la bioaccesibilidad se entiende como la cantidad o fracción de un compuesto que es liberada de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y, por tanto, queda disponible para ser absorbida (Heaney, 2001). Cuando se ingiere un alimento y comienza su digestión, la bioaccesibilidad de cualquier nutriente o compuesto bioactivo tóxico presente en los alimentos va a depender en gran medida de la composición de la matriz alimentaria (Schabacker y col., 2004). Este concepto incluye las transformaciones digestivas de los alimentos en componentes asimilables por las células del epitelio intestinal (Fernández-García y col., 2009). La bioaccesibilidad se suele evaluar mediante procedimientos de digestión *in vitro* (**Figura 9**), que consisten en la simulación de la digestión gástrica y del intestino

delgado, pudiendo incluir en ocasiones un estudio posterior de la absorción a partir de células modelo de la barrera epitelial intestinal y que se comportan como enterocitos maduros, como es el caso de la línea celular Caco-2 (Courraud y col., 2013; Teixeira y col., 2022).

Por último, la bioactividad se define como el efecto específico que va a desencadenar la exposición a una determinada sustancia y va a incluir la captación tisular, el metabolismo y la consiguiente respuesta fisiológica (Carbonel-Capella y col., 2014). La **Figura 9** muestra las distintas metodologías utilizadas en su evaluación: *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* (Fernández-García y col., 2009).

En el caso concreto de la acrilamida, su alta reactividad molecular ha motivado la necesidad de generar un mayor conocimiento de su estabilidad durante la digestión, ya que podría influir en su biodisponibilidad y, por tanto, en su bioactividad. El trabajo realizado por Hamzalıoğlu y Gökmen (2015) confirmó que la acrilamida contenida en la fracción bioaccesible de galletas y productos fritos a base de patata evoluciona a lo largo del proceso digestivo, observándose una reducción tras la digestión gástrica de entre un 17,4 y 49,2% en las muestras de galletas, y un aumento de hasta 3,95 veces en las muestras de patata. Tras la digestión duodenal, la acrilamida se vio reducida en porcentajes entre el 23,9-58,1% en el caso de las galletas y entre 78,2-96,8% en las patatas. Por su parte, el estudio de Sansano y col. (2017) mostró un incremento en el contenido de acrilamida en la fracción bioaccesible de diversos alimentos tras la digestión gástrica, siendo más elevado en aquellos alimentos que habían sido fritos u horneados, como las patatas fritas (62-32%), los aros de cebolla (87%), los nuggets de pollo (94%) o las galletas (incrementos de hasta un 410%). Este aumento se puede explicar por el bajo pH al que transcurre la fase gástrica, que podría favorecer: i) la conversión *in situ* en el estómago de productos intermedios de la RM (como las bases de Schiff) en acrilamida (Hamzalıoğlu y Gökmen, 2015); ii) la liberación de la acrilamida ligada a macromoléculas funcionales, como podría ocurrir en las melanoidinas del café (Pastoriza y col., 2012); iii) la proteólisis catalizada por la enzima pepsina que, junto con la actividad mecánica del estómago, posibilitaría la liberación de la acrilamida como consecuencia de la degradación de la matriz alimentaria (Sansano y col., 2017).

Aunque no existen evidencias claras, no puede descartarse la absorción de acrilamida a nivel estomacal desde el quimo. Una vez finalizada la fase gástrica, al comienzo de la etapa intestinal la bioaccesibilidad de la acrilamida parece disminuir. Este hecho podría relacionarse con la capacidad nucleófila de los pequeños péptidos y aminoácidos liberados por la acción de la pepsina gástrica (especialmente lisina y cisteína), que en las condiciones del lumen intestinal (pH básico) van a ser capaces de reaccionar con la acrilamida a través de la reacción de adición de Michael, originando aductos acrilamida-aminoácido que van a contribuir a disminuir su bioaccesibilidad (Hamzalıoğlu y Gökmen, 2015; Sansano y col., 2017).

Por otro lado, es necesario considerar la influencia de los procesos fermentativos que desarrolla la microbiota colónica, cuya composición y, por tanto, su capacidad fermentativa, varía a lo largo de la vida o en poblaciones específicas, condicionando la posible liberación de la acrilamida atrapada en la fracción no bioaccesible tras la etapa de digestión en estómago e intestino delgado. Además de la composición de la microbiota, la matriz del alimento juega también aquí un papel fundamental. En el colon se produce la hidrólisis de ciertas proteínas y péptidos residuales gracias a la acción proteolítica catalizada por enzimas de la microbiota, permitiendo de nuevo que puedan tener lugar adiciones de Michael entre la acrilamida no bioaccesible y los aminoácidos resultantes. Además, la fibra sin degradar presente en el residuo no digerido de los alimentos puede ser fermentada a nivel colónico gracias a la capacidad de ciertos microorganismos (*Bifidobacterium* y *Bacteroidetes*) de emplearla como sustrato (Sun y col., 2021), liberando así el contaminante atrapado en ella. La información específica sobre el efecto de la microbiota intestinal en la bioaccesibilidad de la acrilamida es escasa, por lo que este tipo de investigaciones serían bien acogidas por la comunidad científica.

Excreción

La excreción tanto de la acrilamida como de la glicidamida se produce a través de la orina en forma de conjugados del ácido mercaptúrico: N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil)-cisteína (AAMA), N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil)-cisteína sulfóxido (AAMA-sulfóxido), N-acetil-S-(3-amino-2-hidroxi-3-oxopropil)-cisteína (GAMA)

y N-acetil-S-(1-carbamoil-2-hidroxietyl)-cisteína (iso-GAMA) (Zhu y col., 2021) (**Figura 8**). Por ello, los metabolitos urinarios del ácido mercaptúrico pueden dar una idea de la exposición a corto plazo (Yan y col., 2023b). También se ha observado una mínima excreción a través de las heces (1%) y en el CO₂ exhalado (Friedman, 2003). En investigaciones llevadas a cabo en humanos, la administración tanto oral como dérmica de acrilamida en solución ha dado paso a una rápida excreción urinaria, con una tasa de eliminación de alrededor del 50% en las siguientes 24 horas (Fennell y col., 2006). Además, estudios realizados en ratones, con una administración de ¹⁴C-acrilamida mediante inyección subcutánea y de acrilamida mediante ingesta dietética de pan crujiente, obtuvieron una relación lineal entre la excreción urinaria de metabolitos mercaptúricos y la exposición al contaminante, con un porcentaje de recuperación del 54-80% de la dosis inyectada y del 55% de la dosis ingerida (Bjellaas y col., 2007).

2.4. Toxicidad

En 1994, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó a la acrilamida como “probable carcinógeno en humanos” (categoría 2A). La categoría 2A hace referencia a compuestos para los que hay evidencias suficientes de toxicidad en animales y limitadas en humanos, pudiendo causar cáncer en humanos, sin ser todavía concluyentes (IARC, 1994). En el año 2002, la Autoridad Noruega de Control de Alimentos, la catalogó como cancerígeno y mutágeno en la categoría 2 (sustancias que deben tratarse como si fueran carcinogénicas en humanos) y como tóxico para la reproducción en la categoría 3 (SNT, 2002).

Los principales efectos tóxicos derivados de la exposición a acrilamida han sido observados en animales de experimentación o en individuos expuestos accidentalmente al contaminante en el entorno laboral. Entre otros efectos, la exposición a este compuesto se ha relacionado con el riesgo de alteraciones en el metabolismo lipídico y de la glucosa, agravando la patología diabética (Alanazi y col., 2021; Quan y col., 2022), procesos inflamatorios (Şengül y col., 2021) y riesgo cardiovascular (Zhang y col., 2018), además de los efectos neurotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos.

Neurotoxicidad

Estudios con humanos y con animales de experimentación han demostrado los efectos neurotóxicos de la acrilamida, observándose neuropatías periféricas, daños en las células de Purkinje y degradación de axones distales en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico debido al estrés oxidativo inducido (Prasad y Muralidhara, 2014; Zhao y col., 2022). Esta degradación conduce al deterioro de las funciones cognitivas y a producir daños en el córtex cerebral, tálamo e hipotálamo (Parzefall, 2008). En algunos casos, se ha observado que la unión de la acrilamida con los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína de las proteínas presinápticas causa una degeneración en las terminales nerviosas y una inhibición en el transporte axonal debido a la reducción de la liberación de neurotransmisores (LoPachin y col., 2004), interfiriendo en la sinapsis neuronal (Zhang y col., 2017a). A partir de estos estudios se estableció un valor de exposición de 0,2 mg/kg pc/día como el nivel sin efectos adversos observados (NOAEL), y un valor de 1,0 mg/kg pc/día como el nivel más bajo con efecto adverso observado (LOAEL) (FAO/WHO, 2008).

Efectos en la reproducción y desarrollo

A pesar de que no se han encontrado evidencias científicas concluyentes sobre los efectos tóxicos de la acrilamida en la reproducción humana, se ha observado cierto potencial tóxico en los estudios con animales de experimentación. Roedores expuestos a altas dosis de este contaminante en el agua de bebida han mostrado cambios de morfología en los espermatozoides y una reducción del tamaño de las crías. El mecanismo de acción se relaciona con la unión de la acrilamida o la glicidamida a proteínas de la espermátida, produciendo la muerte o alterando la forma de los espermatozoides (Pruser y Flynn, 2011; Katen y Roman, 2015). El índice NOAEL establecido para efectos reproductivos en ratas ha sido de 2 mg/kg pc/día (FAO/WHO, 2008).

En diversos estudios se ha observado que en embarazadas, los metabolitos de la acrilamida de la madre pueden pasar al feto a través de la placenta, lo que a corto y largo plazo puede conducir a la formación de aductos de glicidamida con el material genético del feto (Annola y col., 2008). Este hecho se ha relacionado con una

reducción del peso y de la circunferencia de la cabeza del neonato (Pedersen y col., 2012). Además, la exposición prenatal a acrilamida se ha vinculado con un ritmo de crecimiento corporal ligeramente incrementado tras el nacimiento, así como con la obesidad infantil en las primeras etapas de la vida (Kadawathagedara y col., 2018).

Genotoxicidad y carcinogenicidad

En general, la acrilamida *per se* presenta baja reactividad *in vitro* en condiciones que mimetizan los sistemas biológicos. Sin embargo, a través de su activación metabólica y transformación en glicidamida, se ha podido observar la formación de aductos con el ADN (Da Costa y col., 2003). A pesar de que inicialmente no se encontraron suficientes evidencias significativas para relacionar la exposición dietética a este compuesto con el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer, estudios recientes han podido establecer esta relación (Gu y col., 2022; Li y col., 2022). La exposición a acrilamida se ha relacionado con un ligero aumento del riesgo de padecer cáncer renal, endometrial y ovárico (Virk-Baker y col., 2014; Adani y col., 2020), destacando la capacidad de formar tumores en órganos como los pulmones (Yedier y col., 2022), las mamas (Bellicha y col., 2022) y el colon (Hogervorst y col., 2014). El mecanismo específico de actuación de la acrilamida para producir la carcinogénesis es aún bastante desconocido (Yan y col., 2023b). Además, se ha descrito una alta probabilidad de desarrollo de mutaciones genéticas y tumores en ratas y ratones, afectando a las glándulas mamarias, testículos, glándulas tiroideas, glándulas harderianas, pulmones, ovarios, piel y estómago. En 2022, la EFSA ratificó el efecto genotóxico de la acrilamida y la glicidamida, ya establecido en su informe de 2015, tras evaluar las nuevas evidencias científicas que han surgido con posterioridad (EFSA, 2022).

2.5. Exposición a acrilamida a través de la dieta

2.5.1. Niveles en alimentos y principales fuentes de exposición

Las principales fuentes de exposición a acrilamida incluyen tres matrices alimentarias: patatas, cereales y café. En estos alimentos, la acrilamida se produce como consecuencia de la presencia de precursores en la materia prima y las altas

temperaturas aplicadas durante su procesado. Los niveles de precursores en dichos alimentos son determinantes en la formación de acrilamida. El contenido en precursores en los alimentos frescos puede presentar una amplísima variabilidad y va a depender de la variedad, el tipo de cultivo y sistemas agronómicos empleados, así como de los tratamientos postcosecha y de las condiciones de almacenamiento (Zhang y Zhang, 2007).

En el caso de las patatas (*Solanum tuberosum*), la formación de acrilamida se relaciona con un alto contenido en azúcares reductores (esencialmente, glucosa y fructosa), cuya concentración presenta gran variabilidad dependiendo de la variedad de la patata. Se han descrito valores que oscilan entre 0,2 g glucosa/kg en patatas de variedad Lady Claire hasta 3,1 g glucosa/kg en King Edward (Halford y col., 2012a). Durante su cultivo, el contenido en azúcares está influenciado por factores ambientales como la temperatura, que tiene efectos en las actividades fisiológicas de la planta (Halford y col., 2012b), siendo el rango óptimo de crecimiento para la mayoría de las variedades entre 15 y 20 °C (Kumar y col., 2004). La composición mineral del suelo y el tratamiento de fertilización son dos factores importantes. Los niveles de nitrógeno y azufre en el suelo también pueden variar el contenido de azúcares en el tubérculo, aumentando en suelos pobres en N y S (De Wilde y col., 2006; Elmore y col., 2007). Por otro lado, los precursores se pueden controlar estimando el momento óptimo de recolección del tubérculo, ya que recogidas excesivamente tempranas o tardías coinciden con mayores niveles fisiológicos de azúcares reductores en la planta (FDE, 2019). El contenido de asparagina en las patatas oscila entre un 0,2-4% por peso seco y representa un 20-60% del total de los aminoácidos. Estas cantidades suponen un exceso en relación al contenido en azúcares reductores, por lo que la asparagina no se considera el precursor limitante para la formación de acrilamida en esta matriz alimentaria (FDE, 2019). Por último, es importante tener en cuenta la influencia del almacenamiento, ya que los tubérculos de patata suelen almacenarse durante los meses de invierno para mantener el suministro durante todo el año (Pedreschi y col., 2014). Las concentraciones de azúcares pueden aumentar abruptamente debido a la senescencia del tubérculo, así como al endulzamiento por el frío y la brotación. Por ello, el almacenamiento a 4 °C

es eficaz para evitar que los tubérculos broten, pero a su vez conduce a la degradación del almidón hacia sacarosa y ésta hacia glucosa y fructosa, aumentando los niveles de azúcares reductores y, por tanto, la formación final de acrilamida (Halford y col., 2012a,b). Por estos motivos, los tubérculos deben almacenarse generalmente a temperaturas más altas (8-10 °C), y controlar la brotación rociándolos con supresores químicos (Pedreschi y col., 2014), como el 1,4-dimetilnaftaleno, etileno o el aceite de menta (Reglamento de ejecución (UE) 540/2011), cuyos usos han desplazado al cloroprofam, prohibido recientemente en la UE (Reglamento de ejecución (UE) 2019/989). Además, durante el almacenamiento se deben mantener unos niveles de oxígeno y dióxido de carbono bajos para disminuir la acumulación de azúcares (Kumar y col., 2004).

En los cereales, el nivel de precursores va a depender también del cultivo; sin embargo, a diferencia de las patatas, se ha observado menor variabilidad entre las distintas variedades y tipos de cereales, y no se han descrito efectos por el almacenamiento (Pedreschi y col., 2014). En los cereales y derivados, el precursor limitante para la formación de acrilamida es la asparagina, cuya concentración en los granos se ve afectada por el tipo de cereal, las prácticas agronómicas y las condiciones ambientales (FDE, 2019). Se han observado niveles de asparagina del rango de 189,7-470,5 mg/kg en el maíz, 297,0 mg/kg en la cebada, 61,6-530,3 mg/kg en el trigo, 603,2 mg/kg en el centeno y 859,8 mg/kg en la avena (Žilić y col., 2020). Por otro lado, se ha demostrado que la disponibilidad de azufre y nitrógeno durante el cultivo es particularmente importante, ya que tanto la privación de azufre como, por el contrario, una mayor disponibilidad de nitrógeno, causan un incremento dramático en los niveles de asparagina en los granos (Bråthen y Knutsen, 2005; Claus y col., 2006b). De esta forma, los fertilizantes ricos en nitrógeno podrían aumentar la asparagina libre, mientras que la fertilización con azufre parece reducirla (Wilson y col., 2020).

En cuanto al café, los granos de café verde contienen elevados niveles de asparagina y sacarosa, la cual dará lugar a glucosa y fructosa por acción de la temperatura durante el tostado. Al igual que en los cereales, el precursor limitante para la formación de acrilamida en los granos de café es la asparagina, encontrándose

en mayores cantidades en la variedad *Robusta* (1026 mg/kg) frente a la variedad *Arábica* (658 mg/kg) (Murkovic y Derler, 2006; Bagdonaire y col., 2008; Bertuzzi y col., 2020). Lo contrario ocurre en los niveles de azúcares reductores (glucosa y fructosa), que son superiores en la variedad *Arábica* (424 y 936 mg/kg respectivamente) que en la *Robusta* (138 y 338 mg/kg, respectivamente) (Bertuzzi y col., 2020). Estos contenidos aumentan con el grado de maduración de la fruta del café, mientras que en los granos inmaduros los niveles de asparagina pueden verse incrementados debido a la fertilización con nitrógeno, por un aumento de su disponibilidad durante el crecimiento de la planta (Reis y col., 2011).

Durante el tratamiento térmico de todas estas matrices alimentarias se produce la formación de acrilamida, de manera que es necesario controlar las condiciones de procesado, ya sea fritura, horneado, tostado o secado. Así, la “Caja de Herramientas de Acrilamida” de la CIAA (Confederación de Industria Agroalimentaria de la Unión Europea), actualmente denominada Food Drink Europe (FDE), recomienda mantener la temperatura inferior a 175 °C durante la fritura de las patatas y a 180-200 °C durante el horneado de patatas y productos de base cereal, eligiendo en ambos casos siempre un color dorado frente al más oscuro y reduciendo el tiempo de cocinado. Durante el tostado del café y sus derivados, la acrilamida comienza a formarse rápidamente a temperaturas entre los 180-200 °C hasta los 250 °C (Summa y col., 2007). Es necesario tener en cuenta que las diversas operaciones culinarias que se aplican en los distintos entornos de cocinado (industrial, doméstico o de restauración colectiva) pueden condicionar los niveles de acrilamida generados durante el procesado de los alimentos (Pedreschi, 2009; Mesías y col., 2019a).

En el informe de la EFSA publicado en el año 2015 en relación a la opinión científica sobre la presencia de acrilamida en los alimentos, se incluyeron valores del contenido medio en distintas matrices alimentarias, de acuerdo a datos procedentes de los distintos países miembros de la Unión Europea (**Tabla 2**). Entre ellos destacan el café soluble y las patatas fritas tipo chips y productos con masa de patatas como los alimentos con un mayor contenido en el contaminante, siendo el pan y los alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad los que presentan un menor contenido.

Tabla 2. Niveles medios de acrilamida en alimentos expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EFSA, 2015).

Alimento	Media
Patatas fritas	332
Patatas fritas (chips) y productos con masa de patatas	558
Pan	40
Cereales de desayuno	223
- Salvado y cereales integrales, grano inflado	164
- Trigo y centeno	142
Maíz, avena, espelta, cebada y arroz	73
Galletas, barquillos, panes crujientes y similares	264
Café	317
- Tostado	244
- Soluble	674
Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, excluidos las galletas y los biscotes	24
Galletas y biscotes para bebés y niños de corta edad	103

2.5.2. Niveles de exposición en la población

La exposición a acrilamida vendrá determinada por los patrones alimentarios propios de cada población y franja de edad. Así, la población infantil entre 1 y 3 años se encuentra expuesta a la acrilamida por el consumo de productos derivados de patatas y cereales; los niños, sobre todo, por el elevado consumo de cereales para el desayuno, además de galletas, productos de panadería, patatas fritas y snacks; mientras que, en adultos, los principales alimentos que determinan su exposición son las patatas fritas, snacks, café, galletas y productos de panadería (Lineback y col., 2012).

Las estimaciones de la OMS en cuanto a exposición a acrilamida determinaron niveles entre 0,2 y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día para la población general. La EFSA, por su parte, realizó las estimaciones dividiendo a la población en distintos grupos de edad, siendo los niños entre 1 y 3 años los mayormente expuestos con una media de exposición de 1,3 (0,9-1,9) $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día, al igual que el resto de población infantil de 3 a 10 años de 1,2 (0,9-1,6) $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día (EFSA, 2015), debido al mayor consumo de alimentos de base cereal y patatas fritas (Mucci y Wilson, 2008) y a su bajo peso corporal,

pudiendo estar asociado a mayor riesgo que la población adulta (Erkekoğlu y Baydar, 2010). En el caso de los adolescentes, se ha estimado una exposición diaria media de 0,7 (0,4-0,9) $\mu\text{g}/\text{kg pc}$ y en adultos de 0,5 (0,4-0,6) $\mu\text{g}/\text{kg pc}$ (EFSA, 2015). En la **Tabla 3**, se describe la exposición media a acrilamida en la población adulta estimada en diversos estudios.

Tabla 3. Exposición media alimentaria a acrilamida en población adulta.

País	Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$)	Fuente
Bélgica	$0,33 \pm 0,06$	Claeys y col. (2016)
China	$0,28 \pm 0,2$	Zhou y col. (2013)
Colombia	$0,52 \pm 0,4$	Barón Cortés y col. (2021)
España	$0,3 \pm 0,2$	Obón-Santacana y col. (2014)
EEUU	$0,36 \pm 0,1$	Abt y col. (2019)
Francia	$0,43 \pm 0,33$	Sirot y col. (2012)
Grecia	$0,3 \pm 0,1$	Obón-Santacana y col. (2014)
Irán	$0,53 \pm 0,37$	Nematollahi y col. (2020)
Noruega	$0,3 \pm 0,1$	Obón-Santacana y col. (2014)
Países Bajos	$0,48 \pm 0,05$	Konings y col. (2003)
	$0,5 \pm 0,2$	Obón-Santacana y col. (2014)
Polonia	$0,67 \pm 1,26$	Zajac y col. (2013)
	$0,214 \pm 0,006$	Ciešlik y col. (2020)
Portugal	$0,40 \pm 0,1$	Costa y col. (2022)
Reino Unido	$0,5 \pm 0,3$	Obón-Santacana y col. (2014)
Turquía	$0,53 \pm 0,1$	Başaran y Faiz (2022)

2.5.3. Métodos para evaluar la exposición dietética

Para evaluar la exposición a acrilamida a través de la dieta es necesario conocer (A) la concentración del contaminante en los alimentos, (B) los datos de consumo de dichos alimentos por parte de la población y (C) el peso corporal de los consumidores.

A. Evaluación del contenido en contaminantes de los alimentos

La concentración de contaminantes en los alimentos de la dieta se puede obtener por dos vías:

- Realizando una estimación del contenido del contaminante a través de datos bibliográficos. Con este abordaje se obtienen datos armonizados extrapolables a cualquier alimento procedente de cualquier país, lo que permite unificar y generalizar la comparación de los datos. El principal inconveniente radica en la baja especificidad de los valores utilizados para un estudio concreto en el cual se va a considerar la variabilidad de la composición de las distintas matrices alimentarias y la influencia de factores externos como el tipo de manipulación, almacenaje y cocinado de los alimentos.
- Realizando el análisis del contaminante directamente en los alimentos consumidos. Esta metodología va a proporcionar datos concretos sobre los alimentos analizados según sus características particulares de composición y procesado, aportando mayor precisión al estudio. Como desventaja, este método no sólo conlleva el empleo de más tiempo y recursos humanos y materiales, sino también una mayor dificultad en la comparación de los datos.

Los métodos más utilizados para llevar a cabo el análisis directo son la monitorización de alimentos individuales y el método de dieta duplicada.

- La monitorización de alimentos individuales consiste en la selección de los alimentos más frecuentes y representativos de la dieta de una determinada población. Posteriormente, se realiza el análisis de cada alimento de forma individual para determinar los niveles de los compuestos de interés (Jalón, 2006). Este método aporta una gran cantidad de información, identificando los alimentos con mayor contribución a la exposición a un contaminante concreto y, de esta forma, permite estimar la exposición media en la población de estudio, pudiendo clasificarla por estratos definidos (rangos de edad, género, distribución geográfica, etc.). El aspecto negativo es el gran número de análisis que requiere, que se va a traducir en un gran coste económico e importante inversión de tiempo.

- El método de dieta duplicada es un sistema objetivo y directo de valoración de la ingesta de alimentos a través del análisis de una réplica de la ración diaria ingerida por un individuo o población seleccionada (Shim y col., 2014). Este método proporciona información precisa sobre la cantidad ingerida de ciertos contaminantes y/o sustancias químicas potencialmente perjudiciales para la salud (Porca Fernández y col., 2016).

B. Evaluación del consumo de alimentos

La evaluación del consumo de alimentos requiere un estudio exhaustivo de una población mediante la selección y recopilación de información de los alimentos más representativos de la dieta. Esto se puede realizar mediante:

i. **Datos individuales**, obtenidos utilizando lo que genéricamente se denomina encuestas alimentarias o nutricionales. Estos datos proceden de la evaluación del consumo específico de cada individuo de la población y se obtienen a través de métodos retrospectivos o prospectivos. En los métodos retrospectivos se pregunta al sujeto qué ha consumido en el pasado, a través de un recordatorio de 24 horas, cuestionario de frecuencia de consumo o historia dietética. Por el contrario, los métodos prospectivos reflejan el consumo actual y englobarían el registro diario dietético y el método de dieta duplicada.

- **Métodos retrospectivos:**

- El recordatorio de 24 horas consiste en el registro de todos los alimentos y bebidas ingeridas en las 24 horas previas a la entrevista, estimando la cantidad consumida mediante medidas caseras, modelos de alimentos o fotografías (Baranowski, 2012). Para realizarlo, los investigadores pueden realizar entrevistas con los participantes o bien distribuirles hojas de registro para autocompletar. Se recomienda recoger la información durante varios días o combinarlo con un registro dietético, para evaluar al menos tres días, siendo uno de ellos festivo o del fin de semana, evitando así el sesgo asociado a la variabilidad de la ingesta de un individuo a lo largo de una semana. Se considera el método de mejor relación coste/eficacia, ya que puede ser implementado en cualquier ámbito y llegar a un

buen número de sujetos, por tanto, es sencillo alcanzar un buen ratio de participación (FAO, 2018).

– El cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos tiene como objetivo evaluar la frecuencia de consumo de una lista de alimentos concreta durante un periodo de tiempo determinado (diario, semanal, mensual o anualmente) (FAO/WHO, 2008). Dicho cuestionario se articula en tres ejes fundamentales: una lista de alimentos, la frecuencia de consumo en unidad de tiempo y la porción estándar establecida como punto de referencia. El consumo de alimentos en este tipo de cuestionarios se puede medir de forma cualitativa, obteniendo el número de veces que cada alimento del listado es consumido en el periodo de tiempo especificado; semicuantitativa, estimando el número de veces que se consume la porción estándar; o cuantitativa, precisando la cantidad concreta consumida de cada alimento (Willet y Lenart, 2012; FAO, 2018).

– La historia dietética es un método de evaluación de la dieta frecuentemente utilizado en la práctica clínica para describir los alimentos y/o nutrientes ingeridos en un periodo de tiempo relativamente largo (1 mes, 6 meses o incluso 1 año) (Fagúndez y col., 2015). Este método se compone inicialmente de un recordatorio de 24 horas, que contempla las posibles variaciones estacionales y semanales, un cuestionario de frecuencia de consumo y, por último, un registro diario dietético de tres días consecutivos (Nelson y Bingham, 1997). De esta forma, se valora la ingesta global del individuo encuestado, sus hábitos de consumo, y la distribución y composición de las comidas a lo largo del día (Serra Majem y Aranceta Bartrina, 2006). Debido a la complejidad de la entrevista, requiere formación específica del entrevistador y no se recomienda realizarla a individuos menores de 14 o mayores de 80 años. Además, al tratarse de un método costoso en recursos económicos y con gran inversión de tiempo, no se aplica en estudios con grandes muestras poblacionales.

La principal limitación de las encuestas utilizadas en los métodos retrospectivos reside en la pérdida de información en cuanto a la materia prima utilizada y la variación de su composición, al tipo de técnica culinaria o tratamiento térmico

utilizados y grado de procesado, así como, en la posible imprecisión a la hora de estimar el tamaño de ración consumida por el individuo.

- Métodos prospectivos:

- El registro diario dietético se basa en recoger la información de todos los alimentos y bebidas consumidos diariamente durante varios días consecutivos en formularios adecuados. No se recomienda que la duración del estudio sea superior a 4 días para evitar la fatiga del participante y que ésta reduzca la precisión de los datos aportados. Este método se puede llevar a cabo cuantificando la ingesta de forma somera (mediante medidas caseras, modelos de alimentos o fotografías) o precisa (pesando los alimentos previamente y los desperdicios tras su consumo) (Ortega y col., 2015).

- El método de dieta duplicada, comentado anteriormente, permite analizar una réplica de la ración diaria de la dieta concreta consumida por la población de estudio, conociéndose exactamente la cantidad de alimento consumido.

ii. **Datos a nivel doméstico**, que hacen referencia a los datos obtenidos a través de la evaluación del consumo de alimentos en los hogares que se realizan a través de encuestas administradas por organismos oficiales como el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Estas encuestas se basan en un método conocido como “Cesta de la compra”, en el que se recoge la información de los alimentos adquiridos en cada hogar. Los alimentos se combinan en muestras agregadas y se clasifican en grupos afines para su análisis (carne, pescados, verduras, etc.), obteniendo tanto las ingestas medias de la población, como los alimentos más consumidos en la dieta (Jalón, 2006). En el caso de detectar concentraciones elevadas de un contaminante en un grupo determinado de alimentos, es necesario realizar un análisis individual de cada alimento de dicha categoría para localizar el origen de la contaminación. Su principal ventaja radica en su baja relación coste/información, ya que se reduce mucho el número de análisis necesario y, además, permite vigilar las tendencias de exposición a contaminantes sin sobrecargar a los participantes del estudio.

A pesar de que las encuestas mencionadas anteriormente se pueden llevar a cabo por medio de un entrevistador, en las últimas décadas se han implementado nuevas tecnologías, obteniéndose una mejora en la eficacia y coste de la recogida de los datos de consumo de alimentos. Entre estas nuevas metodologías se encuentran las tecnologías PDA (personal digital assistant) u ordenadores/agendas electrónicas de bolsillo, tecnologías basadas en grabadoras de cámara y sonido, en sensores y escáneres, y en ordenadores, internet y teléfono móviles (como distintas aplicaciones móviles). Estas innovaciones podrían optimizar los registros anteriormente mencionados gracias a la posibilidad de grabar en tiempo real los datos de consumo de alimentos, con la debilidad de la incapacidad de medir la porción exacta de alimento consumida, que se establece según la opinión parcial y subjetiva del individuo encuestado.

iii. **Datos a nivel nacional**, obtenidos a través de las hojas de balance de alimentos que se utilizan para estimar patrones, niveles y tendencias de las dietas en los distintos países. De esta forma, se reúne información acerca de la disponibilidad de alimentos para el consumo nacional sin especificar el consumo individual o su distribución en la población. Una hoja de balance de alimentos representa un esquema de los principales alimentos suministrados en un país determinado durante un periodo de tiempo concreto (uno o varios años), de manera que, para cada alimento, se muestra la fuente de suministro y su utilización posterior: se indica primero el suministro interno disponible durante el periodo de tiempo en cuestión (sumándole a la cantidad total de alimentos producida, la cantidad total importada) y, posteriormente, se define su utilización interna (cantidades destinadas al ganado, utilizadas como semilla, para uso alimentario, pérdidas durante el almacenamiento y transporte y consumo humano) (Cotier y Morón, 1997).

C. Evaluación del peso corporal del individuo

Por último, para evaluar la exposición dietética a un contaminante es necesario conocer el peso corporal de cada individuo de la población de estudio. Esta información se puede obtener de bases de datos generadas por organismos oficiales como la OMS a nivel mundial (WHO, 2023a,b), la EFSA a nivel europeo (EFSA,

2012a) o el Ministerio de Sanidad y Consumo a nivel español (Encuesta Nacional de Salud de España, 2017) e incluso de estudios epidemiológicos realizados en distintos grupos poblacionales, como el estudio ENPE (Estudio Nutricional de la Población Española) (Aranceta-Bartrina y col., 2016; 2020; Pérez-Rodrigo y col., 2022), entre otros (**Tabla 4**).

Estas fuentes ofrecen pesos medios de diferentes franjas de edad extrapolables a cualquier estudio poblacional, pero, a la vez, asumen un cierto error debido a que no corresponden exactamente a la población de estudio. Para solventar este error, se pueden medir los pesos específicos en estudios de intervención, obteniéndose datos concretos, aunque generalmente tienen la limitación de estar referidos a un menor tamaño muestral.

2.6. Evaluación del riesgo asociado a la exposición a acrilamida

Para evaluar el riesgo asociado a la exposición a acrilamida se emplea un valor de $BMDL_{10}$ (límite inferior de confianza de la dosis de referencia) de 0,17 mg/kg pc/día para evaluar los efectos neoplásicos y de 0,43 mg/kg pc/día para evaluar los efectos neurológicos (EFSA, 2015). Estos límites, obtenidos de estudios con animales de experimentación, junto con la exposición diaria de acrilamida a través de la dieta estimada en la población, se utilizan en el cálculo del Margen de Exposición (MOE). En 2015, la EFSA publicó un informe estableciendo que para sustancias carcinogénicas y genotóxicas un valor de MOE de 10.000 o superior, basado en un $BDML_{10}$ procedente de estudios carcinogénicos en animales, supone un nivel bajo de peligro para la salud pública, de la misma forma que un valor de MOE de 125 o superior en el caso de sustancias con efectos neurotóxicos. Teniendo en cuenta la exposición a acrilamida estimada para la población europea, el valor calculado de MOE estaría comprendido entre 1075-226 para efectos neurotóxicos, indicando un riesgo bajo para la salud. En cambio, en el caso del MOE estimado para efectos neoplásicos, el rango se ha calculado entre 425-89, implicando un riesgo importante para la salud humana, de ahí la preocupación por reducir la exposición a acrilamida a través de la dieta (EFSA, 2015).

Tabla 4. Valores de peso corporal (kg) por franjas de edad según organismos oficiales y estudios epidemiológicos.

Edad (años)	Peso (kg)		Fuente
	Hombres	Mujeres	
>1	7		WHO (2023a)
1-5	14		
5-10	24		WHO (2023b)
>1	12		EFSA (2012a)
1-3	5		
18-64	82	67	
65-74	82	71	
>75	77	66	
3-8	24		Aranceta-Bartrina y col. (2020)
9-18	58	53	
19-24	77	60	
25-64	82	67	Aranceta-Bartrina y col. (2016)
65-74	81	72	Pérez-Rodrigo y col. (2022)
>75	77	70	

2.7. Actividades de regulación

Desde el descubrimiento de la presencia de acrilamida en los alimentos procesados térmicamente en el año 2002, asociaciones empresariales del sector agroalimentario junto con la comunidad científica y las autoridades gubernamentales competentes en materia de seguridad alimentaria, como la EFSA, han aunado esfuerzos para comprender la química de formación y buscar estrategias de mitigación con el fin de reducir la exposición a acrilamida en la dieta y su consecuente riesgo asociado aplicando en el procesado de los alimentos el principio ALARA, “tan bajo como sea razonablemente posible” (Morales y col., 2018). A partir de entonces, la EFSA llevó a cabo una monitorización del contenido de acrilamida en los alimentos mediante la creación de una base de datos recopilando los resultados derivados de investigaciones

de los estados miembros sobre este contaminante en todos los grupos de alimentos (EFSA, 2009; 2010b; 2011; 2012b). A la vista de estos datos y teniendo en cuenta el consumo de alimentos por parte de la población, en el informe de la EFSA del 2015, se estableció que la acrilamida aumenta el riesgo de desarrollar cáncer en todos los grupos de edad (EFSA, 2015). Siguiendo los informes de monitorización emitidos por la EFSA, la Comisión Europea publicó distintas recomendaciones en las que se establecieron valores indicativos de acrilamida en las distintas matrices alimentarias (EC, 2011; 2013), que se han ido revisando y actualizando a lo largo de los años y que culminaron con la publicación, en el año 2017, del Reglamento 2017/2158 de la Comisión Europea (en vigor desde el 11 de abril de 2018). En este documento se establecieron medidas encaminadas a la gestión de riesgos, incluyendo códigos de buenas prácticas obligatorios para mitigar la formación de acrilamida por los productores, así como niveles de referencia de acrilamida para cada grupo de alimentos, de especial aplicación en la industria alimentaria (Reglamento (UE) 2017/2158). Estos niveles de referencia son indicadores que deben utilizarse para verificar la eficacia de las medidas de mitigación y se basan en la experiencia y la incidencia en las categorías de alimentos analizadas (**Tabla 5**).

Con la aplicación de todas las medidas de mitigación pertinentes, los valores de acrilamida deben situarse en el nivel más bajo razonablemente posible para cada categoría de alimentos. No obstante, hay que tener en cuenta que, a veces, las categorías de alimentos incluidas en el reglamento son muy amplias y para algunos de ellos puede haber características específicas, tanto de los productos en sí mismos como de las condiciones de producción, geográficas o estacionales. En tales casos, aun aplicando todas las medidas de mitigación pertinentes, es más complicado mantener la acrilamida por debajo de los niveles de referencia. En estas circunstancias, el reglamento indica la obligatoriedad de demostrar que se han aplicado dichas medidas por parte del explotador de la empresa alimentaria (Reglamento (UE) 2017/2158). Con posterioridad al reglamento, se publicó una nueva Recomendación 2019/1888 en la que se aconseja el control y la monitorización de los niveles de acrilamida en otras matrices alimentarias, entre las que se encuentran

las aceitunas, masas fritas, distintos alimentos de base cereal, frutos secos, frutas deshidratadas o cacao, entre otros (Recomendación (UE) 2019/1888).

Tabla 5. Niveles de referencia del contenido de acrilamida en alimentos (Reglamento (UE) 2017/2158).

Alimento	Nivel de referencia (µg/kg)
Patatas fritas	500
Patatas fritas (chips) y productos con masa de patatas	750
Pan	
a) A base de trigo	50
b) Otros	100
Cereales de desayuno	
- Salvado y cereales integrales, grano inflado	300
- Trigo y centeno	300
Maíz, avena, espelta, cebada y arroz	150
Galletas y barquillos	350
Galletas saladas	400
Pan crujiente	350
Pan de especias	800
Productos similares	300
Café	
- Tostado	400
- Instantáneo (soluble)	850
Sucedáneos del café	
- Compuestos exclusivamente por cereales	500
- Compuestos por una mezcla de cereales y achicoria	(*)
- Compuestos exclusivamente por achicoria	4 000
Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, excluidos las galletas y los biscotes	40
Galletas y biscotes para lactantes y niños de corta edad	150

*El nivel de referencia que debe aplicarse a los sucedáneos compuestos por una mezcla de cereales y achicoria debe tener en cuenta la proporción relativa de estos ingredientes en el producto final.

En paralelo a estas medidas de control, se han desarrollado otras estrategias de mitigación en la industria alimentaria, a través de la publicación en 2009 del “Código

de Prácticas para la Reducción de la Acrilamida en los Alimentos (CAC/RCP 67-2009)” por la Comisión del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC). Este documento incluía actuaciones recomendadas para la industria y otras partes implicadas en la elaboración de productos de patata y de productos a base de cereales (Codex Alimentarius, 2009). Como se ha mencionado en el apartado 2.5.1., la FDE, que representa a la industria alimentaria y de bebidas de Europa, en colaboración con la Unión Europea y las autoridades nacionales de los estados miembros, publicaron su “Caja de Herramientas de Acrilamida” en 2005. Este documento ha sido sucesivamente actualizado, la última vez en 2019, con el objetivo de establecer puntos de control para que los operadores de las empresas alimentarias sigan las directrices marcadas para reducir la formación de acrilamida en los alimentos. Las recomendaciones se centran, fundamentalmente, en el café y derivados, alimentos de base cereal y de base patata (FDE, 2019). Otros organismos oficiales también han emitido recomendaciones para el control de este compuesto, como la “Guía para la industria” de la Administración de Alimentos y Medicamentos americana (FDA) en 2016, que incluía estrategias para ayudar a los productores, fabricantes y operadores de la industria alimentaria a reducir la formación de acrilamida (FDA, 2016). En el caso de España, deben mencionarse las recomendaciones a nivel nacional para reducir la formación de acrilamida durante el cocinado de los alimentos, elaboradas en 2015 por la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN, actualmente AESAN), posteriormente revisadas y actualizadas en 2018 (AECOSAN, 2018).

2.8. Estrategias de mitigación

Las medidas de mitigación engloban una serie de procedimientos aplicados durante el procesado industrial de los alimentos y tienen como objetivo mantener los niveles de acrilamida por debajo de los valores de referencia establecidos por la legislación europea. Según el Reglamento 2158/2017, las técnicas de mitigación se centran en la aplicación de prácticas de higiene correctas y de procedimientos basados en los principios del análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) (Reglamento (UE) 2017/2158). La **Figura 10** muestra un resumen de las medidas de mitigación

implementadas en dicho reglamento y las recomendaciones de la “Caja de Herramientas de Acrilamida” para distintas matrices alimentarias (Reglamento (UE) 2017/2158; FDE, 2019).

A nivel industrial, la reducción de acrilamida se puede alcanzar con una correcta selección de las materias primas, es decir, teniendo en cuenta su composición en precursores. Aquellas variedades vegetales con un bajo contenido en asparagina y azúcares reductores (fructosa y glucosa) serán las más adecuadas. Para ello, inicialmente se deben controlar las condiciones de cultivo de la materia prima y posteriormente su almacenamiento en condiciones óptimas.

Las formulaciones pueden controlarse modificando las recetas culinarias mediante la sustitución de ingredientes o la adición de diversos compuestos que favorezcan una menor formación de la acrilamida, tales como:

- Sustitución de ingredientes como harina de trigo por otros cereales con menor contenido en asparagina; el bicarbonato de amonio por bicarbonato de sodio y acidulantes o ácidos orgánicos; o la fructosa por sacarosa.
- Adición de la enzima asparaginasa. Se trata de una enzima capaz de descomponer la asparagina en ácido aspártico y amoníaco, evitando así que reaccione con los azúcares para generar acrilamida (Pedreschi y col., 2008). Se han descrito reducciones de acrilamida entre un 60-90% en algunos productos de pastelería que parten de elaboración de masas tratadas con dicha enzima (Kukurová y col., 2009).
- Adición de compuestos que modifiquen las condiciones de la reacción, como el pH. Como se ha mencionado anteriormente, para la formación de acrilamida el pH óptimo debe ser próximo a 8, por tanto, la acidificación del medio de reacción va a favorecer tanto la ralentización de la formación del compuesto (por la protonación del grupo amino de la asparagina) como su eliminación (Mesías y col., 2019a).
- Adición de compuestos que compitan con los precursores, como por ejemplo la glicina y la cisteína, que son aminoácidos competidores de la asparagina, y pueden también interaccionar posteriormente con la acrilamida bloqueándola a través de reacciones de adición de Michael (FDE, 2019).

La materia prima, además, puede someterse a distintos pretratamientos antes del cocinado, como: a) en el caso de la patata, el remojo en agua fría o caliente, o el escaldado, que inducen la lixiviación de los azúcares reductores, disminuyendo así su contenido y, por tanto, la formación de acrilamida en la fritura posterior; y b) en productos de panadería, el aumento del tiempo de fermentación permite una mayor acción de las levaduras y bacterias ácido-lácticas, que van a consumir significativamente los azúcares reductores, limitando la formación de acrilamida (Albedwawi y col., 2021). En relación al tratamiento térmico, se debe limitar la temperatura del procesado a un máximo de 175 °C durante la fritura y de 220 °C durante el horneado. Entre las técnicas alternativas de cocinado cabría destacar la fritura al vacío, que disminuye la temperatura de procesado del alimento (Pedreschi y col., 2014), pudiendo reducir hasta un 90% el contenido de acrilamida en las patatas fritas (Granda y col., 2004). Las nuevas tecnologías de cocinado, además de permitir el control de la formación de acrilamida, deben mantener las propiedades organolépticas originales del alimento, así como, la calidad microbiológica del producto final (Reglamento (UE) 2017/2158).

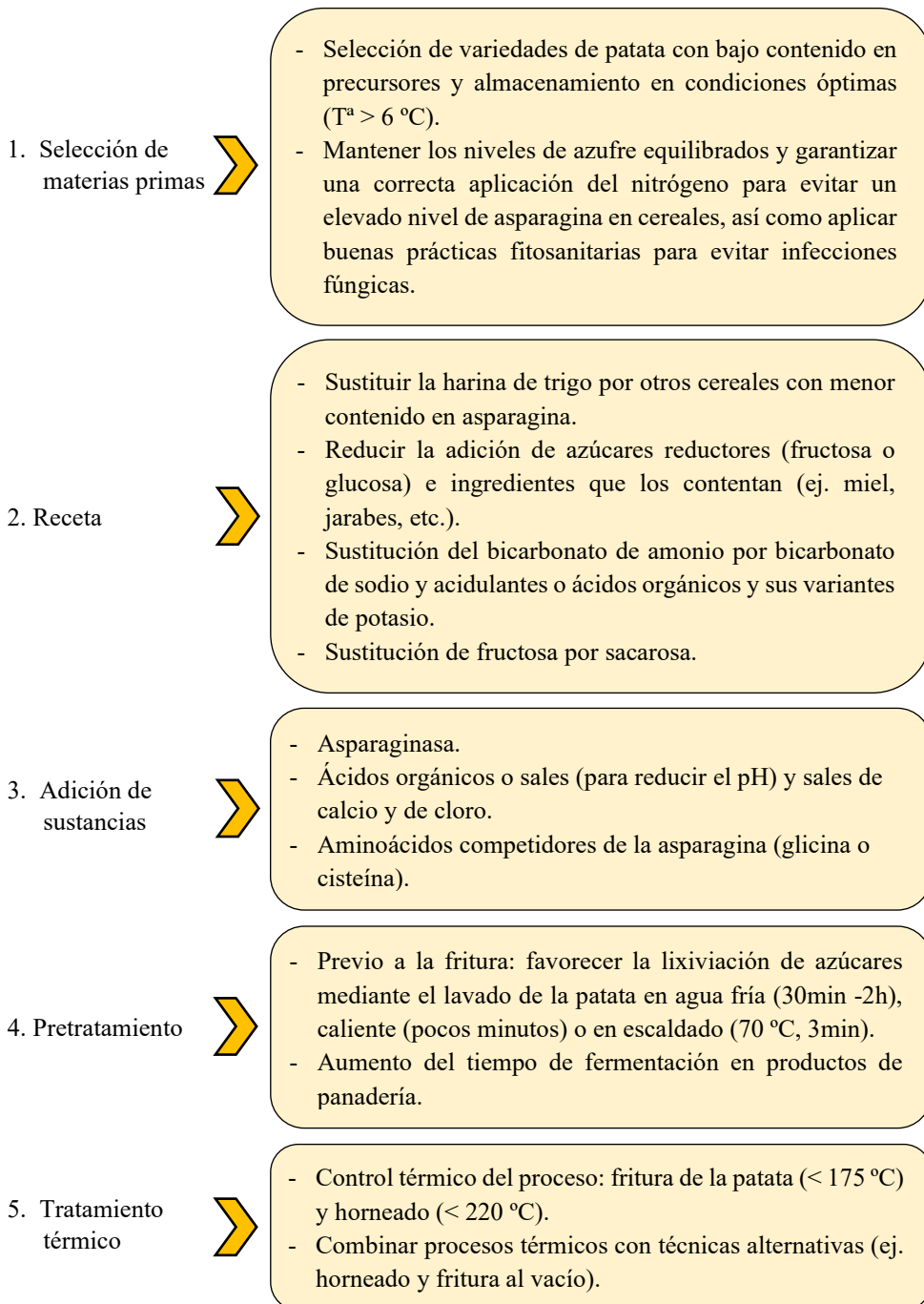


Figura 10. Esquema de las medidas de mitigación para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos (Reglamento (UE) 2017/2158; FDE, 2019).

Metodología

CAPÍTULO 1. Contenido de acrilamida en preparaciones culinarias representativas de la dieta española procedentes del entorno doméstico, la restauración colectiva y la industria alimentaria. Estudio 1

1.1. Diseño experimental

La forma de elaborar los alimentos difiere significativamente en función del manipulador, la tecnología/utensilios empleados y del entorno en el que tienen lugar las operaciones culinarias. Según la materia prima utilizada, su manipulación y las condiciones de dicho procesado (humedad, temperatura, tiempo de tratamiento, presión, etc.), que pueden ser diferentes en el ámbito doméstico, de restauración colectiva o industrial, los precursores de acrilamida presentes en la materia prima podrían dar lugar a distintas tasas de formación del compuesto. Partiendo de esta premisa, en este estudio se evaluó el contenido de acrilamida en preparaciones culinarias comúnmente consumidas en la dieta española procedentes de distintos ámbitos de elaboración de alimentos (doméstico, restauración colectiva e industria alimentaria). El objetivo final de esta investigación fue conocer la influencia de los diferentes tipos de manipulación y preparación de las materias primas en la formación del contaminante. Para ello se seleccionaron once alimentos procesados, habitualmente consumidos por la población general, y se dividieron en tres grupos:

- a) Alimentos con base patata: patatas fritas y tortilla de patatas.
- b) Alimentos con base cereal: torrijas y bizcocho.
- c) Alimentos de composición mixta, compuestos por una base de cereal a la que se incorpora carne, pescado y/o verduras: filetes empanados, san jacobó, pizza, empanadillas, empanadas, migas y croquetas.

Cinco muestras de cada alimento seleccionado, representativas del entorno doméstico, de la restauración colectiva y del entorno industrial, fueron elaboradas o adquiridas entre los meses de septiembre y octubre de 2019 en los siguientes ámbitos culinarios (**Figura 11**):

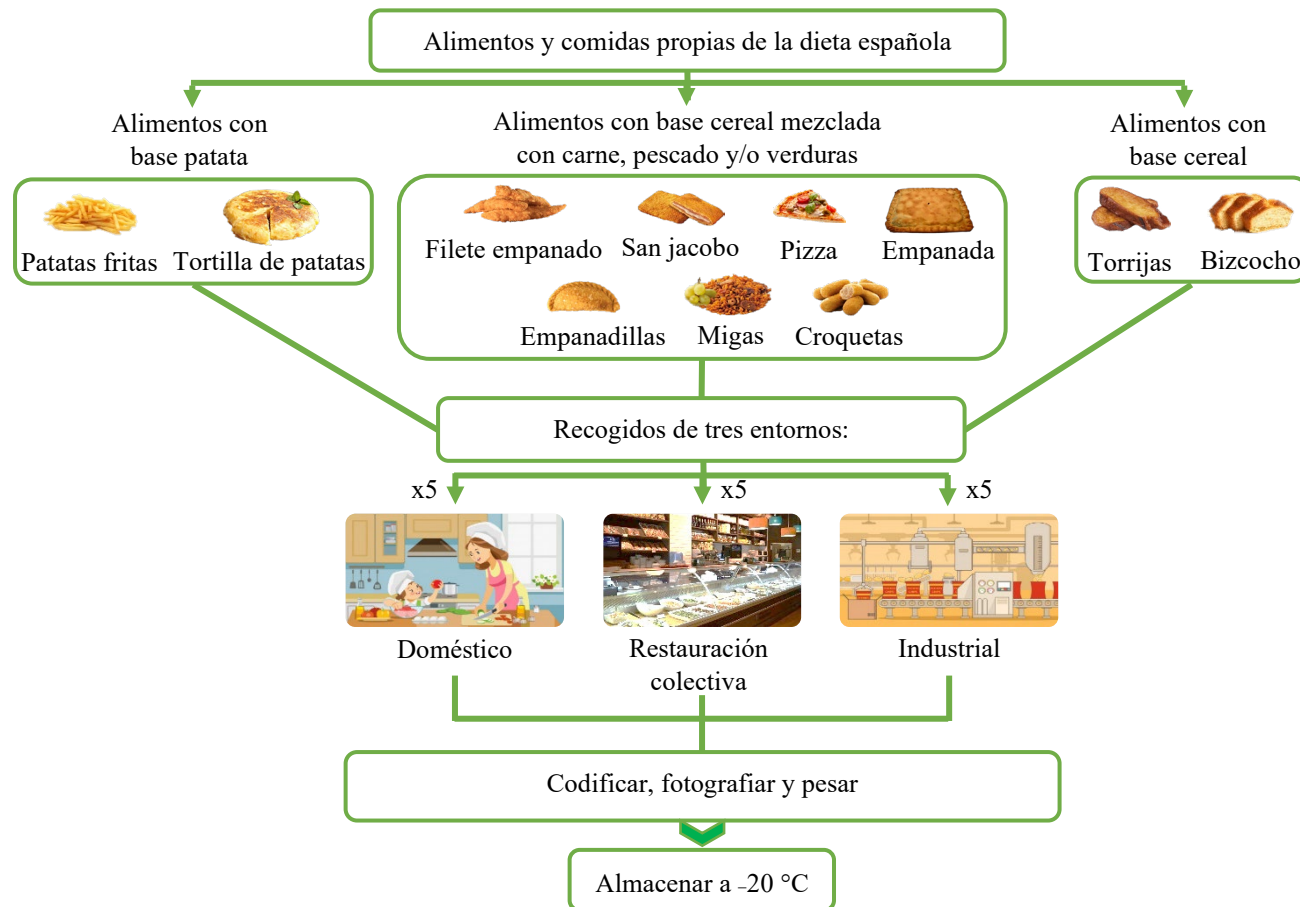


Figura 11. Diseño experimental de la recogida de alimentos procesados de distintos entornos culinarios.

- Doméstico: cinco voluntarios prepararon los alimentos en sus casas siguiendo su metodología de cocinado habitual, sin restricciones en cuanto a la manipulación previa al cocinado o la selección del alimento fresco, ni respecto a las técnicas aplicadas o condiciones del cocinado.
- Restauración colectiva: en este entorno se incluyó a bares, cafeterías y restaurantes, así como establecimientos de comida para llevar. Cada alimento seleccionado se adquirió en cinco establecimientos diferentes.
- Industrial: se obtuvieron alimentos precocinados o listos para el consumo de cinco supermercados, considerando diferentes marcas comerciales. Los alimentos precocinados se prepararon siguiendo las instrucciones indicadas en cuanto a la técnica (horneado y fritura) y modo de cocinado (tiempo, temperatura y/o potencia del electrodoméstico).

Tras la adquisición, las muestras se codificaron, fotografiaron y pesaron. Todas las preparaciones se trituraron y almacenaron a -20 °C hasta llevar a cabo el análisis de acrilamida.

1.2. Determinación de acrilamida por LC-ESI-MS/MS

Para determinar el contenido de acrilamida en los alimentos se pesaron 2 g de cada muestra y se añadieron 37,6 mL de agua mili-Q, 4 mL de hexano y 400 µL de una solución metanólica de [¹³C₃]-acrilamida de concentración 5 µg/mL utilizada como estándar interno. Tras agitar durante 15 minutos (Ultra Turrax, IKA, Mod-T10 basic), se añadió 1 mL de las soluciones Carrez I (15 g de ferrocianuro de potasio/100 mL de agua) y Carrez II (30 g de acetato de zinc/100 mL de agua), y se centrifugaron las muestras a 9000 x g y 4 °C durante 10 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se retiró el hexano y los sobrenadantes se pasaron por filtros de 0,45 µm y de 0,22 µm. El sobrenadante filtrado se clarificó introduciendo una alícuota de 1 mL en cartuchos Oasis-HLB, previamente acondicionados con metanol y agua destilada. Se descartaron las primeras gotas y se recogió el resto en viales ámbar de cromatografía.

Tanto las muestras como la recta de calibración (1-100 ng/mL) se analizaron en un equipo Agilent 1200 de cromatografía líquida acoplado a un detector de masas

triple cuadrupolo (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La separación analítica se llevó a cabo inyectando 5 μL de la muestra en una columna Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm, 5 μm ; GL Sciences Inc.) a 30 $^{\circ}\text{C}$ con una fase móvil de ácido fórmico al 0,02%, flujo de 1 mL/min y elución isocrática. Bajo estas condiciones cromatográficas, la acrilamida eluyó a los 6,1 min. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador (12,0 L/min) y la temperatura de la fuente se estableció en 350 $^{\circ}\text{C}$.

En la cuantificación de la acrilamida se utilizaron las transiciones m/z 72,1– m/z 55,1 para identificar la acrilamida y m/z 75,1– m/z 58,1 para la [$^{13}\text{C}_3$]-acrilamida, con 76 V para la fragmentación y una energía de colisión de 9 V en el primer caso y 8 V en el segundo. Los límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD) se calcularon a través de la inyección de concentraciones diluidas de las soluciones estándar, obteniendo un LOD de 4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y un LOQ de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los análisis se realizaron por duplicado.

1.3. Ingesta de acrilamida en diferentes ámbitos culinarios

Para estimar la ingesta de acrilamida a través del consumo de alimentos cocinados en distintos ámbitos culinarios, se multiplicó el peso medio de la ración de cada alimento o comida (g/ración) por su contenido de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$). A partir de estos datos, se comparó (1) la ingesta en cada grupo de alimentos según el ámbito culinario del que procedía (doméstico, restauración colectiva o industrial), y (2) la ingesta dentro de un mismo ámbito culinario teniendo en cuenta todos los alimentos preparados en ese entorno. Considerando que todos los alimentos seleccionados eran susceptibles de tener cantidades de acrilamida detectables, en aquéllos en los que el contenido fue inferior al límite de cuantificación ($<15 \mu\text{g}/\text{kg}$), se consideró que la presencia del compuesto era la mitad del LOQ (7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), en línea con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2003).

1.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron los programas estadísticos SPSS (versión 26) (International Business Machines, S.A., Madrid, Spain) y Statgraphics (Centurión XVI.I) (Statgraphics Technologies, The plains, Virginia,

USA). La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov y para la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Levene. Las comparaciones múltiples se realizaron con un análisis de varianza de una vía (prueba ANOVA) o Kruskal-Wallis si las muestras no tenían una distribución normal, seguidas de un tratamiento post-hoc de contraste según la prueba de comparación múltiple de Scheffe, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

CAPÍTULO 2. Evaluación de la exposición a acrilamida en diferentes entornos de restauración colectiva mediante estudios de dieta duplicada. Estudios 2-5

2.1. Diseño experimental

Con objeto de evaluar la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en el entorno de la restauración colectiva, se realizó un estudio de dietas duplicadas recogiendo, durante dos semanas consecutivas (de lunes a viernes), los menús elaborados en comedores de:

- Centros escolares: **Estudio 2.**
- Centros universitarios: **Estudio 3.**
- Centros de trabajo: **Estudio 4.**
- Centros de mayores: **Estudio 5.**

El análisis de cada colectividad permitió estimar la exposición en distintos grupos poblacionales, abarcando escolares (población infantil-juvenil), universitarios, adultos y personas de avanzada edad. Los menús recogidos en las distintas colectividades se pueden observar en la **Tabla 6.**

Tabla 6. Menús recogidos en los comedores de cada colectividad.

Colectividades	Menús recogidos			
	Desayuno	Almuerzo	Merienda	Cena
Centros escolares	●	●	-	-
Centros universitarios	-	●	-	-
Centros de trabajo	-	●	-	-
Centros de mayores	●	●	●	●

Comedores de centros escolares

Se reclutaron dos centros escolares, uno en Madrid y otro en Guadalajara, gracias a la colaboración con la Dirección General de Salud Pública de Castilla-La Mancha. En coordinación con los responsables de los comedores de los colegios, se recogieron todos los alimentos y comidas que se proporcionaron en el menú del desayuno y el almuerzo de cada centro. Los investigadores conocieron previamente la planificación de los menús, lo cual permitió codificar envases para la recogida de cada alimento/comida. Los envases fueron enviados desde el ICTAN a los centros escolares a través de una empresa de mensajería, que igualmente entregó las muestras a los investigadores una vez fueron recogidas por los responsables de las cocinas escolares. El estudio estuvo inicialmente planificado para los meses de febrero (primer colegio) y marzo de 2020 (segundo colegio). Sin embargo, debido a la pandemia por Covid-2019, la recogida del segundo colegio tuvo que retrasarse hasta mayo de 2021.

Comedores de centros universitarios

Se seleccionaron dos comedores universitarios de la Comunidad de Madrid y, conociendo previamente la planificación de los menús, los investigadores codificaron envases en los que se recogieron todos los alimentos y comidas que se proporcionaron en el menú del almuerzo durante dos semanas de marzo de 2020, incluyendo primer plato, segundo plato, guarnición, postre y pan. Cuando la guarnición incluía *ensalada* o *patatas fritas*, se seleccionaron ambas opciones para estimar distintos escenarios de exposición a acrilamida: un escenario de menor exposición (considerando siempre la opción *ensalada* como guarnición) y un escenario de mayor exposición (considerando siempre la opción *patatas fritas* como guarnición).

Comedores de centros de trabajo

Se seleccionaron dos comedores de centros de trabajo de la Comunidad de Madrid, en los que los investigadores recogieron todos los alimentos y comidas que se proporcionaron en el menú del almuerzo durante dos semanas en los meses de enero y febrero de 2020. En la primera colectividad, se recogieron dos opciones para cada

plato que componía el menú (primer plato, segundo plato, postre y pan) teniendo en cuenta la oferta del comedor y considerando así 16 combinaciones posibles por día, con el fin de estimar la exposición a acrilamida según la opción seleccionada por el usuario. En la segunda colectividad, se recogió la única opción de menú ofertada diariamente por el comedor.

Comedores de centros de mayores

Para este estudio se reclutaron dos centros de mayores de Toledo, de nuevo gracias a la colaboración con la Dirección General de Salud Pública de Castilla-La Mancha. El procedimiento fue similar a la recogida de los centros escolares descrito anteriormente, viéndose igualmente afectado por la pandemia por Covid-19. En coordinación con los responsables de los comedores, y a través de una empresa de mensajería, los investigadores recibieron todos los alimentos y comidas que se proporcionaron en el menú del desayuno, almuerzo, comida y cena de cada centro en el mes de febrero de 2020 (primer centro) y, en el mes de diciembre de 2021 (segundo centro). Puesto que las personas mayores alojadas en los centros realizan allí toda su ingesta de alimentos, fue posible llevar a cabo una evaluación de la exposición a acrilamida en la dieta total de este colectivo.

2.2. Tratamiento de las muestras

Una vez recibidos todos los alimentos y comidas en las instalaciones del ICTAN, se codificaron, fotografiaron y pesaron. Cuando fue necesario, se separaron las porciones no comestibles y se volvieron a pesar para obtener el peso final de la porción comestible. Todas las muestras se trituraron y almacenaron a -20 °C hasta llevar a cabo el análisis de acrilamida.

La **Figura 12** muestra un esquema del diseño experimental de la recogida de menús de cada colectividad.

Recogida de las dietas duplicadas

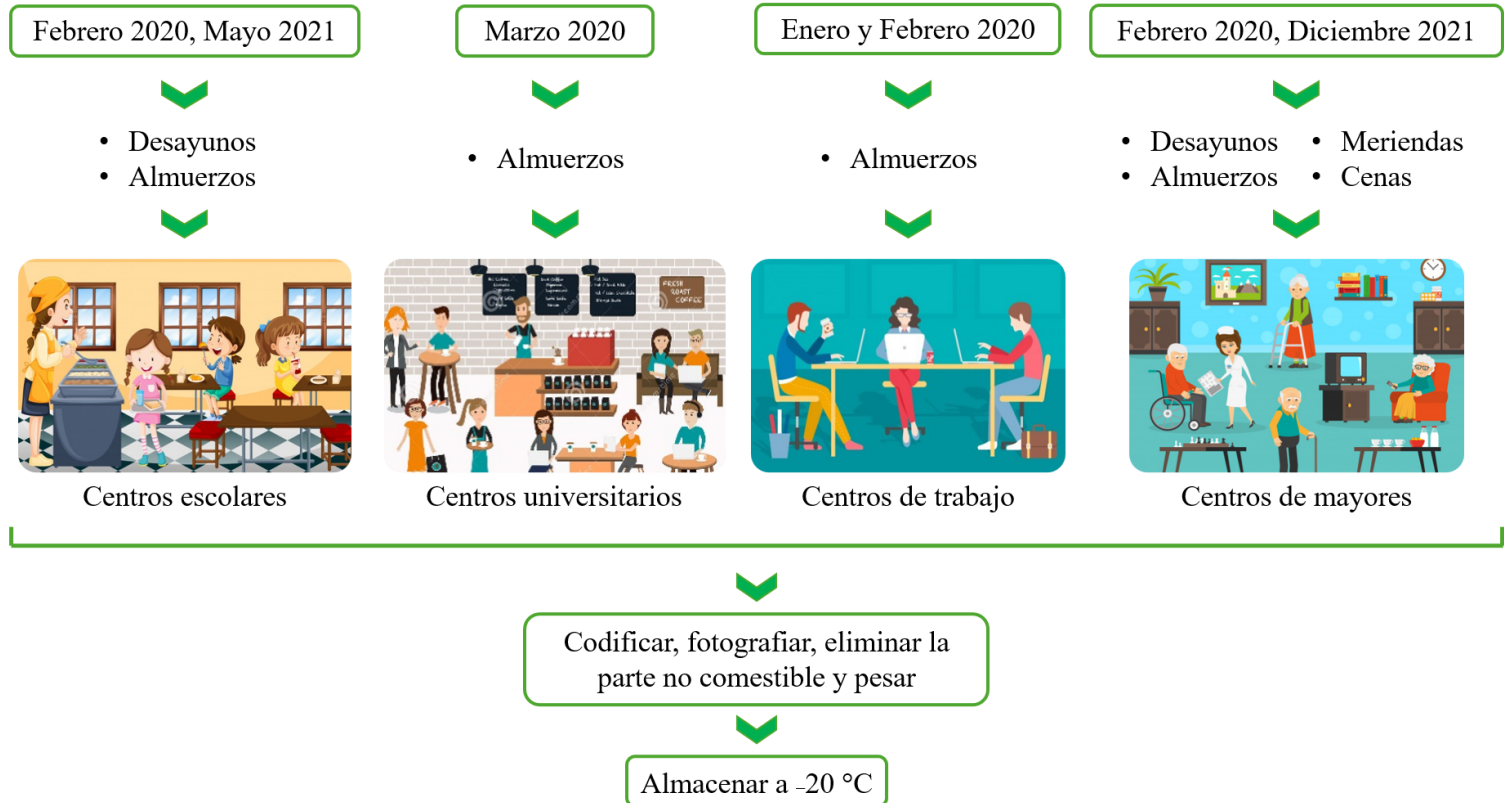


Figura 12. Diseño experimental de la recogida de menús en las distintas colectividades.

2.3. Determinación del contenido de acrilamida por LC-ESI-MS/MS

El contenido de acrilamida de las muestras recogidas en cada uno de los comedores de la restauración colectiva se determinó según el método descrito en el capítulo anterior.

2.4. Evaluación de la ingesta de acrilamida y la exposición diaria

Para evaluar la ingesta de acrilamida y la exposición diaria en los comedores de centros escolares, de trabajo y de mayores se estimaron dos escenarios, uno de menor exposición o límite inferior (Lower Bound, LB) y otro de mayor exposición o límite superior (Upper Bound, UB). En el escenario de menor exposición, aquellos alimentos procesados con niveles de acrilamida inferiores al límite de cuantificación (<LOQ) se consideraron como 0, mientras que en el escenario de mayor exposición se les asignó el valor del LOQ (15 µg/kg) para estudiar ambos extremos, en línea con las recomendaciones de la EFSA (EFSA, 2015). En ambos escenarios, a los alimentos consumidos en fresco, no sometidos a tratamiento térmico, se les asignó un valor de 0 para evitar la sobreestimación de la exposición total al contaminante. En el caso de los comedores de los centros universitarios, los escenarios de exposición planteados estimaron una menor o mayor ingesta diaria dependiendo de la elección del consumidor en cuanto a la guarnición del menú: *ensalada* (libre de acrilamida) o *patatas fritas* (con probable presencia de acrilamida). Respecto a los comedores de centros de trabajo, en el centro de trabajo 1 se estimaron rangos de ingesta en valores mínimos y máximos para poder abarcar todas las posibles combinaciones de alimentos y comidas recogidas en los menús diarios; mientras que en el centro de trabajo 2 se calcularon los valores de ingesta diaria como la suma de los aportes de cada plato del menú de cada día.

La estimación de la exposición a acrilamida se llevó a cabo a través de una aproximación determinística, basándonos en el consumo de alimentos y el contenido del contaminante. La contribución individual de cada alimento/comida a la ingesta de acrilamida se calculó combinando su concentración de acrilamida con el peso de la porción comestible de cada ración. Para calcular la exposición diaria en cada colectividad, se realizó un sumatorio del aporte de acrilamida de todos los

alimentos/comidas consumidas cada día. A partir de la ingesta diaria se estimó la media para todo el período de recogida de menús en cada uno de los escenarios de exposición planteados, salvo en el comedor del centro de trabajo 1, en el cual se estimó un intervalo entre el valor mínimo y el valor máximo. Los resultados se dividieron por el peso corporal de cada grupo poblacional, tal y como se muestra en la **ecuación 1**.

Ecuación 1.

$$\text{Exposición Dietética} = \Sigma \frac{\text{Consumo diario} \left(\frac{\text{kg}}{\text{día}} \right) \times \text{Contenido de acrilamida} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right)}{\text{Peso corporal (kg)}}$$

Se aplicaron valores de peso corporal según datos obtenidos de la bibliografía para cada franja de edad. Para el colectivo infantil-juvenil se diferenciaron 3 grupos (preescolar, primaria y preadolescente), teniendo en cuenta los rangos de edad de los estudiantes que usan el servicio de comedor en los centros educativos (3-12 años) (**Tabla 7**) (Fernández y col., 2011).

Tabla 7. Pesos estimados para los usuarios de los comedores de centros escolares.

Clasificación	Rangos de edad (años)	Pesos medios (kg)
Preescolar	3-5	19
Primaria	6-9	27
Preadolescente	10-12	40

En el caso de los universitarios, adultos y personas de avanzada edad, se hizo una distinción de sexo para los valores de los pesos corporales (**Tabla 8**) (Aranceta-Bartrina y col., 2016; Aranceta-Bartrina y col., 2020; Pérez-Rodrigo y col., 2022). En resumen, se estimó la exposición a acrilamida: (1) en la población infantil-juvenil que consume el desayuno y el almuerzo en los comedores escolares; (2) en el colectivo universitario que consume el almuerzo en comedores de centros universitarios; (3) en la población adulta que consume el almuerzo en comedores de

centros de trabajo; (4) en las personas de avanzada edad que consumen su dieta completa en los centros de mayores.

Tabla 8. Pesos estimados para los usuarios de los comedores de las distintas colectividades.

	Colectividad					
	Centros universitarios		Centros de trabajo		Centros de mayores	
Rangos de edad (años)	18-24		25-64		≥ 65	
Sexo	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
Pesos medios (kg)	77	60	82	67	81	72

Aranceta-Bartrina y col. (2016), Aranceta-Bartrina y col. (2020), Pérez-Rodrigo y col. (2022).

2.5. Caracterización del riesgo asociado a la exposición a acrilamida

La caracterización del riesgo asociado a la exposición a acrilamida se llevó a cabo mediante el cálculo del margen de exposición (MOE) para efectos neurológicos y efectos neoplásicos (**ecuación 2**) (EFSA, 2012c). Este índice establece una comparación entre el BMDL₁₀ para dichos efectos y la exposición diaria a acrilamida. Para efectos neurológicos se tomó como referencia un valor de BMDL₁₀ de 430 µg/kg pc/día, dosis relacionada con el desarrollo de cambios neurológicos en ratas. Para efectos neoplásicos, se tomó como referencia un valor de BMDL₁₀ de 170 µg/kg pc/día, dosis relacionada con el desarrollo de tumores en ratones.

Ecuación 2.

$$\text{MOE} = \frac{\text{BMDL}_{10} (\mu\text{g/kg pc/día})}{\text{Exposición} (\mu\text{g/kg pc/día})}$$

2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó utilizando el software estadístico Statgraphics Centurión XVII.I. Para las comparaciones múltiples se utilizó el análisis de la varianza de una vía (prueba ANOVA) seguida del test de Tukey HSD.

En la comparación de dos muestras independientes se llevó a cabo el test t-Student. En todos los casos la normalidad de los datos se midió mediante la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas se comprobó a través del test de Levene. Todos los parámetros estadísticos se evaluaron asumiendo un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 3. Estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de la acrilamida y efecto de la fermentación colónica. Estudios 6 y 7

3.1. Diseño experimental de la evaluación de la bioaccesibilidad gastrointestinal de la acrilamida en alimentos individuales y comidas completas en las distintas etapas de la digestión gastrointestinal. Estudio 6

Para estudiar la bioaccesibilidad de la acrilamida durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, se seleccionaron alimentos individuales ricos en acrilamida y platos que contenían ese mismo alimento acompañado de otros que no son considerados fuente del contaminante en la dieta. El objetivo fue estudiar las posibles interacciones entre las matrices alimentarias. Como alimentos individuales se seleccionaron productos con base cereal (galletas y cereales de desayuno) o con base patata (patatas fritas y patatas “a lo pobre”), como fuentes principales de exposición a acrilamida. En las comidas completas estuvieron presentes los alimentos mencionados, ricos en carbohidratos, acompañados de otros que son fuente de proteína (leche, yogurt, carne o huevo).

Los derivados de cereales, los lácteos, las patatas frescas, los huevos y la carne de ternera fueron adquiridos en supermercados locales. El cocinado de las patatas fritas y las patatas “a lo pobre” se llevó a cabo en la cocina experimental del ICTAN, así como el de los platos combinados que contenían filete a la plancha y las patatas “a lo pobre” con huevo revuelto, siempre simulando la manipulación, utensilios y técnicas de cocinado domésticas.

Las combinaciones de alimentos se hicieron en la proporción en la que se encontrarían en un plato real (**Tabla 9**), considerando las raciones medias de cada producto propuestas por Ruiz López y Artacho Martín-Lagos (2010).

Tabla 9. Proporciones de cada alimento individual en las comidas completas.

Comida completa	Proporción
<u>Cereales de desayuno con yogur desnatado</u>	
Cereales	1
Yogur	2
<u>Galletas con leche desnatada</u>	
Galletas	1
Leche	2,5
<u>Patatas fritas con filete de ternera</u>	
Patatas fritas	3
Filete de ternera	2
<u>Patatas “a lo pobre” con huevos revueltos</u>	
Patatas “a lo pobre”	1
Huevos revueltos	1

Una vez se adquirieron y/o elaboraron las muestras de alimentos individuales y comidas completas, se codificaron, fotografiaron y pesaron. Puesto que estos productos y sus elaboraciones eran íntegramente porción comestible, tras su preparación, simplemente se trituraron y almacenaron a -20 °C hasta los análisis de acrilamida y la realización de las digestiones *in vitro*.

La **Figura 13** muestra esquemáticamente los alimentos individuales y las comidas completas que los contuvieron.

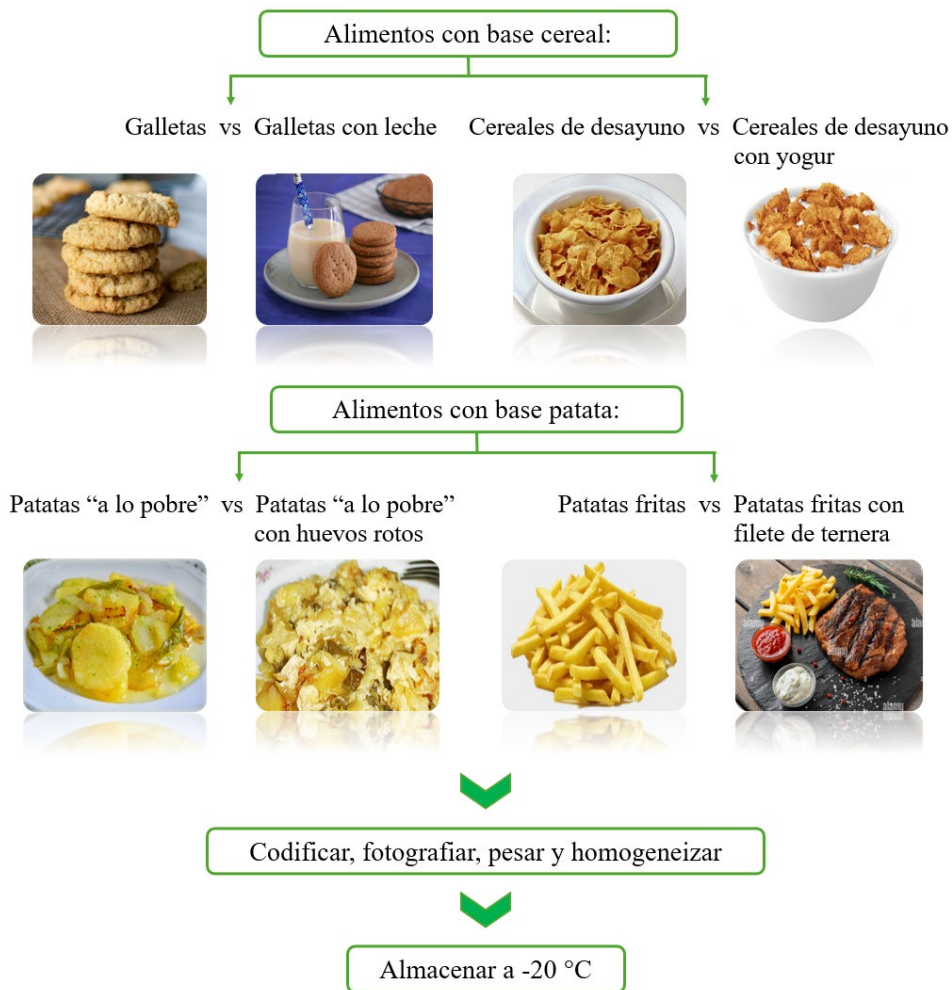


Figura 13. Esquema de los sistemas de alimentos utilizados para el ensayo de bioaccesibilidad.

Digestión gastrointestinal *in vitro*

Los alimentos aislados y las comidas completas se digirieron por triplicado siguiendo el protocolo estandarizado internacionalmente INFOGEST, descrito por Egger y col. (2016). El método INFOGEST se compone de una fase oral, una fase gástrica y una fase intestinal. Los fluidos salival (SSF), gástrico (SGF) e intestinal (SIF) simulados se prepararon a una concentración de 1.25x de los niveles fisiológicos, utilizando para ello soluciones de distintos electrolitos que se mezclan en las proporciones indicadas

en la **Tabla 10**. Cuando estos fluidos simulados concentrados se combinan con las soluciones de enzimas empleadas en el proceso de digestión, los electrolitos llegan a sus concentraciones fisiológicas.

Para evaluar el efecto de la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida es necesario idear un diseño experimental que mantenga constante la cantidad de acrilamida en el sistema de digestión. De esta forma podremos, por una parte, observar el comportamiento aislado de la acrilamida en un alimento individual y por otra, analizar cómo afecta la presencia de una matriz alimentaria rica en proteína a la bioaccesibilidad de esa cantidad fija de contaminante. Para llevar a cabo este diseño experimental, en el procedimiento de digestión se pesaron 5 g de las muestras de comidas completas, cantidad máxima de alimento fresco que puede digerirse en este método. En el caso de los alimentos aislados, la porción digerida se correspondió con la cantidad en la que se encontraba cada alimento aislado en los 5 g de comida completa, añadiendo agua destilada hasta alcanzar los 5 g. De esta manera se logró mantener los mismos niveles iniciales de acrilamida en la digestión del alimento aislado y de la comida completa, manteniendo también la concentración de enzimas y de electrolitos. Además de realizar la digestión gastrointestinal *in vitro* completa, para observar el comportamiento de la acrilamida durante las diferentes etapas, el proceso digestivo se detuvo tras la fase oral y la fase gástrica. Se prepararon también blancos de digestión, empleando 5 mL de agua destilada en lugar de alimento, que se sometieron al mismo procedimiento digestivo, con las mismas adiciones de enzimas y electrolitos, con el propósito de descartar que las enzimas pudieran contener restos de acrilamida.

Tabla 10. Volúmenes de las soluciones stock de electrolitos utilizadas para preparar los fluidos digestivos simulados en un volumen de 400 mL diluidos en agua y con una concentración 1.25x.

Solución salina		unidades	KCl	KH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	NaCl	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	(NH ₄) ₂ CO ₃	HCl	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂
Stock	(g/L)		37,3	68	84	117	30,5	48		44,1
	M		0,5	0,5	1	2	0,15	0,5	6	0,3
SSF	Stock	mL	15,1	3,7	6,8	-	0,5	0,06	0,09	0,025
	Concentración salina final	mM	15,1	3,7	13,6	-	0,15	0,06	1,1	1,5
SGF	Stock	mL	6,9	0,9	12,5	11,8	0,4	0,5	1,3	0,005
	Concentración salina final	mM	6,9	0,9	25	47,2	0,12	0,5	15,6	0,15
SIF	Stock	mL	6,8	0,8	42,5	9,6	1,1	-	0,7	0,04
	Concentración salina final	mM	6,8	0,8	85	38,4	0,33	-	8,4	0,6

SSF: fluido salival simulado; SGF: fluido gástrico simulado; SIF: fluido intestinal simulado. Fuente: Brodkorb y col. (2019)

Para todas las muestras se siguieron los siguientes pasos, mostrados en la **Figura 14**:

- En la fase oral, las muestras se mezclaron con 4,5 mL de SSF (sin α -amilasa) incluyendo 25 μ L de cloruro cálcico (CaCl_2) 0,3 M para obtener una consistencia pastosa. Posteriormente, se sonicó la mezcla para sustituir la adición de la enzima lipasa en la fase intestinal y, de esta forma, facilitar la accesibilidad de los lípidos en los pasos siguientes del protocolo de digestión *in vitro* (Teixeira y col., 2022). A continuación, se añadieron 0,5 mL de una solución con la enzima α -amilasa (75 U α -amilasa/mL SSF) y se incubaron las mezclas a 37 °C durante 2 min en constante agitación, simulando la masticación.
- En la fase gástrica, se añadieron 10 mL de SGF conteniendo 5 μ L de CaCl_2 0,3 M y pepsina, ajustándose el pH a 3,0 con HCl 1 M y alcanzándose una concentración final de pepsina de 2000 U/mL en el tubo de digestión. Seguidamente, las muestras se incubaron de nuevo a 37 °C durante 2 h con agitación constante.
- Para simular la fase intestinal, se añadieron 20 mL de SIF que contenía pancreatina, sales biliares y 40 μ L de CaCl_2 0,3 M, y se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido sódico (NaOH) 1 M. Las concentraciones finales de pancreatina y sales biliares en el tubo de digestión fueron 13,37 mg/mL y 10 mM, respectivamente. Esta mezcla se incubó a 37 °C en constante agitación durante 2 h, tras lo cual se congeló rápidamente en nitrógeno líquido para detener las reacciones enzimáticas y se almacenó a -20 °C.

Tras un mínimo de una noche en congelación, las digestiones se descongelaron y se centrifugaron a 4 °C y 3220 g durante 45 min para separar la fracción bioaccesible (soluble) y no bioaccesible (insoluble), que volvieron a congelarse a -80 °C para ser liofilizadas y, posteriormente, determinar su contenido en acrilamida.

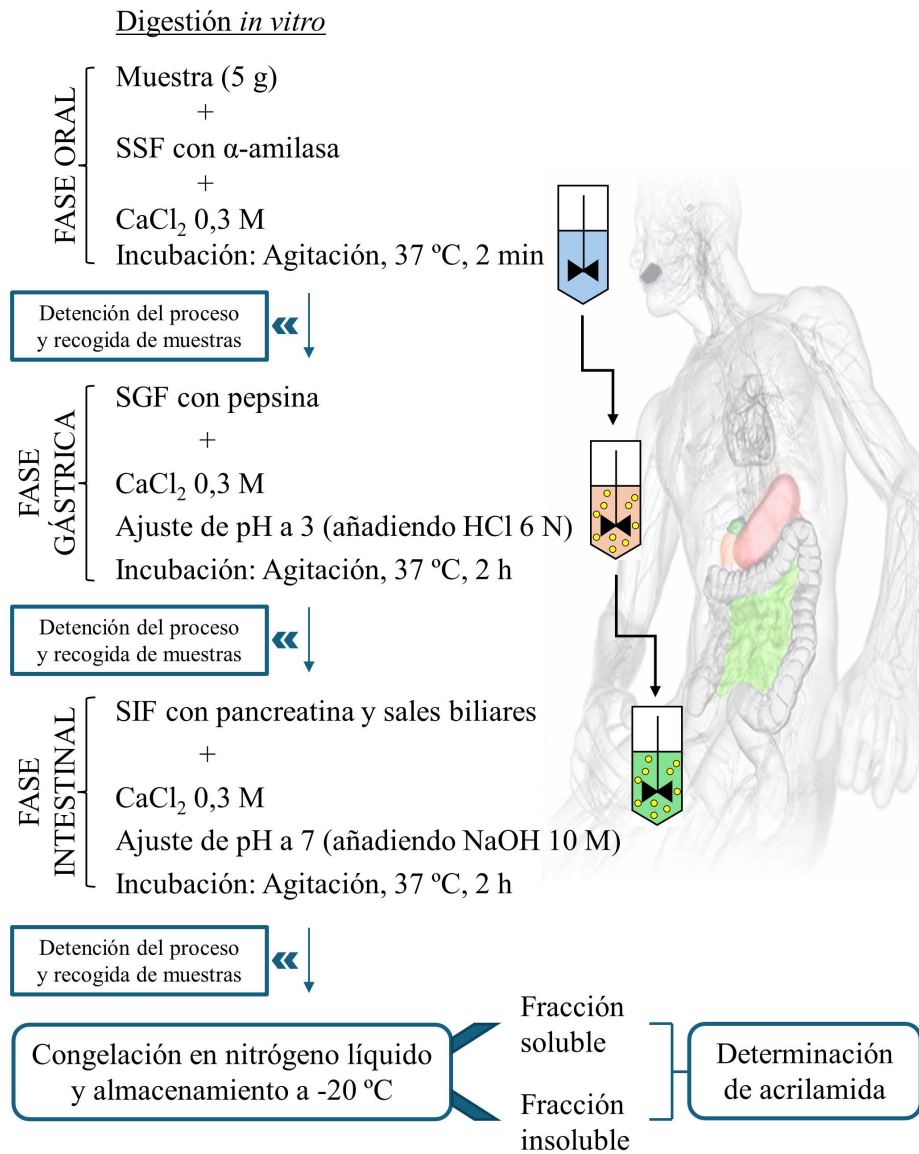


Figura 14. Esquema del procedimiento de la digestión *in vitro* de alimentos individuales y comidas completas.

3.2. Diseño experimental de la evaluación de la bioaccesibilidad total de la acrilamida en snacks fritos mediante digestión gastrointestinal acoplada a fermentación colónica *in vitro*. Estudio 7

Para llevar a cabo el estudio de la bioaccesibilidad total de acrilamida (digestión gastrointestinal acoplada a fermentación colónica) es necesario partir de cantidades apropiadas del contaminante en el residuo insoluble (fracción no bioaccesible) tras la digestión del alimento. De esta manera, cuando el residuo se someta a la acción de la microbiota durante el proceso fermentativo, se podrá disponer de cantidades detectables del contaminante en caso de ser liberado tras la fermentación colónica. Así, para este diseño experimental fue necesario partir de alimentos que supusieran un aporte relevante de acrilamida y que, tras digestión gastrointestinal, pudieran ofrecer una fracción importante de acrilamida no bioaccesible. Por este motivo se seleccionó la categoría de snacks fritos, eligiendo el tradicional snack de patata frita junto a otros chips de vegetales, incluyendo chips de boniato, remolacha, zanahoria y yuca. Todos ellos fueron adquiridos en supermercados locales de la provincia de Granada, se codificaron, fotografiaron, homogeneizaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Sobre estas muestras se llevó a cabo un estudio preliminar de bioaccesibilidad de acrilamida tras digestión gastrointestinal, resultando adecuados los snacks de patata, boniato, remolacha y zanahoria para continuar con el proceso fermentativo. Debido a los bajos niveles de acrilamida no bioaccesible tras la digestión en los chips de yuca, se decidió descartar esta muestra para la realización de este ensayo. Los snacks seleccionados se incluyen en la **Figura 15**. La composición nutricional de los snacks se obtuvo a partir de la información proporcionada en el etiquetado.

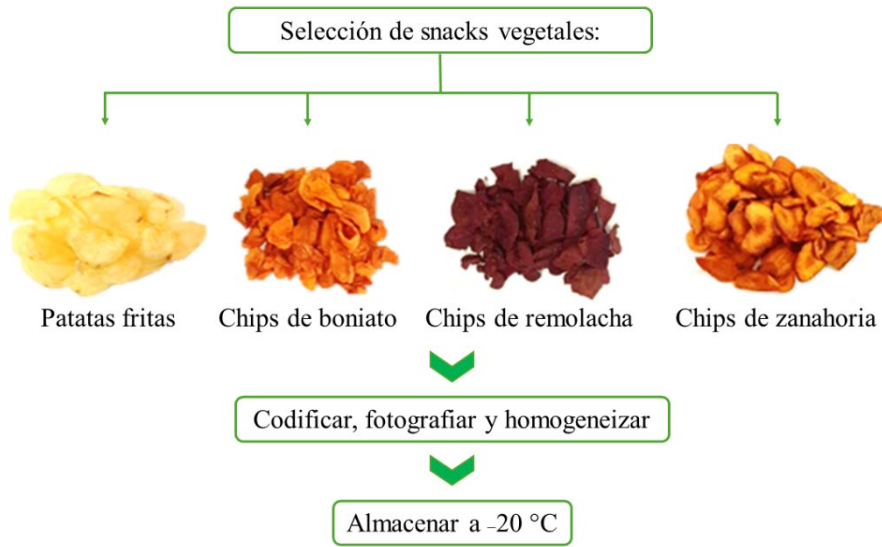


Figura 15. Snacks vegetales seleccionados para el estudio de bioaccesibilidad total de acrilamida acoplada a fermentación colónica.

Digestión y fermentación colónica *in vitro*

La digestión gastrointestinal *in vitro* de los cuatro tipos de snacks vegetales se realizó pesando 4 g de cada muestra y completando con agua destilada hasta los 5 g necesarios según el método establecido. El resto del procedimiento se llevó a cabo de la misma forma descrita en el punto 3.1 de este Capítulo, esta vez sin detener el proceso en cada etapa de la digestión.

Una vez finalizada la digestión gastrointestinal y separadas las fracciones soluble y no soluble (residuo sólido insoluble), como se muestra en la **Figura 16**, se llevó a cabo la fermentación *in vitro* utilizando el método de Pérez-Burillo y col. (2021).

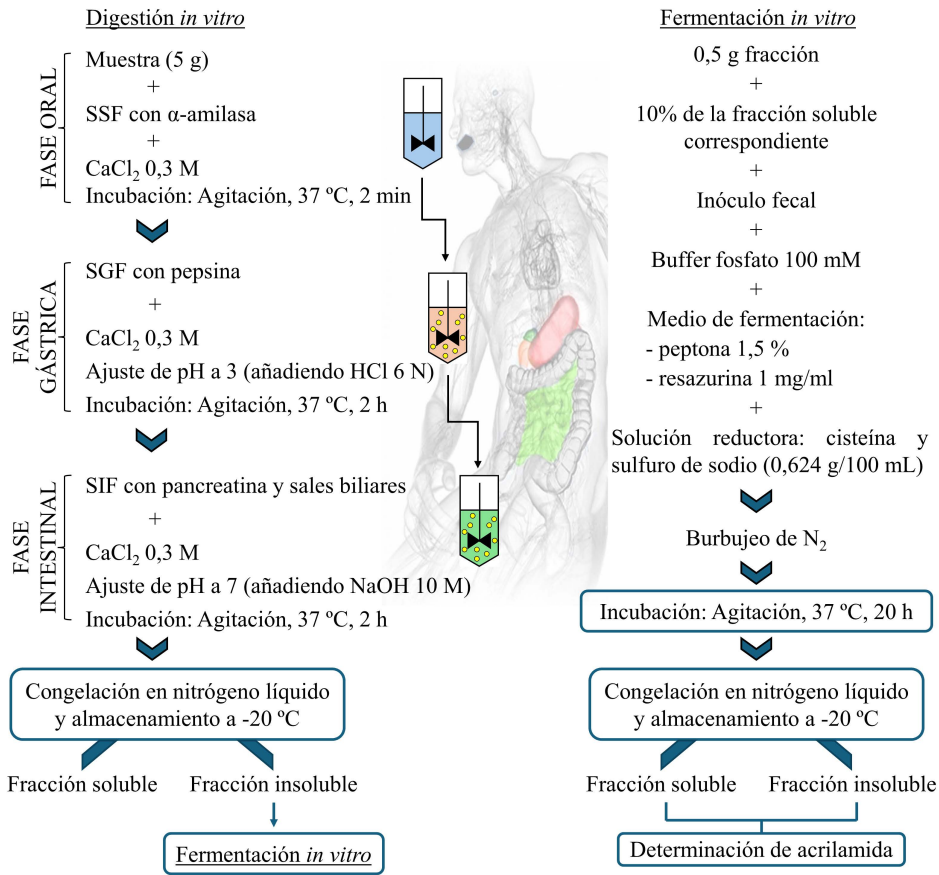


Figura 16. Esquema del procedimiento de la digestión *in vitro* de snacks vegetales acoplada a fermentación colónica

Para desarrollar un protocolo de fermentación colónica *in vitro* fue necesario contar con la colaboración de donantes de heces que proporcionen el inóculo para el proceso fermentativo. El estudio se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones éticas de la Declaración de Helsinki y la aprobación ética para el ensayo con heces humanas se obtuvo del Comité Ético de Investigación Humana perteneciente a la Universidad de Granada (España), con número de registro 1080. Las muestras de heces se obtuvieron de cuatro donantes de tres grupos poblacionales: niños (6 ± 1 años), adolescentes (13 ± 2 años) y adultos (38 ± 12 años). A cada voluntario se le entregó un folleto informativo junto con un consentimiento, que fue firmado por los participantes o los padres/tutores legales, en caso de los niños. Todos los donantes

estaban sanos, no padecían intolerancias alimentarias conocidas, tenían índices de masa corporal óptimos (rango 18,5–24,5 kg/m²) y seguían una dieta normal, sin haber tomado antibióticos en el último año. Las muestras fecales fueron donadas en la mañana del día del ensayo y las heces de cada donante del mismo grupo de edad se mezclaron y homogeneizaron para minimizar la variabilidad interindividual. El pool resultante se introdujo en contenedores estériles y se mantuvo a 4 °C hasta la preparación del inóculo. Se preparó un medio de fermentación con una solución de peptona 1.5% a pH 7 con resazurina (1 mg/mL) y posteriormente se autoclavó. Además, se preparó una solución reductora con cisteína (0,624 g/100 mL) y sulfuro de sodio (0,624 g/100 mL), que se añadió al medio de fermentación ya autoclavado, evitando de esta forma pérdidas de cisteína durante el tratamiento térmico. El inóculo fecal consistió en una solución al 32% de heces en buffer fosfato 100 mM a pH 7,0 estéril.

Considerando que, según Pérez-Burillo y col. (2021), el 10% de la fracción soluble obtenida tras el proceso digestivo pasa a la fermentación colónica junto con toda la fracción insoluble, se pesaron 0,5 g del residuo tras digestión y se le añadió la parte proporcional de fracción soluble en cada snack. Se adicionaron 7,5 mL del medio de fermentación y 2 mL del inóculo fecal y se burbujeó la muestra con N₂ para crear un ambiente anaeróbico. Posteriormente se incubaron las muestras a 37 °C durante 20 horas en agitación suave.

Para detener la actividad de la microbiota, las muestras se introdujeron en hielo picado inmediatamente después de finalizar las 20 horas de incubación y se centrifugaron a 4000 x g durante 10 min. El sobrenadante, que correspondería a la fracción soluble potencialmente absorbible en el colon tras la fermentación, y el precipitado, que representaría la fracción no absorbida tras la fermentación junto con células microbianas, fueron congelados a -80 °C, liofilizados y almacenados a 4 °C hasta la posterior determinación de acrilamida.

El procedimiento de fermentación colónica exige la manipulación de diferentes tipos de blancos. Por una parte, blancos de enzimas, que procedían de los blancos de digestión, es decir, digestiones que únicamente contenían 5 g de agua y las enzimas y fluidos gastrointestinales. Se manipularon de igual modo que el resto de los

digeridos de snacks, añadiendo el inóculo de heces de las distintas poblaciones consideradas. Este blanco es útil para conocer el efecto de las enzimas aisladas sobre la microbiota del inóculo. Por otra parte, es necesario conocer si los inóculos de heces podían contener restos de acrilamida de la dieta de los donantes y si dicha acrilamida puede evolucionar a lo largo de las 20 h del proceso fermentativo. Por este motivo, se incluyeron blancos de tiempo 0 h y blancos de tiempo 20 h para cada tipo de inóculo de heces, que estaban constituidos por agua (0,5 mL) y el inóculo fecal específico. Ninguno de los blancos empleados mostró contenido en acrilamida.

3.3. Determinación de acrilamida por LC-ESI-MS/MS

En todas las muestras sin digerir y en las obtenidas tras los ensayos de digestión *in vitro* y digestión *in vitro* acoplada a fermentación colónica, se determinó el contenido en acrilamida siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 1 con algunas modificaciones.

La medida de acrilamida en los digeridos requirió la optimización y validación del protocolo normalizado de trabajo, ya que la presencia de enzimas digestivas introducía una interferencia que comprometía la inequívoca cuantificación del compuesto. Para eliminar esta interferencia se introdujeron distintas modificaciones en el proceso de extracción de la muestra y en las transiciones seleccionadas en el espectrómetro de masas. Inicialmente se añadió un paso adicional de ultrafiltración y precipitación con ácido trifluoroacético, procedimientos que fueron descartados, ya que sólo eliminaban compuestos de alto peso molecular, probablemente sin afectar a la interferencia asociada con compuestos de bajo peso molecular. Finalmente, la reducción del volumen de inyección a 5 μ L y la inclusión de una nueva transición (m/z 72-27) empleando también el ion 27 para la cuantificación condujo a la resolución eficiente e inequívoca del pico de la acrilamida. Para ello, fue necesario aumentar la energía de colisión (11.0 V en lugar de 9.0 V). Por último, el método se complementó con un gradiente al 50% de acetonitrilo al final de cada inyección para una mayor limpieza de la columna entre cada inyección.

3.4. Cálculos de bioaccesibilidad gastrointestinal y total

Bioaccesibilidad gastrointestinal. Estudio 6

Para cada alimento aislado o comida completa, se calculó el porcentaje de acrilamida presente en las fracciones soluble (bioaccesible) y no soluble (no bioaccesible) obtenidas tras las distintas etapas de la digestión (oral, gástrica e intestinal), teniendo en cuenta la cantidad de muestra digerida, su contenido de acrilamida y la recuperación del contaminante en cada fracción tras el proceso digestivo. Para cada etapa, además, se estimó el porcentaje de recuperación de la acrilamida inicial digerida.

Bioaccesibilidad total. Estudio 7

El porcentaje de acrilamida bioaccesible y no bioaccesible, y el porcentaje de recuperación de la acrilamida inicial en el estudio de los snacks vegetales, se calculó de forma similar a la descrita en el apartado anterior. Del mismo modo, se realizó el cálculo de la acrilamida en las fracciones soluble (liberada) y no soluble tras la fermentación colónica *in vitro* para cada grupo poblacional estudiado (niños, adolescentes y adultos), tomando como referencia el contenido de acrilamida de la muestra previa a fermentar.

El porcentaje de acrilamida total potencialmente absorbible se calculó sumando el porcentaje de acrilamida soluble tras la digestión gastrointestinal (restando el 10% que pasaría a la fermentación colónica junto con el total de la acrilamida no soluble) y el porcentaje de acrilamida soluble (liberada) tras la fermentación colónica en cada grupo poblacional.

Para extrapolar todos estos resultados a un consumo realista de estos snacks, se estimó la acrilamida ingerida a través del consumo de una bolsa individual de cada snack de 50 g, calculándose la acrilamida potencialmente absorbible tras la digestión gastrointestinal, la acrilamida potencialmente absorbible tras la fermentación y la acrilamida potencialmente absorbible total en cada grupo poblacional.

3.5. Estimación de la exposición a acrilamida a través del consumo de snacks vegetales. Estudio 7

La exposición a acrilamida derivada del consumo de los cuatro tipos de snacks vegetales estudiados se calculó combinando el contenido de acrilamida en cada muestra con los datos de consumo total per cápita de “patatas fritas y otros snacks” en la población española recogidos en el Informe anual de consumo de alimentos en España en el 2020, emitido por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021), aplicando siempre el mismo dato de consumo, independientemente del snack considerado. Adicionalmente, se calculó la exposición a acrilamida a través del consumo de una ración estándar considerando una bolsa comercial individual de snacks de 50 g. El resultado se dividió por el peso corporal estimado para cada grupo poblacional, teniendo en cuenta la edad de los voluntarios de las muestras fecales y los datos descritos en otros estudios de la bibliografía (Fernández y col., 2011; AESAN, 2020; Eglitis, 2020; NCD RisC, 2020) (**ecuación 1**). Se establecieron pesos medios de 23, 48, y 70 kg para niños, adolescentes y adultos, respectivamente. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$.

3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en estos ensayos se realizó de la misma forma en que se ha descrito en el Capítulo anterior.

Resultados

CAPÍTULO 1. Contenido de acrilamida en preparaciones culinarias representativas de la dieta española procedentes del entorno doméstico, la restauración colectiva y la industria alimentaria. Estudio 1

• Artículo 1.

Desde el hallazgo en 2002 de la presencia de acrilamida en determinados alimentos procesados, hoy en día se ha detectado su presencia en una amplísima variedad de productos procesados que son parte habitual de nuestra dieta. Esto ha llevado a la Comisión Europea a establecer recomendaciones para monitorizar la presencia de este contaminante en los alimentos a través del Reglamento (UE) 2017/2158 y la Recomendación (UE) 2019/1888. La heterogeneidad y diversidad de materias primas, así como la gran variabilidad de técnicas de elaboración de los alimentos dependiendo del entorno culinario en el que se preparen, inciden directamente en el contenido de acrilamida de los mismos y, por tanto, en los niveles de ingesta de los consumidores. De manera que, para establecer de forma representativa la contribución de una determinada preparación culinaria a la exposición a acrilamida, es necesario considerar las distintas variantes de su receta elaboradas en diferentes entornos culinarios como el doméstico, la restauración colectiva o el industrial.

El objetivo principal de este estudio fue establecer el rango de exposición a acrilamida a partir de alimentos y platos comúnmente consumidos en la dieta española elaborados en distintos entornos de preparación. Para ello, se seleccionaron once grupos de alimentos procesados que se clasificaron según su matriz alimentaria mayoritaria, siendo i) alimentos con base de patata (patatas fritas y tortilla de patatas), ii) alimentos con base de cereal (torrijas y bizcocho) y iii) alimentos con base de cereal y proteína animal (filete empanado, san jacob, pizza, empanada, empanadillas, migas y croquetas). Las muestras se adquirieron en tres entornos culinarios: doméstico, restauración colectiva e industrial, con objeto de evaluar la influencia de la manipulación y cocinado de los alimentos en la formación de acrilamida.

Los resultados mostraron que los alimentos con base de patata contribuyen en gran medida a la exposición a acrilamida en la dieta debido tanto a los altos niveles

de precursores presentes en el tubérculo fresco como a la técnica de cocinado empleada, la fritura. En este grupo de alimentos, los niveles de acrilamida más elevados se observaron en las patatas fritas cocinadas en los hogares y en las tortillas de patatas elaboradas en la restauración colectiva. Para el resto de las elaboraciones, los valores más altos se encontraron en las muestras procedentes del entorno de la restauración colectiva. Por el contrario, los niveles más bajos se detectaron en el entorno industrial, sugiriendo que en este ámbito se lleva a cabo un control más estricto del proceso tanto en la selección de las materias primas, como en su manipulación y cocinado, de acuerdo con lo que establece el Reglamento 2017/2158.

En resumen, gran parte de los alimentos preparados en la restauración colectiva contribuyen en buena medida a la exposición a acrilamida, a excepción de las patatas fritas y algunos alimentos con base de cereal, como las torrijas y las migas, con mayores niveles en el ámbito doméstico, y las empanadas, con niveles superiores en el industrial.

Por otra parte, cabe destacar que la gran variabilidad en el contenido de acrilamida de los productos analizados refleja cómo las diferencias en la composición de precursores en las materias primas, las operaciones de manipulación, la formulación de la receta y la técnica culinaria seleccionada dentro de cada entorno de preparación de alimentos son factores que contribuyen a la exposición. Estos resultados subrayarían la necesidad de establecer medidas de control más precisas y armonizadas en los procesos de cocinado, así como de adoptar estrategias de mitigación para controlar la formación de acrilamida en los alimentos preparados en los hogares y en la restauración colectiva. Estas acciones ayudarían a reducir las concentraciones de acrilamida en los alimentos y, de esta forma, disminuir el riesgo asociado a la exposición dietética a este contaminante en España.

Este trabajo ha sido publicado en la revista *Foods* como artículo de investigación:

González-Mulero, L.; Mesías, M.; Morales, F.J.; Delgado-Andrade, C. **Acrylamide Exposure from Common Culinary Preparations in Spain, in Household, Catering and Industrial Settings.** *Foods* 2021, 10, 2008. <https://doi.org/10.3390/foods10092008>

La doctoranda y primera firmante del presente artículo ha participado en el diseño experimental, la recogida de alimentos, codificación, manipulación y determinación del contenido de acrilamida. Además, ha contribuido al análisis de datos, discusión de los resultados obtenidos y redacción del artículo científico.

Article

Acrylamide Exposure from Common Culinary Preparations in Spain, in Household, Catering and Industrial Settings

Lucía González-Mulero, Marta Mesías*, Francisco J. Morales and Cristina Delgado-Andrade

Abstract: In 2019, the European Commission recommended monitoring the presence of acrylamide in certain foods not included in Regulation 2158/2017, to consider other sources of exposure to the contaminant. In the present study, eleven groups of processed foods commonly consumed in Spain were classified, according to their food matrix, into potato-based food, cereal-based food and food based on cereal mixed with meat, fish or vegetables. Samples were collected from three different settings: household, catering services and industrial origin, to evaluate the influence of the food preparation site on acrylamide formation. The highest concentrations of acrylamide were observed in chips (French fries), especially those prepared at home. Although at lower levels, all the other foods also contained significant concentrations of acrylamide, confirming the need to control its content in foods not included in the EU regulation. Industrially processed foods made a lower contribution to acrylamide exposure, probably due to the more stringent controls exercised on culinary processes in this context. The higher levels recorded for households and catering services highlight the need for greater awareness of culinary processes and for measures to be adopted in these settings to limit the formation of acrylamide in food preparation.

Keywords: acrylamide; exposure; Maillard reaction; culinary processes; catering; industry; households

1. Introduction

In recent years, economic and sociocultural factors have produced significant changes in eating habits in developed countries. Urban lifestyles, changes in the distribution of household tasks, a lack of time and scant interest among the younger generations in learning traditional forms of cooking have all contributed to a greater reliance on caterers, company canteens, institutional catering, restaurants and other food supply services [1]. Moreover, ‘fast food’ options have become firmly established among certain population groups, at the expense of fresh food [2]. This shift in dietary habits also involves a change in the profile of foods consumed, resulting in a greater consumption of precooked products, to be quickly and easily prepared or finished at home. According to a

2020 government report on food consumption in Spain [3], the consumption of ready-cooked dishes increased by 11.3% since 2019. In many cases, these food preparations are based on a protein source combined with cereals or potato. This type of food composition, when subjected to common culinary operations such as roasting, toasting, baking, or frying, can result in the development of the Maillard reaction within the food matrix and hence the formation of acrylamide [4,5].

Acrylamide is a process chemical contaminant. Its presence in food consumption increases the risk of developing cancer in all age groups [4]. Dietary exposure to acrylamide is a cross-sectional event, as it is contained in many types of foods, regardless of the area of production (industrial, household or catering services). In the last decade, the food industry has implemented strategies to reduce its impact, especially in the products most likely to generate critical levels of acrylamide. In this respect, the Confederation of the Food and Drink Industries of the EU (later renamed FoodDrinkEurope) developed its “Acrylamide Toolbox” to harmonise mitigation strategies in the food processing industry [6]. In 2017, in a related initiative, the European Commission established mitigation measures and benchmarks to reduce the presence of acrylamide in foods, focusing in particular on the industrial processing of three main sources of acrylamide: potato-based products, cereal derivatives and coffee and its substitutes [7]. However, the large variety of foods consumed by European populations makes it necessary to consider other food matrixes as possible sources of this contaminant. In this sense, previous researchers identified foodstuffs such as biscuits and bread derivatives [8], roasted chestnut products [9] or roasted cocoa beans (dark chocolate) [10] as a source of acrylamide. Accordingly, in 2019, the European Commission issued further recommendations to monitor the presence of acrylamide in other potato-based products (croquettes, potato casserole, potato/meat dishes, etc.), bakery products (croissants, doughnuts, pancakes, etc.), cereal products (rice and maize crackers, cereal snacks, etc.) and other foods (dried fruits, olives in brine, vegetable crisps, etc.) [11], in order to consider the adoption of possible risk management measures, complementing those already provided by Regulation 2158/2017.

The great variability of culinary elaborations in domestic and industrial settings and in catering services is directly reflected in the acrylamide content of foods, and hence the impact produced on consumers. This variability arises from

differences in raw materials, recipes, processing conditions and decisions made by the operator/consumer, among other aspects. In the domestic context, for example, according to the degree of bread toasting employed, acrylamide levels can vary by up to 8%, while certain conditions of potato frying can increase the total dietary exposure to acrylamide by up to 80% [4]. Consequently, in order to establish the contribution of a given culinary preparation to acrylamide exposure, it is necessary to consider various recipes for the same (or similar) end product being prepared by different persons within different settings, or diverse commercial brands in the case of marketed products. A previous observational study conducted in 208 Spanish households revealed the great variability in acrylamide formation for a process as apparently simple as potato frying [12]. Therefore, in culinary preparations with more complex recipes and processes, even greater variability is to be expected.

In view of these considerations, and in the light of European Food Safety Authority (EFSA) requirements, together with the multiple scenarios in which acrylamide exposure can take place, it seems urgently necessary to obtain and publish reliable exposure data not only for typical dietary sources of acrylamide but also for complex culinary preparations, including precursors. Accordingly, the main aim of the present study is to establish the range of acrylamide exposure from common culinary preparations within Spanish diets, considering household, industrial and catering settings, and taking into account recent changes in patterns of food consumption.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

Acrylamide standard (99%), potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (98%, Carrez-I) and zinc acetate dihydrate (>99%, Carrez-II) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Acrylamide labelled by $^{13}\text{C}_3$ (99%) was acquired from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). Formic acid (98%), methanol (99.5%) and hexane were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Deionised water was produced by a Milli-Q Integral 5 water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA). All other chemicals, solvents and reagents were of analytical grade. Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were obtained from Waters (Milford, MA, USA). Cellulose syringe filter units (0.22 μm) were purchased from Análisis Vínicos (Tomelloso, Ciudad Real, Spain).

2.2. Sample Design

Eleven types of processed foods that are characteristically consumed in Spain were selected for analysis. The samples were divided into three groups, by main food types, as follows: (1) potato-based foods (chips (French fries); Spanish potato omelette); (2) cereal-based food ('*torrijas*'; sponge cake); (3) foods based on cereal mix with meat, fish or vegetables (breaded fillet; ham and cheese fillet; pizza; meat, tuna and/or vegetable puff pastry pies; meat, tuna and/or vegetable patties; '*migas*', croquettes).

The dishes were prepared and collected from three different settings: (i) a domestic setting: five volunteers prepared the foods at home. Each participant performed the culinary procedure following their usual method, with no prior operational restriction in terms of the selection of raw materials, the cooking conditions and techniques employed; (ii) a catering setting: the same culinary preparations of the selected foods were acquired in collective catering and takeaway establishments; (iii) a food industry setting: ready-to-eat or precooked preparations of the selected items were purchased in different supermarkets. Five samples of different commercial brands of each food group were considered. For foods that were not ready-to-eat, the cooking instructions supplied regarding technique (mainly baking and frying) and intensity (time, temperature or power) were strictly followed. Samples were collected and analysed from January 2021 to April 2021. Supplementary Table S1 provides a detailed description of the ingredients and culinary techniques applied in each case. Samples were coded, photographed and weighed, and the edible fraction of each serving portion was taken, weighed and homogenised with a hand blender (Taurus, Vital CM, Spain). The samples were then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.3. Acrylamide Determination by Liquid Chromatography–Electrospray Ionisation–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

For each sample, the acrylamide content was determined as follows, in accordance with Mesias and Morales [13], with some modifications. Two grams of ground samples were weighed and mixed with 37.6 mL of Milli-Q water in polypropylene centrifugal tubes. A total of 4 mL of hexane was added to the tubes to remove the fat content of the foods. All the samples were spiked with 400 μL of a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide methanolic solution as an internal standard and later homogenised (Ultra Turrax, IKA, Mod-T10 basic, Bohn, Germany) for 15 min. The

sample was then treated with 1 mL of Carrez I (15 g of potassium ferrocyanide/100 mL of water) and 1 mL of Carrez II (30 g of zinc acetate/100 mL of water) solutions and centrifuged ($9000\times g$ for 10 min) at 4 °C. The hexane was removed, and the samples were cleaned using Oasis-HLB cartridges, preconditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water. An aliquot of the clear supernatant (1 mL) was loaded into the cartridge at a flow rate of 2 mL/min; the first drops were discarded, after which the remainder were collected. The solution was then filtered through a 0.22 μm filter into an amberlite LC-MS vial.

Sample extracts and calibration standards were analysed on an Agilent 1200 liquid chromatograph coupled to an Agilent Triple Quadrupole MS detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Analytical separation was achieved with an Inertsil ODS-3 column (250×4.6 mm, 5 μm ; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) at 30 °C. Isocratic elution was achieved with a mobile phase of formic acid in water (0.2 mL/100 mL) at a flow rate of 0.4 mL/min. The injection volume was 10 μL . Electrospray ionisation in the positive ionisation mode was used. Under these chromatographic conditions, acrylamide eluted at 6.1 min. The needle was set at 1.0 kV. Nitrogen was used as the nebulizer gas (12.0 L/min) and the source temperature was set at 350 °C. Signals at m/z 72.1– m/z 55.1 and m/z 75.1– m/z 58.1 were isolated for acrylamide and ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide, respectively. For the transitions m/z 72.1 > m/z 55.1 and m/z 75.1 > m/z 58.1, the fragmentation was set at 76 V and the collision energy at 8 V. Masses were recorded using multiple reactions monitoring (MRM). For quantitation, the signals at m/z 75.1 and 78.1 were used, while signals at m/z 58.1 and 55.1 served for qualification.

The recovery rate of acrylamide spiked to the samples ranged between 94–106% for potato, between 90–105% for cereal-based food and between 90–102% for food based on cereal mixed with meat, fish or vegetables. The precision, repeatability and reproducibility of the analytical method were evaluated by analysing different samples on the same day (precision), by different operators (repeatability) and on different days (reproducibility).

The relative standard deviations (RSDs) of the analysis were 2.8%, 1.2% and 2.5% for the precision, repeatability and reproducibility, respectively. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated by injecting lower concentrations of standards. A concentration determined as a signal-to-noise ratio of 3 was assigned to LOD (4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and that determined as a signal-to-noise ratio of 10 was assigned to LOQ (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$). All analyses were performed twice. The

results for acrylamide are expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$ of the sample.

2.4. Estimation of Dietary Exposure to Acrylamide

Dietary exposure to acrylamide was estimated by considering the average serving size for each dish ($\text{g}/\text{serving}$) multiplied by the mean acrylamide content obtained for all categories of processed foods ($\mu\text{g}/\text{kg}$). The three preparation settings (households, catering services and industrial) were first compared within each food analysed and then globally, including all the foods, in order to analyse the variations in exposure according to the preparation scenario. When the level of acrylamide in a given dish was non-detectable ($<15 \mu\text{g}/\text{kg}$), the results for the samples in question were replaced by numerical values corresponding to half of the reported LOQ, in line with WHO recommendations [14].

2.5. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using SPSS version 26 (SPSS, Chicago, IL, USA). Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). One-way ANOVA, followed by Scheffé's test or Student's *t*-test, was used to determine the overall significance of the differences obtained. Variance homogeneity was determined by Levene's test. All statistical parameters were evaluated assuming a level of significance of $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

Certain foods commonly consumed in Spain were selected for analysis. The selection criteria included food preferences, contemporary lifestyles and the culinary preparations routinely employed in the three settings considered as possible scenarios for acrylamide exposure (households, catering services and industrial origin). Some of these foods are usually consumed during specific periods or in limited geographical areas. For instance, *torrijas* is a sweet dish typically consumed at Easter, while *migas* is a traditional rural dish made basically with bread and other ingredients, which vary from one region to another. Nevertheless, minor differences in the composition of a given type of food are not relevant to our study aims, and so only the standard (or most common) form of culinary preparation was considered. All the food preparations selected for analysis contained a protein source in their composition together with cereals or potato, thus providing acrylamide precursors. In addition, the culinary operations applied in all of them promote the formation of the contaminant. Table S1 describes the ingredients of the food preparations

considered and the cooking methods used in their elaboration.

3.1. Acrylamide Content in the Food Groups

Table 1 shows the acrylamide content in each of the samples analysed. The chips, by a significant margin, presented the highest average acrylamide content (391 µg/kg). However, lower values for this food have been reported elsewhere by the EFSA [4], and in studies of samples obtained from households [15] and from local markets [16]. On the other hand, higher mean values have been found in samples from restaurants [15]. These previously reported findings are summarised in Table 2. Chips also presented the greatest variability in acrylamide content, ranging from 23 to 1114 µg/kg, a pattern that is in line with data reported previously (Table 2). Our own research group also documented this huge variability in the household setting (27–4200 µg/kg) [12], in catering services (<20–1068 µg/kg) [5] and in primary school canteens (20–4000 µg/kg) [17]. Sanny et al. [18] reported similar results for restaurants (152–1023 µg/kg), institutional caterers (151–505 µg/kg) and chain fast food services (150–392 µg/kg). In the other samples considered, acrylamide contents were lower, with the mean values ranging from 21 µg/kg (*torrijas*) to 78 µg/kg (Spanish omelette). Thus, chips represent an outlier in this food dataset, a finding that should be acknowledged and evaluated in statistical processing. If chips were excluded from the global evaluation, the acrylamide values obtained for the Spanish omelette would be significantly higher ($p < 0.05$) than those for all other food groups, with contents ranging from 23 to 183 µg/kg. These data are of the same order of magnitude as those reported by Bermudo et al. [19] (135 µg/kg), Delgado-Andrade et al. [20] (128 µg/kg) and Branciarri et al. [21] (151 µg/kg), but lower than those of Delgado-Andrade et al. [22] (240 µg/kg) (Table 2). These results show that among the food groups sampled, those based on potatoes are the main contributors to the total exposure to dietary acrylamide [4]. This effect is due to the high level of reducing sugars and free asparagine in the fresh tuber, on the one hand, and to their method of preparation (frying), on the other [23,24]. Although both products are based on processed potatoes, the levels of acrylamide in chips and Spanish omelette are substantially different, probably due to the different moisture levels in the sources of potato used in each case. For the Spanish omelette, potatoes are submitted to a light frying process and then mixed with egg prior to the preparation of this composite food. In contrast, chips are more intensely fried, a process that provokes more severe dehydration. The egg content in the dish

could also be associated with the lower acrylamide levels measured in Spanish omelette, as eggs are rich in sulphur-containing amino acids [25]. These molecules have nucleophilic side chains that can originate Michael-type addition reactions with acrylamide from cooked potatoes, which decrease the free acrylamide content in the final product [26].

Table 1. Acrylamide content ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in eleven groups of processed foods representing foods commonly consumed by the Spanish population.

Food Group	%Samples <LOQ	Acrylamide ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
		Mean	SD	Median	P90	Minimum	Maximum
Potato-based food							
Chips	-	391a	320	253	927	23	1114
Spanish omelette	-	78b	43	79	152	23	183
Cereal-based food							
<i>Torrijas</i>	33	21b	16	16	56	<LOQ	58
Sponge cake	20	36b	32	29	94	<LOQ	138
Food based on cereal mix with meat, fish or vegetables							
Breaded fillet	33	23b	18	19	59	<LOQ	64
Ham and cheese fillet	20	27b	14	25	46	<LOQ	48
Pizza	40	22b	24	18	62	<LOQ	104
Puff pastry pies	-	34b	15	29	60	15	66
Patties	7	41b	31	32	106	<LOQ	131
<i>Migas</i>	7	37b	26	28	86	<LOQ	95
Croquettes	20	24b	12	24	42	<LOQ	45

Results represent the mean ($n = 15$), standard deviation (SD), median, 90th percentile (P90), minimum and maximum levels. LOQ: limit of quantification ($15 \mu\text{g}/\text{kg}$). Values below the LOQ were set at half the LOQ ($7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$). Different letters mean significant differences between the food groups ($p < 0.05$).

Table 2. Acrylamide concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) reported by different international studies for the food groups analysed in the present study.

Food Group	Acrylamide ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Analytical Methodology	Origin	Literature Reference
Potato-based food				
Chips	63-799	GC-MS/MS	Restaurant	[27]
	152-1023	GC-TOF-MS	Restaurant	[18]
	151-505	GC-TOF-MS	Institutional caterers	[18]
	150-392	GC-TOF-MS	Chain fast food service	[18]
	291-970	LC-ESI-MS/MS	Restaurant	[28]
	1590-2390	LC-ESI-MS/MS	Household	[28]
	201	n.i.	Data submitted by food associations	[4]
	332	n.i.	Data submitted by European countries	[4]
	20-1330	n.i.	Household	[29]
	190-1090	n.i.	Restaurant	[29]
	418	LC-MS/MS	Restaurant	[15]
	206	LC-MS/MS	Household	[15]
	27-4200	LC-ESI-MS/MS	Household	[12]
	20-4000	LC-ESI-MS/MS	School canteen	[17]
	187	LC-ESI-MS	Local markets	[16]
	36-1411	HPLC-DAD	Street vendors	[30]
Spanish omelette	135	LC-MS/MS	n.i.	[19]
	240 ^a	LC-ESI-MS	Supermarkets	[22]
	128 ^a	LC-ESI-MS	Catering	[20]
	151	HPLC-DAD	School canteen	[21]
Cereal-based food				
Torrijas	16 ^a	LC-ESI-MS	Collective catering	[20]
Sponge cake	<30	LC-MS/MS	Supermarkets	[31]

Table 2. Cont.

Food based on cereal mix with meat, fish or vegetables				
Breaded fillet	19	n.i.	n.i.	[32]
	40	LC-ESI-MS/MS	Restaurant/school canteen	[33]
	451	GC-MS	Local supplier (market)	[34]
Ham and cheese fillet	32	LC-ESI-MS/MS	Restaurant/school canteen	[33]
Croquettes	285-420	RP-HPLC	Supermarkets	[35]
	36	LC-ESI-MS/MS	Restaurant/school canteen	[33]

n.i.: not indicated. a Measured in kg of dry matter. GC-TOF-MS: gas chromatography time-of-flight mass spectrometry; LC-ESI-MS/MS: liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry; GC-MS/MS: gas chromatography tandem mass spectrometry; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; HPLC-DAD: high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection; RP-HPLC: reversed-phase high-performance liquid chromatography.

Among the other food groups analysed, there were no significant differences in the mean acrylamide values ($p > 0.05$) (Table 1). To calculate these mean values for samples with acrylamide levels below the LOQ (15 µg/kg), a level of 7.5 µg acrylamide/kg was assumed. The acrylamide levels obtained for sponge cakes (<LOQ-138 µg/kg), pizzas (<LOQ-104 µg/kg), patties (<LOQ-131 µg/kg) and *migas* (<LOQ-95 µg/kg) were comparable. Further down the scale, the levels for *torrijas* (<LOQ-58 µg/kg) were similar to those of breaded fillets (<LOQ-64 µg/kg), ham and cheese fillets (<LOQ-48 µg/kg), puff pastry pies (<LOQ-66 µg/kg) and croquettes (<LOQ-45 µg/kg). These results are in line with those reported previously (Table 2). In agreement with these concentrations, Esposito et al. [36] recently reported that the mean and median levels of acrylamide in several cereal-derived baked foods collected at local manufacturers of Campania region (Italy), were above the benchmark levels issued by EU regulation 2017/2158.

The low acrylamide content observed in all food groups except chips and Spanish omelette could be attributed to the food matrix composition and the culinary technique or processes used in their preparation. Thus, the low acrylamide concentration detected in the *torrijas* (mean value 21 µg/kg) could

be due to the type of bread used, the frying conditions or even to the high moisture content of this food, since the bread is immersed in milk for some minutes prior to frying. In the case of sponge cake, the different proportions of ingredients and differences in baking temperatures and times could explain the variability in the acrylamide levels detected. For pizza, puff pastry pies and patties, it might be significant that acrylamide is formed mainly in the dough used for their preparation, while the ingredients included in the filling would make a lower contribution, with the exception of some processed vegetables, which already contain the contaminant due to their previous processing. Differences among these types of foods could be attributed to the different proportions of dough in the final product or to differences in the processing techniques applied (baking or frying). Similarly, the formation of acrylamide in coated fried/roasted foods such as breaded fillet, ham and cheese fillet and croquettes mainly takes place in the crust and will depend on the composition of the coating. The type of coating material and its composition, including breadcrumbs or flour, with or without the addition of water, milk, egg, salt, potato starch and seasonings, and shortenings, amongst other ingredients [37], contribute to determining the levels of reducing sugars and asparagine in the product. In this respect, Esposito et al. [36] concluded that it seems necessary to better understand the role of sugars, eggs, butter and other ingredients in the formation mechanism of acrylamide during the production of biscuits and other sweets, in order to improve the recipes from the perspective of new mitigation approaches. The level of acrylamide-forming precursors and again the culinary technique applied (roasting or frying) definitively influences the formation of acrylamide. The maximum concentration reached was similar for these three food groups. Finally, the type of bread used to make the *migas* and the heat treatment applied influences the formation of acrylamide. Before preparing this dish, the bread is moistened or immersed in water for a few moments, which delays the development of browning when the *migas* are sautéed in the pan. However, the contribution of the other ingredients, especially peppers, should also be considered. For these products, too, acrylamide occurrence after processing has been reported [38], as in the case of other heat-treated vegetables [5].

3.2. Effect of the Culinary Setting

The influence of the culinary setting on acrylamide content in the different groups of processed foods was considered by examining three scenarios: households, industrial preparation and catering services. Figure 1 shows the distribution of the samples analysed, by type of food.

The highest acrylamide values were found in the home-prepared chips, with values ranging from 71 µg/kg to 1114 µg/kg, which is in line with previous reports in this respect, according to which in the domestic setting, and depending on the potato frying conditions, the total dietary exposure to acrylamide could be increased by up to 80% [4,29]. By contrast, the lowest acrylamide levels in our samples were recorded for the chips prepared in the industrial setting (23–656 µg/kg). The variations observed can be explained by differences in frying conditions, in culinary techniques and in the characteristics of the potatoes used. Take-away establishments and collective catering services frequently use commercial parfried frozen potatoes, which are prepared in a procedure (blanching) that reduces the level of reducing sugars [39]. This circumstance could account for the low level of acrylamide observed in chips produced in industrial settings. Nevertheless, five samples presented an acrylamide content exceeding the European Regulation benchmark value of 500 µg/kg [7] in the three settings (Figure 1).

For the remaining food groups, no benchmark levels for acrylamide content have yet been established, although some of these products are addressed by European Commission Recommendation 2019/1888, which presents a non-exhaustive list of foods to be monitored [11]. These foods varied widely in acrylamide content, according to the culinary setting considered, as shown in Figure 1. Overall, none of these cases included foods with the highest levels of acrylamide, the highest concentrations of which were found in *torrijas* (58 µg/kg), ham and cheese fillet (48 µg/kg) and *migas* (95 µg/kg) for the household environment; in Spanish omelette (183 µg/kg), sponge cake (138 µg/kg), breaded fillet (64 µg/kg), pizza (104 µg/kg) and croquettes (45 µg/kg) for catering services; and in puff pastry pies (56 µg/kg) and patties (131 µg/kg) for the foods of industrial origin. The fact that many of the samples obtained from the catering setting presented the highest levels of acrylamide may be indicative of a lack of control during food preparation and suggests there is a

need to standardise the variety of practices employed by food handlers [18,40].

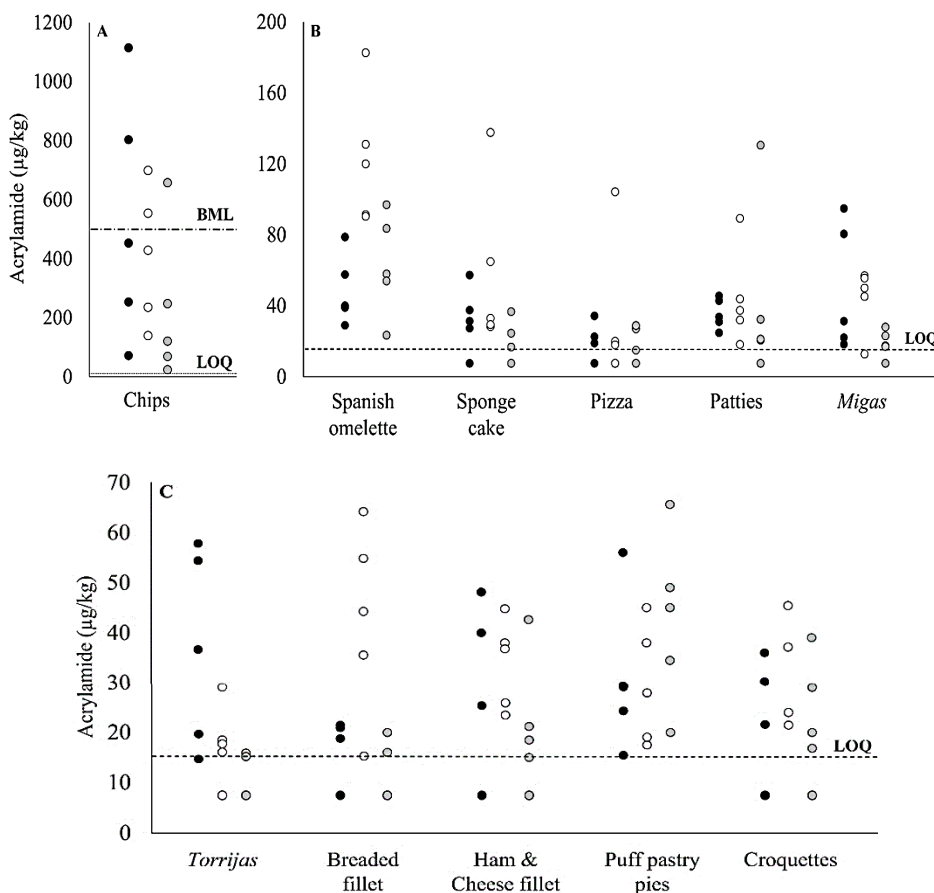


Figure 1. Acrylamide content ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (ranges 0–1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (A), 0–200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (B) and 0–70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (C)) in the groups of processed foods prepared in each of the three settings. Black dots represent the household setting, white dots collective catering and grey dots industrial origin. BML: benchmark level established for chips by the European Regulation 2158/2017 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$). LOQ: limit of quantification.

For the Spanish omelette samples, statistically significant differences were detected between the different settings, with a higher acrylamide content in the catering setting than in the household and industrial contexts ($p < 0.05$). The levels recorded are within the range of concentrations observed by Delgado-Andrade et al. [20] and Branciari et al. [21] in Spanish omelettes prepared by catering services (Table 2). The same pattern was observed for the breaded fillet, where despite the wide range of values among the samples, significant

differences in terms of the preparation context were only observed between catering services and the other two settings. Similar results have been reported by Mesías et al. [33] (Table 2). For the *torrijas* group, the household samples presented significantly higher acrylamide levels than those of industrial origin, very likely due to the less rigorous control exercised during the cooking process.

The generally lower levels of acrylamide measured in most of the samples obtained from the industrial setting suggests there is a stricter control of food preparation in this sector, including attention to the raw materials used, their handling and cooking. This scrupulous approach might also reflect the impact of the control measures established by European regulation 2017/2158 [7], a consequence that has also been observed in the industrial production of crisps (potato chips). In this respect, Powers et al. [41] corroborated the effectiveness of the mitigation measures applied in crisp manufacturing, observing a downward trend in average levels of acrylamide, from 763 µg/kg in 2002 to 372 µg/kg in 2019, according to the European Snacks Association. This period was characterised by falls not only in the maximum values of acrylamide, but also in the percentage of samples exceeding the reference value for this food (750 µg/kg). This reduction in acrylamide levels in crisps appears to be due to stricter attention to the temperature and duration of the cooking, blanching before frying (the removal of sugars and other soluble metabolites in hot water), vacuum frying, the control of moisture levels in the final product, the selection of appropriate varieties of fresh potatoes, according to their end use, and the careful control of the storage temperature and conditions of the fresh materials, as well as post-frying quality control by reference to the colour of the food [42]. All of these mitigation measures, together with other recommendations for the food production sector, are compiled and described in the Acrylamide Toolbox [6].

3.3. Acrylamide Exposure in Different Food Groups and Settings

The acrylamide content per serving is valuable information that could influence consumers' dietary choices. Table 3 shows the mean values and ranges of acrylamide exposure per serving, assuming a normal portion size for each type of food. Our study data show that the consumption of chips produces the highest exposure to this contaminant, especially when they are prepared at

home (mean value: 53.8 µg/serving). These findings are in agreement with the acrylamide levels assumed by Grob et al. [43], for whom average levels of exposure were 20–70 µg for a 100 g serving. The frequent consumption of chips, especially by the teenage population, makes this food one of the main dietary sources of acrylamide [21]. Other important foods in this respect include Spanish omelette (18.5 µg/serving) and patties (13.2 µg/serving). Both of these values were obtained from foods prepared by catering services, which contribute significantly to the dietary exposure to acrylamide, more so than those prepared in household and industrial settings. On the other hand, lower levels of acrylamide exposure from the consumption of Spanish omelette were reported by Delgado-Andrade et al. [20,22] (12 and 6.4 µg/serving in samples obtained from institutional catering and school canteens, respectively). At a lower scale, the same situation was observed in the mean exposure values for breaded fillets (4.3 µg/serving in food prepared by catering services vs. 1.5 and 1.2 µg/serving for household and industrial settings, respectively) and pizza (5.0 µg/serving for catering services vs. 2.9 µg/serving for households and 2.8 µg/serving for industrial settings). The lowest acrylamide exposure in food prepared by catering services was recorded for croquettes (1.5 µg/serving) compared to other breaded samples such as breaded fillets (4.3 µg/serving) and ham and cheese fillet (3.4 µg/serving). By preparation context, significant differences ($p < 0.05$) were only observed between catering services and the other two settings for the Spanish omelette and the breaded fillet, and between household and industrial settings for the *torrijas* (Table 3). Considerable variability was observed in the results for the three settings, with five outliers in catering services, four in household preparation and three in the industrial setting (Figure 2).

Table 3. Estimation of acrylamide exposure from different food groups and settings.

Food Group	Portion (g)	Exposure ($\mu\text{g}/\text{serving}$)					
		Household		Catering services		Industrial	
		Mean \pm SD	Min-Max	Mean \pm SD	Min-Max	Mean \pm SD	Min-Max
Potato-based food							
Chips	100	53.8 \pm 42.1a	7.1 - 111.4	41.1 \pm 22.7a	13.9 - 69.8	22.3 \pm 25.6a	2.3 - 65.6
Spanish omelette	150	7.3 \pm 2.9a	4.5 - 12.2	18.5 \pm 5.7b	14.0 - 28.3	9.5 \pm 4.3a	4.6 - 15.0
Cereal-based food							
<i>Torrijas</i>	160	5.9 \pm 3.1a	3.2 - 9.5	2.8 \pm 1.2ab	2.5 - 4.8	2.1 \pm 0.6b	1.3 - 2.6
Sponge cake	60	1.9 \pm 1.1a	1.7 - 3.6	3.5 \pm 2.8a	1.8 - 4.1	1.1 \pm 0.7a	1.1 - 2.3
Food based on cereal mix with meat, fish or vegetables							
Breaded fillet	100	1.5 \pm 0.7a	1.9 - 2.1	4.3 \pm 1.9b	1.5 - 6.4	1.2 \pm 0.6a	1.6 - 2.0
Ham and cheese fillet	100	2.6 \pm 1.9a	2.5 - 4.8	3.4 \pm 0.9a	2.3 - 4.5	2.1 \pm 1.3a	1.5 - 4.3
Pizza	160	2.9 \pm 1.8a	3.0 - 5.5	5.0 \pm 6.6a	2.9 - 16.7	2.8 \pm 1.7a	2.4 - 4.6
Puff pastry pies	180	6.2 \pm 3.0a	2.8 - 10.2	5.9 \pm 2.4a	3.2 - 8.2	8.6 \pm 3.4a	3.7 - 12.0
Patties	310	10.7 \pm 2.6a	7.7 - 14.1	13.2 \pm 8.1a	5.6 - 27.7	12.7 \pm 15.0a	6.4 - 40.5
<i>Migas</i>	150	7.4 \pm 5.3a	2.8 - 15.1	6.6 \pm 2.7a	2.5 - 8.9	2.8 \pm 1.2a	2.6 - 4.4
Croquettes	50	1.0 \pm 0.7a	1.2 - 2.0	1.5 \pm 0.5a	1.2 - 2.6	1.1 \pm 0.6a	0.9 - 2.2

SD: Standard deviation. Different letters in the same row mean significant differences ($p < 0.05$) between the settings.

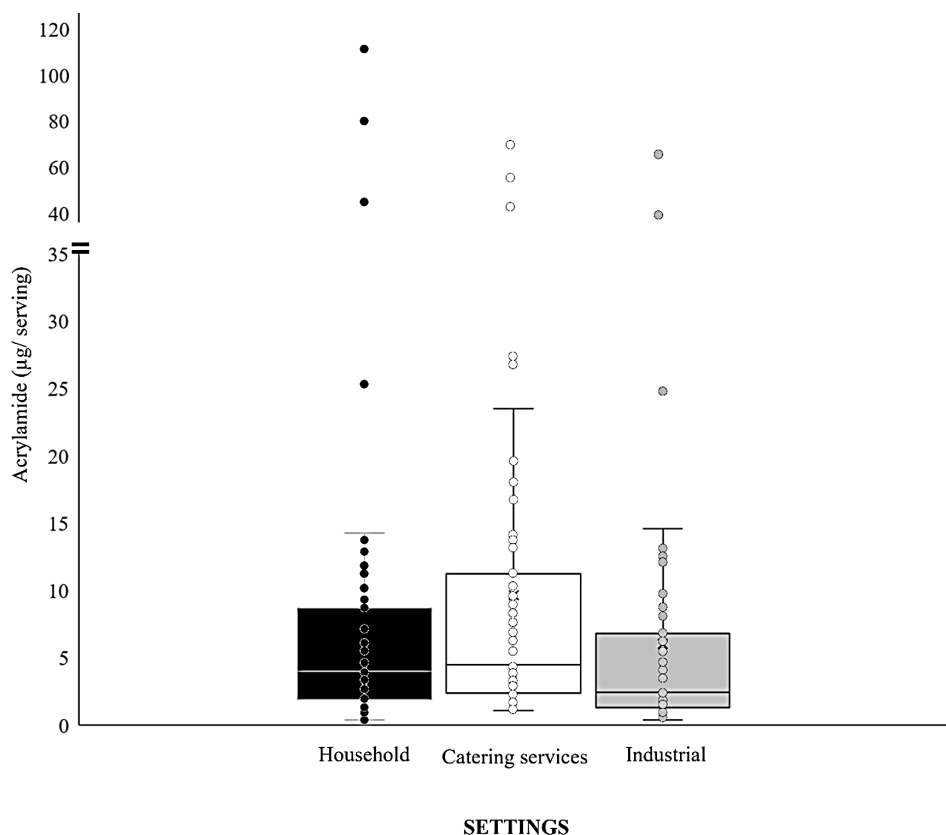


Figure 2. Distribution of acrylamide exposure ($\mu\text{g}/\text{serving}$) in the three settings (household, catering services and industrial) with each of the processed food groups analysed (chips, Spanish omelette, *torrijas*, sponge cake, breaded fillet, ham and cheese fillet, pizza, puff pastry pie, patties, *migas*, croquettes). Values are mean \pm SD.

In summary, food preparation in the catering sector contributed most to acrylamide exposure in most of the food groups analysed, with the exception of chips, *torrijas* and *migas*, where the mean exposure was greater in the domestic preparations, and puff pastry pies, where exposure was highest in the industrial samples. These results underscore the need to control acrylamide levels in foods beyond those listed in the European regulation, as possible contributors to acrylamide exposure in the diet, as indicated in the 2019/1888 recommendations issued by the European Commission [11]. Overall, the differences observed are not statistically significant ($p > 0.05$), but industrially processed foods tend to make a lower contribution to acrylamide exposure than those produced in household and catering settings (Figure 2), very probably

due to the application of mitigation strategies and/or stricter process control in the industrial setting. The need for these measures is emphasised in the Acrylamide Toolbox, together with the recommendation that a risk/benefit analysis should be conducted, considering the balance between the nutritional quality and the acrylamide levels present in foods [6].

4. Conclusions

This study highlights the variability in acrylamide levels in different food preparations commonly consumed in Spain. The highest levels of this contaminant were observed in chips (French fries), which confirms that this food is one of the principal sources of dietary exposure to acrylamide. Although at lower levels, acrylamide was also present in the other food samples considered, which underscores the need to control its content in foods not yet addressed in EU food quality regulations. The wide variability observed in acrylamide concentration might be explained by differences in the composition of raw materials, in the manufacturing process, in culinary preparation techniques and in the recipes used, within each of the food preparation settings analysed. The lowest acrylamide values were observed in industrially processed foods, in comparison to catering services and food preparation in the household. By standard portion size, chips produce the highest exposure to acrylamide, especially when they are prepared in the domestic environment. Although the differences are not statistically significant, industrially processed foods contribute less to acrylamide exposure than those prepared in the household and by catering services. These results probably reflect the existence of stricter control of the culinary process in the industrial environment, possibly associated with the implementation of the mitigation measurements required by the European regulation concerning this sector. Accordingly, stricter monitoring is needed of food cooking processes and mitigation measures should be promoted to control acrylamide formation in foods prepared in the household and by catering services. These actions will help reduce the amounts of acrylamide in processed foods and alleviate the risk associated with exposure to this contaminant from common culinary preparations in Spain.

Supplementary Materials: Table S1: ingredients and culinary treatments used in the preparation of different food groups analysed in the present study.

Author Contributions: Conceptualization, M.M., C.D.-A. and F.J.M.; methodology,

L.G.-M.; software, L.G.-M.; validation, M.M., C.D.-A. and F.J.M.; formal analysis, L.G.-M.; investigation, M.M., C.D.-A. and F.J.M.; resources, M.M., C.D.-A. and F.J.M.; data curation, L.G.-M.; writing—original draft preparation, L.G.-M.; writing—review and editing, M.M., C.D.-A. and F.J.M.; supervision, M.M., C.D.-A. and F.J.M.; funding acquisition, M.M., C.D.-A. and F.J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Spain): project ACRINTAKE (RTI2018-094402-B-I00, MCIU/AEI/FEDER, UE).

Acknowledgments: The authors thank I. Alvarez for her technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Monteiro, C.A.; Moubarac, J.C.; Levy, R.B.; Canella, D.S.; Louzada, M.L.D.C.; Cannon, G. Household availability of ultra-processed foods and obesity in nineteen European countries. *Public Health Nutr.* **2018**, *21*, 18–26. [CrossRef]
2. Delgado-Andrade, C. Maillard reaction products: Some considerations on their health effects. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2014**, *52*, 53–60. [CrossRef]
3. MAPAMA (Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods). Report on Food Consumption in Spain in 2020. 2021. Available online: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-anual-consumo-2020_baja-res_tcm30-562704.pdf (accessed on 1 June 2021).
4. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA J.* **2015**, *13*, 4104.
5. Mesías, M.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J. Alternative food matrices for snack formulations in terms of acrylamide formation and mitigation. *J. Sci. Food. Agric.* **2019**, *99*, 2048–2051. [CrossRef] [PubMed]
6. FoodDrinkEurope (FDE). 2019. Available online: https://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf (accessed on 12 June 2021).
7. EC (European Commission). Commission regulation (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *OJ* **2017**, *L304*, 24–44.
8. Rufián-Henares, J.A.; Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F.J. Acrylamide content of selected Spanish foods: Survey of biscuits and bread derivatives. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 343–350. [CrossRef]
9. Karasek, L.; Wenzl, T.; Anklam, E. Determination of acrylamide in roasted chestnuts and chestnut-based foods by isotope dilution HPLC-MS/MS. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1555–1558. [CrossRef]
10. Kruszewski, B.; Obiedziński, M.W. Impact of raw materials and production processes on furan and acrylamide contents in dark chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 2562–2569. [CrossRef]
11. Commission Recommendation 2019/1888 of 7 November 2019 on the monitoring of the presence of acrylamide in certain foods (C/2019/7876). *OJ* **2019**, *L290*, 31–33.
12. Mesías, M.; Delgado-Andrade, C.; Holgado, F.; Morales, F.J. Impact of the consumer cooking practices on acrylamide formation during the preparation of French fries in Spanish households. *Food Addit. Contam. Part A* **2020**, *37*, 254–266. [CrossRef]

13. Mesías, M.; Morales, F.J. Acrylamide in commercial potato crisps from Spanish market: Trends from 2004 to 2014 and assessment of the dietary exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *81*, 104–110. [[CrossRef](#)]
14. WHO (World Health Organization). Instructions for Electronic Submission of Data on Chemical Contaminants in Foods-Appendix 4: Evaluation of Low-Level Contamination in Foods. 2003. Available online: http://www.who.int/foodsafety/chem/instructions_GEMSFoods_january_2012.pdf?ua=1 (accessed on 1 May 2021).
15. Abt, E.; Robin, L.; McGrath, S.; Srinivasan, J.; Dinovi, M.; Adachi, Y.; Chirtel, S. Acrylamide levels and dietary exposure from foods in the United States, an update based on 2011–2015 data. *Food Addit. Contam. Part A* **2019**, *36*, 1475–1490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Barón Cortés, W.R.; Vásquez Mejía, S.M.; Suárez Mahecha, H. Consumption study and margin of exposure of acrylamide in food consumed by the Bogotá population in Colombia. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *100*, 103934. [[CrossRef](#)]
17. Mesias, M.; Delgado-Andrade, C.; Holgado, F.; Morales, F. Acrylamide in French fries prepared at primary school canteens. *Food Funct.* **2020**, *11*, 1489–1497. [[CrossRef](#)]
18. Sanny, M.; Jinap, S.; Bakker, E.J.; van Boekel, M.A.J.S.; Luning, P.A. Possible causes of variation in acrylamide concentration in French fries prepared in food service establishments: An observational study. *Food Chem.* **2012**, *132*, 134–143. [[CrossRef](#)]
19. Bermudo, E.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M.T. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products. *Talanta* **2008**, *76*, 389–394. [[CrossRef](#)]
20. Delgado-Andrade, C.; Mesias, M.; Morales, F.J.; Seiquer, I.; Navarro, P. Assessment of acrylamide intake of Spanish boys aged 11–14 years consuming a traditional and balanced diet. *LWT Food Sci. Technol.* **2012**, *46*, 16–22. [[CrossRef](#)]
21. Branciarri, R.; Roila, R.; Ranucci, D.; Altissimi, M.S.; Mercuri, M.L.; Haouet, N.M. Estimation of acrylamide exposure in Italian schoolchildren consuming a canteen menu: Health concern in three age groups. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2020**, *71*, 122–131. [[CrossRef](#)]
22. Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J.; Seiquer, I.; Navarro, M.P. Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1304–1311. [[CrossRef](#)]
23. Amrein, T.M.; Bachmann, S.; Noti, A.; Biedermann, M.; Barbosa, M.F.; Biedermann-Brem, S.; Grob, K.; Keiser, A.; Realini, P.; Escher, F.; et al. Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: A comparison of cultivars and farming systems. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5556–5560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mestdagh, F.J.; De Meulenaer, B.; Van Poucke, C.; Detavernier, C.; Cromphout, C.; Van Peteghem, C. Influence of oil type on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6170–6174. [[CrossRef](#)]
25. Nimni, M.E.; Han, B.; Cordoba, F. Are we getting enough sulfur in our diet? *Nutr. Metab.* **2007**, *4*, 24. [[CrossRef](#)]
26. Adams, A.; Hamdani, S.; Van Lancker, F.; Méjri, S.; De Kimpe, N. Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1517–1522. [[CrossRef](#)]
27. Mojska, H.; Gielecinska, I.; Szponar, L.; Oltarzewski, M. Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2090–2096. [[CrossRef](#)]
28. Normandin, L.; Bouchard, M.; Ayotte, P.; Blanchet, C.; Becalski, A.; Bonvalot, Y.; Phaneuf, D.; Lapointe, C.; Gagné, M.; Courteau, M. Dietary exposure to acrylamide in

- adolescents from a Canadian urban center. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *57*, 75–83. [CrossRef] [PubMed]
29. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Survey Data on Acrylamide in Food: Individual Food Products. 2015. Available online: <https://www.fda.gov/food/chemicals/survey-data-acrylamide-food> (accessed on 12 May 2021).
30. Deribew, H.A.; Woldegiogis, A.Z. Acrylamide levels in coffee powder, potato chips and French fries in Addis Adaba city of Ethiopia. *Food Control* **2021**, *123*, 107727. [CrossRef]
31. Svensson, K.; Abramsson, L.; Becker, W.; Glynn, A.; Hellenäs, K.-E.; Lind, Y.; Rosén, J. Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 1581–1586. [CrossRef]
32. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Survey Data on Acrylamide in Food: Total Diet Study Results. 2006. Available online: <https://www.fda.gov/food/chemicals/survey-data-acrylamide-food-total-diet-study-results#table4> (accessed on 22 May 2021).
33. Mesías, M.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J. Process contaminants in battered and breaded foods prepared at public food service establishments. *Food Control* **2020**, *114*, 107217. [CrossRef]
34. Ahmad, S.; Ahmad Tarmizi, A.H.; Razak, R.A.; Jinap, S.; Norliza, S.; Sulaiman, R.; Sanny, M. Selection of vegetable oils and frying cycles influencing acrylamide formation in the intermittently fried beef nuggets. *Foods* **2021**, *10*, 257. [CrossRef]
35. Michalak, J.; Gujska, E.; Czarnowska-Kujawska, M.; Nowak, F. Effect of different home-cooking methods on acrylamide formation in pre-prepared croquettes. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *56*, 134–139. [CrossRef]
36. Esposito, F.; Velotto, S.; Rea, T.; Stasi, T.; Cirillo, T. Occurrence of acrylamide in Italian baked products and dietary exposure assessment. *Molecules* **2020**, *25*, 4156. [CrossRef] [PubMed]
37. Perera, C.; Embuscado, M.E. Texture Design for Breaded and Battered Foods. In *Food Texture Design and Optimization*; Dar, Y.L., Light, J.M., Eds.; Wiley Blackwell: Chicago, IL, USA, 2014; pp. 128–158.
38. Constantin, O.; Kukurová, K.; Neagu, C.; Bednáriková, A.; Ciesarova, Z.; Rapeanu, G. Modelling of acrylamide formation in thermally treated red bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, *238*, 149–156. [CrossRef]
39. Pedreschi, F. Fried and dehydrated potato products. In *Advances in Potato Chemistry and Technology*; Jaspreet, S., Lovedeep, K., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2009; pp. 319–337.
40. Sanny, M.; Luning, P.A.; Jinap, S.; Bakker, E.J.; van Boekel, M.A. Effect of frying instructions for food handlers on acrylamide concentration in French fries: An explorative study. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 462–472. [CrossRef] [PubMed]
41. Powers, S.J.; Mottram, D.; Curtis, A.; Halford, N. Progress on reducing acrylamide levels in potato crisps in Europe, 2002 to 2019. *Food Addit. Contam. Part A* **2021**, *38*, 782–806. [CrossRef]
42. Mesias, M.; Nouali, A.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J. How far is the Spanish snack sector from meeting the acrylamide Regulation 2017/2158? *Foods* **2020**, *9*, 247. [CrossRef]
43. Grob, K.; Biedermann, M.; Biedermann-Brem, S.; Noti, A.; Imhof, D.; Amrein, T.; Pfefferle, A.; Bazzocco, D. French fries with less than 100 µg/kg acrylamide. A collaboration between cooks and analysts. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 185–194. [CrossRef]

SUPPLEMENTARY

Table S1. Ingredients and culinary treatments used in the preparation of different food groups analyzed in the present study.

Food Group	Ingredients	Culinary treatment*
Potato-based food		
Chips	Potatoes, salt	Frying
Spanish omelette	Potatoes, salt, eggs and optionally (onion)	Frying
Cereal-based food		
<i>Torrijas</i>	Sliced wheat-flour bread, milk, eggs, sugar, cinnamon	Frying
Sponge cake	Wheat flour, sugar, eggs, baking powder, and optionally (shortenings, vegetable oils)	Roasting
Food based on cereal mix with meat, fish or vegetables		
Breaded fillet	Chicken fillet, breadcrumbs, wheat flour, eggs	Roasting/Frying
Ham and cheese fillet	Cooked ham, cheese, pork fillet, breadcrumbs, wheat flour, eggs	Frying
Pizza	Pizza dough, tomato, cheese and other ingredients such as oregano, meat, cooked ham, bacon, olives, tuna or Mushrooms	Roasting
Puff pastry pies	Puff pastry, tomato, tuna, red pepper	Roasting
Patties	Dough of patties, tomato, tuna, hard-boiled egg, red pepper	Roasting/Frying
<i>Migas</i>	Wheat-flour bread, green pepper, bacon, chorizo sausage, garlic, paprika, and optionally (grapes, pork meat)	Sautéed
Croquettes	Bechamel sauce (milk, wheat flour), breadcrumbs, egg and other ingredients such as cooked ham, bacon, chicken, tuna or cheese	Frying

*All the frying treatments used vegetable oils.

CAPÍTULO 2. Evaluación de la exposición a acrilamida en diferentes entornos de restauración colectiva mediante estudios de dieta duplicada. Estudios 2-5

- Estudio 2: Evaluación de la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en comedores de centros escolares. **Artículo 2.**

Los cambios en los patrones familiares y sociales observados en las últimas décadas han propiciado el aumento del consumo de alimentos fuera del hogar por parte de la población general. Además, el estilo de vida actual conduce a que la mayoría de los niños en edad escolar deban realizar la comida principal del día en sus centros educativos. Por ello, las autoridades sanitarias han promovido la mejora del perfil nutricional de los menús escolares, limitando los alimentos azucarados o grasos e incrementando la oferta de frutas y verduras. A pesar de esto, es habitual encontrar en dichos menús alimentos procesados cuyo consumo puede derivar en la exposición a contaminantes químicos de procesado como la acrilamida. Como consecuencia de su toxicidad, la evaluación del riesgo asociado a su exposición es necesaria sobre todo en la población infantil, debido a su mayor exposición relativa por su bajo peso corporal.

El objetivo del presente estudio fue evaluar, por primera vez en España, la exposición a acrilamida en niños a partir del consumo de alimentos en comedores de centros escolares. Para ello, se recogieron y se analizaron todos los alimentos, comidas y bebidas proporcionadas en los desayunos y los almuerzos de comedores de dos centros educativos de la Comunidad de Madrid y Castilla la Mancha. La recogida se realizó durante 10 días lectivos consecutivos, empleando el método de dieta duplicada recomendado por la EFSA. Para valorar la exposición diaria a acrilamida en los centros escolares se consideraron dos escenarios extremos, de mayor y menor exposición, respectivamente.

Entre las muestras analizadas, las galletas mostraron los valores más altos de acrilamida, superando los niveles de referencia establecidos por el Reglamento Europeo 2017/2158 (350 µg/kg). En el escenario de menor exposición, la mayor contribución a la ingesta diaria del contaminante se observó por parte de los desayunos (73,3%); sin embargo, los almuerzos resultaron los principales

responsables en el escenario de mayor exposición (65,4%). La exposición a acrilamida se estimó en tres franjas de edad: preescolares de 3 a 5 años, niños de 6 a 9 años y preadolescentes de 10 a 12 años, siendo superior en la franja de menor edad debido al bajo peso corporal. Los márgenes de exposición para efectos neoplásicos oscilaron entre 144 y 1026, encontrándose muy por debajo de la referencia de 10.000, lo que indicaría un mayor riesgo de posibles efectos adversos para la salud entre la población infantil, considerando además que este cálculo se estimó sólo teniendo en cuenta la ingesta del contaminante en desayuno y almuerzo.

Los resultados revelan que dietas incluso equilibradas, variadas y que contengan alimentos con un bajo contenido en acrilamida, implican niveles de exposición relevantes a este contaminante que deben tenerse en cuenta al realizar evaluaciones de riesgo, especialmente en la población infantil.

Este trabajo ha sido publicado en la revista *Food & Chemical Toxicology* como artículo de investigación:

González-Mulero, L.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J.; Mesías, M. **Assessment of dietary acrylamide exposure in children attending Spanish school canteens using the duplicate diet method.** *Food & Chemical Toxicology* 2023, 181, 114066. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114066>

La doctoranda y primera firmante de dicho artículo ha participado en el diseño experimental, recogida de menús, codificación, manipulación y determinación del contenido de acrilamida. Además, ha contribuido al análisis de datos, discusión de los resultados obtenidos y redacción del artículo científico



Assessment of dietary acrylamide exposure in children attending Spanish school canteens using the duplicate diet method

Lucía González-Mulero, Cristina Delgado-Andrade, Francisco J. Morales, Marta Mesías*

ABSTRACT

Acrylamide is a carcinogenic chemical contaminant formed in heat-treated foods. In this study, a duplicate diet method was used to evaluate the acrylamide content of foods/meals served at breakfast and lunch in two Spanish school canteens. The dietary acrylamide intake in students was estimated within lower bound (LB) and upper bound (UB) scenarios. Biscuits exhibited the highest acrylamide values, exceeding the benchmark level established by the European Regulation 2017/2158 (350 µg/kg), followed by main courses such as stews, side dishes and bread. In the LB scenario, breakfasts accounted for the major contributors to the daily acrylamide intake (73.3%). However, lunches were the main responsible in the UB scenario (65.4%). Acrylamide exposure was estimated for three age ranges: 3-5y pre-school children (0.59 and 0.92 µg/kg body weight/day), 6-9y children (0.43 and 0.67 µg/kg body weight/day) and 10-12y early adolescents (0.28 and 0.44 µg/kg body weight/day). Margins of exposure for neoplastic effects ranged between 144 and 1026, which is below the reference of 10,000, indicating a health concern. The findings reveal that any diet, even one that is balanced, varied and contains foods low in acrylamide, involves an additive exposure to the contaminant that should be considered when conducting acrylamide exposure risk assessments.

Keywords:

Children School canteen Acrylamide Duplicate diet, Dietary exposure

1. Introduction

School canteens play a vital role in providing essential services to Spanish children throughout their schooling, especially during the early stages. In the last two decades, there has been a significant increase in the number of children and adolescents who consume their main meal of the day outside of their homes due to changes in family and social dynamics. Specifically in Spain, 36.4% of early childhood education students and 29.4% of primary school students engage in this activity (Delcampoalcole, 2018). Consequently, school meals contribute

significantly to childrens' overall diet. In most cases, school canteens lack the ability to prepare their menus on-site. Instead, catering companies often provide prepared menus, with food being cooked in a central kitchen and then transported to the school for immediate consumption. Despite the efforts of health authorities in recent years to promote the improvement of the nutritional profile of school menus by limiting the presence of sugary and fatty foods and increasing the provision of vegetables and fruits to safeguard the health and well-being of schoolchildren (AESAN, 2010), processed foods that undergo cooking techniques such as frying, roasting or baking are prevalent.

Consumption of processed foods exposes children to the so-called chemical process contaminants, which are compounds naturally formed during the cooking process (Murkovic and Pedreschi, 2017). One of these contaminants is acrylamide, a compound generated during the Maillard reaction between the free amino acid asparagine and carbonyl compounds, mainly reducing sugars, at temperatures above 120 °C and in low moisture conditions. Therefore, acrylamide is commonly found in foods that have undergone baking, frying or roasting processes (Stadler et al., 2002). Acrylamide has been classified as probably carcinogenic for humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1994). To address concerns about its potential toxicity, some countries and organisations have established guidelines or regulations for acceptable acrylamide levels in foods (FAO, 2009; EC, 2017). Hence, it becomes essential not only to assess the impact of cooking practices on acrylamide formation, but also to consider the overall eating patterns that contribute to daily exposure to this contaminant. This issue is particularly concerning for public health, with a specific focus on children due to their dietary habits and vulnerability arising from their smaller body weight. This vulnerability can lead to a higher relative exposure to contaminants present in foods (EFSA, 2015a).

According to existing literature, various methods have been employed to assess dietary acrylamide exposure, involving different calculation approaches (probabilistic, deterministic), consumption estimates (24-h recall, 2- and 7-day dietary records, food frequency questionnaires, etc.) and reference levels of acrylamide in food. These methods have been applied to study both the general population and specific groups (Cressey et al., 2012; Claeys et al., 2016; Nematollahi et al., 2020; González et al., 2022). However, many of these studies have certain limitations. One notable limitation is the use of mean values to describe

the presence of acrylamide in groups of processed foods, which are then combined with food consumption tables that do not account for variations in cooking methods. Additionally, the use of general databases for acrylamide occurrence, such as those provided by the European Food Safety Authority (EFSA), can lead to inaccuracies in exposure rate calculations. These issues hinder the establishment of robust and reliable conclusions, limiting the ability of national and regional institutions to effectively monitor acrylamide exposure and make progress in this area. Furthermore, dietary recall methods present methodological challenges. Participants tend to under-report intake, especially for foods considered unhealthy, which can introduce recall bias and difficulties in classifying products within a food category (Thompson and Subar, 2017). To improve exposure assessment and obtain more accurate data, EFSA recommends conducting duplicate diet studies to estimate the real dietary intake of contaminants and evaluate food safety risks and potential adverse effects on human health (EFSA, 2015a). However, there have been very few research studies employing duplicate diet methods to assess real exposure to acrylamide in the diet, with no such research existing in the Spanish context. In light of this, the aim of the present study was to assess acrylamide exposure in Spanish school children who eat at school canteens using the duplicate diet method recommended by EFSA. This study will provide estimations of the risk associated with such exposure in Spanish school-age children for the first time, offering valuable insights into the potential health implications.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals, solvents and reagents used for acrylamide determination were of analytical grade. Acrylamide standard (99%), potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (98%, Carrez-I) and zinc acetate dihydrate (>99%, Carrez-II) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Formic acid (98%), methanol (99.5%) and hexane were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). [$^{13}\text{C}_3$]-acrylamide (99%) was acquired from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were obtained from Waters (Milford, MA, USA) and Cellulose syringe filter units (0.22 and 0.45 μm) were acquired from Análisis Vínicos (Tomelloso, Ciudad Real, Spain). Deionised water from a Milli-Q Integral 5 water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA) was used to prepare all solutions.

2.2. Study design and sample collection

Two primary schools located in different regions of Spain, one in Madrid (centre) and the other in Castilla la Mancha (mid-east) were recruited for the study. The school canteens usually prepare daily meals for approximately 60 primary school students aged 3–12 years. They follow a 4-week menu rotation that aligns with the recommendations for a healthy and balanced diet to prevent childhood obesity, as outlined in the Spanish Strategy for Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Obesity promoted by the Spanish Council on Food Safety and Nutrition (BOE, 17/2011 Law). The present study took place over two periods, between February 2020 and May 2021. Both schools provided meals cooked in their own kitchens for a week in February and another week in May with the aim of collecting menus corresponding to winter and summer seasons, respectively. Each school canteen participated in a two-week trial (Fig. 1), during which all foods and meals served for breakfast and lunch from Monday to Friday were collected using the duplicate diet method (Shim et al., 2014; Porca Fernández et al., 2016). Table 1 provides additional details related to the study. Breakfasts were the same over the two weeks in each school. A total of 167 different meals were collected, consisting of 70 individual foods from breakfasts (41.9%) and 97 individual foods/meals from lunches (58.1%). After collection, the samples were transported to the laboratory using a refrigerated courier service. In the laboratory, the samples were coded, photographed and processed. To provide a comprehensive description of the foods, each meal was classified according to FoodEx 2 classifications provided by EFSA (EFSA, 2011, 2015b). These classifications use pre-established facets and descriptors to categorise the foods. All portions of the collected meals were edible, with the exception of the potato and pork ribs stew (282 g), chicken drumsticks (209 g) and breaded horse mackerel fillets (112 g), where the bones were removed. The edible portions were weighed and homogenised using a hand blender (Taurus, vital CM, Spain). Aliquots of each meal were then stored at -20 °C until further analysis.

2.3. Acrylamide determination by LC-ESI-MS/MS

The acrylamide content of meals compounding breakfast and lunch was determined following the method described by González-Mulero et al. (2021). Two g of ground sample was weighed in polypropylene centrifugal tubes and mixed with 37.6 mL of Milli-Q water. Next, 4 mL of hexane was added to the tubes. Samples were spiked with 400 µL of a 5 µg/mL [¹³C₃]-acrylamide methanolic

solution as internal standard and homogenised (Ultra Turrax, IKA, Mod-T10 basic, Bohn, Germany) for 15 min. Then, 250 μL of both Carrez I (15 g of potassium ferrocyanide/100 mL of water) and Carrez II solutions (30 g of zinc acetate/100 mL of water) were added and centrifuged at 4 $^{\circ}\text{C}$, 9000 \times g for 10 min. Following this, the hexane layer was removed, and supernatants were filtered through a 0.22 μm cellulose filter. Clear supernatants were cleaned using an Oasis-HLB cartridge, previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of distilled water, at a flow rate of 2 mL/min. The first drops were discharged, and the remainder was collected using an amberlite LC-MS vial.

Acrylamide from sample extracts and calibration standards was determined by an Agilent 1200 liquid chromatograph coupled to an Agilent Triple Quadrupole MS detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). An Inertsil ODS-3 column was used (250 \times 4.6 mm, 5 μm ; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) at 30 $^{\circ}\text{C}$ to achieve analytical separation. Isocratic elution was employed with a mobile phase of formic acid in water (0.2 mL/100 mL) at a flow rate of 0.4 mL/min. The injection volume was 10 μL with the needle set at 1.0 kV. Electrospray ionisation was used in the positive mode. Acrylamide was eluted for 6.1 min under these chromatographic conditions. Nitrogen was used as the nebulizer gas (12.0 L/min) and the source temperature was set at 350 $^{\circ}\text{C}$.

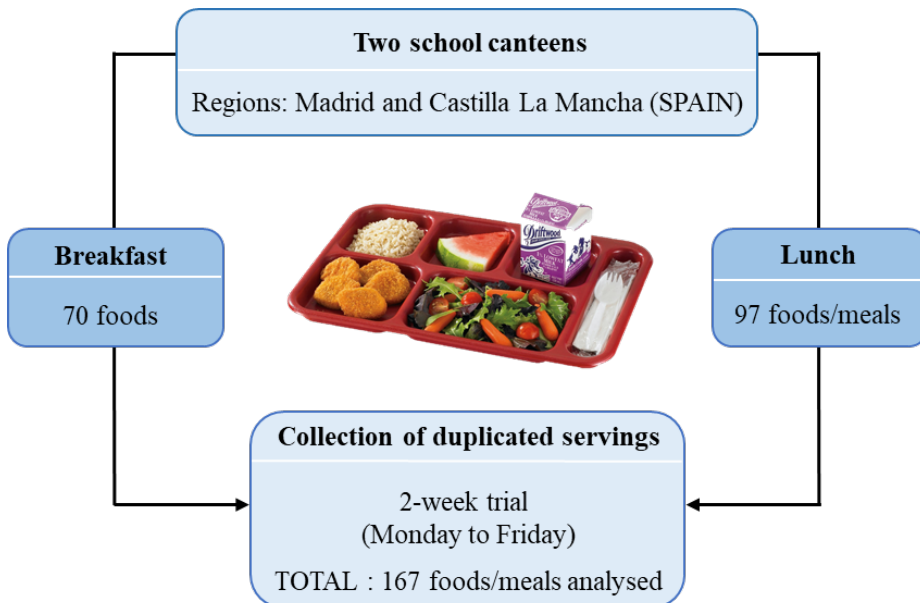


Fig. 1. Design of the duplicate diet study in school canteens.

Table 1

Description of the menus provided by the school canteens.

	Menu	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
School 1	Breakfast	Milk	Milk	Milk	Milk	Milk
		Fruit juice	Fruit juice	Fruit juice	Fruit juice	Fruit juice
		Biscuits	Cornflakes	Chocolate puffed rice breakfast cereals	Cornflakes	Biscuits
	Lunch week 1	Spaghetti bolognese Battered squid rings Mixed salad Pear Bread	Beans with sausage stew Beef burger Pilau rice* Apple Bread	'A banda' rice* French omelette Mixed salad Orange Bread	Sauteed peas with egg and ham Roasted chicken drumsticks French fries Yoghurt Bread	Lean pork and potato stew Pomfret in tomato sauce Mixed salad Banana Bread
	Lunch week 2	Noodles with red pepper and garlic Breaded monkfish Mixed salad Pear Bread	Zucchini cream Grilled pork loin with sauteed vegetables Mixed salad Orange Bread	Lentils stew Tuna in tomato sauce Sauteed pasta Apple Bread	Mixed paella French omelette Mixed salad Yoghurt Bread	Traditional chickpea-based stew prepared with meat and vegetables Peach in syrup Bread

Table 1. Cont.

School 2	Breakfast	Milk	Milk	Milk	Milk	Milk
		Soluble cocoa	Soluble cocoa	Soluble cocoa	Soluble cocoa	Soluble cocoa
		Fruit	Fruit	Fruit	Fruit	Fruit
		Biscuits	Bagel	Puff pastry biscuits	Muffin	Whole wheat biscuit
	Lunch week 1	Pasta with sausage, cheese and tomato sauce	Sauteed chard with ham	Potato and pork ribs stew	Carrot cream	Traditional chickpea-based stew prepared with meat and vegetables
Baked cod		Turkey stew	Breaded horse mackerel fillets	Battered chicken cutlets	Salad	
Mixed salad		White rice	Mixed salad	Mixed salad	Melon	
Apple		Watermelon	Banana	Yoghurt	Bread	
Bread		Bread	Bread	Bread	Bread	
	Lunch week 2	Sauteed peas with bacon	Pasta salad	Brothy rice with chicken and vegetables	Sauteed of boiled chard and potato	White beans with sausage stew
Baked pomfret in tomato sauce		Breaded burger	French fries	Breaded hake	Roasted chicken drumsticks	Tuna omelette
Mixed salad		Apple	Bread	Mixed salad	Mixed salad	Mixed salad
Nectarine				Melon	Yoghurt	Watermelon
Bread				Bread	Bread	Bread

*Pilau rice: typical meal of Indian cuisine consisting on stir-fried rice with vegetables, meat and spices. 'A banda' rice: typical meal consisting in rice cooked in fish broth.

For acrylamide and [$^{13}\text{C}_3$]-acrylamide, signals at m/z 72.1– m/z 55.1 and m/z 75.1– m/z 58.1 were isolated, respectively. Fragmentation was set at 76 V and collision energy was set at 8 V for the transition m/z 72.1 > m/z 55.1 and at 9 V for m/z 75.1 > m/z 58.1. Masses were recorded using multiple reactions monitoring (MRM). The recovery rate of samples when spiked with acrylamide ranged between 92 and 103%. Relative standard deviations (RSDs) for all determinations in the analyses were less than 10%. Samples were analysed at least by duplicate. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were calculated by injecting lower concentrations of standards. A concentration determined to have a signal-to-noise ratio of 3 was assigned to LOD (4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), whilst a concentration determined to have a signal-to-noise ratio of 10 was assigned to LOQ (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Precision, repeatability and reproducibility of the analytical method were evaluated by analysing different samples on the same day (precision), outcomes produced by different operators (repeatability) and outcomes produced on different days (reproducibility).

The accuracy of findings was examined by performing proficiency tests launched by the Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) program. The latest results for the food matrices provided for FAPAS pertained to crispbread (test 30118, January 2022), coffee (test 30117, December 2021) and potato crisps (test 30120, April 2022) yielding z-scores of -0.1, 0.1 and 0.4, respectively.

2.4. Estimation of acrylamide exposure

A deterministic approach was employed to calculate the acrylamide exposure of children through the consumption of foods and meals provided by the school canteens. The individual contribution of the acrylamide from each meal was calculated by combining its acrylamide content and the weight of the edible portion of the serving. Processed foods with acrylamide concentrations below the LOQ (<15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were replaced by zero and LOQ values, in lower bound (LB) and in upperbound (UB) scenarios, respectively, as suggested in literature for studies in the field of food safety (Branciari et al., 2020; EFSA, 2015a). Dietary acrylamide exposure in schoolchildren was calculated by summing the acrylamide contributions of all the foods/meals consumed during each single day at breakfast and lunch during the 2-weeks of the study, and then dividing this total by the children body weight (bw) (Equation (1)).

Eq. 1.

$$\text{Estimated dietary exposure} = \Sigma \frac{\text{Food consumption} \left(\frac{\text{kg}}{\text{day}} \right) \times \text{Acrylamide content of food} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right)}{\text{Body weight (kg)}}$$

Three different mean values of bw were used for this estimation, in accordance with age-associated data (Fernández et al., 2011) and age classifications of the Spanish educational system: 1) Pre-school children aged 3–5 years (mean bw = 19 kg); 2) Primary school children aged 6–9 years (mean bw = 27 kg); 3) Primary school early adolescents aged 10–12 years (mean bw = 40 kg). Finally, average daily exposure was calculated for a 10-day period during which the regular canteen menu was served at each school. Results were expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day. An acrylamide exposure risk assessment was performed by computing the margin of exposure (MOE) for both neurotoxic and neoplastic effects in LB and UB scenarios, according to the following formula:

Eq. 2.

$$\text{MOE} = \frac{\text{BMDL10} (\mu\text{g}/\text{kg per day})}{\text{Estimated dietary exposure} (\mu\text{g}/\text{kg per day})}$$

For neurotoxic effects, a benchmark dose lower confidence limit (BMDL10) for neurotoxicity of 430 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day, previously calculated in rats was used. MOEs lower than 125 may indicate a human health concern. For carcinogenic effects, a BMDL10 of 170 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day, previously calculated in Harderian gland tumours in male mice was used. In this case, risk is indicated with MOEs lower than 10,000 (EFSA, 2015a).

2.5. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XVI.I. The data are expressed as means and standard deviations (SD). One-way ANOVA, followed by Tukey HSD test, was used to identify the overall significance of differences in acrylamide exposure among individuals belonging to the three examined age ranges. Student's t-test was also used to analyse significant differences between the two participating schools. This analysis compared both overall acrylamide intake and acrylamide exposure according to age. Variance homogeneity was determined by the Levene's test. All statistical parameters were evaluated assuming a significance level of $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Characterisation of menus provided in school canteens

Table 1 presents the individual foods and meals comprising the menus served at school canteens during the two-week trial. The composition of these menus aligns with the recommendations outlined in various consensus documents on nutrition in schools published in Spain (AESAN, 2008, 2010; Agencia de salud pública de Cataluña, 2020). For breakfast, the guidelines suggest including a dairy product, a cereal-based food (breakfast cereal or biscuits), fruit and other items like olive oil (maximum twice a week) and bakery products or confectionery (maximum once a week). For the lunch menu, the recommendations advise incorporating different proportions of vegetables, starchy foods, proteins, fruit and virgin olive oil. It is also recommended to use various culinary techniques throughout the week (i.e. boiling, frying, roasting, baking). A typical lunch should consist of a main course based on rice (once a week), pasta (once a week), legumes (once-twice a week) or vegetables (once-twice a week), including potatoes. The second course should feature a protein source like meat (once-three times a week), fish (once-three times a week) or eggs (maximum twice a week). These should be accompanied by different salads (three-four times a week) and other side dishes (potatoes, vegetables, legumes, etc., once-twice a week). Desserts should primarily consist of fresh fruit most days of the week, with occasional alternatives like yoghurt, fresh cheese or fruit juices. Moreover, one portion of bread is allowed every day. It is essential to limit the serving of breaded and fried products, which should not exceed twice a week as a second course or once a week as a side dish. The school canteen menus analysed in the present study closely adhered to these guidelines, maintaining a similar distribution of foods and meals for both breakfast and lunch. This approach ensured the recommended weekly frequency of servings for all food groups and applied various cooking techniques over the course of a week.

3.2. Acrylamide content of foods and meals

The acrylamide content of meals served by school canteens for both breakfast and lunch is summarised in Table 2. Meanwhile, Table 3 shows processed meals with acrylamide levels falling between LOD and LOQ, for which LOQ value (15 µg/kg) was assigned in the UB scenario. Among the 167 foods/meals analysed, only 21% (36 samples) had acrylamide levels above the

LOQ, with 16 samples from breakfast and 20 samples from lunch. This indicates that approximately 21% of samples from both breakfast and lunch contained measurable levels of the contaminant. The highest concentrations of acrylamide were found in biscuits, with mean values ranging from 646 µg/kg in school 1 to 680 µg/kg in school 2. All biscuits, except for whole wheat biscuits, almost doubled the benchmark levels (BL) established by the European Regulation 2017/ 2158 for these foods (350 µg/kg) (EC, 2017). This finding is consistent with previous reports on other branded biscuits, which showed a range of 144–781 µg/kg (Verma and Yadav, 2022). According to EFSA, the average acrylamide content of biscuits is estimated to be 201 µg/kg, with the 95th percentile reaching 810 µg/kg. It is important to note that acrylamide content can vary significantly between different brands and type of biscuits (EFSA, 2015a). All other cereal-based foods consumed during breakfast had lower acrylamide levels and all of them were below BL described in the European Regulation (EC, 2017) (Table 2). The results for breakfast cereals are among the lowest values reported for commercial breakfast cereals marketed in Spain (from <20 to 639 µg/kg) (Mesías et al., 2019a), and they are lower than the range described for samples from the Slovenian market (220.2–498.5 µg/kg) (Mencin et al., 2020). Even the pastries (bagel and muffins) examined showed non-quantifiable levels of the contaminant, as did fruits, juices, milk and soluble cocoa.

The lunches served at participating school showed generally low acrylamide concentrations (foods/meals with non-quantifiable acrylamide levels were not considered), ranging from 16 µg/kg (found in bean and sausage stew, noodles with red pepper and garlic, and potato and pork rib stew) to 43 µg/kg (detected in tuna omelette). Only the bread from school 1 had quantifiable levels of the contaminant, with a mean value of 33 µg/kg, which was lower than the BL for wheat-based bread (50 µg/kg) (EC, 2017). The acrylamide content in bread can vary based on factors such as bread type, ingredients used and baking conditions. According to EFSA, the average acrylamide content of bread is estimated to be 42 µg/kg, with the 95th percentile at 156 µg/kg (EFSA, 2015a). Even though French fries are known to be one of the major sources of exposure to acrylamide in the diet (El Tawila et al., 2020), the French fries analysed in the schools of this study did not exhibit high levels of acrylamide. Acrylamide was not detected in French fries served

at school 1, and very low concentrations were found in those served at school 2 (41 µg/kg), which were significantly lower than the BL for this foodstuff (500 µg/kg) (EC, 2017). It is necessary to point out that French fries at school 1 were prepared from frozen par-fried potatoes, which usually undergo blanching and light frying treatments before freezing, reducing the precursors and the subsequent acrylamide formation during frying (Negoiță et al., 2022). With the exception of breaded hamburgers and tuna omelette, all other foods found to contain acrylamide were stews or stir-fried dishes. The acrylamide content in these meals may be related to the presence of fried or sautéed vegetables, such as onions or peppers, which are known to contain sugars and asparagine that promote the acrylamide formation during heat treatments (Başaran, 2022). Additionally, spices or seasonings added to these meals, like red paprika, turmeric or black pepper, may also contribute to acrylamide content since they have been reported to contain significant amounts of the contaminant (Jeong et al., 2020; Wongthanyakram et al., 2020). Previous studies have established similar findings (Delgado-Andrade et al., 2012), identifying acrylamide levels of 5 µg/kg in vegetable soup and 20 µg/kg in bean and rice stew (data expressed in dry matter). In breaded hamburgers, acrylamide presence is linked to the bread used in the product coating (Guerra-Hernández, 2016). For tuna omelette, the contribution of other ingredients included in the meal, such as fried onion, cannot be ruled out as potential sources of acrylamide.

When considering only the edible serving of each food/meal, biscuits were found to have the highest acrylamide levels (19.0–27.1 µg/serving) (Table 2), followed by stew-based meals, with concentrations ranging between 6.6 and 10.7 µg/serving. A previous study conducted by our research team described a lower figure for bean stew prepared with rice (2.4 µg/serving) (Delgado-Andrade et al., 2012). All other meals contributed to a lesser extent to the daily intake of the contaminant. Regarding bread, only the bread included in the menu served at school 1 contributed to daily acrylamide intake, with an estimated 0.8 µg/serving. This value is significantly lower than the 5.2 µg/serving reported in a previous investigation (Delgado-Andrade et al., 2012).

Table 2. Acrylamide concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) reported by different international studies for the food groups analysed in the present study.

Meal	n*	FoodEx2 code	Acrylamide content ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Edible serving (g)	Acrylamide contribution ($\mu\text{g}/\text{serving}$)	
			mean	SD		mean	SD
School 1							
Breakfast							
Biscuits	4	A009V	646	44	42	27.1	0.6
Cornflakes	4	A00DD	31	1	37	1.1	0.1
Chocolate puffed rice breakfast cereals	2	A00DR#F04.A034J	71	5	31	2.2	0.2
Lunch							
Beans with sausage stew	1	A03VT	16		523	8.4	
Pilau rice	1	A040M	22		203	4.5	
Sauteed peas with egg and ham	1	A012G#F04.A00GZ\$F04.A022T\$F04.A031G\$F28.A07GT	20		318	6.4	
Noodles with red pepper and garlic	1	A040M#F04.A00JA\$F04.A00GZ	16		335	5.4	
Lentils stew	1	A00QD#F28.A07GM	19		564	10.7	
Bread	10	A0DRD	33	24	25	0.8	0.8
School 2							
Breakfast							
Biscuits	2	A009V	680	2	28	19.0	0.1
Whole wheat biscuits	2	A00AA	117	1	45	5.3	0.1
Puff pastry biscuits	2	A00CC	111	2	22	2.4	0.1

Table 2. Cont.

Lunch					
Potato and pork ribs stew [†]	1	A03VJ	16	276	4.4
Breaded burger	1	A022K#F04.A03 XF\$F04.A07HK\$ F28.A07GS	17	76	1.3
French fries	1	A0BYV	41	85	3.5
White beans with sausage stew	1	A03VT	25	264	6.6
Tuna omelette	1	A03YN#\$F04.A0 3YN	43	79	3.4

Only meals with an acrylamide concentration higher than LOQ (15 µg/kg) are detailed. *n refers to the times that food is consumed during the two weeks of trial. †All the food servings were edible except for potato and pork ribs stew where the non-edible portion was removed (total serving: 282 g). Data are mean ± SD of at least two analytical duplicates.

3.3. Daily acrylamide intake from school canteen menus and the contribution of individual foods/meals. LB and UB scenarios

Based on the acrylamide levels calculated for each food or meal, the daily acrylamide intake from breakfast and lunches served in school menus over the course of the two-week trial was estimated. At this point it is important to mention that, as the contribution in the complete edible portion was considered for this estimation, the results would represent the maximum daily acrylamide intake from each school canteen. Two scenarios were considered: the LB scenario, using only data from Table 2 and the UB scenario, which incorporated data from both Tables 2 and 3. In each scenario, average values were calculated for a one-week period and for the ten-day period of data collection, in accordance with daily contaminant intake (Table 4). In the LB scenario, the daily acrylamide intake ranged from 2.0 to 33.3 µg/day at school 1 and from negligible to 19.1 µg/day at school 2. The weekly averages for school 1 were 15.7–16.4 µg/day, while for school 2, they were 6.2–8.3 µg/day. Despite these differences, the mean acrylamide intake was not found to significantly differ between schools (16.1 vs. 7.3 µg/day at schools 1 and 2, respectively; $p = 0.072$). When considering the students from both schools together, the accumulated mean acrylamide intake was 11.7 µg/day. In the UB scenario, the daily intake was notably higher compared to the LB scenario. At school 1, the daily

intake ranged from 9.3 to 38.1 $\mu\text{g}/\text{day}$, while at school 2, it ranged from 5.1 to 28.0 $\mu\text{g}/\text{day}$. The mean acrylamide intakes for both weeks were substantially different but without statistical difference (22.4 vs. 12.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ for school 1 and 2, respectively). The accumulated mean acrylamide intake was 17.4 $\mu\text{g}/\text{day}$ for both centres, which was not significantly different from the figure obtained in the LB scenario. The highest weekly acrylamide intake levels occurred on days when biscuits were consumed at breakfast (Table 2), being the only source of acrylamide exposure at school 2 in the LB scenario. Although to a lesser extent, notable acrylamide exposures were observed on days when stews were included on the menu (Table 4). The acrylamide content of these meals was relatively low (16–25 $\mu\text{g}/\text{kg}$), but the portion sizes were larger than for other foods/meals, resulting in a higher total content per serving (6.6–10.7 $\mu\text{g}/\text{serving}$) (Table 2). On all remaining days, acrylamide intake levels were lower, with negligible exposure to the contaminant recorded on 3 days in the case of school 2 in the LB scenario.

The contribution of foods and meals included in breakfast and lunch to daily acrylamide intake considering both the LB and UB scenarios is presented in Fig. 2. In the LB scenario, breakfast accounted for 73.3% of daily acrylamide intake, primarily due to biscuit consumption. Cereal-based foods, such as biscuits and breakfast cereals, were the main contributors to breakfast intake in this scenario. On the other hand, lunches were responsible for 26.7% of daily acrylamide intake. Among lunch items, the main contributors were the main course, especially stews, followed by side dishes like French fries or pilau rice; second courses and, finally, bread. However, in the UB scenario, the situation changed significantly. Now, the major contribution came from lunches, accounting for 65.4% of daily acrylamide intake, while breakfast provided the lowest contribution at 34.6%. This shift highlights the significance of including foods and meals with minimal levels of acrylamide, which were assigned the LOQ value, in a comprehensive assessment of dietary acrylamide intake. The impact of this contribution could be substantial, to the extent that the combined intake of these highly consumed food items might outweigh that of those considered the main sources of acrylamide, which are consumed less frequently.

Table 3. Edible serving (g) and acrylamide contribution ($\mu\text{g}/\text{serving}$) in processed meals with acrylamide levels below LOQ compounding breakfast and lunch of menus provided by school canteens.

Meal	n*	FoodEx2 code	Edible serving (g)	Acrylamide contribution ($\mu\text{g}/\text{serving}$)
School 1				
Lunch				
Spaghetti bolognese	1	A040Q	368	5.5
Battered squid rings	1	A02JJ#F28.A07HL\$F28.A07G V	221	3.3
Beef burger	1	A03XF	150	2.3
'A banda' rice	1	A041D	328	4.9
French omelette	2	A03YN	109	1.6
Roasted chicken drumsticks	1	A022C#F28.A07GY	126	1.9
French fries	1	A0BYV	100	1.5
Lean pork and potato stew	1	A03VJ	430	6.4
Pomfret in tomato sauce	1	A02AP#F04.A044C	251	3.8
Breaded monkfish	1	A02BJ#F28.A07HK\$F28.A07G S	229	3.4
Zucchini cream	1	A03XY	495	7.4
Grilled pork loin with sauteed vegetables	1	A06GH#F04.A03YB	196	2.9
Tuna in tomato sauce	1	A02DX#F04.A044C	199	3.0
Sauteed pasta	1	A040R	183	2.7
Mixed paella	1	A041D	322	4.8
Traditional chickpea-based stew prepared with meat and vegetables	1	A03VK#F04.A00SL\$F28.A07G M	337	5.1

Table 3. Cont.

School 2				
Breakfast				
Soluble cocoa	10	A03HG	4	0.1
Bagel	1	A00BR	33	0.5
Muffin	1	A00BC	32	0.5
Lunch				
Bread	10	A0DRD	45	0.7
Pasta with sausage, cheese and tomato sauce	1	A040Q#F04.A025C\$F04.A06BN	452	6.8
Baked cod	1	A02BV#F28.A07GX	88	1.3
Sauteed chard with ham	1	A03XX#F04.A00MX\$F04.A022T\$F28.A07GT	128	1.9
Turkey stew	1	A03VY#F04.A023T	122	1.8
White rice	1	A040M	166	2.5
Breaded horse mackerel fillets	1	A02CN#F28.A07HK	82	1.2
Carrot cream	1	A03XY	238	3.6
Battered chicken cutlets	1	A01SP#F28.A07HL	123	1.8
Traditional chickpea-based stew prepared with meat and vegetables	1	A03VK#F04.A00SL\$F28.A07GM	326	4.9
Sauteed peas with bacon	1	A03XX#F04.A012H\$F04.A022X\$F28.A07GT	232	3.5
Baked pomfret in tomato sauce	1	A02AP#F04.A044C\$F28.A07GX	211	3.2
Pasta salad	1	A042H	145	2.2
Brothy rice with chicken and vegetables	1	A041J#F04.A01SP	215	3.2
Breaded hake	1	A02CB# F28.A07HK	46	0.7
Sauteed of boiled chard and potato	1	A03XX#F04.A00MX\$F04.A00ZT\$F28.A07GL\$F28.A07GT	119	1.8
Roasted chicken drumsticks	1	A022C#F28.A07GY	140	2.1

Acrylamide concentration in all the samples were between LOD and LOQ, consequently a value of 15 µg/kg was assigned for all of them. *n refers to the times that food is consumed during the two weeks of trial. †All the food servings were edible except for chicken drumsticks and breaded horse mackerel fillets where the non-edible portion was removed (total serving: 209 g and 112 g, respectively).

The findings reported by Branciari et al. (2020) and Hilbig et al. (2004) are consistent with the results obtained in the LB scenario of the present research. In the study by Branciari et al. (2020), acrylamide exposure was estimated in Italian schoolchildren consuming a canteen menu. In this case, the daily acrylamide contribution of all cereal products (pasta, breakfast cereals, bread and bakery products) ranged from 30.2 to 32.7%, depending on the age of schoolchildren. In that study, higher intake was associated with meals served at lunch (62.9–73.2%), with approximately half of all acrylamide content being provided by potato-based products (30.2–34.8%). Similarly, in the investigation by Hilbig et al. (2004), which recorded the whole diet of children and adolescents, the main contributors to acrylamide intake were bread (18–46%), pastries (16–35%) and potato products (7–35%).

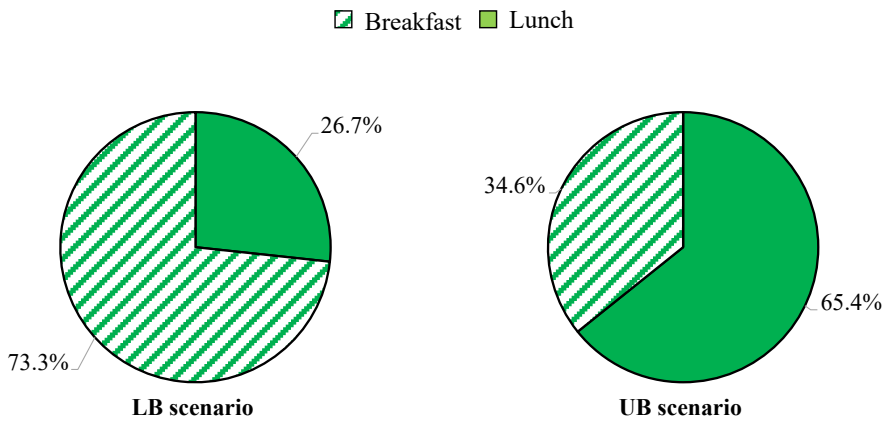


Fig. 2. Contribution of the foods and meals included in breakfast and lunch to the daily acrylamide intake (%). LB: lower bound. UB: upper bound.

Table 5

Dietary exposure to acrylamide at the school canteens and associated risk assessment.

	Schoolchildren age ranges												P value*	
	3-5 y				6-9 y				10-12 y					
	LB		UB		LB		UB		LB		UB		LB	UB
School 1	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD		
Exposure ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day)	0.77	0.66	1.18b	0.65	0.54	0.46	0.86Bab	0.47	0.36	0.31	0.56a	0.31	0.146	0.033
MOE for neurological effects	560		365		796		500		1179		769			
MOE for neoplastic effects	221		144		315		198		466		304			
School 2														
Exposure ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day)	0.35	0.40	0.66	0.44	0.25	0.28	0.48A	0.32	0.17	0.19	0.31	0.21	0.357	0.092
MOE for neurological effects	1233		655		1752		897		2595		1379			
MOE for neoplastic effects	487		259		692		354		1026		545			
P value†	0.072		0.051		0.073		0.049		0.069		0.051			
Both schools														
Exposure ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day)	0.59	0.58	0.92b	0.60	0.43	0.41	0.67ab	0.44	0.28	0.27	0.44a	0.28	0.072	0.007
MOE for neurological effects	735		469		995		641		1547		989			
MOE for neoplastic effects	291		186		393		253		612		391			

LB: lower bound. UB: Upper bound. Different lowercase letters mean significant differences between the acrylamide exposure of the three age ranges considered in each school for each scenario ($p < 0.05$)*. Different capital letters mean significant differences in the acrylamide exposure for each age range between the two schools ($p < 0.05$)†.

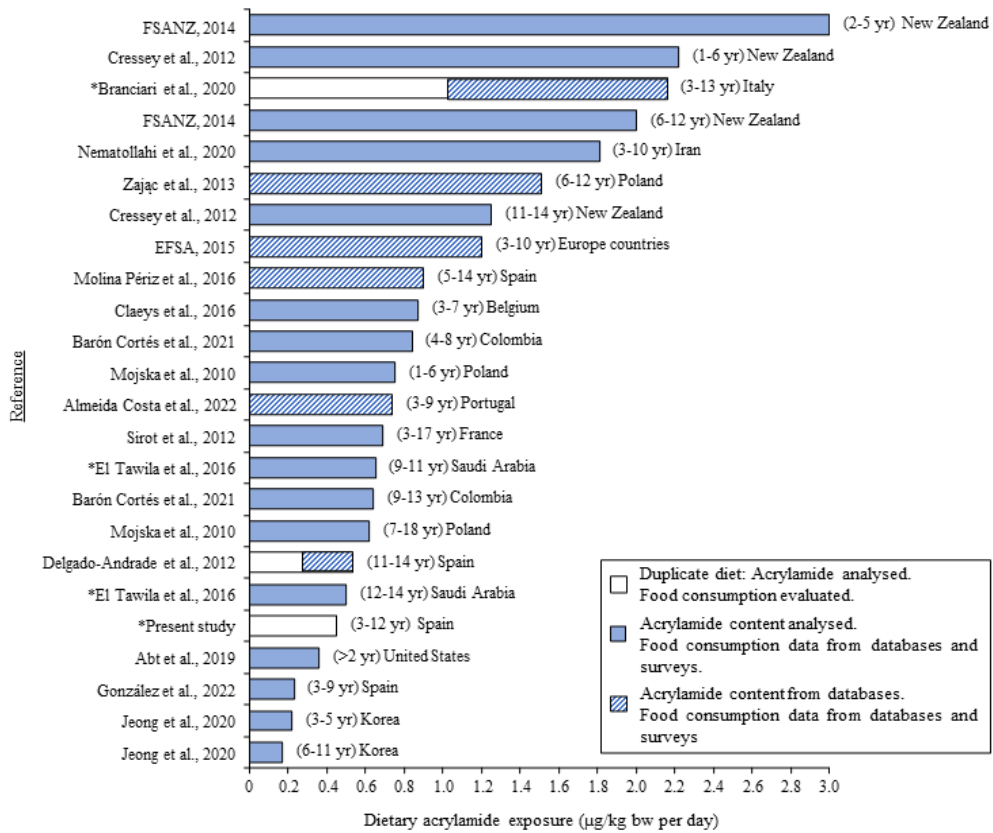


Fig. 3. Dietary acrylamide exposure reported by different studies from different countries. *These studies do not describe the acrylamide exposure from the total diet, but only from part of the daily diet (Abt et al., 2019; Almeida Costa et al., 2022; Barón Cortés et al., 2021; Branciarri et al., 2020; Claeys et al., 2016; Cressey et al., 2012; Delgado-Andrade et al., 2012; EFSA, 2015; FSANZ, 2014; González et al., 2022; Jeong et al., 2020; Mojska et al., 2010; Molina Pérez et al., 2016; Nematollahi et al., 2020; Sirof et al., 2012; Zajac et al., 2013).

3.4. Dietary acrylamide exposure at school canteens

The assessment of mean dietary exposure to acrylamide in students attending school canteens was conducted based on three age ranges: 3–5 years, 6–9 years and 10–12 years (Table 5). In consideration of the influence of body weight and taking into account that the same portions of foods consumed were applied for the three age groups, acrylamide exposure was found to be higher in the youngest students and lower in early adolescents. Although more than 50% differences emerged in exposure between these age groups, no statistically significant differences were

found between groups in the LB scenario. In contrast, in the UB scenario, significant differences in exposure were observed in school 1 ($p = 0.033$) and when considering data from both schools together ($p = 0.007$). As expected, due to the acrylamide contribution from each school canteen, exposure at school 2 (range: 0.17–0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day for LB and 0.31–0.66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day for UB) was lower than at school 1 (range: 0.36–0.77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day for LB and 0.56–1.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day for UB), although significant differences only emerged when comparing the 6–9 y age groups in the UB estimation. Considering overall data collected from both schools, mean acrylamide exposures were 0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day (10–12 y), 0.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day (6–9 y) and 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day (3–5 y) in the LB scenario and 0.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day (10–12 y), 0.67 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day (6–9 y) and 0.92 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day (3–5 y) in the UB scenario. The finding that higher exposure was associated with lower body weight reaffirms the need to control the consumption of processed foods among pre-schoolers (3–5 y). This is because higher acrylamide exposure in this age group may increase the risk associated with acrylamide exposure in younger school children by 25% (when compared with students aged 6–9 y) and 50% (when compared with students aged 10–12 y).

Any comparison between data reported in the present study and findings from existing literature should be made with caution due to the different methods employed for estimating dietary acrylamide exposure. On the one hand, food consumption data are usually collected from surveys, which fail to represent real intake within a population and, to an even lesser extent, within specific groups. The most frequently used surveys are: a) 24-h dietary recall, which provides individual data on food consumption and culinary techniques as remembered and perceived by respondents; b) food record diaries, where participants record information about the portions of food consumed but are hampered since they require information to be gathered over a number of days, and; c) food frequency questionnaires, which provide more global information about the frequency of consumption of specific foods in the diet and lack precision and may not capture the specific cooking techniques used (Sirot *et al.*, 2012). On the other hand, some assessments of acrylamide content rely on data collected from existing literature rather than direct food measurements. This approach presents challenges in assigning single acrylamide values to individual foods due to the influence of various factors, such as the content of precursors in the raw material, the degree of processing, culinary technique applied, etc. Our research team has reported large variability in estimated

acrylamide levels for the same food matrix especially across different production settings, including the food industry (Mesías et al., 2019b, 2020b; 2022), households (Mesías et al., 2018), restaurants (Mesías et al., 2019c) or collective catering (Mesías et al., 2020a). This variation underscores the impact of food preparation settings on dietary exposure to the contaminant (González-Mulero et al., 2021). To obtain accurate information on both real food consumption and acrylamide content in foods, the most suitable method is the duplicate diet approach. This method involves collecting duplicate samples of the foods consumed by an individual or a group over a specific period. The collected samples are then analysed for their acrylamide content using appropriate analytical techniques, providing reliable data on actual food consumption and acrylamide exposure (Shim et al., 2014; Porca Fernández et al., 2016).

Levels of acrylamide exposure reported in existing literature for similar age ranges as the mean value evaluated in the present investigation are presented in Fig. 3. It is observed that only two studies applied a duplicate diet methodology (Delgado-Andrade et al., 2012; Branciari et al., 2020). Most prior research reports acrylamide exposure in relation to the overall diet, with only a few studies evaluating specific aspects of daily consumption. This was the case in the present investigation, where only foods and meals served at breakfast and lunch were considered. Therefore, the present estimations (considering only LB in this comparison) are likely to be lower than those described in most other studies, specifically, rising from 0.5 µg/kg bw per day in the present study to 3 µg/kg bw per day in other studies. However, despite not considering the overall diet, the present findings revealed higher values than those reported in some other works, which recorded estimates ranging from 0.17 to 0.36 µg/kg bw per day (Abt et al., 2019; Jeong et al., 2020; González et al., 2022). When comparing with the estimations calculated by Branciari et al. (2020) for acrylamide exposure through breakfast and lunch menus served at school canteens, the present findings in Spanish schoolchildren indicate a lower level of exposure to this contaminant. Our estimations were also lower than those reported for Arab school students through the evaluation of foods served at school cafeterias. The differences in this case may be attributed to the fact that, while foods were analysed to determine acrylamide content, food consumption was estimated using food frequency questionnaires (El Tawila et al., 2017). This method may lead to overestimation of outcomes.

3.5. Risk assessment

As a means of evaluating the risk associated with acrylamide exposure through school canteen menus, MOE values were calculated according to age and school centre. MOE values provide an indication of the level of concern posed by the presence of a potentially harmful compound in food and help in keeping exposure as low as possible. The EFSA Scientific Committee states that MOE values lower than 10,000 for genotoxic and carcinogenic substances are highly concerning from a public health perspective. Similarly, MOE values lower than 125 indicate risk of non-neoplastic effects (i.e. neurological effects) (EFSA, 2015a).

MOE values calculated for neurological and neoplastic effects in student at different ages are presented in Table 5. Concerning neurological effects, all MOE values were above the reference value of 125 (range: 560–2595 in LB scenario, 365–1379 in UB scenario), indicating no risk. However, with regards to neoplastic effects, all values were well below the reference value of 10,000 (range: 221–1026 in LB scenario, 144–545 in UB scenario), indicating a high level of concern. It is important to note that these estimations only considered acrylamide exposure from breakfast and lunch consumption and, therefore, underestimated the total exposure to the contaminant. As expected, lower MOE values have been reported in European children for both neurotoxic (269–475) and neoplastic effects (106–189) when the total diet was considered (EFSA, 2015a). However, data of similar order of magnitude as reported in the present research have been documented in children in other studies, even when estimating total daily diet (Barón Cortés et al., 2021; Almeida Costa et al., 2022). In summary, due to the low body weight of the participating children, even the very small acrylamide exposure found in relation to just two of the meals consumed in a day, resulted in some concern outcomes regarding the neoplastic effects of the contaminant. This concern would have been even greater if the overall daily diet had been considered.

4. Conclusions

The present research assessed dietary acrylamide exposure through menus (breakfast and lunch) provided by school canteens in Spanish children using the duplicate diet method, following the latest EFSA recommendations. The investigation acknowledges certain considerations in its design, such as using the same standard portion of foods for all age ranges addressed and not accounting leftovers, which may overestimate the exposure particularly for the

youngest children and relying on literature data for body weights of different populations. Acrylamide was detected in only 21% of analysed foods/meals. Cereal-based products, especially biscuits, were the greatest contributors to acrylamide intake, followed by stews (due to their large portion size), fried potatoes and seasonings. Considering the LB scenario, breakfasts were the major contributors to daily acrylamide intake, while lunches were the main responsible in the UB scenario. The acrylamide intake through school canteen menus, along with the small body weight of students, resulted in low MOE values, indicating a risk of neoplastic effects in both the LB and the UB scenarios. This concern would have been even greater if the overall daily diet had been considered. The main outcome highlighted that every type of diet, even those that are well-balanced, diverse, and composed of low-acrylamide foods, still leads to some level of exposure to this contaminant. Therefore, this finding emphasises the importance of incorporating this additive exposure into the assessment of acrylamide exposure risks.

Funding: The present research was funded by the R&D project ACRINTAKE (RTI2018-094402-B-I00), financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/and the Regional Development European Fund ("FEDER"): A way to make Europe.

CRedit authorship contribution statement: Lucía González-Mulero: Data curation, Formal analysis, Validation, Writing - original draft. Cristina Delgado-Andrade: Methodology, Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Validation, Writing - review & editing. Francisco J. Morales: Methodology, Funding acquisition, Investigation, Writing - review & editing. Marta Mesías: Methodology, Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Validation, Writing - review & editing.

Acknowledgments: The authors wish to thank Ms I. Alvarez for her technical assistance, Maria Montessori Public School (Mostoles, Madrid) for their participation and the staff of the Food Health Service of the General Directorate for Public Health of the Autonomous Community Castilla-La Mancha (Spain) for performing sampling and liaising with school canteens.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Abt, E., Robin, L.P., McGrath, S.C., Srinivasan, J., Dinovi, M., Adachi, Y., Chirtel, S.J., 2019. Acrylamide levels and dietary exposure from foods in the United States, an update based on 2011-2015 data. *Food Addit. Contam.* 36 (10), 1475-1490. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1637548>.

- AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2008. Guía de comedores escolares. Programa Perseo. https://www.sennutricion.org/media/guia08_COMEDOR_ESCOLAR_txt.pdf. (Accessed 10 September 2022).
- AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2010. Documento de consenso sobre la alimentación en los centros educativos. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/educanaos/documento_consenso.pdf. (Accessed 15 February 2023).
- Agencia de salud pública de Cataluña, 2020. La alimentación saludable en la etapa escolar. https://salutpublica.gencat.cat/web/.content/minisite/aspcat/promocio_salut/alimentacio_saludable/02Publicacions/pub_alim_inf/guia_alimentacio_saludable_etapa_escolar/guia_alimentacion_etapa_escolar.pdf. (Accessed 16 February 2023).
- Almeida Costa, S.S., Correia, D.M., Carvalho, C., Vilela, S., Severo, M., Lopes, C., Torres, D., 2022. Risk characterization of dietary acrylamide exposure and associated factors in the Portuguese population. *Food Addit. Contam.* 39 (5), 888–900. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2047540>.
- Barón Cortés, W.R., Mejía, S.E., Mahecha, H.S., 2021. Consumption study and margin of exposure of acrylamide in food consumed by the Bogotá population in Colombia. *J. Food Compos. Anal.* 100, 103934 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103934>.
- Başaran, B., 2022. The effect of different orders of vegetables in frying on acrylamide levels. *Turk. J. Agric. Res.* 9, 49–59. <https://doi.org/10.19159/tutad.1034713>.
- BOE, Boletín Oficial del Estado, 2011. 17/2011 law, of July 5th, on food safety and nutrition. *Boletín Oficial del Estado* 160. July 6th, 2011. <https://www.boe.es/boe/dias/2011/07/06/pdfs/BOE-A-2011-11604.pdf>. (Accessed 20 January 2023).
- Branciarri, R., Ranucci, D., Altissimi, M.S., Mercuri, M.L., Haouet, N., 2020. Estimation of acrylamide exposure in Italian schoolchildren consuming a canteen menu: health concern in three age groups. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 71 (1), 122–131. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1624692>.
- Claeys, W.L., De Meulenaer, B., Huyghebaert, A., Scippo, M., Hoet, P., Matthys, C., 2016. Reassessment of the acrylamide risk: Belgium as a case-study. *Food Control* 59, 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.051>.
- Cressey, P., Thomson, B., Ashworth, M., Grounds, P., McGill, E., 2012. Acrylamide in New Zealand Food and Updated Exposure Assessment. <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/4032-Acrylamide-in-New-Zealand-food-andupdated-exposure-assessment>. (Accessed 10 February 2023).
- Delcamposcole, 2018. Los comedores escolares en España: Del diagnóstico a las propuestas de mejora. www.delcamposcole.org. (Accessed 15 January 2023). https://www.observatoriodelainfancia.es/ficherosoia/documentos/5587_d_Informe-Comedores-Escolares.pdf.
- Delgado-Andrade, C., Mesías, M., Morales, F.J., Seiquer, I., Navarro, M.P., 2012. Assessment of acrylamide intake of Spanish boys aged 11–14 years consuming a traditional and balanced diet. *LWT-Food Sci. Technol.* 46 (1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.006>.
- EC, European Commission, 2017. Commission regulation (EU) 2017/2158 of 20

- November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *Off. J. L304* (2007), 24–44. <https://data.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>.
- EFSA, European Food Safety Authority, 2011. The Food Classification and Description System FoodEx 2 (Draft-revision 1), vol. 215. EFSA Supporting publication, pp. 1–438. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-215>.
- EFSA, European Food Safety Authority, 2015. The Food Classification and Description System FoodEx 2 (Revision 2). EFSA Supporting publication, pp. 1–90. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2015.EN-804.EN-804>.
- EFSA, European Food Safety Authority CONTAM Panel, 2015a. Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA J.* 13, 4104. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>.
- El Tawila, M., Agamy, N., Emara, R., Aboorhyem, S., Elzayat, A., 2020. Dietary risk assessment of acrylamide in school canteen snacks among primary school students in Alexandria Governorate. *J. Med. Sci.* 10, 1639–1643. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.9779>.
- El Tawila, M., Al-Ansari, A.M., Al-Rasheedi, A.A., Neamatallah, A.A., 2017. Dietary exposure to acrylamide from cafeteria foods in Jeddah schools and associated risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* 97 (13), 4494–4500. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8314>.
- FAO, Food and Agriculture Organization, 2009. Code of practice for the reduction of acrylamide in foods (CAC/RCP 67–2009). https://www.fao.org/input/download/standards/11258/CXP_067e.pdf. (Accessed 15 February 2023).
- Fernández, C., Lorenzo, H., Vrotsou, K., Aresti, U., Rica, I., Sánchez, E., 2011. Curvas y tablas de crecimiento (Estudio transversal). In: Instituto de Investigación sobre Crecimiento y Desarrollo. Estudio de crecimiento de Bilbao, pp. 12–26.
- FSANZ, Food Standards Australia New Zealand, 2014. In: 24th Australian Total Diet Study in Food Standards Australia New Zealand. https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/1778-FSANZ_AustDietStudy-web.pdf. (Accessed 16 March 2023).
- González, N., Marqués, M., Calderón, J., Collantes, R., Corraliza, L., Timoner, I., Bosch, J., Castell, V., Domingo, J.L., Nadal, M., 2022. Occurrence and dietary intake of food processing contaminants (FPCs) in Catalonia, Spain. *J. Food Compos. Anal.* 106, 104272 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104272>.
- González-Mulero, L., Mesías, M., Morales, F.J., Delgado-Andrade, C., 2021. Acrylamide exposure from common culinary preparations in Spain, in household, catering and industrial settings. *Foods* 10 (9), 2008. <https://doi.org/10.3390/foods10092008>.
- Guerra-Hernández, E., 2016. Acrylamide in battered foods. In: Gökmen, V. (Ed.), *Acrylamide in Food. Analysis, Content and Potential Health Effects*. Academic Press, Oxford, UK, pp. 253–274.
- Hilbig, A., Freidank, N., Kersting, M., Wilhelm, M., Wittsiepe, J., 2004. Estimation of the dietary intake of acrylamide by German infants, children and adolescents as calculated from dietary records and available data on acrylamide levels in food groups. *Int. J. Hyg Environ. Health* 207 (5), 463–471. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00317>.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 1994. Some industrial chemicals. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Humans* 60, 489–425.

<https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono60.pdf>.
(Accessed 20 March 2023).

- Jeong, H., Hwang, S., Kwon, H., 2020. Survey for acrylamide in processed foods from Korean market and individual exposure estimation using a non-parametric probabilistic model. *Food Addit. Contam.* 37 (6), 916–930. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1746410>.
- Mencin, M., Abramovič, H., Vidrih, R., Schreiner, M., 2020. Acrylamide levels in food products on the Slovenian market. *Food Control* 114, 107267. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107267>.
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F., Morales, F.J., 2018. Acrylamide content in French fries prepared in households: a pilot study in Spanish homes. *Food Chem.* 260, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.140>.
- Mesías, M., Sáez-Escudero, L., Morales, F.J., Delgado-Andrade, C., 2019a. Reassessment of acrylamide content in breakfast cereals. Evolution of the Spanish market from 2006 to 2018. *Food Control* 105, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.026>.
- Mesías, M., Morales, F.J., Delgado-Andrade, C., 2019b. Acrylamide in biscuits commercialised in Spain: a view of the Spanish market from 2007 to 2019. *Food Funct.* 10 (10), 6624–6632. <https://doi.org/10.1039/c9fo01554j>.
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F., Morales, F.J., 2019c. Acrylamide content in French fries prepared in food service establishments. *LWT – Food Sci. Technol.* 100, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.050>.
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F., Morales, F.J., 2020a. Acrylamide in French fries prepared at primary school canteens. *Food Funct.* 11 (2), 1489–1497. <https://doi.org/10.1039/c9fo02482d>.
- Mesías, M., Nouali, A., Delgado-Andrade, C., Morales, F.J., 2020b. How far is the Spanish snack sector from meeting the acrylamide regulation 2017/2158? *Foods* 9 (2), 247. <https://doi.org/10.3390/foods9020247>.
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., Morales, F.J., 2022. An updated view of acrylamide in cereal products. *Curr. Opin. Food Sci.* 46, 100847. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100847>.
- Mojska, H., Gielecińska, I., Szponar, L., Oltarzewski, M., 2010. Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food Chem. Toxicol.* 48 (8–9), 2090–2096. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.009>.
- Molina Pérez, E., Mañes, J., Manyes, L., 2016. Risk assessment of dietary exposure to acrylamide in Spanish and Valencian population. *Rev. Toxicol.* 33, 20–30. <https://www.redalyc.org/pdf/919/91946517004.pdf>. (Accessed 14 September 2022).
- Murkovic, M., Pedreschi, F., 2017. Potentially toxic food components formed by excessive heat processing. In: Uribarri, J. (Ed.), *Dietary AGEs Their Role Heal Disease*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 103–118. <https://doi.org/10.1201/9781315120041-9>.
- Negoită, M., Mihai, A.L., Hornet, G.A., 2022. Influence of water, NaCl and citric acid soaking pre-treatments on acrylamide content in French fries prepared in domestic conditions. *Foods* 11, 1204. <https://doi.org/10.3390/foods11091204>.
- Nematollahi, A., Kamankesh, M., Hosseini, H., Ghasemi, J., Hosseini-Esfahani, F., Mohammadi, A., Khaneghah, A.M., 2020. Acrylamide content of collected food

- products from Tehran's market: a risk assessment study. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 27, 30558–30570. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09323-w>.
- Porca Fernández, C., Bellido Castañeda, V., García Almeida, J.M., Bellido Guerrero, D., 2016. Nuevo enfoque en la valoración de la ingesta dietética. *Nutr. Clín. Med.* 2, 95–107. <https://doi.org/10.7400/NCM.2016.10.2.5040>.
- Shim, J.S., Oh, K., Kim, H.C., 2014. Dietary assessment methods in epidemiologic studies. *Epidemiol. Health* 36, e2014009. <https://doi.org/10.4178/epih/e2014009>.
- Sirot, V., Hommet, F., Tard, A., Leblanc, J., 2012. Dietary acrylamide exposure of the French population: results of the second French total diet study. *Food Chem. Toxicol.* 50 (3–4), 889–894. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.033>.
- Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P.A., Robert, M., Riediker, S., 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419 (6906), 449–450. <https://doi.org/10.1038/419449a>.
- Thompson, F.E., Subar, A.M., 2017. Dietary assessment methodology. In: Coulston, A.M., Boushey, C.J., Ferruzzi, M., Delahanty, L. (Eds.), *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. Academic Press: Elsevier, Oxford, UK, pp. 5–48.
- Verma, V., Yadav, N., 2022. Acrylamide content in starch based commercial foods by using high performance liquid chromatography and its association with browning index. *Curr. Res. Food Sci.* 5, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.010>.
- Wongthanyakram, J., Kheamphet, P., Masawat, P., 2020. Fluorescence determination of acrylamide in snack, seasoning, and refreshment food samples with an iOS gadget-based digital imaging colorimeter. *Food Anal. Methods* 13 (12), 2290–2300. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01835-y>.
- Zajac, J., Bojar, I., Helbin, J., Kolarzyk, E., Potocki, A., Strzemecka, J., Owoc, A., 2013. Dietary acrylamide exposure in chosen population of South Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 20 (2), 351–355. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23772590>.

- Estudio 3: Evaluación de la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en comedores de centros universitarios. **Artículo 3.**

Durante la época universitaria, muchos estudiantes abandonan sus hogares familiares y adoptan un estilo de vida más urbano, caracterizado por la falta de tiempo e interés en el aprendizaje de las formas tradicionales y más saludables de cocinar los alimentos. Estos nuevos patrones alimentarios suelen incluir un consumo excesivo de alimentos altamente procesados, que suponen una fuente importante de exposición a contaminantes químicos como la acrilamida. En muchas ocasiones, los jóvenes realizan la comida principal del día en los comedores universitarios, configurando libremente su menú diario a partir de los platos ofertados en el buffet del comedor, y no siempre seleccionando las opciones más saludables.

El objetivo de este estudio fue evaluar, por primera vez en España, la exposición dietética a acrilamida en estudiantes universitarios a partir del consumo de alimentos en comedores universitarios. Para ello, se recogieron y se analizaron todos los alimentos y comidas ofertados en los menús diarios ofrecidos en dos centros universitarios de la Comunidad de Madrid. La recogida se realizó durante 10 días lectivos consecutivos, siguiendo el método de dieta duplicada recomendado por la EFSA. Para tener en cuenta la libertad de los estudiantes en la elección de su menú diario, se consideraron dos escenarios de exposición, dependiendo de la guarnición seleccionada: ensalada (escenario de menor exposición) o patatas fritas/horneadas (escenario de mayor exposición).

Los resultados mostraron que el consumo frecuente de patatas procesadas como guarnición aumenta considerablemente la ingesta de acrilamida, pudiendo incrementar hasta cuatro veces el riesgo de exposición al contaminante, especialmente en mujeres, debido a su menor peso corporal. Los valores obtenidos en el cálculo del margen de exposición para efectos neoplásicos indicaron un alto nivel de preocupación para la salud de los universitarios, a pesar de que se consideraron exclusivamente los alimentos consumidos durante el almuerzo.

Esta investigación pone de manifiesto la necesidad y la importancia de promover hábitos alimentarios saludables entre los jóvenes universitarios fomentando la

selección de alimentos más seguros en términos de contaminantes químicos de procesado.

Este trabajo ha sido publicado en la revista *Foods* como artículo de investigación:

González-Mulero, L.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J.; Mesías, M. **Dietary exposure to acrylamide in Spanish university canteens by the duplicate diet method.** *Foods* 2023, 12, 4263. <https://doi.org/10.3390/foods12234263>

La doctoranda y primera firmante del artículo ha participado en el diseño experimental, recogida de menús, codificación, manipulación y determinación del contenido de acrilamida. Además, ha contribuido al análisis de datos, discusión de los resultados obtenidos y redacción del artículo científico.



Article

Dietary Exposure to Acrylamide in Spanish University Canteens by the Duplicate Diet Method

Lucía González-Mulero, Cristina Delgado-Andrade*, Francisco J. Morales and Marta Mesías

Abstract: During the university period, many students adopt new dietary patterns, sometimes including the excessive consumption of highly processed foods, which can expose them to process contaminants such as acrylamide. This research aimed to evaluate the dietary exposure to acrylamide of Spanish university students in their campus canteens using the duplicate diet method, and to estimate the associated health risks based on their food consumption habits. Apart from potato-based foods, the analysed food/meals contained non-detectable or low levels of acrylamide (<63 µg/kg). Two exposure scenarios were considered, depending on whether students selected salad (lowest exposure) or processed potatoes (highest exposure) as side dishes. The frequent consumption of processed potatoes could increase acrylamide intake from 6.5 to 26.4 µg/day. Due to their lower body weight, women had a higher risk of acrylamide exposure in both scenarios. The margin of exposure (MOE) values for neoplastic effects indicated high levels of health concern, even only considering the main meal of the day. Furthermore, the risk of acrylamide exposure could increase by more than four times depending on the side dish selected by the students. This research highlights the need to promote healthy dietary habits among young people, encouraging the selection of safer food options in terms of food processing contaminants.

Keywords: acrylamide; dietary intake; university students; university canteen; dietary exposure; risk assessment

1. Introduction

In recent years, there have been significant changes in economic and sociocultural factors that have greatly influenced dietary habits in developed countries. Younger generations, including university students, are increasingly adopting an urban lifestyle characterised by a fast-paced lifestyle and a lack of time to learn traditional and healthier forms of cooking. As a result, this population group has become more dependent on catering and canteens companies, restaurants, and other food supply services [1]. During the university period, it is common for students to leave home and develop new daily habits

that modify their dietary patterns. This can often result in a move away from a balanced diet due to a lack of experience in making healthy decisions or a low perception of the importance of proper nutrition. In that sense, students who eat in university canteens where buffet-style food is offered may not always choose the most recommended options. These decisions can have a significant impact on their health not only during their time at university but also in their future lives [2].

Political and social agents are making efforts to promote healthy eating habits by introducing changes in the knowledge, attitudes, and preferences of consumers. Furthermore, health authorities have increased control over the menus offered by public services to protect the health and well-being of the population. This includes implementing healthy menus and improving the nutritional profile by limiting the availability of sugary and fatty foods and increasing the provision of vegetables and fruits [3,4]. However, sometimes, the menus provided at certain public food establishments and institutions lack variety and include in most cases processed foods. In such instances, the choices available to the consumer are limited.

The consumption of processed foods can lead to exposure to unhealthy compounds known as chemical process contaminants, such as acrylamide. Acrylamide is a chemical compound that can naturally form during the Maillard reaction, which occurs when free amino acids, such as asparagine, react with reducing sugars, such as glucose and fructose [5,6]. In 1994, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified acrylamide as a probable human carcinogen (Group 2A) [7]. This was later supported by the European Food Safety Authority (EFSA) in 2015, when they indicated that dietary exposure to acrylamide may be a concern for neoplastic effects based on evidence from animal studies [8]. Given the potential risks associated with dietary exposure to acrylamide, it is important to estimate the levels of exposure in order to assess the associated risks. In this sense, the margin of exposure (MOE) approach provides an indication of the level of health concern about the acrylamide presence in foods without quantifying the risk. The use of the MOE values can help risk managers in defining the possible actions required to keep the acrylamide exposure as low as possible. Several methodologies are used to estimate the exposure to acrylamide, many of which rely on data from food consumption surveys and the databases of acrylamide content in different foods

[9–11]. It is important to note that different countries, regions, or population groups may have different dietary habits and the levels of acrylamide in food may vary depending on the raw materials and culinary techniques used. However, these factors are often not taken into consideration when estimating the exposure to acrylamide. This fact highlights the need for more comprehensive and detailed assessments of the dietary exposure to this contaminant.

To better approximate the actual exposure to acrylamide, EFSA recommends the use of duplicate diet studies. These studies can improve the accuracy of the acrylamide-level assessments by providing more detailed information about the levels of the contaminant in foods, particularly those prepared at home or in public services or collectivities [8]. In this context, the aim of this research was to assess, for the first time in Spain, the acrylamide dietary exposure in university canteens with the duplicate diet method, estimating the associated risk of acrylamide exposure based on the food consumption habits of university students.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

Acrylamide standard (99%), potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (98%, Carrez- I), and zinc acetate dihydrate (>99%, Carrez-II) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Formic acid (98%), methanol (99.5%), and hexane were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Acrylamide labelled by $^{13}\text{C}_3$ (99%) was acquired from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). To prepare all solutions, deionised water from a Milli-Q Integral 5 water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA) was used. Cellulose syringe filter units (0.22 and 0.45 μm) were acquired from Análisis Vínicos (Tomelloso, Ciudad Real, Spain) and Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were obtained from Waters (Milford, MA, USA). All chemicals, solvents, and reagents used were of analytical grade.

2.2. Study Design and Food Samples

For the study, two university canteens located in Madrid (Spain) were selected (canteen 1 and canteen 2). Each canteen was associated with different universities and operated by separate companies, involving the different handling and preparation of food. The research was conducted between February and March

2020. Both canteens participated in a two-consecutive-week trial during which the foods and meals served for lunch between Monday and Friday were collected in accordance with the duplicate diet method [8] (Table 1). Both lunch menus were composed of a first course (first dish), a second course with a side dish (second dish), a dessert, and bread. When the canteen offered salad or French fries/baked rustic fries as options of side dishes, both foods were collected to address two exposure scenarios associated with the choice of consumption (the lowest exposure when salad was selected and the highest exposure when processed potatoes were selected). This allowed the researchers to assess the potential impact of different food choices by university students on acrylamide exposure. A total of 117 different foods/meals were collected. After collection, the food samples were coded, photographed, and processed in the laboratory. Each meal was assigned FoodEx 2 classifications according to EFSA [8,12], which is a standardised food classification system used to facilitate data collection and analysis. The FoodEx 2 system categorises foods based on their composition and culinary preparation, allowing for a more accurate assessment of acrylamide exposure. To prepare the food samples for analysis, the edible portion of each meal was separated, weighed, and homogenised using a hand blender (Taurus, vital CM, Spain). Each food/meal was homogenised separately and after that, the aliquots of each sample were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis.

2.3. Acrylamide Determination by LC-ESI-MS/MS

The acrylamide content of foods and meals was determined according to the procedure described by González-Mulero et al. [13]. Two grams of each ground sample was weighted and mixed with 37.6 mL of Milli-Q water, 4 mL of hexane to remove the fat content, and 400 μL of a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide methanolic solution as an internal standard. The mixture was homogenised and then treated with 1 mL of both Carrez I and Carrez II solutions and centrifuged. After the hexane removal, the samples were filtered through a 0.22 μm filter and cleaned using Oasis-HLB cartridges. Sample extracts and calibration standards were analysed on an Agilent 1200 liquid chromatograph coupled to an Agilent Triple Quadrupole MS detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The precision, repeatability, and reproducibility of the analytical method were assessed by analysing different samples on the same day (precision), by different operators (repeatability), and on different days (reproducibility).

Table 1. Description of the menus collected from the university canteens.

	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	
University canteen 1	Lunch week 1	Lentils stew Cod fish in tomato sauce French fries / mix salad Pudding Bread	Garlic soup with bread and poached egg Battered squid rings French fries / mix salad Orange Bread	Spaghetti with garlic Chicken stew French fries / mix salad Flan Bread	Rice stew with vegetables Sauteed green asparagus with scrambled eggs French fries / mix salad Apple Bread	Bean stew Grilled swordfish French fries / mix salad Yoghurt Bread
	Lunch week 2	Braised broccoli with garlic Fried eggs French fries / mix salad Rice pudding Bread	Canned white asparagus with salad Fried blue whiting French fries / mix salad Chocolate and cream cup Bread	Spaghetti carbonara Grilled chicken French fries / mix salad Apple Bread	Potatoes with cod stew Roasted pork loin French fries / mix salad Pudding Bread	Vegetables cream Meat lasagne French fries / mix salad Yoghurt Bread
University canteen 2	Lunch week 1	Mixed paella Pork loin in tomato sauce Baked rustic fries / mix salad Strawberry jelly Bread	Pumpkin cream Baked pomfret French fries / mix salad Coconut mousse Bread	Sautéed green beans Spanish omelette with fried green pepper Mix salad Custard with biscuit Bread	Fried spring rolls Chicken stew Baked rustic fries / mix salad Banana Bread	Mixed salad Red wine-braised sausages Baked rustic fries Orange Bread
	Lunch week 2	Vegetable and garlic cream Meatballs in tomato sauce Baked rustic fries / mix salad Yoghurt Bread	Sauteed vegetables Cod fish in tomato sauce Boiled white rice Rice pudding Bread	Pasta with tomato sauce Baked redfish with sautéed vegetables French fries / mix salad Chocolate custard Bread	Pasta salad Pork loin in tomato stew French fries / mix salad Strawberry jelly Bread	Vegetables cream Grilled mackerel Baked rustic fries / mix salad Melon Bread

The samples spiked with acrylamide showed a recovery rate ranging from 94% to 103%, with all determinations having relative standard deviations (RSDs) below 10%. To determine the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for the analytical method, lower concentrations of standards were injected, and their signal-to-noise ratios were calculated. The concentration that yielded a signal-to-noise ratio of 3 was assigned as the LOD (4.5 µg/kg), while the concentration that yielded a signal-to-noise ratio of 10 was assigned as the LOQ (15 µg/kg). The samples were analysed in duplicate and the results were reported in µg/kg.

To examine the accuracy of the findings, proficiency tests were conducted through the Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) program. FAPAS® Quality Control Test Materials are real food matrices used as quality control materials by laboratories participating in a proficiency test. The most recent results for the food matrices provided by FAPAS were for crispbread (test 30118, January 2022), coffee (test 30117, December 2021), and potato crisps (test 30120, April 2022). These tests yielded z-scores of -0.1, 0.1, and 0.4, respectively.

2.4. Estimation of Acrylamide Exposure

To determine the acrylamide exposure of university students (µg/kg bw/day) from consuming food and meals provided by lunches at university canteens, a deterministic approach was used. The acrylamide contribution of each meal for each individual was calculated by combining the acrylamide content of the meal with the weight of the edible portion of the serving. For samples with an acrylamide concentration below the LOQ (< 15 µg/kg), their contribution to acrylamide intake was disregarded to avoid overestimating the acrylamide exposure, therefore, the lower bound scenario was estimated. The dietary acrylamide exposure of university students was calculated by adding up the acrylamide contribution of all the foods/meals consumed during a single day at lunch and then divided by their body weight (bw) (kg) (Equation (1)). An estimate was made of the average daily exposure over the 10-day study period.

Eq.1.

$$\text{Estimated dietary exposure} = \Sigma \frac{\text{acrylamide content of food} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) \times \text{Food consumption} \left(\frac{\text{kg}}{\text{day}} \right)}{\text{Body weight}}$$

The dietary exposure was estimated separately for males and females, using an average body weight data of 72 kg for males and 60 kg for females, as

reported for a Spanish population aged 19–24 years [14]. The results were expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day.

To assess the risk of acrylamide exposure, a margin of exposure (MOE) was calculated for both neurotoxic and neoplastic effects, using the following formula:

Eq.2.

$$\text{MOE} = \frac{\text{BMDL10 } (\mu\text{g}/\text{kg per day})}{\text{Estimated dietary exposure } (\mu\text{g}/\text{kg per day})}$$

To assess the risk of neurotoxic effects, a benchmark dose lower confidence limit (BMDL10) of $430 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day, previously calculated in rats [8], was used. MOEs below 125 may indicate a potential human health concern for neurotoxic effects. For carcinogenic effects, a BMDL10 of $170 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day, previously calculated in male mice for Harderian gland tumours, was used. In this case, an MOE below 10,000 may indicate a potential risk [8].

2.5. Statistical Analyses

All statistical analyses were conducted using Statgraphics Centurion XVII software. The data were presented as means and standard deviations (SD). Student's t-test was used to identify the overall significance of the differences. Levene's test was used to check for variance homogeneity. All statistical analyses were carried out assuming a significance level of $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Acrylamide Content in Foods and Meals Provided by the University Canteens

Table 2 provides a summary of the acrylamide content in foods and meals served in the lunch at university canteens. Only 31% of the total 117 foods/meals analysed (36 samples) had acrylamide concentrations above the LOQ ($15 \mu\text{g}/\text{kg}$). The distribution according to the course type is as follows: 5 (13.9%) were first courses, 3 (8.3%) were second courses, 17 (47.2%) were side dishes, 10 (27.8%) were breads, and 1 (2.8%) was a dessert.

Considering only foods/meals with quantifiable acrylamide levels (Table 2), all the samples that were part of the first course, second course, and desserts showed low acrylamide concentrations, ranging from $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ (chocolate custard) to $63 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Spanish omelette with fried green pepper). The first courses consisted of stews or creams where the presence of acrylamide would not be expected. However,

the preparation of these meals involves frying or sautéing certain vegetables, such as peppers, onions, or carrots, which can undergo the Maillard reaction during the cooking process. These vegetables contain sugars and asparagine, which promote the formation of the contaminant when exposed to heat [15,16].

Table 2. Acrylamide content in foods/meals compounding lunches of university canteens.

Meal	Foods	n ^a	FoodEx 2 code	Acrylamide content (µg/kg)	Edible serving (g)	Acrylamide contribution (µg/serving)
Canteen 1						
First course	Lentils stew	1	A00QD#F28.A07GM	31	378	11.6
	Garlic soup with bread and poached egg	1	A041Z#F04.A0DRD\$F04.A00GZ	52	432	22.6
	Bean stew	1	A03VR	22	334	7.4
Second course	Battered squid rings	1	A02JJ#F28.A07HL	17	149	2.6
Side dish	French fries	10	A0BYV	221 ± 444	120 ± 32	27.2 ± 54.4
	Bread	10		15 ± 0.9	90 ± 8	1.3 ± 0.3
Canteen 2						
First course	Vegetable and garlic cream	1	A03XY#F04.A00GZ	18	241	4.3
	Vegetable cream	1	A03XY	18	252	4.6
Second course	Spanish omelette with fried green pepper	1	A03YN#F04.A00ZT#F04.A019A#F28.A07GR	63	225	14.2
	Meatballs in tomato sauce	1	A03XG#F04.A044C	23	172	4.0
Side dish	French fries	2	A0BYV	41 ± 37	112 ± 20	4.2 ± 3.4
	Baked rustic fries	5	A011R	242 ± 120	134 ± 13	32.0 ± 14.6
Dessert	Chocolate custard	1	A02PX#F04.A034L	15	115	1.8

Only dishes with an acrylamide concentration higher than LOQ (15 µg/kg) are detailed (36 from a total of 117 foods/meals analysed). ^an refers to the times that foods/meals were collected during the study period. Data are expressed as mean ± SD.

Additionally, acrylamide may be introduced into the meals through ingredients commonly added to these dishes, such as spices or seasonings. Red

paprika, turmeric, or black pepper, for example, have been reported to contain significant amounts of the contaminant [17,18]. Although in small quantities comparable to those observed in this study, the presence of acrylamide in soups, purees, and legume stews has been described by other researchers in previous studies [19,20]. As for the second courses, the acrylamide content in the Spanish omelette with green peppers could be attributed to both the fried potatoes included in the omelette [13] and the fried green peppers [21]. In the case of meatballs, it was likely linked to the contaminant content in the tomato sauce [22], although the contribution of other ingredients included in the meal, such as fried vegetables, cannot be ruled out as a potential source of acrylamide. Regarding desserts, only the chocolate custard showed detectable levels of this compound, which may be due to the use of chocolate as an ingredient in the recipe [23].

Low concentrations of acrylamide were also observed in the bread samples, with detectable levels only found in the breads from canteen 1 (mean value of 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Results were significantly lower than the benchmark levels established by the European Regulation for wheat-based bread, which is set at 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [24].

The processed potatoes, including the French fries and baked rustic fries served as side dishes, showed the highest concentrations of acrylamide. Canteen 1 served French fries on the 10 days of the study, with acrylamide levels ranging from 16 to 1304 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Meanwhile, canteen 2 offered potatoes as a side dish on 8 of the 10 study days, including French fries for 3 days and rustic potatoes for 5 days. The acrylamide levels varied from non-detectable (in one sample) to 67 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for French fries and between 93 and 351 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for rustic potatoes. Only the French fries sample from Monday of the first week in canteen 1 exceeded the reference value established by the European regulation for acrylamide in this food (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [24]. Although French fries are typically linked to a higher acrylamide content than baked potatoes [25], the levels observed in this study were comparable between the two or even lower in French fries (average content: 185 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for French fries, considering levels from two canteens and 242 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for baked rustic fries). Previous studies about acrylamide in French fries prepared at Spanish school canteens and food service establishments reported higher concentrations (mean values: 329 and 303 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ranges from <20 to 4000 and from <20 to 1068 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively) [26,27].

To determine the real contribution of each food/dish to acrylamide exposure, the weight of the edible portion was considered (Table 2). The processed potatoes were the greatest contributors to acrylamide exposure, with the highest values

found in baked potatoes (32.0 µg/serving), followed by French fries (27.2 and 4.2 µg/serving in canteen 1 and 2, respectively). The main courses contributed in a range between 2.6 and 22.6 µg/serving, while the lowest contribution was associated with the desserts and bread due to both lower levels of the contaminant and smaller portion sizes.

3.2. Acrylamide Intake Estimation in University Canteens under Different Scenarios

Table 3 displays the acrylamide intake levels calculated for each day of the week over the course of the two-week trial. The average values for both a one-week and a ten-day period of data collection were also calculated for each university canteen. Two scenarios were assessed, considering the selection of side dishes when two options are offered on the menu: the lowest exposure scenario, which assumes the selection of salad, and the highest exposure scenario, which assumes the selection of French fries/baked rustic fries. If the student chose to eat salad as long as it was included in the menu, the estimated acrylamide intake would range from 1.3 to 26.4 µg/day in canteen 1 and from negligible to 43.0 µg/day in canteen 2. On the contrary, if the student chose to eat processed potatoes, the acrylamide exposure would increase in canteen 1, ranging from 2.3 to 173.0 µg/day, not being affected in canteen 2 compared to the lowest exposure scenario. The mean acrylamide intake was not significantly different between the two canteens when comparing the lowest ($p = 0.7751$) or the highest exposure ($p = 0.4702$). Taking into account the two canteens together, the average daily intake of acrylamide could range from 6.5 to 26.4 µg, with significant differences ($p = 0.0311$), depending on whether the student chose salad or processed potatoes as side dishes.

In canteen 1, acrylamide was consumed daily due to the presence of the contaminant in the bread, which was included daily on the menu (Table 3). The intake increased when the first course also contained acrylamide and reached even higher levels when acrylamide was present in both the first and second courses (on Tuesday of the first week). The highest exposure in canteen 1 was associated with the consumption of French fries as a side dish, to such an extent that 82% of the daily consumption could be from this food if selected from the menu (Figure 1). The daily acrylamide intake could reach values of up to 173.0 µg/day in this scenario (Table 3). On the other hand, in canteen 2, five of the

menus included in the study did not contain acrylamide levels. In this case, the maximum levels were reached when processed potatoes were included in the menu as the only alternative (Friday of the first week) or as the side dish chosen voluntarily (in the highest exposure scenario). The daily acrylamide intake could reach values of up to 43.0 µg (Table 3), assuming around 71% of the daily intake of the contaminant (Figure 1).

Table 3. Acrylamide intake through the consumption of the menus provided by the university canteens.

Acrylamide intake (µg)						
<i>LOWEST EXPOSURE</i>						
	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Mean
Canteen 1						
Week 1	13.0 ± 0.2	26.4 ± 0.7	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	8.6 ± 0.9	10.1 ± 10.4
Week 2	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Daily mean (10 days)						5.7 ± 8.3a
Canteen 2						
Week 1	nd	nd	14.2 ± 1.0	nd	43.0 ± 0.7	11.5 ± 18.7
Week 2	8.3 ± 0.3	nd	1.8 ± 0.1	nd	4.6 ± 0.5	2.9 ± 3.5
Daily mean (10 days)						7.2 ± 13.5a
Both canteens						6.5 ± 1.1A
<i>HIGHEST EXPOSURE</i>						
	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Mean
Canteen 1						
Week 1	173.0 ± 2.6	52.9 ± 1.4	8.0 ± 0.1	27.8 ± 0.7	21.6 ± 1.9	56.7 ± 67.1
Week 2	28.6 ± 0.5	5.2 ± 0.1	3.5 ± 0.1	5.3 ± 0.3	2.3 ± 0.1	9.0 ± 11.0
Daily mean (10 days)						32.8 ± 51.8a
Canteen 2						
Week 1	42.8 ± 0.2	4.5 ± 0.3	14.2 ± 1.0	12.0 ± 0.4	43.0 ± 0.7	23.3 ± 18.2
Week 2	38.4 ± 0.9	nd	8.3 ± 0.3	nd	37.0 ± 1.3	16.7 ± 19.4
Daily mean (10 days)						20.0 ± 18.1a
Both canteens						26.4 ± 9.1B

nd: non-detected. Data are expressed as the total intake each day of the study and daily mean during the whole 10-day period ± standard deviation considering only lunches. The lowest exposure involves the selection of salad as side dishes when offered in the menu. The highest exposure involves the selection of French fries/baked rustic fries as side dishes when offered in the menu. Same lowercase letters in the values for the daily mean (10 days) involve no significant differences between schools within each exposure scenario. Different uppercase letters in the values for both canteens involve significant differences between the lowest exposure and highest exposure.

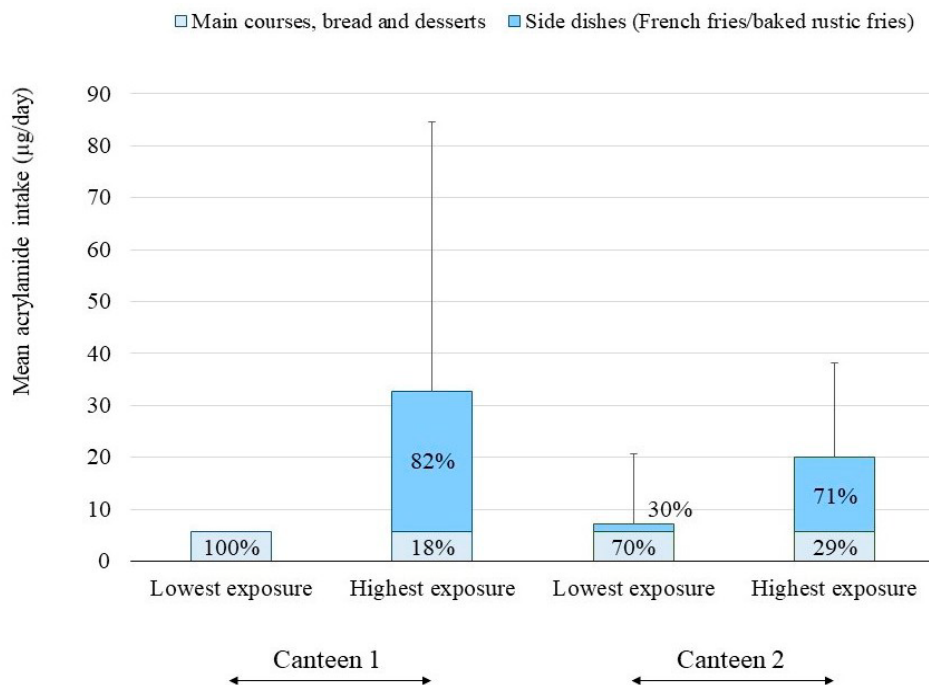


Figure 1. Mean daily acrylamide intake (μg) through the consumption of the menus provided by the university canteens and the contribution of side dishes and the rest of the foods/meals to the total daily intake.

Although in recent years there has been an attempt to promote healthy eating habits among the general population, the consumption of fried, pre-cooked, or fast foods is still high, particularly among the younger population. Studies conducted on university students have revealed that the diet of the university population is of low quality, with a moderate-to-low adherence to the Mediterranean diet, where more than 80% of the population needs changes towards a healthier dietary pattern [28]. These habits include, among other factors, a high tendency to consume snacks and prepared meals even three or more times a week, including French fries [29]. A study carried out in a Spanish university canteen revealed a high tendency among young people to choose French fries as a side dish, with significant relationships found between the student's gender and dish choice. Men ate more French fries than women (78% vs. 56.5%) and only 8.9% of them refused to have a side dish vs. the 35% of women [2]. A similar trend was observed among university students in Belgium, aged between 18 and 35 years. It was found that men ate French fries

more frequently, usually a couple of times a month. However, the majority of women consumed French fries only occasionally or not at all likely due to a greater concern for a healthy diet and weight maintenance [30].

Our findings suggest that the regular consumption of French fries could increase the daily intake of acrylamide even by up to 92.5% (i.e., Monday, canteen 1, week 1). Therefore, this habit should be considered when evaluating the risks associated with the exposure to this contaminant. Furthermore, given the significant impact of frequent consumption of French fries in canteens on acrylamide intake, it is important to recognise the responsibility of caterers and canteen kitchens in mitigating acrylamide exposure by reducing the amount of this contaminant in their prepared products, particularly French fries, as previously suggested by Mestdagh et al. [30].

Researchers from Poland conducted a survey among a group of individuals between the ages of 16 and 35 to assess their knowledge regarding the presence of contaminants in the diet. The results showed that only 20% of the respondents take into consideration the potential content of harmful substances when choosing food products. With respect to acrylamide, only 7% of those surveyed reported being aware that this compound forms in food during its processing, with most having obtained this information from the Internet [31]. It is therefore necessary to not only promote the consumption of balanced diets among young people, but also to provide adequate training in food safety to encourage the selection of safe food options for consumers.

3.3. Evaluation of the Potential Risk Related to the Exposure to Acrylamide at the University Canteens

This study evaluated the mean dietary exposure to acrylamide in university students attending university canteens, separately for males and females and considering the scenarios of greater and lesser exposure to the contaminant (Table 4). The results showed that, taking into account the influence of body weight, women had a slightly higher acrylamide exposure compared to men, without significant differences ($p < 0.05$). When comparing the two canteens, as a consequence of the acrylamide levels found in the menus, the lowest exposure scenarios were similar in both food service establishments (range: 0.07–0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day). However, in the highest exposure scenarios, exposure to the contaminant was 40% lower in the second canteen

(0.26 vs. 0.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day in men and 0.33 vs. 0.54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day in women). Due to the high variability in the results, significant differences among the values could not be identified ($p < 0.05$).

Table 4. Estimation of the risk associated with dietary exposure to acrylamide in lunches of university canteens.

	Men		Women	
	Lowest exposure	Highest exposure	Lowest exposure	Highest exposure
Faculty canteen 1				
Mean exposure \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day)	0.07 \pm 0.11aA	0.43 \pm 0.67aA	0.10 \pm 0.14aA	0.54 \pm 0.86aA
MOE for neurotoxic effects	5791	1011	4525	790
MOE for neoplastic effects	2289	400	1789	312
Faculty canteen 2				
Mean exposure \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day)	0.09 \pm 0.17aA	0.26 \pm 0.23aA	0.12 \pm 0.22aA	0.33 \pm 0.30aA
MOE for neurotoxic effects	4615	1658	3606	1296
MOE for neoplastic effects	1824	656	1426	512
Both university canteens				
Mean exposure \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day)	0.08 \pm 0.14aA	0.34 \pm 0.50aA	0.11 \pm 0.18aA	0.44 \pm 0.64aA
MOE for neurotoxic effects	5136	1257	4014	982
MOE for neoplastic effects	2031	497	1587	388

SD: standard deviation. Same lowercase letters involve no significant differences between lowest and highest exposure for a same sex in each canteen. Same uppercase letters involve no significant differences between sex for each exposure scenario.

Based on the overall data collected from both canteens (Table 4), the average exposure to acrylamide would be 0.08 and 0.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day for men and women, respectively, when salad was selected as a side dish whenever

it was offered on the menu (lowest exposure scenario). In contrast, exposure would change to 0.34 and 0.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day for men and women, respectively, when the selected side dish was French fries/baked rustic fries (highest exposure scenario). The results were close to those described by Mestdagh et al. [30] when evaluating the dietary intake of acrylamide in the university canteen lunches of a Belgian university (mean acrylamide exposure: 0.537 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day). It should be noted that this study only estimated the exposure to acrylamide from canteen lunches and did not take into account other sources of exposure from the rest of the diet throughout the day. Comparable findings regarding the dietary exposure to acrylamide among university students have also been reported in Ningxia (China), despite evaluating the complete daily diet of the students. The study found that the average exposure to the contaminant was 0.515 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day (0.483 and 0.530 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day for males and females, respectively), with potato products contributing 23.87% to the total exposure [32]. When three different exposure scenarios were assessed (low, middle, and high), our data were close to the middle scenario in the case of the highest exposure situation of canteen 1. Nevertheless, the highest exposure scenario in canteen 2 was closer to the low-exposure group considered by these researchers. They performed the estimation evaluating the total diet through a food frequency questionnaire and a database of acrylamide content in which food samples were purchased from different markets and then prepared according to several cooking methods [33]. Higher levels of acrylamide exposure have been reported in university students from Lima (Peru). In this case, the estimation was again made by applying a database of acrylamide content and a food frequency questionnaire evaluating the complete diet, reporting the exposure of 1.37 and 1.41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw per day in male and female students, respectively [34]. Most studies found in the literature use the methodology described above to assess the exposure to acrylamide through the diet. These studies usually rely on dietary surveys (such as 24 h recall, food dietary records, or food frequency questionnaires) to evaluate the food consumption and databases or the random sampling of foods to determine their acrylamide content [9–11]. However, these estimates may not take into account the significant variability that can exist in the acrylamide levels in processed foods, depending on factors such as the raw materials used or the specific culinary techniques employed [13] and the amount of food consumed

by each individual, among others. To address these limitations, duplicate diet studies offer a more realistic estimate of the exposure and the associated risk by evaluating the real content of the contaminant and the precise amount of food consumed by a specific group [8]. The differences in the applied methodologies make it difficult to compare the results of the studies found in the literature. In that sense, it has been reported that the validity of the acrylamide intake estimation using a dietary record method could be reasonably high when compared to the analytical value of the duplicate diet method, with further improvement being required for estimating the acrylamide intake using food frequency questionnaires [35].

Acrylamide and its metabolite glycidamide are genotoxic and carcinogenic compounds due to their ability to potentially damage DNA and lead to cancer. The risk assessment for genotoxic compounds, for which no tolerable daily intake has been recommended, typically uses the margin of exposure (MOE) approach. An MOE above 10,000 is generally considered to indicate a low health concern for a compound with genotoxic and carcinogenic properties. In the same way, an MOE above 125 is generally considered to indicate the low health concern for a compound with neurotoxic properties [8]. In the present study, the MOE values suggest significant food health concerns for university students. The MOEs calculated for neurotoxic and neoplastic effects in university students are presented in Table 4. The MOE values for neurotoxic effects ranged from 982 to 5136, which were all above the reference value of 125, indicating a low health concern for these effects. However, the MOE values for neoplastic effects ranged from 388 to 2031, which were all well below the reference value of 10,000, indicating a high health concern for these effects with a higher risk in women than in men. Again, it is important to note that exposure was only estimated from lunch consumption, and thus, the total exposure to acrylamide is underestimated. This would further aggravate the concern regarding the high levels of exposure to acrylamide among university students. A similar trend was reported in university students from China, with MOE values exhibiting figures under 10,000 and even in some cases were below 200 but, in this case, assessing the total diet of the students [32]. According to the results, the risk of acrylamide exposure can increase by more than four times based on the food choices made by students. Therefore, it is crucial to promote healthy dietary habits during this stage of life when permanent patterns of

nutritional behaviour are being constructed and implement suitable mitigation measures while cooking in public canteens.

4. Conclusions

This investigation focused on the evaluation of dietary exposure to acrylamide in university canteens, estimating the associated risk based on the food consumption habits of university students by establishing a maximum and a minimum scenario of exposure to the contaminant. As recommended by EFSA, a duplicate diet study was designed to better approximate to the actual exposure to acrylamide considering the real portions and analysing the acrylamide concentrations in all the collected foods/meals provided in the lunches of the university canteens. Most of the analysed food preparations either did not contain detectable levels of acrylamide or had low levels. However, the processed potatoes were found to be the primary source of the contaminant, which could result in an increased daily acrylamide exposure if they are selected as a side dish when offered on the menu. Due to their lower body weight, women had higher acrylamide exposure compared to men. The calculation of the MOE values for neoplastic effects indicated a high health concern, with a higher risk in women than men, even considering only the central meal of the day. Moreover, the risk of acrylamide exposure can increase by more than four times depending on the side dish selected by students. Our research establishes the need to promote healthy dietary habits among young people, but also to provide proper training in food safety targeting both consumers and food handlers to encourage the selection of safer food options in terms of food processing contaminants.

Author Contributions: Conceptualisation, C.D.-A., M.M. and F.J.M.; methodology, L.G.-M. and M.M.; software, L.G.-M. and F.J.M.; validation, C.D.-A. and M.M.; formal analysis, L.G.-M.; investigation, C.D.-A., M.M. and F.J.M.; resources, C.D.-A., M.M. and F.J.M.; data curation, L.G.-M., C.D.-A. and M.M.; writing—original draft preparation, L.G.-M.; writing—review and editing, C.D.-A., M.M. and F.J.M.; visualisation, C.D.-A., M.M. and F.J.M.; supervision, C.D.-A., M.M. and F.J.M.; project administration, C.D.-A. and M.M.; funding acquisition, C.D.-A. and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the R&D project ACRINTAKE (RTI2018-094402-B-I00), financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ and the Regional Development European Fund (“FEDER”): A way to make Europe.

Acknowledgments: The authors wish to thank I. Alvarez for her technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Monteiro, C.A.; Moubarac, J.C.; Levy, R.B.; Canella, D.S.; Louzada, M.L.D.C.; Cannon, G. Household availability of ultra-processed foods and obesity in nineteen European countries. *Public Health Nutr.* **2018**, *21*, 18–26. [[CrossRef](#)]
2. Cerezo-Prieto, M.; Frutos-Esteban, F.J. Hacia rutas saludables: Efecto de las etiquetas nutricionales en las conductas alimentarias en un comedor universitario. *Aten. Primaria* **2021**, *53*, 10202. [[CrossRef](#)]
3. AESAN. Documento de Consenso Sobre la Alimentación en los Centros Educativos. Available online: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/educanaos/documento_consenso.pdf (accessed on 15 November 2022).
4. Capitán Gutiérrez, J.M.; Cedillo, M.A.; García, M.A. Implantación, Seguimiento y Promoción de un Menú Saludable en la Universidad de Sevilla — “Comer Sano Suená Bien”. *Rev. Española Nutr. Hum. Diet.* **2017**, *21*, 48–49.
5. Rannou, C.; Laroque, D.; Renault, E.; Prost, C.; Sérot, T. Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods. *Food Res. Int.* **2016**, *90*, 154–176. [[CrossRef](#)]
6. Murkovic, M.; Pedreschi, F. *Dietary AGEs and Their Role in Health and Disease*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; pp. 103–118.
7. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Volume 60). Available online: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Industrial-Chemicals-1994> (accessed on 20 January 2023).
8. EFSA. Scientific Opinion on acrylamide in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.* **2015**, *13*, 4104.
9. Zając, J.; Bojar, I.; Helbin, J.; Kolarzyk, E.; Potocki, A.; Strzemecka, J.; Owoc, A. Dietary acrylamide exposure in chosen population of South Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2013**, *20*, 351–355.
10. Wyka, J.; Tajner-Czopek, A.; Broniecka, A.; Piotrowska, E.; Bronkowska, M.; Biernat, J. Estimation of dietary exposure to acrylamide of Polish teenagers from an urban environment. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *75*, 151–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Barón Cortés, W.R.; Vásquez Mejía, S.M.; Suárez Mahecha, H. Consumption study and margin of exposure of acrylamide in food consumed by the Bogotá population in Colombia. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *100*, 103934. [[CrossRef](#)]
12. EFSA. Overview of the procedures currently used at EFSA for the assessment of dietary exposure to different chemical substances. *EFSA J.* **2011**, *9*, 2490. [[CrossRef](#)]
13. González-Mulero, L.; Mesías, M.; Morales, F.J.; Delgado-Andrade, C. Acrylamide exposure from common culinary preparations in Spain, in household, catering and industrial settings. *Foods* **2021**, *10*, 2008. [[CrossRef](#)]
14. Aranceta-Bartrina, J.; Gianzo-Citorese, M.; Pérez-Rodrigo, C. Prevalencia de sobrepeso, obesidad y obesidad abdominal en población española entre 3 y 24 años. Estudio ENPE. *Rev. Esp. Cardiol.* **2020**, *73*, 290–292. [[CrossRef](#)]
15. Yu, J.; Zhang, S.; Zhang, L. Evaluation of the extent of initial Maillard reaction during cooking some vegetables by direct measurement of the Amadori compounds. *J. Sci.*

- Food Agric.* **2018**, *98*, 190–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bařaran, B. The effect of different orders of vegetables in frying on acrylamide levels. *Turk. J. Agric. Res.* **2022**, *9*, 49–59. [[CrossRef](#)]
 17. Jeong, H.; Hwang, S.; Kwon, H. Survey for acrylamide in processed foods from Korean market and individual exposure estimation using a non-parametric probabilistic model. *Food Addit. Contam. Part A* **2020**, *37*, 916–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 18. Wongthanyakram, J.; Kheamphet, P.; Masawat, P. Fluorescence determination of acrylamide in snack, seasoning, and refreshment food samples with an IOS gadget-based digital imaging colorimeter. *Food Anal. Methods* **2020**, *13*, 2290–2300. [[CrossRef](#)]
 19. Delgado-Andrade, C.; Mesías, M.; Morales, F.J.; Seiquer, I.; Navarro, M.P. Assessment of acrylamide intake of Spanish boys aged 11–14 years consuming a traditional and balanced diet. *LWT Food Sci. Technol.* **2012**, *46*, 16–22. [[CrossRef](#)]
 20. Lambert, M.; Inthavong, C.; Hommet, F.; Leblanc, J.C.; Hulin, M.; Guérin, T. Levels of acrylamide in foods included in ‘the first French total diet study on infants and toddlers’. *Food Chem.* **2018**, *240*, 997–1004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 21. Song, Y.; Ding, Z.; Peng, Y.; Wang, J.Y.; Zhang, T.; Yu, Y.; Wang, Y. Acrylamide formation and aroma evaluation of fried pepper sauce under different exogenous Maillard reaction conditions. *Food Chem.* **2022**, *15*, 100413. [[CrossRef](#)]
 22. Tateo, F.; Bononi, M.; Andreoli, G. Acrylamide levels in cooked rice, tomato sauces and some fast food on the Italian market. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 232–235. [[CrossRef](#)]
 23. Gil, M.; Gallego, V.; Jaramillo, J.; Gil, M.; Uribe, D. Advances on acrylamide in cocoa and its derivatives: A challenge to control from postharvest to the industrialization. *Curr. Opin. Food Sci.* **2022**, *47*, 100903. [[CrossRef](#)]
 24. EC. European Commission regulation (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *Off. J.* **2017**, *L304*, 24–44.
 25. Orsák, M.; Kotíková, Z.; Podhorecká, K.; Lachman, J.; Kasal, P. Acrylamide formation in red-, purple- and yellow-fleshed potatoes by frying and baking. *J. Food Compos. Anal.* **2022**, *110*, 104529. [[CrossRef](#)]
 26. Mesías, M.; Delgado-Andrade, C.; Holgado, F.; Morales, F.J. Acrylamide in French fries prepared in food service establishments. *LWT Food Sci. Technol.* **2019**, *100*, 83–91. [[CrossRef](#)]
 27. Mesías, M.; Delgado-Andrade, C.; Holgado, F.; Morales, F.J. Acrylamide in French fries prepared at primary school canteens. *Food Func.* **2020**, *11*, 1489–1497. [[CrossRef](#)]
 28. García-Meseguer, M.J.; Cervera Burriel, F.; Vico García, C.; Serrano-Urrea, R. Adherence to Mediterranean diet in a Spanish university population. *Appetite* **2014**, *78*, 156–164. [[CrossRef](#)]
 29. Nelson Laska, M.; Graham, D.; Moe, S.G.; Lytle, L.; Fulkerson, J. Situational characteristics of young adults’ eating occasions: A real-time data collection using Personal Digital Assistants. *Public Health Nutr.* **2011**, *14*, 472–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 30. Mestdagh, F.; Lachat, C.; Baert, K.; Moons, E.; Kolsteren, P.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Importance of a canteen lunch on the dietary intake of acrylamide. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 509–516. [[CrossRef](#)]
 31. Kowalska, M.; Zbikowska, A.; Onacik-Gür, S.; Kowalska, D. Acrylamide in food products—Eating habits and consumer awareness among Medical School students. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2017**, *24*, 570–574. [[CrossRef](#)]
 32. Gao, Q.; Xue, Y.; Yuan, X.; Gao, H.; Wu, C. Dietary exposure to acrylamide of

- university students in Ningxia of Northwest China and the effect on their neurobehavioral performance and oxidative stress in serum. *Food Sci. Nutr.* **2022**, *11*, 661–667. [[CrossRef](#)]
33. Gao, J.; Zhao, Y.; Zhu, F.; Ma, Y.; Li, X.; Miao, H.; Wu, Y. Dietary exposure of acrylamide from the fifth Chinese Total Diet Study. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *87*, 97–102. [[CrossRef](#)]
34. Tacca Ortiz, C.M. Conocimiento e Ingesta de Acrilamida en Estudiantes de Nutrición de la UNFC, 2018. Bachelor's Thesis, Federico Villarreal National University, Lima, Peru, 2020.
35. Yamamoto, J.; Ishihara, J.; Kotemori, A.; Nakadate, M.; Sobue, T. Validity of estimated acrylamide intake by the dietary record method and food frequency questionnaire in comparison with a duplicate method: A pilot study. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2018**, *64*, 340–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- Estudio 4: Evaluación de la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en comedores de centros de trabajo. **Resultados inéditos**

Caracterización de los menús ofrecidos en comedores de centros de trabajo

Para evaluar la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en comedores de centros de trabajo, se llevó a cabo un estudio en el que se recogieron todos los alimentos y comidas servidos en el almuerzo de los comedores de dos centros. La recogida se hizo de lunes a viernes durante dos semanas consecutivas siguiendo el método de dieta duplicada.

Las **Tablas 11** y **12** incluyen una descripción de los alimentos que componen los menús recogidos. En el centro de trabajo 1 se recogieron dos opciones de primeros y segundos platos, postres y panes en cada menú diario (**Tabla 11**), mientras que en el centro de trabajo 2 la recogida incluyó una única opción por menú (**Tabla 12**). La mayor oferta de platos en el primer centro permitió simular 16 combinaciones de menú (primer plato, segundo plato, postre y pan), que reflejarían las distintas opciones de almuerzos según las preferencias del consumidor.

En los menús de ambos centros se observó una distribución equilibrada de grupos de alimentos conforme a las recomendaciones nutricionales establecidas por AESAN para una dieta saludable y sostenible (AESAN, 2022a). Estas directrices incluyen el consumo de unas 3 raciones al día de hortalizas (150-200 g/ración) y frutas (120-200 g/ración), un consumo moderado de patatas y otros tubérculos (150-200 g/ración), de 3 a 6 raciones de cereales (40-60 g de pan o 60-80 g de pasta o arroz, en seco) y 3 raciones de lácteos (máx. 250 mL de leche, 85-125 g de queso fresco, 40-60 g de queso curado y 125 g de yogur). Igualmente, es aconsejable consumir semanalmente unas 4 raciones de legumbres (170 g/ración), 4 huevos y 3 raciones tanto de pescado (125-150 g/ración), preferiblemente azul, como de carne (100-125 g/ración), preferiblemente blanca. De acuerdo con estas instrucciones, los menús recogidos aportaron al menos 1 de las raciones diarias recomendadas de hortalizas, así como de frutas, hasta 2 raciones de cereales y, en algunos casos, 1 de lácteos. Además, proporcionaron casi 2 raciones de legumbres, 1-2 de huevos y al menos 2 de carne y pescado de forma semanal.

Contenido de acrilamida en los menús de los centros de trabajo

Las muestras recogidas en ambos centros de trabajo incluyeron primeros platos, segundos platos, postres y panes. En el segundo plato se recogió por separado el alimento principal y la guarnición. En el comedor del primer centro se recogieron 98 muestras de alimentos, entre ellas un 51% (50 muestras) presentaron valores de acrilamida superiores al LOQ, distribuyéndose entre segundos platos (36,0%), panes (34,0%), primeros platos (20,0%) y postres (10,0%). En el segundo centro se recogieron un total de 48 muestras de alimentos, de las cuales un 27% (13 muestras) mostraron niveles de acrilamida superiores al LOQ, distribuyéndose entre segundos platos (69,2%), primeros platos (15,4%) y postres (15,4%) (**Figura 17**).

De todos los alimentos y comidas analizados, los platos elaborados con patata procesada mostraron los mayores niveles de acrilamida en ambos centros, incluyendo patatas al horno (233 $\mu\text{g}/\text{kg}$), patatas fritas (115-155 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y croquetas de patata rellenas de carne (105 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (**Tablas 13 y 14**). En ambos comedores, las patatas fritas presentaron valores medios inferiores al límite de referencia establecido por el Reglamento Europeo 2017/2158 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Reglamento (UE) 2017/2158). Además de las patatas, las lentejas estofadas (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y el salmón guisado con verduras (109 $\mu\text{g}/\text{kg}$) servidos en el centro 1 fueron los platos que destacaron por tener los niveles más elevados del contaminante (**Tabla 13**), siendo bastante inferior en el resto de los alimentos (16-75 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Con respecto a los panes, no se detectó presencia de acrilamida en los procedentes del centro 2, mientras que niveles de entre 17 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fueron observados en los del centro 1, valores por debajo de los niveles de referencia indicados en el Reglamento (50-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Reglamento (UE) 2017/2158).

Aporte de acrilamida por parte de los alimentos y comidas de cada menú

El aporte de acrilamida de cada alimento y comida se calculó teniendo en cuenta el contenido de acrilamida en las muestras y su porción comestible (**Tablas 13 y 14**). La mayor contribución se observó en algunos guisos y verduras procesadas, incluyendo lentejas estofadas (17,5 y 54,4 $\mu\text{g}/\text{ración}$ en los centros 2 y 1, respectivamente), patatas al horno (24,0 $\mu\text{g}/\text{ración}$), pimientos rellenos (16,7

$\mu\text{g/ración}$), patatas fritas (15,8 $\mu\text{g/ración}$) y verduras rehogadas con tomate (15,5 $\mu\text{g/ración}$).

Para estimar el escenario de mayor exposición, a aquellos alimentos y comidas con valores de acrilamida inferiores al LOQ y superiores al LOD, se les asignó un valor de 15 $\mu\text{g/kg}$. En dicho escenario, las judías estofadas con almejas (8,2 $\mu\text{g/ración}$) y el cocido completo (7,2 $\mu\text{g/ración}$) supusieron las principales fuentes de acrilamida, seguidos del arroz con tomate y huevo frito (6,4 $\mu\text{g/ración}$), los macarrones con tomate (6,2 $\mu\text{g/ración}$) y el revuelto de ajetes (6,1 $\mu\text{g/ración}$) (**Tablas 15 y 16**).

Ingesta diaria de acrilamida de los menús ofertados en cada centro de trabajo

La ingesta diaria del contaminante en cada centro de trabajo se estimó teniendo en cuenta el aporte de acrilamida de los alimentos y comidas de los menús de cada comedor durante los 10 días de estudio. El cálculo se realizó para los escenarios de menor y de mayor exposición. En el centro de trabajo 1 se calcularon 16 posibles ingestas diarias de acrilamida, teniendo en cuenta todas las posibles combinaciones de alimentos y comidas dentro del menú ofertado cada día. La dispersión de los resultados para ambos escenarios se representa mediante un gráfico de cajas y bigotes en la **Figura 18**. En el centro de trabajo 2, la ingesta se calculó sumando el aporte de acrilamida de cada alimento o comida que componía el menú de cada día. Estos resultados se representan conjuntamente con los del centro 1 dentro de la **Figura 18** (cuadrado sólido en rojo).

Los resultados muestran una gran variabilidad entre los valores de ingesta diaria de acrilamida que dependerá, en gran medida, de la configuración del menú en base a las preferencias del consumidor en el primer centro, así como de la presencia del contaminante en los platos. La mayor dispersión se observó en el miércoles de la primera semana de ensayo y en el martes de la segunda semana, con valores oscilando entre 0 y 68,9 $\mu\text{g/día}$ en escenario LB (**Figura 18A**), y entre 5,3 y 69,8 $\mu\text{g/día}$ en el escenario UB (**Figura 18B**). En el segundo centro, la ingesta varió de 0 a 23,4 $\mu\text{g/día}$ en el escenario LB y de 11,1 a 30,5 $\mu\text{g/día}$ en el escenario UB, encontrándose mayormente incluida en el intervalo observado para cada día en el centro 1. No

obstante, algunos días el centro 2 destacó por contribuir con la mínima y con la máxima ingesta dentro de los 17 menús representados en cada caja de la figura (16 correspondientes al centro 1 y 1 correspondiente al centro 2); en 4 ocasiones en el escenario LB (1 ingesta máxima y 3 ingestas mínimas) y en 3 ocasiones en el escenario UB (2 ingestas máximas y 1 ingesta mínima).

Exposición dietética a acrilamida en los comedores de centros de trabajo y evaluación del riesgo asociado

La exposición diaria a acrilamida en cada comedor para los escenarios LB y UB, y su consecuente riesgo, se calculó dividiendo la ingesta diaria de acrilamida de cada centro por el peso corporal de hombres y mujeres, tomando como referencia un peso medio de 67 kg para las mujeres y 82 kg para los hombres (Aranceta-Bartrina y col., 2016) (**Tabla 17**). En el centro 1 la exposición para las mujeres osciló entre 0 y 1,03 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ en el escenario LB y entre 0,08 y 1,04 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ en el escenario UB. Debido a su mayor peso corporal, los hombres presentaron menores valores de exposición, alcanzando niveles máximos de 0,84 y 0,85 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ en los escenarios LB y UB, respectivamente. Los valores medios estimados para la exposición tanto en mujeres como en hombres en el centro 2, estuvieron comprendidos en los intervalos descritos para el primer centro. El principal punto diferenciador entre ambos centros fue que la variedad de configuraciones disponibles en el centro 1 permitía al consumidor llegar a niveles de exposición nulos o muy próximos a cero, lo que nunca fue posible en el centro 2. En todos los casos, los valores MOE calculados para efectos neurológicos fueron superiores al valor de referencia de 125, no implicando riesgo. Sin embargo, para efectos neoplásicos, todos los MOE fueron muy inferiores al valor de referencia de 10.000, salvo en los días en los que la exposición a acrilamida fue nula, para los cuales no existiría riesgo alguno (expresado en la **Tabla 17** como sr, sin riesgo). En el centro 1, las múltiples posibilidades diarias de configuración del almuerzo en función de las preferencias del consumidor condujeron a menús sin riesgo (1 combinación el jueves de la primera semana y 4 el martes de la segunda) o con riesgo elevado; mientras que en el centro 2, con una única opción diaria, solamente los días que no incluían fuentes de

acrilamida (el miércoles de la primera semana) estuvieron exentos de riesgo. Así, los valores oscilaron entre 1221 y 165 en el escenario LB y entre 2609 y 163 en el escenario UB, considerando en ambos casos el conjunto de mujeres y hombres. En caso del escenario UB, los valores del centro 2 estuvieron incluidos dentro del rango observado para el centro 1.

Tabla 11. Descripción de los menús elaborados en el centro de trabajo 1 durante las dos semanas de estudio.

	Semana 1	Semana 2
Lunes	Primeros platos: Tallarines saltados con ajo y aceite Tortilla de espárragos Segundos platos: Costillas a la barbacoa con croquetas de patata rellenas de carne Pescado rebozado con verduras rehogadas Postre: Arroz con leche Manzana asada Pan: Pan integral Pan chapata	Primeros platos: Verduras rehogadas Raviolis con tomate Segundos platos: Empanada de carne con patatas fritas Albóndigas con tomate y ensalada Postre: Melón Tarta de chocolate Pan: Pan integral Pan chapata
Martes	Primeros platos: Judías estofadas Ensalada de arroz Segundos platos: Filete de pavo con mostaza y ensalada Ternera guisada con patatas al horno Postre: Piña natural Manzana Pan: Pan tipo mollete Pan tipo baguete	Primeros platos: Sopa de cocido Espinacas rehogadas Segundos platos: Cocido completo Tortilla de gambas con patatas al horno Postre: Naranja Cuajada con miel Pan: Pan tipo mollete Pan tipo baguete
Miércoles	Primeros platos: Fideuá Lentejas estofadas Segundos platos: Salmón guisado con verduras y ensalada Huevos con tomate y berenjena rebozada Postre: Pera Plátano con sirope de chocolate Pan: Pan integral Pan tipo chapata	Primeros platos: Guiso de patatas y pescado Brócoli con bechamel gratinado Segundos platos: Sándwich de jamón y queso gratinado con verduras rehogadas Pollo guisado con ensalada Postre: Mandarina Natillas de chocolate Pan: Pan integral Pan tipo chapata

Tabla 11. Continuación.

Jueves	<p>Primeros platos: Arroz caldoso Patatas aliñadas</p> <p>Segundos platos: Carne de cerdo guisada con tomate y verduras rehogadas Cordón bleu con ensalada</p> <p>Postre: Uvas Flan</p> <p>Pan: Pan tipo mollete Pan tipo baguete</p>	<p>Primeros platos: Arroz con carne y pescado Ensalada con aceitunas negras y huevo duro</p> <p>Segundos platos: Huevos fritos con chorizo y ensalada Escalopes de ternera con patatas al horno</p> <p>Postre: Kiwi Peras al vino</p> <p>Pan: Pan tipo mollete Pan tipo baguete</p>
Viernes	<p>Primeros platos: Lasaña de verduras Escalivada</p> <p>Segundos platos: Filete con champiñones y patatas fritas Hojaldre de york y queso con patatas fritas</p> <p>Postre: Mouse de chocolate Plátano</p> <p>Pan: Pan integral Pan tipo chapata</p>	<p>Primeros platos: Verduras rehogadas con tomate Migas de pan con carne y verduras</p> <p>Segundos platos: Filete de pollo a la plancha Pimientos rellenos</p> <p>Postre: Manzana natural Yogur</p> <p>Pan: Pan integral Pan tipo chapata</p>

Tabla 12. Descripción de los menús elaborados en el centro de trabajo 2 durante las dos semanas de estudio.

	Semana 1	Semana 2
Lunes	Ensalada con rulo de cabra Costillas a la barbacoa con patatas fritas Kiwi Pan	Crema de calabacín Filete de pavo a la plancha con puré de patatas Natillas con galleta Pan
Martes	Arroz con verduras y huevo Emperador a la plancha con patatas fritas Flan de vainilla Pan	Arroz con tomate y huevo frito Rape rebozado con patatas fritas Kiwi Pan
Miércoles	Judías estofadas con almejas Lenguado guisado con verduras rehogadas Tarta de bizcocho y mascarpone Pan	Macarrones con tomate Bacalao al horno con zanahorias rehogadas Tarta de bizcocho con nata Pan
Jueves	Verduras salteadas con jamón Huevos fritos con bacon Manzana Pan	Revuelto de ajetes Carne de cerdo guisada con tomate Naranja Pan
Viernes	Lentejas estofadas Filetes rusos con tomate y patatas fritas Pera Pan	Ensalada de pimientos de piquillo Filete de lomo empanado con verduras salteadas con jamón Plátano Pan

Tabla 13. Contenido de acrilamida, porción comestible y aporte de acrilamida de los alimentos y las comidas del centro de trabajo 1.

Comidas	n*	Código FoodEx2	Contenido de acrilamida (µg/kg)	Porción comestible [†] (g)	Aporte de acrilamida (µg/ración)
Arroz caldoso	1	A041H	33	358	11,6
Ensalada con aceitunas negras y huevo duro	1	A042C#F04.A00HQ\$F04.A00HCS\$F04.A01BP\$F04.A032B	17	264	4,5
Ensalada de arroz	1	A041G	25	293	7,4
Fideuá	1	A040R	20	363	7,2
Judías estofadas	1	A03VT	18	346	6,1
Lasaña de verduras	1	A03XE	34	382	12,8
Lentejas estofadas	1	A00QD#F04.A025C\$F28.A07GM	150	362	54,4
Migas de pan con carne y verduras	1	A007A#F04.A022Y\$F04.A00HCS\$F04.A05CN\$F04.A05CPS\$F28.A07GT	57	154	8,8
Verduras rehogadas con tomate	1	A03YD#F04.A044C	75	206	15,5
Albóndigas con tomate	1	A03XG#F04.A044C	29	200	5,8
Berenjena rebozada	1	A00JD#F28.A07HL\$F28.A07GS	38	116	4,4
Carne de cerdo guisada con tomate	1	A03VY#F04.A01XB	16	246	3,9
Chorizo	1	A025C	33	29	0,9
Croquetas de patata rellenas de carne	1	A06GF#F04.A049S\$F28.A07GS	105	82	8,6
Huevos con tomate	1	A032C#F04.A044C	19	170	3,2
Patatas al horno	3	A011R	233 ± 343	120	24,0 ± 33,7
Patatas fritas	2	A0BYV	115 ± 5	92	10,3 ± 0,5
Pimientos rellenos	1	A05CN#F04.A03XS	47	355	16,7
Salmón guisado con verduras	1	A028P#F04.A044E	109	98	10,6
Sándwich de jamón y queso gratinado	1	A03ZB#F04.A02QE	16	282	4,5
Ternera guisada	1	A03VY	16	228	3,7
Verduras rehogadas	4	A03YD	27 ± 16	198	6,3 ± 6,5

Tabla 13. Continuación.

Flan	1	A00BX	21	110	2,3
Plátano con sirope de chocolate	1	A01LC#F04.A046H	21	104	2,2
Tarta de chocolate	1	A00BG	31	57	1,8
Mouse de chocolate	1	A02NE#F04.A06MF	17	128	2,2
Manzana asada	1	A01DJ#F28.A07GX	25	106	2,6
Pan integral	1	A005E	20	71	1,4
Pan tipo chapata	1	A004Y	17	98	1,6
Pan tipo mollete	1	A004Y	20	81	1,7

Únicamente se detallan los alimentos y comidas con una concentración de acrilamida superior al LOQ (15 µg/kg). *n: número de veces que se consumen los alimentos durante las dos semanas de ensayo. Cuando n=1 no se indica SD ya que tan sólo se analizó una ración del alimento. † Todas las porciones de comida fueron comestibles.

Tabla 14. Contenido de acrilamida, porción comestible y aporte de acrilamida de los alimentos y las comidas del centro de trabajo 2.

Comidas	n*	Código FoodEx2	Contenido de acrilamida (µg/kg)	Porción comestible† (g)	Aporte de acrilamida (µg/ración)
Ensalada de pimientos de piquillo	1	A042C#F04.A05CN	27	177	4,7
Lentejas estofadas	1	A00QD#F28.A07GM	33	538	17,5
Bacalao al horno	1	A02BV#F28.A07GX	16	227	3,6
Carne de cerdo guisada con tomate	1	A03VY#F04.A01XB	17	487	8,0
Filete de lomo empanado	1	A01XB#F28.A07HK\$ F28.A07GS	32	165	5,2
Huevos fritos con bacon	1	A032C#F04.A022X	22	265	5,9
Patatas fritas	4	A0BYV	155 ± 38	98	15,8 ± 7,2
Rape rebozado	1	A02BJ#F28.A07HL	16	185	2,9
Natillas con galleta	1	A02PX#F04.A009X	16	138	2,2
Tarta de bizcocho con nata	1	A00AQ#F04.A02ML	18	48	0,9

Únicamente se detallan las comidas con una concentración de acrilamida superior al LOQ (15 µg/kg). *n: número de veces que se consumen los alimentos durante las dos semanas de ensayo. Cuando n=1 no se indica SD ya que tan sólo se analizó de una ración del alimento. † Todas las porciones de comida fueron comestibles.

Tabla 15. Porción comestible y aporte de acrilamida de alimentos y comidas procesadas en el centro de trabajo 1 con niveles inferiores al LOQ (escenario de mayor exposición, UB).

Comidas	n*	Código FoodEx2	Porción comestible [†] (g)	Aporte de acrilamida (µg/ración)
Arroz con carne y pescado	1	A041J#F04.A03XR	378	5,7
Brócoli con bechamel gratinado	1	A00FR#F04.A00FR	359	5,4
Escalivada	1	A03YB	159	2,4
Espinacas rehogadas	1	A00MJ#F28.A07GT	227	3,4
Guiso de patata y pescado	1	A03XQ	371	5,6
Patatas aliñadas	1	A03VG	227	3,4
Raviolis con tomate	1	A040Y#F04.A044C	317	4,7
Tallarines salteados con ajo y aceite	1	A040Q#F04.A00GZ	226	3,4
Tortilla de espárragos	1	A03YQ#F04.A00RT	137	2,0
Cocido completo	1	A03VK#F04.A00SL\$F28.A07GM	478	7,2
Cordón bleu	1	A03VV#F04.A022T\$F04. A02TV\$F28.A07HK\$F28.A07GS	61	0,9
Costillas a la barbacoa	1	A03VK#F04.A045B\$F28.A07GX	175	2,6
Empanada de carne	1	A00CC#F04.A049S	183	2,7
Escalopes de ternera	1	A01QX#F28.A07HK\$F28.A07GS	129	1,9
Filete con champiñones	1	A01QX#F04.A00TQ\$F28.A07GT	103	1,5
Filete de pavo con mostaza	1	A023T#F04.A044G	148	2,2
Filete de pollo a la plancha	1	A01SP#F28.A07GT	111	1,7
Hojaldre de york y queso	1	A00CC#F04.A022T\$F04.A02TV	169	2,5
Huevos fritos	1	A032C	103	1,5
Pescado rebozado	1	A02KC\$F28.A07GS	117	1,8
Pollo guisado	1	A03VK#F04.A01SP	147	2,2
Tortilla de gambas	1	A03YN#F04.A02GB	121	1,8

Tabla 15. Continuación.

Arroz con leche	1	A041B	194	2,9
Natillas de chocolate	1	A02PX#F04.A06MF	113	1,7
Peras al vino	1	A01DP#F04.A03MX	116	1,7
Pan tipo baguette	4	A004Y	68	1,0 ± 0,1

La concentración de acrilamida en todas las muestras fue inferior al LOQ y superior al LOD, por lo que a todas se les asignó un valor de 15 µg/kg. *n: número de veces que se consumen los alimentos durante las dos semanas de ensayo. Cuando n=1 no se indica SD ya que tan solo se analizó de una ración del alimento. †Todas las porciones de comida fueron comestibles excepto las costillas a la barbacoa, el pollo guisado y el arroz con carne y pescado donde se eliminó la porción no comestible, siendo las porciones totales 271 g; 190 g y 390 g, respectivamente.

Tabla 16. Porción comestible y aporte de acrilamida de alimentos y comidas procesadas en el centro de trabajo 2 con niveles inferiores al LOQ (escenario de mayor exposición, UB).

Comidas	n*	Código FoodEx2	Porción comestible [†] (g)	Aporte de acrilamida (µg/ración)
Arroz con tomate y huevo frito	1	A041G#F04.A032C \$F04.A044C	425	6,4
Arroz con verduras y huevo	1	A041G#F04.A032C	286	4,3
Crema de calabacín	1	A03XY#F04.A00JR	290	4,4
Judías estofadas con almejas	1	A03VS#F04.A02HA	546	8,2
Macarrones con tomate	1	A040Q#F04.A049S \$F04.A16FE\$F04.A044C	423	6,2
Revuelto de ajetes	1	A03YQ#F04.A00GZ	406	6,1
Verduras salteadas con jamón	2	A03YC#F04.A022T	246	3,7 ± 0,7
Costillas a la barbacoa	1	A03VK#F04.A045B\$F28. A07GX	143	2,1
Emperador a la plancha	1	A026V#F28.A07GT	135	2,0
Filete de pavo a la plancha	1	A023T#F28.A07GT	111	1,7
Filetes rusos con tomate	1	A049S#F04.A044C\$F28.A 07HK	326	4,9
Lenguado guisado	1	A04ZV#F28.A07GM	118	1,8
Puré de patatas	1	A03VD#F04.A03VD	204	3,1
Verduras rehogadas	1	A03YD	230	3,4
Zanahorias rehogadas	1	A00QH#F28.A07GT	201	3,0
Flan de vainilla	1	A00BX#F04.A047E	99	1,5
Tarta de bizcocho y mascarpone	1	A00AQ#F04.A02QH	115	1,7
Pan	10	A004Y	66	1,0 ± 0,1

La concentración de acrilamida en todas las muestras estuvo entre el LOD y el LOQ, por lo que a todas se les asignó un valor de 15 µg/kg. *n: número de veces que se consumen los alimentos durante las dos semanas de ensayo. Cuando n=1 no se indica SD ya que tan solo se analizó una ración del alimento. †Todas las porciones de comida eran comestibles excepto las costillas a la barbacoa, el emperador a la plancha, las judías estofadas con almejas y el lenguado guisado donde se eliminó la porción no comestible, siendo las porciones totales 264 g; 148 g; 636 g y 174 g, respectivamente.

Tabla 17. Exposición diaria a acrilamida a través de los menús consumidos en los comedores de centros de trabajo y evaluación del riesgo asociado.

	Mujeres		Hombres	
	LB	UB	LB	UB
<i>Centro de trabajo 1</i>				
Exposición ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$)	0 – 1,03	0,08 – 1,04	0 – 0,84	0,07 – 0,85
MOE para efectos neurológicos	sr – 418	5393 – 413	sr – 512	6600 – 505
MOE para efectos neoplásicos	sr – 165	2132 – 163	sr – 202	2609 – 200
<i>Centro de trabajo 2</i>				
Exposición ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$)	0,17 \pm 0,13	0,29 \pm 0,11	0,14 \pm 0,11	0,23 \pm 0,09
MOE para efectos neurológicos	2524	1500	3089	1895
MOE para efectos neoplásicos	998	593	1221	726

LB: Escenario de menor exposición. UB: Escenario de mayor exposición. En el centro de trabajo 1, los resultados representan la exposición mínima y la máxima, y los valores MOE calculados para cada intervalo. En el centro de trabajo 2, los resultados representan los valores medios de exposición \pm SD, y los valores MOE calculados para cada valor medio. Sr: sin riesgo.

Figura 17. Porcentaje de alimentos y comidas con niveles de acrilamida superiores al LOQ y su distribución en los platos que componen el menú diario del almuerzo en ambos centros de trabajo.

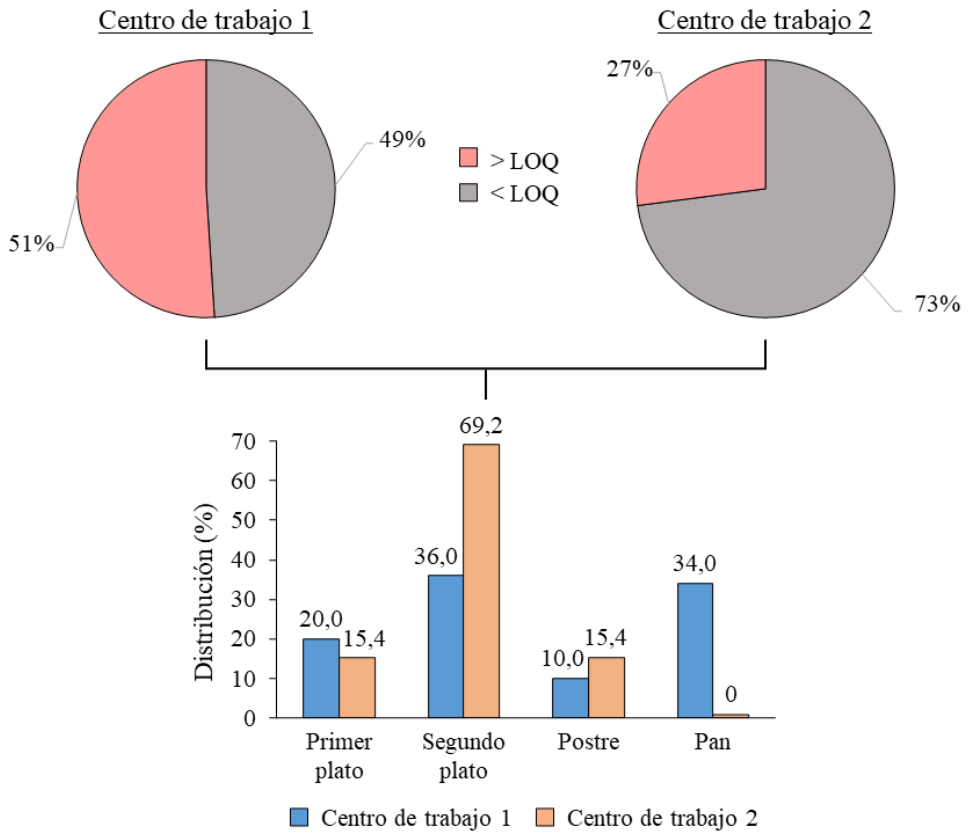
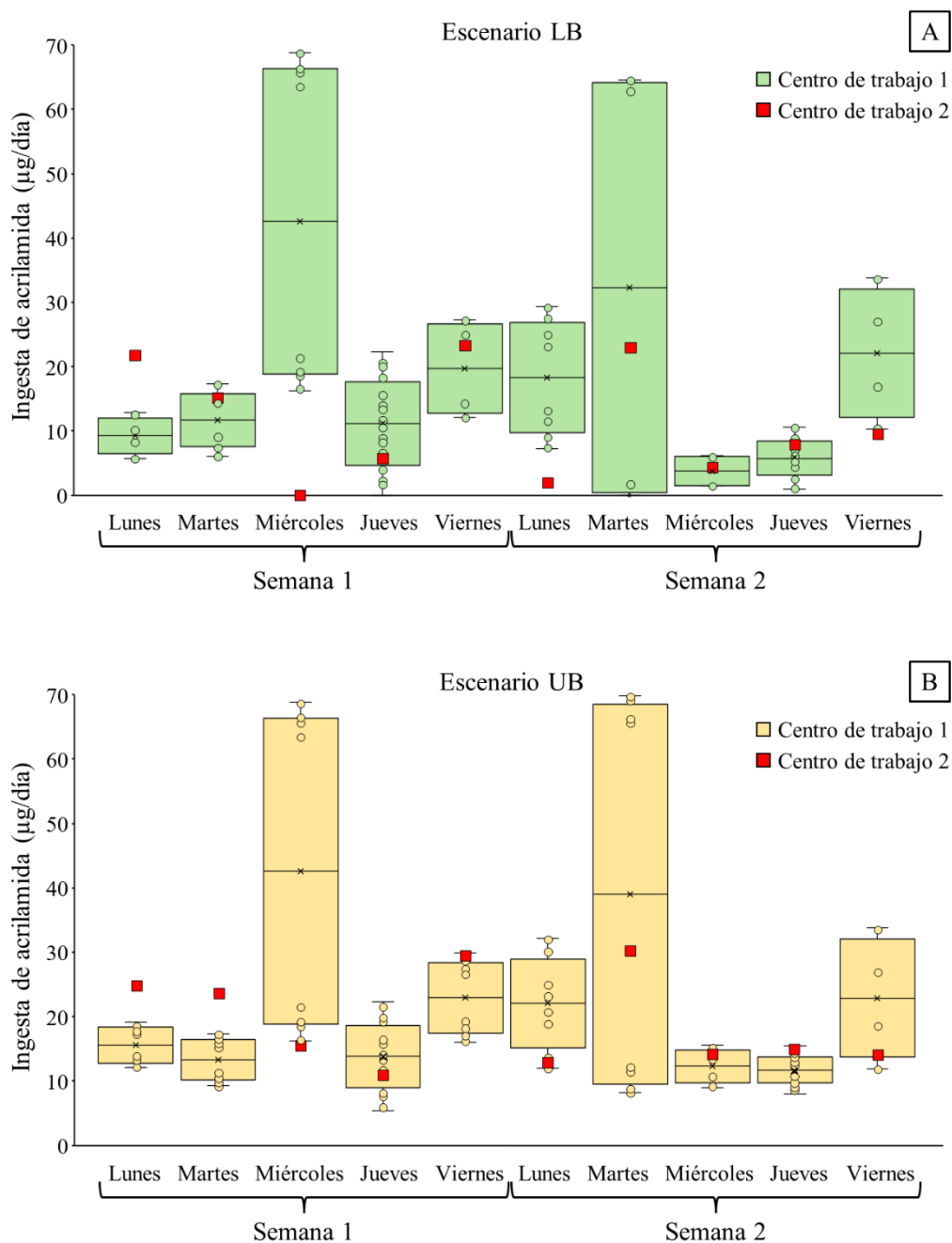


Figura 18. Ingesta diaria de acrilamida en los centros de trabajo evaluados. (A) Escenario de menor exposición (LB); (B) Escenario de mayor exposición (UB).



- Estudio 5: Evaluación de la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en comedores de centros de mayores. **Resultados inéditos.**

Caracterización de los menús ofrecidos en comedores de centros de mayores.

Para evaluar la exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos elaborados en comedores de centros de mayores, se llevó a cabo un estudio de dieta total en el que se recogieron los menús completos proporcionados durante dos semanas consecutivas en dos centros de mayores de la Comunidad de Castilla la Mancha, incluyendo desayunos, almuerzos, meriendas y cenas (**Tablas 18, 19, 20 y 21**).

Las directrices para mantener una distribución equilibrada de los alimentos a lo largo del día en los centros de mayores se establecen en la Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición (BOE, 2011) y en las recomendaciones del Comité Científico de la AESAN publicadas en 2022 (AESAN, 2022b). En dichos documentos se indica que los menús elaborados en los comedores de los centros de cuidado de mayores deben estar compuestos por un primer plato, un segundo plato y un postre, configurando un menú equilibrado en nutrientes, que incluya además alimentos de temporada adaptados a las estaciones del año. Asimismo, deben tener en cuenta el estado nutricional de las personas mayores usuarias de dichos centros, las preferencias alimentarias (en particular en personas con bajo apetito), las restricciones de determinados alimentos, y el uso de medicamentos, que en ocasiones pueden interaccionar con algunos nutrientes condicionando su correcta absorción. A veces la interacción pueden incluso producir efectos secundarios como alteraciones sensoriales que afecten al olfato y al gusto y, por tanto, al consumo de alimentos. La textura es otro aspecto a tener en cuenta, ya que el estado de la dentición en esta etapa de la vida es un factor fundamental que determinará la forma física en que los alimentos deban ser ingeridos. Por otro lado, se debe garantizar una ingesta adecuada de líquidos, incorporando sopas y alimentos ricos en agua a las dietas de las personas mayores, especialmente en verano, y ofrecer bebidas como leche o infusiones en el desayuno y las meriendas.

En cuanto al consumo de alimentos en este grupo poblacional, recientemente se ha publicado un documento actualizado con orientaciones para la elaboración de

menús saludables y medioambientalmente sostenibles en centros residenciales y centros de día para personas mayores. Este documento recomienda la ingesta diaria de 3 raciones de hortalizas (verduras o ensalada como acompañamiento de los platos principales), 2 o 3 raciones de frutas, de 3 a 6 raciones de cereales y 3 raciones de productos lácteos, además de un consumo moderado de patatas. Igualmente, se aconseja un consumo semanal de 4 raciones de legumbres, 3 raciones de pescados o mariscos, 4 o 5 raciones de huevos y un máximo de 3 raciones de carne o productos cárnicos (AESAN, 2023).

En el presente estudio, los menús ofrecidos en los comedores de los centros de mayores se adaptaban a dichas recomendaciones, incluyendo diaria y semanalmente las raciones sugeridas para cada grupo alimentario a excepción de las frutas, que no siempre alcanzaron el mínimo de 2 raciones/día y los huevos y legumbres, cuyo consumo también fue algo inferior al recomendado en ambos centros. La distribución de alimentos a lo largo de la semana, por tanto, fue variada, al igual que las técnicas culinarias aplicadas para su cocinado.

Contenido de acrilamida en los menús de los centros de mayores.

De las 148 muestras de alimentos y comidas recogidas en los menús del centro de mayores 1, un 54% (80 muestras) presentó niveles de acrilamida superiores al LOQ, distribuidas de forma similar en el desayuno (25,0%), el almuerzo (22,5%), la merienda (25%) y la cena (27,5%) (**Figura 19**). Este porcentaje fue bastante inferior en el segundo centro, donde del total de 156 muestras recogidas, sólo un 29% (46 muestras), presentó niveles cuantificables del contaminante. En este caso, los alimentos con un contenido en acrilamida superior a 15 µg/kg se consumieron principalmente en el desayuno (43,5%) seguido de la merienda (21,7%), la cena (19,6%) y el almuerzo (15,2%) (**Figura 19**).

Las concentraciones más elevadas del contaminante se observaron en el café soluble y en las patatas fritas en ambos centros, incluyendo además el cacao soluble (261 µg/kg) en el centro de mayores 1. En el caso del café, los niveles medios de acrilamida oscilaron entre 192 µg/kg (centro 2) y 2831 µg/kg (centro 1), superando el valor de referencia establecido por el Reglamento Europeo 2017/2158 para este

alimento (850 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Reglamento (UE) 2017/2158). Las patatas fritas mostraron niveles medios entre 213 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (centro 1) y 304 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (centro 2), por debajo del valor de referencia regulado (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los comedores ofrecieron, además, otros platos basados en patatas procesadas, como tortilla de patata (valor medio 161 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (**Tabla 22**) y patatas cocinadas al horno (valor medio 31 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (**Tabla 23**), todos ellos con niveles moderados del contaminante. Los alimentos derivados de cereales contribuyeron con concentraciones entre 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (magdalenas) y 122 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (galletas), de nuevo con valores inferiores a los niveles de referencia (50-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el pan, 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en galletas) (Reglamento (UE) 2017/2158). El resto de los alimentos y comidas oscilaron entre 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (cocido completo) y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (pimientos de piquillo) (**Tabla 23**).

Aporte de acrilamida por parte de los alimentos y comidas de cada menú

Considerando la porción comestible de las muestras y su contenido del contaminante, se calculó el aporte de acrilamida de cada alimento y comida (**Tablas 22 y 23**). La mayor contribución se observó en los alimentos derivados de patata, como las patatas fritas (27,3 $\mu\text{g}/\text{ración}$) y la tortilla de patatas (21,6 $\mu\text{g}/\text{ración}$), seguidos por platos estofados, sopas y cremas, destacando la sopa de tomate (22,7 $\mu\text{g}/\text{ración}$) y la sopa de marisco (16,1 $\mu\text{g}/\text{ración}$). Para estimar el escenario UB, se asignó un valor de acrilamida de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a todos los platos y alimentos con niveles inferiores al límite de cuantificación y superiores al límite de detección. En este caso, el aporte procedió mayoritariamente de los guisos y estofados (5,4-7,9 $\mu\text{g}/\text{ración}$) y platos elaborados con verduras (hasta 7,8 $\mu\text{g}/\text{ración}$) (**Tablas 24 y 25**).

De forma global, se puede afirmar que los guisos y estofados y los platos elaborados con verduras y patata constituyen los alimentos que proporcionan un mayor aporte de acrilamida en las comidas principales del día.

Ingesta diaria de acrilamida de los menús completos de cada centro de mayores.

Teniendo en cuenta los alimentos y comidas consumidos en el menú diario de cada centro de mayores y su aporte de acrilamida, se estimó la ingesta diaria del compuesto durante las dos semanas de estudio. La estimación se llevó a cabo para los escenarios de menor y mayor exposición, evaluando la ingesta diaria total, la media semanal y la media para los dos centros de forma conjunta.

En el escenario LB, la ingesta diaria de acrilamida osciló entre 17,4 y 72,1 μg en el centro de mayores 1 y entre 6,1 y 40,0 μg en el centro de mayores 2. El promedio semanal para ambos centros fue de 37,7 y 20,5 $\mu\text{g}/\text{día}$, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,021$) (**Tabla 26**). La media global de los dos comedores fue de 29,1 $\mu\text{g}/\text{día}$. La ingesta diaria fue considerablemente superior en el escenario UB, alcanzando un valor medio conjunto de 39,0 $\mu\text{g}/\text{día}$. En este caso, la ingesta de cada día osciló entre 24,4 y 72,1 μg en el centro 1, y entre 16,9 y 50,4 μg en el centro 2, dando lugar a valores medios semanales de 44,8 y 32,9 $\mu\text{g}/\text{día}$, sin diferencias significativas entre ellos ($p = 0,068$) (**Tabla 27**).

Exposición dietética a acrilamida en los comedores de centros de mayores y evaluación del riesgo asociado

La exposición a acrilamida a través del consumo de la dieta total elaborada en los comedores de los centros de mayores, y su consecuente riesgo, se estimó en los escenarios LB y UB, tomando como referencia un peso corporal medio de 72 kg para las mujeres y 81 kg para los hombres (Pérez-Rodrigo y col., 2022) (**Tabla 28**). Como consecuencia de una mayor ingesta de acrilamida, la exposición diaria al contaminante fue más elevada en el centro de mayores 1, con diferencias significativas respecto al centro 2 sólo en el escenario LB ($p = 0,021$).

Aunque sin diferencias significativas ($p > 0,05$), debido al menor peso corporal la exposición diaria fue superior en mujeres (0,52-0,62 $\mu\text{g}/\text{kg pc}$ en el centro 1 y 0,28-0,46 $\mu\text{g}/\text{kg pc}$ en el centro 2) que en hombres (0,46-0,55 $\mu\text{g}/\text{kg pc}$ en el centro 1 y 0,25-0,41 $\mu\text{g}/\text{kg pc}$ en el centro 2), conduciendo por tanto a menores niveles de MOE tanto para efectos neurológicos como para efectos neoplásicos. Para ambos sexos y en todos los escenarios, los valores MOE estimados para efectos neurológicos fueron

superiores al valor de referencia de 125, no implicando riesgo. Sin embargo, para efectos neoplásicos, todos los valores de MOE fueron muy inferiores al valor de referencia de 10.000, implicando un riesgo elevado asociado a la exposición a acrilamida. De forma global, en el escenario LB se estimaron valores medios de MOE de 421 y 474 en hombres y mujeres, respectivamente, viéndose reducidos hasta 314 y 353, respectivamente, en el escenario UB.

Tabla 18. Menús elaborados en el centro de mayores 1 (semana 1).

	Desayuno	Almuerzo	Merienda	Cena
Lunes	Leche Café soluble descafeinado Magdalena 1	Judías estofadas Limanda rebozada con patatas fritas Naranja Pan	Leche Cacao soluble Galletas 1	Coliflor gratinada San jacobó Yogur Pan integral
Martes	Leche Café soluble descafeinado Pan tostado con mantequilla/aceite	Sopa de cocido Cocido completo Plátano Pan	Leche Cacao soluble Galletas 2	Crema de zanahoria Huevos con bechamel rebozados con pisto Yogur Pan integral
Miércoles	Leche Café soluble descafeinado Magdalena 2	Migas de pan con carne y verduras Salmón guisado con verduras Manzana Pan	Leche Cacao soluble Galletas 1	Sopa de picadillo Pollo empanado con patatas fritas Yogur Pan integral
Jueves	Leche Café soluble descafeinado Magdalena 1	Fideos con carne y verduras Tilapia rebozada con ensalada Manzana asada Pan	Leche Cacao soluble Galletas 2	Crema de verduras Tortilla de patatas con pimientos de piquillo Yogur Pan integral
Viernes	Leche Café soluble descafeinado Pan tostado con mantequilla/aceite	Arroz con carne y verduras Pollo guisado al ajillo con patatas fritas Manzana Pan	Leche Cacao soluble Galletas 1	Judías verdes rehogadas Embutido variado Yogur Pan integral

Tabla 19. Menús elaborados en el centro de mayores 1 (semana 2).

	Desayuno	Almuerzo	Merienda	Cena
Lunes	Leche Café soluble descafeinado Magdalena 2	Lentejas estofadas Jamón york con bechamel rebozado con ensalada Pera conferencia Pan	Leche Cacao soluble Galletas 2	Sopa de pescado Tortilla de patatas con pimientos de piquillo Yogur Pan integral
Martes	Leche Café soluble descafeinado Magdalena 1	Arroz caldoso con pollo Carne de cerdo guisada con tomate y verduras Pan	Leche Cacao soluble Galletas 1	Verduras rehogadas Tilapia rebozada con patatas fritas Yogur Pan integral
Miércoles	Leche Café soluble descafeinado Pan tostado con mantequilla/aceite	Sopa de cocido Cocido completo Pera conferencia Pan	Leche Cacao soluble Galletas 2	Calamares rebozados Tomate natural Yogur Pan integral
Jueves	Leche Café soluble descafeinado Magdalena 2	Macarrones boloñesa Huevos fritos con patatas fritas Manzana Pan	Leche Cacao soluble Galletas 1	Embutido variado Yogur Pan integral
Viernes	Leche Café soluble descafeinado Magdalena 1	Judías estofadas Merluza rebozada con pisto Plátano Pan	Leche Cacao soluble Galletas 2	Caballa con asadillo Yogur Pan integral

Tabla 20. Menús elaborados en el centro de mayores 2 (semana 1).

	Desayuno	Almuerzo	Merienda	Cena
Lunes	Zumo Leche <i>Túrmix*</i> Café soluble	Ensalada mixta Paella mixta Profiteroles Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Sopa de tomate Tortilla de atún Mandarinas Pan
Martes	Zumo Leche <i>Túrmix*</i> Café soluble	Judías estofadas Empanadillas de atún con ensalada Pera Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Crema de calabacín Boquerones fritos con ensalada de pimientos Yogur Pan
Miércoles	Zumo Leche <i>Túrmix*</i> Café soluble	Verduras asadas Patatas guisadas con carne Cuajada Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Sopa de arroz Queso fresco con carne de membrillo Mandarinas Pan
Jueves	Zumo Leche <i>Túrmix*</i> Café soluble	Fideuá con marisco San jacobó con ensalada Plátano Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Crema de champiñones Merluza rebozada con patatas al horno Manzana asada Pan
Viernes	Zumo Leche <i>Túrmix*</i> Café soluble	Sopa de marisco Huevos fritos con pisto Natillas Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Lombarda rehogada Tortilla de calabacín Yogur Pan

**Túrmix*: mezcla de cereales y lácteos (leche o yogur).

Tabla 21. Menús elaborados en el centro de mayores 2 (semana 2).

	Desayuno	Almuerzo	Merienda	Cena
Lunes	Zumo Leche <i>Túrmix</i> * Café soluble	Lentejas estofadas Croquetas de jamón con ensalada Pera Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Sopa de verduras Bacalao rebozado Tarta de manzana Pan
Martes	Zumo Leche <i>Túrmix</i> * Café soluble	Berenjenas gratinadas rellenas de carne Patatas guisadas con pescado y marisco Yogur Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Crema de verduras Lacón asado con patatas al horno Mandarinas Pan
Miércoles	Zumo Leche <i>Túrmix</i> * Café soluble	Asadillo de pimiento Macarrones con atún Plátano Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Sopa de picadillo Tortilla de verduras Torrijas Pan
Jueves	Zumo Leche <i>Túrmix</i> * Café soluble	Sopa de cocido Cocido completo Natillas Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Revuelto de champiñones Marrajo con patatas al horno Mandarinas Pan
Viernes	Zumo Leche <i>Túrmix</i> * Café soluble	Ensalada mixta Paella mixta Mandarinas Pan	Leche Cacao soluble Bollería	Sopa de tomate Pollo guisado con verduras y patatas fritas Cuajada Pan

**Túrmix*: mezcla de cereales y lácteos (leche o yogur).

Tabla 22. Contenido de acrilamida, porción comestible y aporte de acrilamida de los alimentos y las comidas del centro de mayores 1.

Comidas	n ^a	Código FoodEx2	Contenido de acrilamida (µg/kg)	Porción comestible [†] (g)	Aporte de acrilamida (µg/ración)
Desayunos y meriendas					
Café soluble descafeinado	10	A03GR	2831 ± 181	2	5,7 ± 0,4
Cacao soluble	10	A03HG	261 ± 30	14	3,6 ± 0,4
Magdalenas	5	A00BC	21 ± 5	31	0,9 ± 0,1
Pan tostado	3	A006D	34 ± 7	23	0,8 ± 0,2
Galletas	10	A009X	122 ± 120	21	2,7 ± 2,7
Almuerzos y cenas					
Judías estofadas	2	A03VT	33 ± 25	413	11,6 ± 5,4
Lentejas estofadas	1	A00QD#F28.A07GM	27	282	7,6
Crema de zanahoria	1	A03XY#F04.A05JG	31	418	12,5
Sopa de picadillo	1	A041V	22	432	9,4
Sopa de pescado	1	A041X	40	353	14,2
Cocido completo	2	A03VK#F04.A00SL\$F28.A07GM	17 ± 4	339	5,8 ± 0,1
Migas de pan con carne y verduras	1	A007A#F04.A022Y\$F04.A00HC\$F04.A05CN\$F04.A05CP\$F28.A07GT	101	156	15,8
Jamón york con bechamel rebozado	1	A022T#F04.A043X\$F28.A07HK	33	117	3,8
San jacob	1	A03XD	24	86	2,1
Huevos con bechamel rebozados	1	A032B#F04.A043X\$F28.A07HK	23	105	2,4
Pollo empanado	1	A01SP#F28.A07HK\$F28.A07GS	26	102	2,6
Tortilla de patatas	2	A03YN#F28.A00ZT	161 ± 6	134	21,6 ± 0,1
Pimientos de piquillo	2	A05CN#F28.A07GX	160 ± 10	42	6,7 ± 0,3
Patatas fritas	5	A0BYV	213 ± 158	69	13,9 ± 11,9
Pan integral	10	A005E	29 ± 7	49	1,4 ± 0,5
Pan	10	A004Y	28 ± 0,6	48	1,3 ± 0,1

Únicamente se detallan los alimentos y comidas con una concentración de acrilamida superior al LOQ (15 µg/kg). *n: número de veces que se consumen los alimentos durante las dos semanas de ensayo. Cuando n=1 no se indica SD ya que tan sólo se analizó una ración del alimento. †Todas las porciones de comida fueron comestibles.

Tabla 23. Contenido de acrilamida, porción comestible y aporte de acrilamida de los alimentos y las comidas del centro de mayores 2.

Comidas	n ^a	Código FoodEx2	Contenido en acrilamida (µg/kg)	Porción comestible [†] (g)	Aporte de acrilamida (µg/ración)
Desayuno y meriendas					
Café soluble	10	A03GQ	192 ± 4	2	0,4 ± 0,1
Cacao soluble	10	A03HG	20 ± 2	10	0,2 ± 0,1
<i>Turmix</i>	10	A06DX	45 ± 2	124	5,5 ± 0,2
Almuerzos y cenas					
Berenjenas rellenas de carne gratinadas	1	A03YF#F04.A00 JD\$F04.A049SS F04.A16FE	36	290	10,5
Judías estofadas	1	A03VT	23	405	9,2
Sopa de marisco	1	A03XK	29	555	16,1
Sopa de tomate	2	A041N	26 ± 15	486	14,0 ± 12,3
Empanadillas de atún	1	A0FBT#F02.A00 CC04.A00ZD	41	104	4,2
San jacobó	1	A03XD	32	101	3,2
Tortilla de verduras	1	A03YQ	65	150	9,8
Tortilla de calabacín	1	A03YN#F04.A00 JR	55	180	9,9
Paella mixta	2	A041D	25 ± 5	335	8,4 ± 2,5
Pisto	1	A03YD	25	309	7,7
Patatas al horno	3	A011R	20 ± 9	106	2,0 ± 0,6
Patatas fritas	1	A0BYV	304	90	27,3
Tarta de manzana	1	A00BA#F04.A01 DJ	30	93	2,8

Túrmix: mezcla de cereales y lácteos (leche o yogur). Únicamente se detallan las comidas con una concentración de acrilamida superior al LOQ (15 µg/kg). *n: número de veces que se consumen los alimentos durante las dos semanas de ensayo. Cuando n=1 no se indica SD ya que tan sólo se analizó una ración del alimento. †Todas las porciones de comida fueron comestibles.

Tabla 24. Porción comestible y aporte de acrilamida de alimentos y comidas procesadas en el centro de mayores 1 con niveles inferiores al LOQ (escenario de mayor exposición).

Comidas	n ^a	Código FoodEx2	Porción comestible [†] (g)	Aporte de acrilamida (µg/ración)
Almuerzos y cenas				
Fideos gruesos con carne y verduras	1	A041V#F04.A007D	527	7,9
Arroz con carne y verduras	1	A041J	305	4,6
Arroz caldoso con pollo	1	A041H	362	5,4
Macarrones boloñesa	1	A040Q#F04.A049S\$F04.A16FE	368	5,5
Verduras rehogadas	1	A03YD	322	4,8
Crema de verduras	1	A03XY	367	5,5
Coliflor gratinada	1	A03YF#F04.A00FR	216	3,2
Judías verdes rehogadas	1	A00PG#F28.A07GT	186	2,8
Limanda rebozada	1	A02AS#F28.A07HK\$F28.A07GS	67	1,0
Salmón guisado con verduras	1	A028P#F04.A044E	137	2,0
Tilapia rebozada	2	A028A#F28.A07HK\$F28.A07GS	68	1,0 ± 0,1
Pollo guisado al ajillo	1	A01SP#F04.A045A\$F28.A07GM	114	1,7
Carne de cerdo guisada con tomate y verduras	1	A03VK	169	2,5
Huevos fritos	1	A032C	45	0,7
Merluza rebozada	1	A02CB #F28.A07HK	84	1,3
Pisto	2	A03YD	119	1,8 ± 0,3
Calamares rebozados	1	A02JJ#F28.A07HL\$F28.A07GV	77	1,2
Caballa con asadillo	1	A02CR#F04.A05CNA05CN\$F28.A07GX	99	1,5

La concentración de acrilamida en todas las muestras fue inferior al LOQ y superior al LOD, por lo que a todas se les asignó un valor de 15 µg/kg. *n: número de veces que se consumen los alimentos durante las dos semanas de ensayo. Cuando n=1 no se indica SD ya que tan solo se analizó una ración del alimento. †Todas las porciones de comida fueron comestibles excepto el salmón guisado con verduras, el arroz con carne y verduras y el pollo guisado al ajillo, donde se eliminó la porción no comestible, siendo las porciones totales 160 g, 319 g y 160 g, respectivamente.

Tabla 25. Porción comestible y aporte de acrilamida de alimentos y comidas procesadas en el centro de mayores 2 con niveles inferiores al LOQ (escenario de mayor exposición).

Comidas	n ^a	Código FoodEx2	Porción comestible (g)	Aporte de acrilamida (µg/ración)
Almuerzo				
Verduras asadas	1	A03YF	169	2,5
Ensalada de pimientos	1	A042D#F04.A05CN	150	2,3
Patatas guisadas con carne	1	A03VJ	360	5,4
Fideuá con marisco	1	A040Q#F04.A0EYX	229	3,4
Lombarda rehogada	1	A00GA#F28.A07GT	179	2,7
Lentejas estofadas	1	A00QD#F04.A025C\$F28.A07GM	512	7,7
Patatas guisadas con pescado y marisco	1	A03XQ#F04.A0EYX	417	6,3
Asadillo de pimiento	1	A05CN#F28.A07GX	161	2,4
Crema de calabacín	1	A03XY#F04.A00JR	429	6,4
Crema de champiñones	1	A03XY#F04.A00TQ	451	6,8
Sopa de verduras	1	A041S	306	4,6
Crema de verduras	1	A03XY	392	5,9
Sopa de picadillo	1	A041V	359	5,4
Lacón asado	1	A023K	62	0,9
Huevos fritos	1	A032C	122	1,8
Croquetas de jamón	1	A022TA022T#F04.A043X\$F28.A07HL\$F28.A07GS	124	1,9
Macarrones con atún	1	A007S#F04.A0FBT	285	4,3
Cocido completo	1	A03VK#F04.A00SL\$F28.A07GM	303	4,5
Tortilla de atún	1	A03YN#\$F04.A0FBT	85	1,3
Boquerones fritos	1	A02DD#F28.A07GS	41	0,6
Carne de membrillo	1	A01DR#F28.A07JQ	66	1,0

Tabla 25. Continuación.

Merluza rebozada	1	A02CB#F28.A07HK\$F28.A07GS	91	1,4
Bacalao rebozado	1	A02BV#F28.A07HK\$F28.A07GS	185	2,8
Revuelto de champiñones	1	A03YN#\$F04.A00TQ	261	3,9
Marrajo al horno	1	A052E#F28.A07GX	145	2,2
Pollo guisado con verduras	1	A03VK#F04.A01SP	213	3,2
Manzana asada	1	A01DJ#F28.A07GX	114	1,7
Profiteroles	1	A00AK	58	0,9
Torrijas	1	A0DRD#F04.A02LT\$F04.A0BY6\$F04.A019V\$F28.A07GV	132	2,0
Natillas	2	A02PX	120	1,8 ± 0,1
Pan	20	A004Y	45	0,7 ± 0,1
Merienda				
Bollería	1	A009T	35	0,5 ± 0,1

La concentración de acrilamida en todas las muestras fue inferior al LOQ y superior al LOD, por lo que a todas se les asignó un valor de 15 µg/kg. *n: número de veces que se consumen los alimentos durante las dos semanas de ensayo. Cuando n=1 no se indica SD ya que tan solo se analizó una ración del alimento. †Todas las porciones de comida eran comestibles excepto los boquerones fritos, el bacalao rebozado y el marrajo al horno donde se eliminó la porción no comestible, siendo las porciones totales 47 g, 219 g y 208 g, respectivamente.

Tabla 26. Ingesta de acrilamida a través del consumo de menús elaborados en comedores de centros de mayores. Escenario de menor exposición.

Ingesta diaria de acrilamida en el escenario de menor exposición($\mu\text{g}/\text{día}$)						
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Media diaria
<i>Centro de mayores 1</i>						
Semana 1	33,2	38,1	48,4	45,6	36,5	40,4 \pm 6,4
Semana 2	72,1	45,7	17,4	22,8	17,6	35,1 \pm 23,7
Media semanal						37,7 \pm 16,6a
<i>Centro de mayores 2</i>						
Semana 1	38,9	19,5	6,1	9,3	39,8	22,7 \pm 16,0
Semana 2	8,9	16,7	15,9	8,7	40,0	18,0 \pm 12,8
Media semanal						20,5 \pm 13,9b
Ambos centros						29,1 \pm 17,4

Diferentes letras en los valores de las medias semanales indican diferencias significativas entre los centros de mayores ($p < 0,05$). Los datos se expresan como media \pm SD.

Tabla 27. Ingesta de acrilamida a través del consumo de menús elaborados en comedores de centros de mayores. Escenario de mayor exposición.

Ingesta diaria de acrilamida en el escenario de mayor exposición ($\mu\text{g}/\text{día}$)						
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Media diaria
<i>Centro de mayores 1</i>						
Semana 1	37,5	40,1	48,4	61,9	45,5	46,7 \pm 9,5
Semana 2	72,1	59,6	24,4	29,0	29,7	42,9 \pm 21,5
Media semanal						44,8 \pm 15,8
<i>Centro de mayores 2</i>						
Semana 1	42,9	30,7	16,9	26,6	46,1	32,6 \pm 12,0
Semana 2	27,7	33,0	31,8	23,0	50,4	33,2 \pm 10,4
Media semanal						32,9 \pm 10,6
Ambos centros						39,0 \pm 14,5

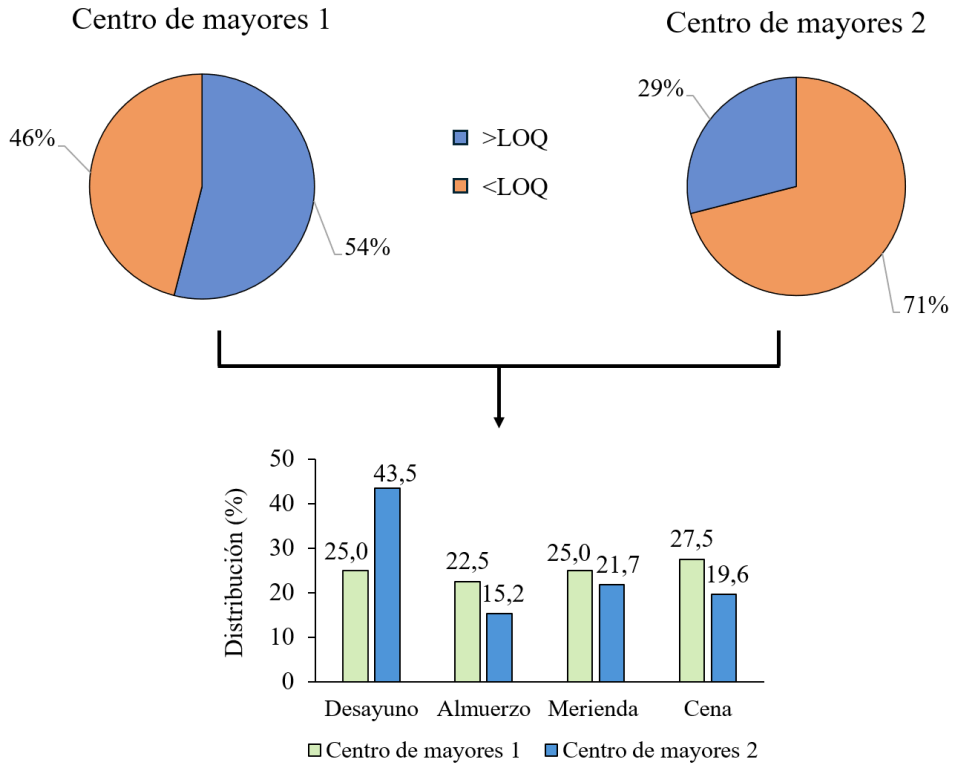
No se detectaron diferencias significativas entre las medias semanales de ambos centros de mayores ($p > 0,05$). Los datos se expresan como media \pm SD.

Tabla 28. Exposición dietética a acrilamida en los comedores de los centros de mayores y evaluación del riesgo asociado.

Escenario	Mujeres		Hombres	
	LB	UB	LB	UB
Centro de mayores 1				
Exposición ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$)	$0,52 \pm 0,23\text{a}$	$0,62 \pm 0,22\text{a}$	$0,47 \pm 0,21\text{a}$	$0,55 \pm 0,19\text{a}$
MOE para efectos neurológicos	820	691	923	307
MOE para efectos neoplásicos	324	273	365	777
Centro de mayores 2				
Exposición ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$)	$0,28 \pm 0,19\text{b}$	$0,46 \pm 0,15\text{a}$	$0,25 \pm 0,17\text{b}$	$0,41 \pm 0,13\text{a}$
MOE para efectos neurológicos	1519	934	1708	1051
MOE para efectos neoplásicos	600	369	675	415
p valor*	0,021	0,069	0,021	0,069
Ambos centros de mayores				
Exposición ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$)	$0,40 \pm 0,24$	$0,54 \pm 0,20$	$0,36 \pm 0,21$	$0,48 \pm 0,18$
MOE para efectos neurológicos	1065	795	1198	894
MOE para efectos neoplásicos	421	314	474	353

Diferentes letras indican diferencias significativas en la exposición entre centros para un mismo escenario ($p < 0,05$). No se detectaron diferencias significativas entre la exposición de ambos sexos en ninguno de los centros mayores de forma individual o conjunta ($p > 0,05$). Los datos de exposición se expresan como media \pm SD.

Figura 19. Porcentaje de alimentos y comidas con niveles de acrilamida superiores al LOQ y su distribución en el desayuno, el almuerzo, la merienda y la cena en ambos centros de mayores.



CAPÍTULO 3. Estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de la acrilamida y efecto de la fermentación colónica

- Estudio 6: Evaluación de la bioaccesibilidad gastrointestinal de la acrilamida en alimentos individuales y comidas completas en las distintas etapas de la digestión gastrointestinal. **Artículo 4.**

En base a los primeros estudios toxicocinéticos en animales de experimentación, tradicionalmente se ha considerado que la acrilamida presente en el alimento es absorbida rápida y eficazmente a través del tracto gastrointestinal y distribuida por los tejidos debido a su alta solubilidad en agua. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no toda la acrilamida ingerida será necesariamente biodisponible, puesto que el proceso de digestión, que incluye la masticación, variaciones de pH y las acciones de múltiples enzimas digestivas en la boca, el estómago y el intestino, genera modificaciones estructurales y químicas que pueden afectar tanto a la bioaccesibilidad como a la biodisponibilidad del contaminante. Por otra parte, la acrilamida es un compuesto electrofílico capaz de interactuar con estructuras nucleófilas a través de la reacción de adición de Michael, siendo otro aspecto que puede influir en su biodisponibilidad. En este sentido, diversos estudios han evaluado el comportamiento de la acrilamida durante la digestión *in vitro* de determinados alimentos, concluyendo que la bioaccesibilidad durante el proceso digestivo puede verse afectada por la composición de la matriz alimentaria. Estos trabajos se han centrado en la digestión de alimentos aislados, evaluando sólo la presencia de acrilamida en la fracción soluble tras digestión (fracción bioaccesible). Sin embargo, la realidad del consumo es la ingesta conjunta de alimentos de diversa complejidad. Por ello, es necesario completar la información realizando digestiones de alimentos de forma combinada, donde puede haber una mayor interacción entre los componentes de la dieta, analizando además la fracción insoluble obtenida tras la digestión (fracción no bioaccesible), lo que permite estimar la recuperación total de acrilamida y la magnitud de su aumento o disminución durante el proceso digestivo respecto a los niveles iniciales en el alimento.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la bioaccesibilidad de la acrilamida en alimentos con base de cereal y patata, digeridos de forma aislada (alimentos individuales) y junto con una fuente proteica (comidas completas), siguiendo el protocolo estandarizado de digestión gastrointestinal *in vitro* INFOGEST. Se determinó la evolución de la acrilamida a lo largo de las distintas etapas del proceso digestivo (digestión oral, digestión oral + gástrica, digestión completa), analizando tanto las fracciones bioaccesibles como las no bioaccesibles y evaluando el efecto de la matriz alimentaria sobre la disponibilidad del compuesto.

Se seleccionaron cuatro sistemas de alimentos con base de patatas y cereales, por ser las principales fuentes de exposición a acrilamida en la dieta. Cada sistema incluyó el alimento de forma aislada o combinado con una fuente proteica: a) cereales de desayuno y cereales de desayuno con yogur desnatado; b) galletas y galletas con leche desnatada; c) patatas fritas y patatas fritas con filete de ternera; d) patatas “a lo pobre” y patatas “a lo pobre” con huevos revueltos. Los alimentos individuales fueron adquiridos en un supermercado local y cocinados en la cocina experimental del Instituto de Ciencia, Tecnología y Nutrición (ICTAN-CSIC, Madrid, España), simulando un entorno doméstico de elaboración. Los alimentos combinados se prepararon mezclando los productos individuales según las proporciones habituales en estos platos.

Los resultados del estudio mostraron que la fracción no bioaccesible de acrilamida tendió a disminuir durante el proceso de digestión en todos los sistemas. La acrilamida bioaccesible final se vio afectada por la composición de la matriz alimentaria, disminuyendo en presencia de una fuente proteica. La digestión de cereales de desayuno, galletas con leche, patatas “a lo pobre” y patatas “a lo pobre” con huevos revueltos reduce la bioaccesibilidad del contaminante respecto al control. En valores absolutos, el consumo combinado de galletas y leche redujo significativamente la acrilamida bioaccesible en comparación con las galletas aisladas. La presencia de fuentes de proteína (huevo o filete de carne) en los productos a base de patata disminuyó significativamente la bioaccesibilidad del compuesto, de forma cuantitativamente más evidente en el sistema de patatas fritas

con filete de ternera. En ambos casos, se debe considerar la posible implicación de la reacción de adición de Michael en el bloqueo de la acrilamida libre.

En conclusión, los hallazgos descritos en el artículo establecen la importancia de considerar comidas completas y no sólo alimentos aislados, así como el estudio de la fracción no bioaccesible, para obtener una información más realista de la evolución de la bioaccesibilidad de la acrilamida, su recuperación e interacciones con otros componentes de la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal.

Este trabajo ha sido publicado en la revista *Food Research International* como artículo de investigación:

González-Mulero, L.; Mesías, M.; Morales, F.J.; Delgado-Andrade, C. **Assessment of the acrylamide bioaccessibility in cereal and potato-based foods after *in vitro* digestion.** *Food Research International* 2022, 161, 111820. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111820>

La doctoranda y primera firmante del presente artículo ha participado en el diseño experimental, la elaboración de los alimentos, codificación, manipulación y determinación del contenido de acrilamida. Además, ha contribuido al análisis de datos, discusión de los resultados obtenidos y redacción del artículo científico.



Assessment of the acrylamide bioaccessibility in cereal and potato-based foods after *in vitro* digestion

Lucía González-Mulero, Marta Mesías*, Francisco J. Morales, Cristina Delgado-Andrade

ABSTRACT

Acrylamide bioaccessibility during and after *in vitro* gastrointestinal digestion of cereal and potato-based foods was monitored. Isolated *vs* combined meals were evaluated with the aim of investigating acrylamide-food matrix interactions. The meals considered were breakfast cereals, biscuits, *patatas a lo pobre* (*patatas-pobre*) and French fries for isolated foods; breakfast cereals with yoghurt, biscuits with milk, *patatas-pobre* with scrambled eggs and French fries with meat steak for combined foods. The non-bioaccessible fraction of acrylamide tended to decrease during the digestion process in all the systems. However, the final bioaccessible acrylamide was affected by the food matrix composition (fibre, protein, sugars and lipids). The digestion of breakfast cereals, biscuits with milk, *patatas-pobre* and *patatas-pobre* with scrambled eggs led to acrylamide bioaccessibility below the initial content of the contaminant in the meals. In absolute values, the combined consumption of biscuits and milk significantly reduced the bioaccessible acrylamide compared with isolated biscuits (from 212 to 122 ng; $p < 0.05$). The presence of protein sources (egg or meat steak) in the potato-based products significantly decreased the acrylamide bioaccessibility, which was more prominent in the French fries-meat steak system (from 2100 to 1698 ng; $p < 0.05$). These findings establish the importance of considering complete meals and not only isolated foods as well as the study of the non-bioaccessible fractions for a better understanding of acrylamide bioaccessibility, its recovery and interactions during gastrointestinal digestion.

Keywords:

Acrylamide, *in vitro* gastrointestinal digestion, bioaccessible fraction, non-bioaccessible fraction, cereal-based foods, potato-based foods

1. Introduction

Acrylamide is a low molecular weight compound formed during the thermal treatment of foods. It is mainly generated through the Maillard reaction between the free amino acid asparagine and the alpha-hydroxycarbonyl group of reducing sugars

(Stadler et al., 2002), at temperatures above 120 °C and in low moisture conditions (Tareke, Rydberg, Karlsson, Eriksson, & Törnqvist, 2002). Due to its neurotoxic, carcinogenic and genotoxic effects, acrylamide has been classified as a probable carcinogenic in humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1994). Once in the organism, acrylamide is metabolised by the cytochrome P450 2E1 enzyme into another compound named glycidamide. Glycidamide is an epoxide derivative with a genotoxic character (Crawford, Kahlon, Wang, & Friedman, 2019) capable of forming adducts with proteins and DNA (Bandarra et al., 2013) and is more reactive than acrylamide. Both acrylamide and glycidamide conjugate with glutathione to be excreted in urine as mercapturic acid derivatives, which is the predominant pathway of acrylamide detoxification (Kocadağlı & Gökmen, 2016). In 2015, the European Food Safety Authority (EFSA) estimated an average exposure to acrylamide ranging from 0.4 to 1.9 µg/kg body weight/day. These levels involve margins of exposure (MOE) between 89 and 425 for neoplastic effects, much lower than the reference level of 10,000, thus implying a concern for human health (EFSA, 2015). To reduce the acrylamide levels in foods and consequently the risk associated with its exposure, several mitigation strategies have been described in the last decades. Most of them are intended to be implemented by the food industry especially in the food matrices more prone to generate critical levels of acrylamide, including interventions at various stages of production (agronomical, recipe, processing and final preparation), as is indicated in the “Acrylamide Toolbox” developed by FoodDrinkEurope (FDE, 2019).

After consumption of foods, the high-water solubility character of acrylamide promotes its rapid absorption and distribution by the systemic circulation to all human tissue (Kocadağlı & Gökmen, 2016). The acrylamide absorption in the gastrointestinal tract of humans after consumption of crisp bread and potato products was first confirmed by Sorgel et al. (2002). Subsequently, Fuhr et al. (2006) evaluated the toxicokinetics of acrylamide in humans after the consumption of potato chips and concluded that most of the acrylamide ingested through foods was absorbed. In this respect, it is important to note that not all ingested acrylamide is necessarily bioavailable. During the digestive process, mastication, variations of the pH and activities of various digestive enzymes in the mouth, stomach and intestine could promote structural and chemical changes, affecting the bioaccessibility of the compound (Hamzahloğlu & Gökmen, 2015; Sansano, Heredia, Peinado, & Andrés, 2017) and in turn its bioavailability. Acrylamide is an electrophilic compound with an

α,β -unsaturated structure and an amide group (Kocadağlı & Gökmen, 2016), making it prone to reacting with nucleophile compounds such as amino groups of certain free amino acids (lysine and histidine), *N*-terminal amino acid residues of proteins and -SH groups of cysteine or methionine by the Michael addition (Friedman, 2003; Hidalgo, Delgado, & Zamora, 2010; Zamora, Delgado, & Hidalgo, 2010). Schabacker, Schwend, and Wink (2004) observed the interaction between acrylamide and chicken egg albumin under simulated gastrointestinal conditions and cooking conditions, suggesting that the protein-acrylamide bound could reduce the acrylamide concentration and consequently its uptake. Hamzahoğlu and Gökmen (2015) investigated the fate of acrylamide in thermally processed foods after ingestion and concluded that the contaminant levels gradually decreased through gastric, duodenal and colon phases during *in vitro* digestion of biscuits due to the Michael addition of amino acids to acrylamide during digestion. Intestinal digestion also decreased the acrylamide levels in fried potatoes but, in contrast to biscuits, values increased significantly during gastric digestion, probably because the gastric conditions promoted the formation of the contaminant from the Schiff base. This trend was also reported by Sansano et al. (2017) in products commonly consumed as part of the Western diet. Conversely, Badoud et al. (2020) did not observe any changes during the digestive process in the acrylamide content in drip-brewed coffee. The bioaccessibility of acrylamide during the digestive process may be conditioned by the composition of the food matrix.

All these previous studies have evaluated the bioaccessibility of acrylamide from individual foods. However, scarce attention has been paid to what happens during the digestive process if these foods are consumed in combination with other foods within a complete meal. The content of acrylamide in the non-soluble portion has not been described either, which would show the total recovery of acrylamide and the magnitude of the increase or reduction of the initial levels during the digestive process. Therefore, the objective of this research was to evaluate the acrylamide bioaccessibility in several cereal and potato-based foods, applying the standardised *in vitro* gastrointestinal digestion protocol INFOGEST. Acrylamide evolution in soluble and non-soluble fractions was monitored throughout different stages of the process, evaluating both isolated and combined foods in order to analyse possible interactions in the food matrix.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Acrylamide standard (99%), potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (98%, Carrez-I), zinc acetate dihydrate (>99%, Carrez-II) and all chemical reagents used for *in vitro* digestion analyses were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Specific enzymes were α -amylase from human saliva (A1031), pepsin from porcine gastric mucosa (P6887), pancreatin from porcine pancreas (P7545) and bile salts (B8756). Acrylamide labelled by $^{13}\text{C}_3$ (99%) was acquired from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). Formic acid (98%), methanol (99.5%) and hexane were acquired from Panreac (Barcelona, Spain). All solutions were prepared using deionised water from a Milli-Q Integral 5 water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA). All other chemicals, solvents and reagents were of analytical grade. Cellulose syringe filter units (0.22 and 0.45 μm) were obtained from Análisis Vínicos (Tomelloso, Ciudad Real, Spain) and Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Food samples

Four different food systems including some of the more representative groups defined as the main sources of dietary acrylamide in the Acrylamide Toolbox (FDE, 2019) were selected. Individual foods were purchased from a local supermarket and cooked by researchers in the experimental kitchen at the Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC, Madrid, Spain), simulating the domestic culinary manipulation and techniques when necessary. Combined foods were prepared by mixing individual foods with other protein-rich foods according to the proportions combined in a regular meal and considering the weights of the mean portions of each product (Ruiz López & Artacho Martín-Lagos, 2010). Two systems were composed of cereal-based products and the other two of potato-based products, including isolated and combined foods as follows: i) breakfast cereals vs breakfast cereals with skimmed yoghurt (1:2 breakfast cereals to yoghurt); ii) biscuits vs biscuits with skimmed milk (1:2.5 biscuits to milk); iii) French fries vs French fries with meat steak (beef) (3:2 French fries to meat steak); iii) *patatas-pobre* (potatoes cooked in oil at low temperatures) vs *patatas-pobre* with scrambled eggs (1:1 *patatas-pobre* to egg). Food systems were then coded, photographed and weighed. Since the entire portion was edible, samples were directly homogenised with a hand blender (Taurus, Vital CM,

Spain) and stored at -20 °C until analysis.

2.3. *In vitro* digestion of food systems

In vitro digestion of the fresh ground food samples was performed in triplicate according to the INFOGEST protocol described by Egger et al. (2016), with slight modifications. Simulated salivary (SSF), gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluids were prepared according to Minekus, Alminger, Alvito, Ballance, and Bohn (2014). For combined foods, 5 g of each system were weighed in polypropylene tubes. For isolated foods, samples were weighed in the amount they were present in the combined food, as shown in Table 1. Milli-Q water was added to bring the final weight to 5 g, thus maintaining the initial acrylamide content in the isolated and combined foods and the enzyme concentrations in all digestions. All the samples were mixed with 4.5 mL of SSF (without α -amylase) including 25 μ L of 0.3 M CaCl₂, to form a paste-like consistency. To replace the addition of the lipase enzyme in the intestinal phase, samples were sonicated at this point (Vibracell VCX 130; Sonics & Materials Inc, Danbury, USA) to facilitate the accessibility of lipids during the subsequent steps of the digestion protocol (Teixeira, Lima Pallone, Delgado Andrade, Mesías, & Seiquer, 2022). Next, 0.5 mL of α -amylase enzyme solution was added to the samples (concentration was adjusted to reach 75 U α -amylase/ml SSF, as established by the standardised protocol) and incubated at 37 °C for 2 min with mild and constant agitation (model Julabo ED, Julabo GmbH, Germany). Then, 10 mL of SGF containing pepsin and 5 μ L of 0.3 M CaCl₂ were added and the pH was lowered to 3.0 using 1 M HCl (pepsin concentration on the final mix was adjusted to 2000 U/mL). Mixtures were incubated at 37 °C for 2 h with mild and continuous agitation. Lastly, the pH was raised to 7.0 with 1 M NaOH and 20 mL of SIF containing pancreatin, bile salts and 40 μ L of 0.3 M CaCl₂ were added (pancreatin concentration in the final mix was adjusted to 13.37 mg/mL, while bile salts were adjusted to 10 mM). The basic mixtures were incubated at 37 °C for 2 h with mild and constant agitation and then rapidly frozen in liquid nitrogen to halt the enzymatic reactions and stored at -20 °C. Frozen samples (containing pellet and digestion supernatant) were defrosted and centrifuged at 4 °C and 3220g for 45 min (Eppendorf 5810/R centrifuge; Merck, Darmstadt, Germany).

Table 1

Acrylamide content ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in isolated and combined food samples and weights for the *in vitro* digestion process.

Food system	Acrylamide ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Sample weight for digestion (g)		Water (ml)	Total (g)	Proportion
Cereal-based		Biscuit	Milk			
Biscuits	119 \pm 2	1.40	-	3.60	5	1:2.5
Biscuits-milk	29 \pm 2	1.40	3.60	-	5	
		Cereal	Yoghurt			
Cereal	116 \pm 9	1.65	-	3.35	5	1:2
Cereal-yoghurt	37 \pm 1	1.65	3.35	-	5	
Potato-based		<i>Patatas-pobre</i>	Scrambled eggs			
<i>Patatas-pobre</i>	16 \pm 0.3a	2.50	-	2.50	5	1:1
<i>Patatas-pobre</i> -scrambled eggs	< LOQ	2.50	2.50	-	5	
		French fries	Meat steak			
French fries	759 \pm 31	3.00	-	2.00	5	3:2
French fries-meat steak	360 \pm 28	3.00	2.00	-	5	

LOQ: Limit of quantitation.

The bioaccessible fraction and the residual fraction (non-soluble fraction) were carefully separated. Blanks of the *in vitro* digestion were prepared with 5 mL of Milli-Q water and the complete protocol was developed. They were shown to be free of acrylamide.

In order to monitor the behaviour of acrylamide during different stages of the digestive process, parallel digestions were performed and stopped after simulated oral (named oral), gastric (including oral + gastric steps, so named gastric) and intestinal (complete *in vitro* gastrointestinal digestion) phases for all the isolated foods and combined foods. All the soluble and non-soluble fractions obtained after the different phases of the digestive process were lyophilised and stored at 4 °C until acrylamide analysis.

2.4. Acrylamide determination by LC-ESI-MS/MS

The acrylamide content was determined following the protocol established by Mesías and Morales (2015) with some modifications. Fresh initial food samples (0.5 g) were weighed and mixed with 9.4 mL of Milli-Q water in polypropylene centrifugal tubes. Hexane (2 mL) was added to remove the fat content of the foods. Tubes were spiked with 100 μ L of the internal standard ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide solution and then homogenised (Ultra Turrax, IKA, Mod-T10 basic, Bohn, Germany) for 15 min. 250 μ L of both Carrez I (15 g of potassium ferrocyanide/100 mL of water) and Carrez II solutions (30 g of zinc acetate/100 mL of water) were added and then centrifuged at 4 °C, 9000x g for 10 min. Next, hexane was removed, and supernatants were filtered through a 0.22 μ m cellulose filter and cleaned, loading 1 mL into an Oasis-HLB cartridge, previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of distilled water, at a flow rate of 2 mL/min. First, drops were discharged, and the rest were collected into an amberlite LC-MS vial. Acrylamide from lyophilised fractions after digestion was extracted in a similar manner to food products, starting from 0.25 g of samples and adding 4.7 mL of Milli-Q water, 50 μ L of the internal standard and 125 μ L of both Carrez I and Carrez II solutions.

Acrylamide was determined by an Agilent 1200 liquid chromatograph coupled to an Agilent Triple Quadrupole MS detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). An Inertsil ODS-3 column (250 4.6 mm, 5 m; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) at 30 °C was used to achieve analytical separation, and a mobile phase of formic acid in water (0.2 mL/100 mL) at a flow rate of 0.4 mL/min was used to achieve an isocratic elution. The injection volume was 5 μ L. Electrospray ionization in the positive ionization mode was used. The acrylamide eluted at 6.1 min under those chromatographic conditions. The needle was set at 1.0 kV. The source temperature was set at 350 °C, and nitrogen was used as the nebulizer gas (12.0 L/min).

Signals at m/z 72- m/z 55 and m/z 72- m/z 27 were isolated for acrylamide and m/z 75- m/z 58 for ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide. The fragmentation was set at 76 V and the collision energy at 9.0 V for the transition m/z 72 > m/z 55, at 8.0 V for the transition m/z 75 > m/z 58 and at 11.0 V for the transition m/z 72 > m/z 27. Ions were recorded using multiple reactions monitoring scan mode (MRM). The recovery rate of acrylamide spiked in the samples ranged between 85 and 128%. The precision and repeatability of the analytical method were evaluated by analysing different samples on the same day by similar operators (repeatability) and on different days by different

operators (precision). The relative standard deviations (RSDs) of the analysis were < 10 % for all the determinations. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated by injecting lower concentrations of standards. A concentration determined as a signal-to-noise ratio of 3 was assigned to LOD (4.5 g/kg), and a signal-to-noise ratio of 10 was assigned to LOQ (15 g/kg). All analyses were performed twice.

2.5. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XVII. A simple ANOVA test followed by Tukey HSD test were used to identify the overall significance of differences between the initial acrylamide content of the four isolated and the four combined foods. The t-Student test was used to compare each phase result of the isolated food with its related combined food. Homogeneity of variances was determined using Levene's test. All statistical parameters were evaluated assuming $p < 0.05$ as the significance level.

3. Results and Discussion

Four different products including cereals (biscuits and breakfast cereals) and potato-based foods (*patatas-pobre* and French fries) as the main sources of dietary acrylamide were selected. Biscuits and breakfast cereals were commercial samples, whereas *patatas-pobre* and French fries were prepared by the researchers. Combined foods were obtained by mixing individual products with protein foods such as dairy products (skimmed yoghurt and milk), eggs and beef meat, following the common way of consuming these foods and considering the weights of the mean portions of each product (Ruiz López & Artacho Martín-Lagos, 2010). Thus, four individuals vs combined foods were designed and used for the *in vitro* multistep enzymatic digestion assay. The aim was to compare each food with its combined system to evaluate the effect of the food matrix on the bioaccessibility of acrylamide.

The initial acrylamide contents in the cereal-based foods were 116 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in breakfast cereals and 119 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in biscuits (Table 1), both values being lower than the benchmark levels established by the European regulation 2017/2158 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for wheat breakfast cereals and 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for biscuits) (EC, 2017). For potato-based foods, acrylamide concentrations were measured as 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in *patatas-pobre* and 759 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in French fries. The acrylamide concentration in the former was above the benchmark level of 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ established by the European regulation (EC, 2017) but

within the range reported by the European Food Safety Authority (EFSA) for this product (169–963 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (EFSA, 2015). As expected, after mixing the individual foods with protein-rich sources, combined foods exhibited lower acrylamide concentrations, which were 37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for cereals with yoghurt (68% reduction), 29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for biscuits with milk (76% reduction), non-quantifiable levels for *patatas-pobre* with scrambled eggs and 360 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for French fries with meat (53% reduction). All samples were weighed in different proportions and mixed with Milli-Q water (Table 1) to maintain the enzyme concentrations in all digestions but also to obtain similar initial acrylamide levels in both isolated and combined foods for each system. This was done to assess the behaviour of a fixed amount of acrylamide in the absence or the presence of a protein source and then to assess the effects on its bioaccessibility.

3.1. Variation of the acrylamide content during the *in vitro* digestion process

3.1.1. Validation of the analytical method

For the determination of the acrylamide content in the digesta, further optimisation and validation of the analytical method initially developed for foodstuffs was required. Analytical separation of acrylamide from digesta was performed by HPLC using an Inertsil ODS-3 V column followed by MS/MS, with ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide as an internal standard. Initially, signals at m/z 75–58 (Fig. 1A) and m/z 72–55 (Fig. 1B) were isolated for ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide and acrylamide, respectively. However, the chromatographic results showed a double peak at the m/z 72–55 transition, at the same retention time as the acrylamide present in the digesta (6.6 min), suggesting the presence of an interference in the extracts (Fig. 1B). Such interference also appeared in the blank after the intestinal phase of digestion, probably associated with the enzyme pancreatin added during this step. In order to separate the interference and be able to quantify the acrylamide, different modifications of the determination method were tested, both in the extraction of the compound and in the injection conditions. Separation using ultrafiltration or precipitation with trifluoroacetic acid was discarded, since only high molecular weight compounds would be removed with these methods, probably without affecting the interference associated with low molecular weight.

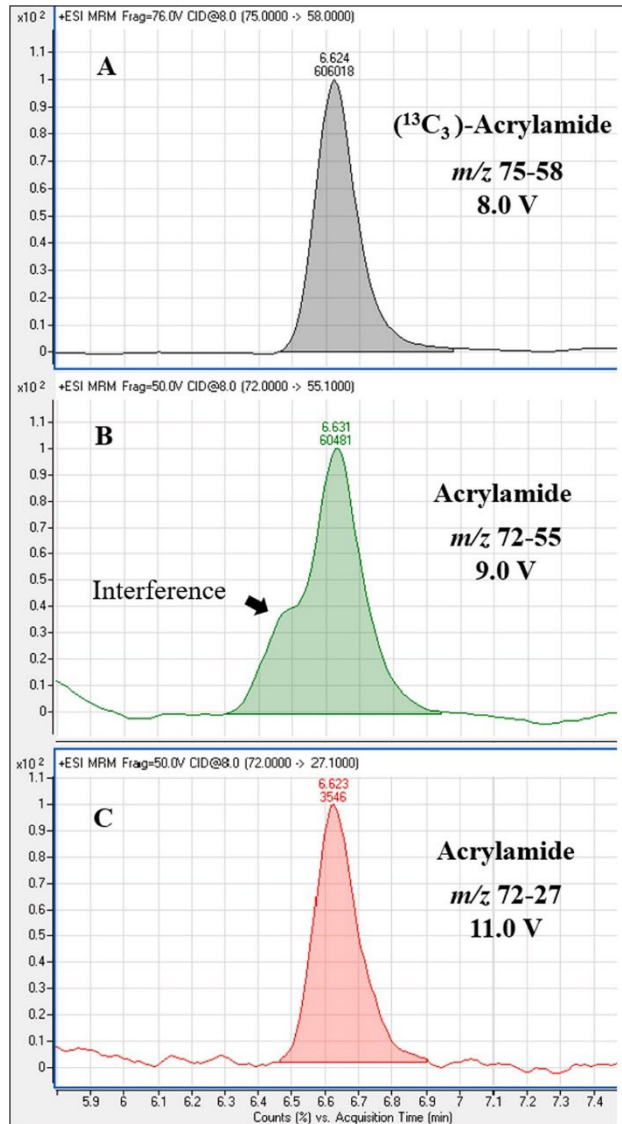


Fig. 1. LC-ESI-MS/MS extracted ion chromatograms of transitions m/z 75–58 ($(^{13}\text{C}_3)$ -acrylamide) (A), m/z 72–55 (acrylamide + interference) (B) and m/z 72–27 (acrylamide) (C).

Since slight acidic conditions during sample extraction could promote the protonation of the interference, the clean-up with Oasis MCX solid-phase extraction (SPE) cartridge was checked (Gökmen & Senyuva, 2006) without further improvement. Additionally, the injection volume was optimised to 5 μL to reduce the interference. To achieve greater specificity in the identification of acrylamide, a new

transition was tested (m/z 72–27), including ion 27 not only as a qualifier ion (FDA, 2003) but also as a quantifier ion. This step required applying higher collision energy (11.0 V instead of 9.0 V). It allowed the elimination of the interference, obtaining the isolated acrylamide peak for its quantification (Fig. 1C). Ultimately, an acetonitrile 50% gradient step was added at the end of each injection to clean the column between samples. The described method demonstrated satisfactory precision (< 10%), repeatability (< 10%), and accuracy (recovery between 85 and 110%).

3.1.2. Changes in acrylamide content during the *in vitro* enzymatic digestion process

In vivo studies on animal and/or human subjects enable a more precise evaluation of the acrylamide evolution and interactions during the digestive process. However, they involve larger and more expensive essays (Boisen & Eggum, 1991) and several difficulties in the sampling. Based on these limitations, *in vitro* models are an alternative methodology to provide faster results at a lower cost. They avoid ethical issues, give high reproducibility and the possibility of controlling the digestion conditions, with easy sampling at any time of the digestion process (Minekus et al., 2014). For that reason, the internationally standardised three-phase static *in vitro* digestion protocol based on human *in vivo* data, considering physiological enzyme activities and salt concentrations, was applied in our study.

Fig. 2 represents the changes in the acrylamide content in the digesta of the different food systems during the *in vitro* enzymatic digestion process, including both bioaccessible and non-bioaccessible fractions. At this point, it is important to highlight that it is the first time that acrylamide bioaccessible fractions after the oral phase as well as non-bioaccessible fractions of the compound after different phases of *in vitro* digestion are investigated, since previous studies have only reported soluble acrylamide in the digesta after gastric and intestinal stages (Badoud et al., 2020; Hamzalıoğlu & Gökmen, 2015; Sansano et al., 2017). The distribution of acrylamide in both fractions as well as the recovery percentage of the initial acrylamide for each system in each digestion phase is also described in Table 2.

The non-bioaccessible fractions of acrylamide tended to decrease during the digestion process in all the systems. However, the acrylamide content in the bioaccessible fractions seemed to depend on the food products. The variability in bioaccessibility must be taken into account to assess the real risk to the contaminant, since an increase in bioaccessibility could increase bioavailability and consequently the negative health consequences associated with exposure to acrylamide (Blank,

2005; Friedman, 2003). As expected, the high starch content of all the foods greatly affected the oral digestion on acrylamide, with significant decreases in all cases compared with the initial acrylamide in the meals except in the case of biscuits. Reductions of acrylamide content were registered in the oral phase in cereals (21%), *patatas-pobre* (11%) and French fries (37%), and these reduction percentages were higher in the combined foods (50% in cereals with yoghurt, 74% in *patatas-pobre* with scrambled eggs and 56% in French fries with meat steak). However, the addition of milk to biscuits did not significantly change the initial amount of acrylamide after the oral phase of digestion. Except for French fries with meat steak, all combined foods showed lower levels of acrylamide in both bioaccessible and non-bioaccessible fractions, exhibiting a lower recovery rate than the digesta without the protein source (Table 2).

This fact was also demonstrated after the gastric phase, with a recovery rate ranging from 104 to 144% in isolated foods digested and from 103 to 114% in combined foods digested (excluding *patatas-pobre* whose values were below the limit of quantitation) (Table 2). In this case, an increase in the acrylamide content was observed over the levels shown after oral digestion, again in all systems except in biscuits and *patatas-pobre* (Fig. 2). Regarding the initial levels in the foods, the acrylamide content following gastric digestion increased in cereals, was not modified in biscuits and *patatas-pobre*, and decreased both in French fries and in all combined foods.

Considering the entire enzymatic digestion process, acrylamide was reduced by 6% ($p > 0.05$) and 26% when comparing bioaccessible fractions of French fries and cereals with the initial content before digestion. In contrast, acrylamide bioaccessibility significantly increased (28%) in biscuits after intestinal digestion which would lead to a higher absorption and higher toxic effects linked to an increased ultimate exposure to the contaminant. In combined foods, bioaccessible fractions were similar to the starting acrylamide levels when yoghurt, milk and meat were added to cereals, biscuits and French fries, respectively. Reductions were observed for bioaccessible acrylamide in *patatas-pobre*, although levels could not be quantified due to values falling below the limit of quantification.

Hamzaloğlu and Gökmen (2015) reported acrylamide reductions ranging from 17.4 to 49.9% in the gastric phase and from 23.9% to 58.1% in the duodenal phase in biscuit digestion. On the other hand, the amounts of acrylamide increased significantly during the gastric digestion of fried potatoes (1.20–3.95%), whereas they

tended to decrease significantly after the intestinal phases (78.2–96.8% in the duodenal phase and 48.3–90.2% in the colon phase). Sansano et al. (2017) also reported significant increases in the acrylamide levels for several processed foods after gastric digestion, except in breakfast cereals. At the end of the intestinal stage, acrylamide values were statistically similar in French fries and lower than the initial values (before digestion) in potato chips. In contrast to these findings, Badoud et al. (2020) observed that acrylamide contents in a drip-brewed coffee extract did not significantly differ between the initial, gastric, duodenal and colon phases.

3.1.3. Effects of the food matrix of meals on acrylamide bioaccessibility. Cereal vs potato-based products

The composition of the food matrices was primarily responsible for the differences found in the systems during the digestive process. Cereal-based foods are therefore a greater source of fibre and protein, resulting in more complex matrices compared with processed potatoes, which are essentially rich in starch and lipids due to the oil retention during the frying process.

The nutritional composition of breakfast cereals vs biscuits as declared by the manufacturer (g/100 g) is the following: protein 7.5 vs 5.0, carbohydrates 78.0 vs 74 (sugars 16.3 vs 26.0), fibre 5.3 vs 2.3 and lipids 1.7 vs 15.0. The higher content of sugars and lipids in biscuits could be a key factor in the digestion process, since high levels of sugars and lipids have been reported to prevent starch gelatinisation, which is the fraction susceptible to enzyme hydrolysis (Agama-Acevedo, Islas-Hernández, Pacheco-Vargas, Osorio-Díaz, & Bello-Pérez, 2012). Following this finding, Bustos, Vignola, Pérez, and León (2017) observed less starch availability in cookies compared with other cereal-based foods such as bread and pasta after *in vitro* digestion. However, regarding bioaccessible acrylamide (%) detected after oral digestion of biscuits, α -amylase seemed to be quite efficient despite its high lipid and sugar content. Interestingly, a significantly higher degree of starch hydrolysis has been demonstrated in products with lower protein content (Bustos et al., 2017; Marti & Pagani, 2013), as seen in biscuits vs cereal. The lack of a protein matrix produces a more porous structure, allowing more efficient enzymatic activities, which could lead to a higher percentage of accessible acrylamide. Similarly, Li, Li, Foxc, Gidleya, and Dhital (2021) have suggested that the macronutrient protein provides hindrances to digestive enzymes in the starch-protein matrix, which could explain the higher percentages of non-bioaccessible acrylamide in breakfast cereals than those found in

biscuits after oral phases (Table 2, Fig. 2). Another aspect to consider is a possible effect of the fibre contained in the food matrix. Vázquez-Sánchez et al. (2018) evaluated the bioaccessibility of advanced end products (AGEs) during the *in vitro* gastrointestinal digestion of traditional biscuits and biscuits enriched with dietary fibre. Authors concluded that AGEs bioaccessibility was highest for the bioaccessible fractions of the traditional biscuits and low for fortified samples, proposing the addition of fibre to cereal-based foods as a measure to prevent chronic diseases derived from the accumulation of AGEs (Rannou, Laroque, Renault, Prost, & Sérot, 2016). According to this finding, the highest fibre content in breakfast cereals could explain the lowest acrylamide bioaccessibility in this foodstuff at the end of the oral phase, suggesting the greater contribution of fibre in decreasing the bioaccessibility of acrylamide compared with biscuits.

In agreement with Sansano et al. (2017), no significant differences between initial acrylamide content in breakfast cereals and acrylamide soluble fractions after gastric digestion were found. However, levels were significantly increased compared with those in the oral phase. The possible acrylamide formation from intermediate Maillard reaction compounds favoured by the acidic pH during this step cannot be discarded. Hamzalıoğlu and Gökmen (2015) reported that intermediate Maillard products such as Schiff bases are potential precursors of acrylamide under gastric conditions. α -dicarbonyl compounds and hydroxymethylfurfural (HMF) are other reactive intermediate compounds which have been demonstrated to play a critical role in acrylamide formation in coffee (Hamzalıoğlu & Gökmen, 2020). The acidic conditions could also release acrylamide due to the breakdown of melanoidin-bound-acrylamide complexes (Pastoriza, Rufián Henares, & Morales, 2012) and the matrix degradation as a consequence of the proteolysis linked to the pepsin activity and the mechanical forces in the stomach (Hamzalıoğlu & Gökmen, 2015; Sansano et al., 2017). A weaker protein matrix could be the reason why none of these aspects had the same effect on acrylamide levels in biscuits, which were unmodified after oral and gastric digestions. Controversial results have been reported for biscuits after gastric digestion. While Sansano et al. (2017) described increased acrylamide levels, Hamzalıoğlu and Gökmen (2015) indicated significant decreases after this stage, differences probably linked to the complexity of the matrix.

Regarding the behaviour of acrylamide during intestinal digestion, several studies have described the possible interaction with nucleophilic groups through the Michael reaction. The high electrophilic property of acrylamide makes it prone to

reacting with amino and sulfhydryl groups of different nucleophiles at these pH conditions (Hidalgo et al., 2010) leading to reductions in acrylamide bioaccessibility after the complete digestion (Hamzalıoğlu & Gökmen, 2015). This interaction can occur with the amino acids already present in the soluble fraction of digesta but also with the smaller peptides or amino acids released in the gastric digestion through the hydrolysis of the protein by the action of pepsin under low pH conditions. This fact could explain the decrease in acrylamide levels after intestinal digestion of breakfast cereals (Fig. 2A), similar to data described by Hamzalıoğlu and Gökmen (2015) in biscuits, but unlike the biscuit digesta in the present study (Fig. 2B), where bioaccessible acrylamide surpassed the initially present levels in the undigested food. Reductions in the accessible acrylamide due to the formation of adducts by the Michael addition at basic pH have been observed in different model systems. Adams, Hamdani, Van Lancker, Méjri, and De Kimpe (2010) identified a notorious free acrylamide drop in the presence of different amino acids with a nucleophilic side chain, the highest reactivity being observed in an acrylamide-cysteine system. Similar results have been observed by Zamora et al. (2010) and by Hidalgo et al. (2010), who investigated the formation of the Michael adducts among acrylamide and amino and sulfhydryl groups of different nucleophilic compounds. Hamzalıoğlu and Gökmen (2015) also described significant declines in acrylamide-lysine (1:1) and acrylamide-cysteine (1:1) systems from the gastric phase to the intestinal one. Based on this capability, Xiong et al. (2017) have proposed the addition of mercapto flavour compounds as a mitigation strategy to eliminate acrylamide in a model system. However, these model systems carried out with an unrealistic acrylamide:amino acid ratio might not be reflecting the true situation occurring in the meal, which contrasts strongly with our estimations. Considering the cysteine and lysine content of meat established by Tovar López, Tovar Andrada, and García González (2010) and the measured levels of acrylamide in the French fries with meat steak obtained in this study, the estimated confrontations might be 1:60 for acrylamide:cysteine and 1:70 for acrylamide: lysine. On its part, as mentioned, the higher fibre content in breakfast cereals could also help to lower the acrylamide bioaccessibility in this foodstuff at the end of the digestive process compared with results observed in biscuits, in agreement with Vázquez-Sánchez et al. (2018). The results of this study can also be analysed to consider the effect of the protein sources on the bioaccessible acrylamide coming from each isolated food. The presence of yoghurt in the combined food significantly lessened the soluble and insoluble compound during the oral and gastric phase of the

gastrointestinal digestion (Fig. 2A) compared with breakfast cereals. As mentioned, the protein provided by the dairy product could have impaired the α -amylase action (Li et al., 2021) resulting in a smaller release of acrylamide from the starch matrix of cereals. Interestingly, a decrease in the bioaccessible fractions after the gastric stage was detected in the presence of yoghurt. Lactic acid bacteria have recently been demonstrated to interact with the acrylamide molecule, binding it to probiotic cell walls thanks to the physicochemical characteristics of the bacterial cell wall proteins and peptidoglycan (Albedwawi et al., 2021; Rivas-Jimenez et al., 2016; Shen et al., 2019; Zhang et al., 2017). This capability means that some carcinogenic compounds would be removed through the faeces, together with the bacteria (dos Reis et al., 2017). In addition, the lactic acid bacteria enhance the lowering of pH that, along with the production of amidases, increases the degradation of acrylamide and thus its reduction (Albedwawi et al., 2021). However, after the complete gastrointestinal digestion, the bioaccessible acrylamide significantly increased in the cereal-yoghurt combination. In these conditions, the possible Michael additions between acrylamide and nucleophile compounds did not take place and yoghurt was not able to block bioaccessible acrylamide present in breakfast cereals. The case of the biscuit-milk combination was substantially different (Fig. 2B), since the introduction of milk in the system decreased the amount of bioaccessible and non-bioaccessible acrylamide throughout the whole gastrointestinal process, even counteracting the increased recovery detected in the case of the isolated biscuits (Table 2). As described, the particular composition of biscuits, high in lipids and sugars, could provide a good proportion of acrylamide precursors able to produce the contaminant during different phases of digestion. The presence of milk in the combined food could trigger the Michael addition as the pH increased as a result of its high concentration of glycine and lysine (Landi, Ragucci, & Di Maro, 2021), whose nucleophilic amino groups could easily react with free acrylamide to block its bioaccessibility (Adams et al., 2010; Zou et al., 2015). Consequently, our results establish that the combined consumption of biscuits and milk would help to reduce the bioaccessible acrylamide present in biscuits. The acrylamide content during the digestive process of the potato-based foods differed from those of cereals. Although the content in the bioaccessible fractions of the *patatas-pobre* after the oral phase was similar to the initial content in the food (Fig. 2C), it was significantly reduced in the case of French fries (Fig. 2D). Levels were increased after the gastric phase, without significant differences in the first system and with a significant rise with respect to the oral stage but not to the initial

content in French fries. Results were contrary to those expected following the findings reported by Sansano et al. (2017) in air-fried potatoes. The Schiff base content in *patatas-pobre*, which are potatoes subjected to a less aggressive heat treatment, would have been expected to be higher, thereby promoting a higher acrylamide formation during the gastric phase. In contrast, the high acrylamide levels in French fries could be associated with a greater advance of the Maillard reaction in these products and, therefore, with a lower Schiff base content, thus reducing the possibility of acrylamide formation during the gastric digestion. The lower protein content of potatoes involves a reduced possibility of the release of peptides and amino acids at this pH, potentially leading to a lower formation of adducts due to the Michael reaction at intestinal conditions (Fig. 2D). Results are contrary to those previously described by Hamzalıoğlu and Gökmen (2015) and Sansano et al. (2017) for this food matrix. However, in line with these authors, small reductions were observed for bioaccessible acrylamide in *patatas-pobre* after complete digestion, although, as mentioned before, levels cannot be quantified due to values falling below the limit of quantification (Fig. 2C). In summary, the presence of protein sources (egg or meat steak) significantly decreased the acrylamide bioaccessibility in the potato-based products analysed. More reliable data were obtained in the French fries-meat system due to the higher abundance of the initial contaminant in French fries compared with *patatas-pobre*. Hodgkinson, Montoya, Scholten, Rutherford, and Moughan (2018) established the elevated DIAAS (digestible indispensable amino acid score) of roasted bovine meat (91%) compared with other cooking methods. The digestion of this high-quality protein source provides important amounts of nucleophile compounds able to participate in the Michael-type additions reactions with acrylamide decreasing its bioaccessible level. A similar effect was described by Rydberg et al. (2003) after the addition of lean fish meat to heated potato samples, with a considerable reduction in acrylamide content beyond that expected due to a purely additive effect. As mentioned, this possible reduction of acrylamide by the Michael additions could depend on the amino acid content in the meat steak and need further study, as the initial levels in the raw product might not be the same in the cooked meat due to the thermal treatment applied. Despite all of this, it must be mentioned that when data were expressed as a percentage of the initial contaminant present in the French fries or the combined food with beef meat, the bioaccessible fractions were exactly the same in both cases (Table 2).

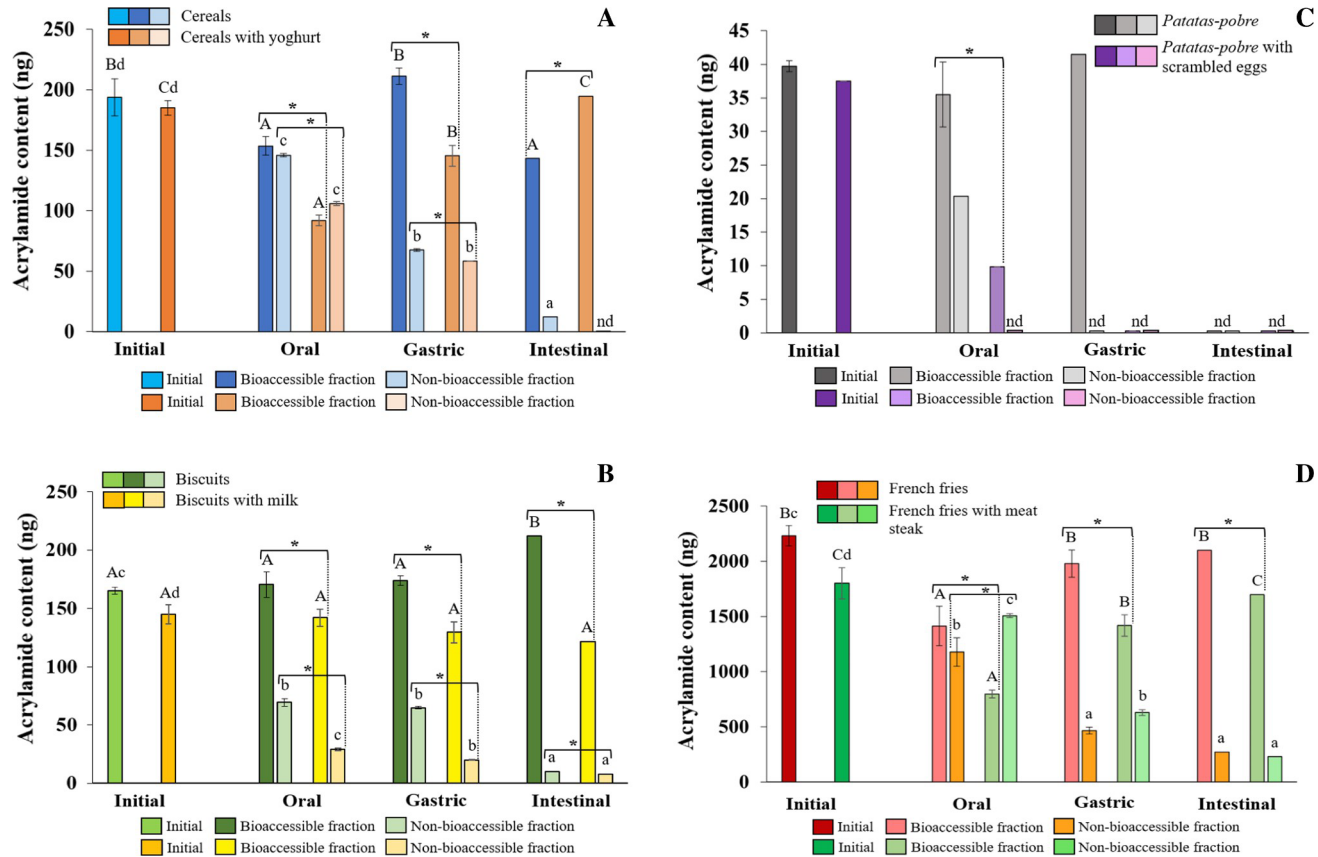


Fig. 2. Variations in the acrylamide content (ng) before and after the *in vitro* enzymatic digestion process in both bioaccessible and non-bioaccessible fractions. Comparison between isolated and combined foods. nd: non-detected. *Asterisk means significant differences among samples ($p < 0.05$). The significant differences within each system, isolated and combined, have been represented with capital letters in the case of the bioaccessible fraction and lowercase letters for the non-bioaccessible fraction.

Table 2

Acrylamide content (%) after the different phases of the *in vitro* enzymatic digestion process. Results are represented as mean \pm standard deviation of percentages in the bioaccessible and non-bioaccessible fractions in oral, gastric and intestinal phases.

Food system	Digestion phases	Acrylamide content (%)		
		Bioaccessible fraction	Non-bioaccessible fraction	Recovery rate
Cereal-based				
Cereals	oral	79 \pm 4c	75 \pm 4c	155 \pm 4
	gastric	109 \pm 4d	35 \pm 1b	144 \pm 3
	intestinal	74 \pm 4c	6 \pm 1a	80 \pm 4
Cereals with yoghurt	oral	50 \pm 4b	57 \pm 7b	107 \pm 10
	gastric	79 \pm 2c	32 \pm 1a	110 \pm 2
	intestinal	105 \pm 5d	n.d.	105 \pm 5
Biscuits	oral	103 \pm 3c	42 \pm 1b	145 \pm 4
	gastric	105 \pm 7c	39 \pm 2b	144 \pm 5
	intestinal	128 \pm 2d	6 \pm 1a	134 \pm 2
Biscuits with milk	oral	98 \pm 6d	20 \pm 1b	118 \pm 6
	gastric	89 \pm 5cd	14 \pm 1ab	103 \pm 4
	intestinal	84 \pm 6c	5 \pm 0.2a	89 \pm 6
Potato-based				
<i>Patatas-pobre</i>	oral	89 \pm 6a	51 \pm 4	141 \pm 8
	gastric	104 \pm 12a	n.d.	104 \pm 12
	intestinal	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Patatas-pobre</i> with scrambled eggs	oral	26 \pm 2	n.d.	26 \pm 2
	gastric	n.d.	n.d.	n.d.
	intestinal	n.d.	n.d.	n.d.
French fries	oral	63 \pm 8b	53 \pm 5b	116 \pm 8
	gastric	89 \pm 8c	21 \pm 6a	110 \pm 3
	intestinal	94 \pm 6c	12 \pm 1a	106 \pm 5
French fries with meat steak	oral	44 \pm 3c	84 \pm 5d	128 \pm 2
	gastric	79 \pm 2d	35 \pm 1b	114 \pm 3
	intestinal	94 \pm 5e	13 \pm 1a	107 \pm 4

Different letters mean significant differences between the isolated and combined foods ($p < 0.05$).

4. Conclusions

Acrylamide bioaccessibility after gastrointestinal digestion of cereal and potato-based food isolated or combined with protein sources was assessed in this study, to understand the effects of the food matrix on the bioaccessible fractions of the contaminant. Due to the high starch content of all the foods, the effect of the oral digestion on acrylamide released from the food matrix was quite marked, representing a good portion of the final bioaccessible acrylamide. One of the novel aspects of this approach was the investigation of the non-bioaccessible fractions. It revealed that insoluble acrylamide decreased progressively during the digestion process and that the increase of the acrylamide content throughout the gastrointestinal tract was sometimes possible, probably due to the release of the compound from the food matrix thanks to the enzymatic action. This occurred in the isolated biscuits, where a recovery higher than 100% was observed. Only the digestions of breakfast cereals, biscuits with milk, *patatas-pobre* and *patatas-pobre* with scrambled eggs led to acrylamide bioaccessibility below the initial content of the contaminant in the meals, pointing to the importance of the food matrix composition in the bioaccessible acrylamide. Interestingly, the combined consumption of biscuits and milk reduced the bioaccessible acrylamide compared with isolated biscuits, and something similar occurred in the case of the French fries-meat system. In both cases, the possible implication of the Michael-type addition reaction in trapping free acrylamide and then decreasing its bioaccessibility must be considered. In conclusion, our findings establish the importance of considering complete meals and not only isolated foods as well as the study of the non-bioaccessible fractions for a better understanding of acrylamide bioaccessibility, its recovery and interactions during the gastrointestinal digestion.

Funding: This work is part of the R&D project ACRINTAKE (RTI2018-094402- B-I00), financed by MCIN/AEI/<https://doi.org/10.13039/501100011033/> and Fondo Europeo de Desarrollo Regional ("FEDER,") A way to make Europe.

CRedit authorship contribution statement: **L. González-Mulero:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Software, Writing - original draft. **M. Mesías:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing - review & editing. **F.J. Morales:** Conceptualization, Investigation, Resources, Software, Supervision, Visualization, Writing - review & editing. **C. Delgado-Andrade:** Conceptualization, Data curation,

Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing – review & editing.

Acknowledgments: The authors wish to thank Ms I. Alvarez for her technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Adams, A., Hamdani, S., Van Lancker, F., Mójri, S., & De Kimpe, N. (2010). Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. *Food Research International*, 43(5), 1517–1522. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.033>
- Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J. J., Pacheco-Vargas, G., Osorio-Díaz, P., & Bello-Pérez, L. A. (2012). Starch digestibility and glycemic index of cookies partially substituted with unripe banana flour. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.010>
- Albedwawi, A. S., Turner, M. S., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Liu, S. Q.,... Ayyash, M. M. (2021). An overview of microbial mitigation strategies for acrylamide: Lactic acid bacteria, yeast, and cell-free extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 143, Article 111159. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111159>
- Badoud, F., Goeckener, B., Severin, K., Ernest, M., Romero, R., Alzieu, T., ... Delatour, T. (2020). Fate of acrylamide during coffee roasting and *in vitro* digestion assessed with carbon 14- and carbon 13-labeled materials. *Food Chemistry*, 320, Article 126601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126601>
- Bandarra, S., Fernandes, A. S., Magro, I., Guerreiro, P. S., Pingarilho, M., Churchwell, M. I., ... Oliveira, N. G. (2013). Mechanistic insights into the cytotoxicity and genotoxicity induced by glycidamide in human mammary cells. *Mutagenesis*, 28(6), 721–729. <https://doi.org/10.1093/mutage/get052>
- Blank, I. (2005). Current status of acrylamide research in food: Measurement, safety assessment, and formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 30–40. doi: 10.1196/annals.1333.004.
- Boisen, S., & Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141–162. <https://doi.org/10.1079/NRR19910012>
- Bustos, M. C., Vignola, M. B., Pérez, G. T., & León, A. E. (2017). *In vitro* digestion kinetics and bioaccessibility of starch in cereal food products. *Journal of Cereal Science*, 77, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.08.018>
- Crawford, L. M., Kahlon, T. S., Wang, S. C., & Friedman, M. (2019). Acrylamide content of experimental flatbreads prepared from potato, quinoa, and wheat flours with added fruit and vegetable peels and mushroom powders, 228, 1–14 *Foods*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/foods8070228>.
- dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Siquiera, N. P., Rosa, D. D., da Silva, L. L., & Peluzio, M. C. G. (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research*, 37, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.11.009>
- EC (European Commission). (2017). Commission regulation (EU) 2017/2158 of 20

- November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *Official Journal*, L304, 24–44. Available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32017R2158> (accessed on 26 April 2022).
- EFSA (European Food Safety Agency). (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13, 4104. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4104.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006>
- FDA (U.S. Food & Drug Administration). Detection and quantitation of acrylamide in foods. (2003). Available from <https://www.fda.gov/food/chemical-contaminants-food/detection-and-quantitation-acrylamide-foods> (accessed on 19 April 2022).
- FDE (Food and Drink Europe). Food drink Europe acrylamide toolbox 2019. Available from: https://www.fooddrinkeurope.eu/wp-content/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf (accessed on 20 April 2022).
- Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4504–4526. <https://doi.org/10.1021/jf030204+>
- Fuhr, U., Boettcher, M. I., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., ... Schömig, E. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15, 266–271. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0647>
- Gökmen, V., & Senyuva, H. Z. (2006). A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods. *Journal of Chromatography A*, 1120, 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.084>
- Hamzaloğlu, A., & Gökmen, V. (2015). Investigation of the reactions of acrylamide during *in vitro* multistep enzymatic digestion of thermally processed foods. *Food & Function*, 6, 109–114. <https://doi.org/10.1039/C4FO00884G>
- Hamzaloğlu, A., & Gökmen, V. (2020). 5-Hydroxymethylfurfural accumulation plays a critical role on acrylamide formation in coffee during roasting as confirmed by multiresponse kinetic modelling. *Food Chemistry*, 318, Article 126467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126467>
- Hidalgo, F. J., Delgado, R. M., & Zamora, R. (2010). Role of mercaptans on acrylamide elimination. *Food Chemistry*, 122(3), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.016>
- Hodgkinson, S. M., Montoya, C. A., Scholten, P. T., Rutherford, S. M., & Moughan, P. J. (2018). Cooking conditions affect the true ileal digestible amino acid content and digestible indispensable amino acid score (DIAAS) of bovine meat as determined in pigs. *Journal of Nutrition*, 148(10), 1564–1569. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy153>
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1994). Some industrial chemicals. In: *IARC Monographs on the evaluation for carcinogenic risk of chemicals to humans*. Chapter 60 (pp. 389–433).
- Kocadağlı, T., & Gökmen, V. (2016). Metabolism of Acrylamide in Humans and

- Biomarkers of Exposure to Acrylamide in Elsevier Inc (Eds), *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. Chapter. 6 (pp. 109–128).
- Landi, N., Ragucci, S., & Di Maro, A. (2021). Amino acid composition of milk from cow, sheep and goat raised in Ailano and Valle Agricola, two localities of 'Alto Casertano' (Campania Region). *Foods*, 10, Article 2431. <https://doi.org/10.3390/foods10102431>
- Li, H. T., Li, Z., Foxc, G. P., Gidleya, M. J., & Dhital, S. (2021). Protein-starch matrix plays a key role in enzymic digestion of high-amylose wheat noodle. *Food Chemistry*, 336, Article 127719. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127719>
- Marti, A., & Pagani, M. A. (2013). What can play the role of gluten in gluten free pasta? *Trends Food Science & Technology*, 31(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.001>
- Mesías, M., & Morales, F. J. (2015). Acrylamide in commercial potato crisps from Spanish market: Trends from 2004 to 2014 and assessment of the dietary exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.031>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, ... C., Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function*, 2014(5), 1113. doi: 10.1039/C3FO60702J.
- Pastoriza, S., Rufián Henares, J. A., & Morales, F. J. (2012). Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.004>
- Rannou, C., Laroque, D., Renault, E., Prost, C., & Sérot, T. (2016). Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods. *Food Research International*, 90, 154–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.037>
- Rivas-Jimenez, L., Ramírez-Ortiz, K., González-Córdova, A., Vallejo-Cordoba, B., Garcia, H., & Hernandez-Mendoza, A. (2016). Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system. *Microbiological Research*, 190, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.016>
- Ruiz López, M. D., & Artacho Martín-Lagos, R. (2010). Guía para estudios dietéticos. Álbum fotográfico de alimentos. Editorial Universidad de Granada (Eds).
- 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, 7012–7018. <https://doi.org/10.1021/jf034649+>
- Sansano, M., Heredia, A., Peinado, I., & Andrés, A. (2017). Dietary acrylamide: What happens during digestion. *Food Chemistry*, 237, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.104>
- Schabacker, J., Schwend, T., & Wink, M. (2004). Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a Caco-2 gut model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (12), 4021–4025. <https://doi.org/10.1021/jf035238w>
- Shen, Y., Zhao, S., Zhao, X., Sun, H., Shao, M., & Xu, H. (2019). *In vitro* adsorption mechanism of acrylamide by lactic acid bacteria. *LWT – Food Science and Technology*, 100, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.058>
- Sorgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A., &

- Landersdorfer, C. (2002). Acrylamide: Increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy*, 48, 267–274. <https://doi.org/10.1159/000069715>
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., ... Riediker, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419, 449–450. <https://doi.org/10.1038/419449a>
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4998–5006. <https://doi.org/10.1021/jf020302f>
- Teixeira, J. L. P., Lima Pallone, J. A., Delgado Andrade, C., Mesías, M., & Seiquer, I. (2022). Bioavailability evaluation of calcium, magnesium and zinc in Brazilian cheese through a combined model of *in vitro* digestion and Caco-2 cells. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, Article 104365. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104365>
- Tovar López, J., Tovar Andrada, J., & García González, C. (2010). Caracterización de la carne de la IGP ternera de Extremadura in Indugrafic S.L. (Eds), *La agricultura y la ganadería extremeñas en 2009* (p. 137).
- Vázquez-Sánchez, K., Martínez-Saez, N., Rebollo-Hernanz, M., del Castillo, M. D., Gaytán-Martínez, M., & Campos-Vega, R. (2018). *In vitro* health promoting properties of antioxidant dietary fiber extracted from spent coffee (Coffee arabica L.) grounds. *Food Chemistry*, 261, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.064>
- Xiong, Z., Li, B., Li, L., Wan, L., Peng, X., & Yin, Y. (2017). Effect of selected mercapto flavor compounds on acrylamide elimination in a model system. *Molecules*, 22, Article 888. <https://doi.org/10.3390/molecules22060888>
- Zamora, R., Delgado, R. M., & Hidalgo, F. J. (2010). Model reactions of acrylamide with selected amino compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1708–1713. <https://doi.org/10.1021/jf903378x>
- Zhang, D., Liu, W., Li, L., Zhao, H. Y., Sun, H. Y., Meng, M. H., ... Shao, M. L. (2017). Key role of peptidoglycan on acrylamide binding by lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 26, 271–277. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0036-z>
- Zou, Y., Huang, C., Pei, K., Cai, Y., Zhang, G., Hu, C., & Ou, S. (2015). Cysteine alone or in combination with glycine simultaneously reduced the contents of acrylamide and hydroxymethylfurfural. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.104>

- Estudio 7: Evaluación de la bioaccesibilidad total de la acrilamida en snacks fritos tras digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*. **Artículo 5.**

El consumo de snacks entre horas ha aumentado en las últimas décadas, especialmente entre los jóvenes, destacando las patatas fritas y otros aperitivos salados. Para mejorar el perfil nutricional de este tipo de productos, buscar alternativas libres de gluten o simplemente ofrecer snacks innovadores con nuevos ingredientes, la industria alimentaria ha desarrollado nuevos aperitivos más saludables basados en vegetales, cereales, raíces o legumbres. Entre ellos se encuentran los chips de vegetales, como la remolacha, la zanahoria o el boniato. Al igual que las patatas, estos alimentos contienen azúcares y aminoácidos y se someten a procesos de fritura u horneado, dando lugar a la formación de acrilamida. La información acerca del potencial toxicológico de estos nuevos snacks es prácticamente inexistente, por lo que la Comisión Europea incluyó los chips de vegetales en la Recomendación de 2019, donde se mencionan alimentos en los que debe monitorizarse el contenido de acrilamida. Estudios sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida han puesto de manifiesto la influencia de la matriz alimentaria y la importancia de incluir la fracción insoluble tras digestión gastrointestinal del alimento en los estudios de digestión *in vitro*. Esta fracción no digerida podría ser metabolizada por la microbiota intestinal al llegar al colon. Por tanto, tras el proceso digestivo sería recomendable incluir una etapa de fermentación *in vitro* que evalúe si la acrilamida contenida en el residuo no bioaccesible tras digestión es liberada a nivel colónico, obteniendo de esta manera una información más completa sobre el destino del contaminante durante el tránsito gastrointestinal global.

En este sentido, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la bioaccesibilidad de la acrilamida en cuatro tipos de snacks vegetales comerciales (chips de patata, boniato, remolacha y zanahoria). Para ello se utilizó el protocolo estandarizado de digestión gastrointestinal *in vitro* INFOGEST y se incluyó una etapa adicional de fermentación *in vitro* sobre los residuos no bioaccesibles empleando inóculos de muestras fecales obtenidos de diferentes grupos de población (niños, adolescentes y adultos). Los niveles de acrilamida se evaluaron en los alimentos sin

digerir y en las fracciones solubles e insolubles obtenidas después de la digestión *in vitro* y tras finalizar el proceso de fermentación. De esta forma, se analizó la posible acción de la microbiota del colon en la liberación de acrilamida no bioaccesible tras digestión y, por tanto, en la acrilamida final potencialmente absorbida a lo largo de todo el tránsito gastrointestinal.

Los resultados mostraron que los niveles de acrilamida en las muestras iniciales oscilaron entre 524 µg/kg (chips de patata) y 2342 µg/kg (chips de boniato). Los chips de patata presentaron concentraciones inferiores al nivel de referencia establecido por el Reglamento de la Comisión Europea 2017/2158, siendo superado por el resto de los chips analizados. Tras la digestión *in vitro*, el comportamiento de la acrilamida en las cuatro muestras fue muy similar, con mayor porcentaje del compuesto en la fracción bioaccesible en comparación con la fracción no bioaccesible. Aunque cuantitativamente no fue demasiado importante, el alto porcentaje de acrilamida en la fracción soluble obtenida tras la fermentación *in vitro* sugiere que una parte de la acrilamida presente en la fracción no bioaccesible podría ser liberada gracias a la acción de la microbiota en el colon. Los valores más altos se observaron en los chips de boniato fermentados con muestras fecales de población infantil. En el caso de los chips de remolacha, los valores de acrilamida en la porción soluble tras fermentación fueron similares en las muestras de los tres grupos poblacionales. Por el contrario, en los chips de zanahoria, la acrilamida se liberó en mayor proporción cuando la fermentación se llevó a cabo con las muestras fecales de población adulta. A la vista de los datos obtenidos, se podría afirmar que tanto la microbiota de cada grupo poblacional como la composición de la matriz alimentaria pueden influir en los niveles de acrilamida potencialmente absorbibles al final del proceso gastrointestinal completo (digestión + fermentación). Además, estos resultados confirman la importancia de considerar no sólo la presencia de acrilamida en los alimentos, sino también la disponibilidad del compuesto durante la digestión y la posterior fermentación colónica, para evaluar de forma más precisa el riesgo asociado a la exposición a este contaminante a través de la dieta.

Este trabajo ha sido publicado en la revista *Food Research International* como artículo de investigación:

González-Mulero, L.; Mesías, M.; Morales, F.J.; Navajas-Porras, B; Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C. **Acrylamide bioaccessibility in potato and veggie chips. Impact of *in vitro* colonic fermentation on the non-bioaccessible fraction.** *Food Research International* 2023, 164, 112409. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112409>

La doctoranda y primera firmante del presente artículo ha participado en el diseño experimental, la elaboración de los alimentos, codificación, manipulación y determinación del contenido de acrilamida. Además, ha contribuido al análisis de datos, discusión de los resultados obtenidos y redacción del artículo científico.



Acrylamide bioaccessibility in potato and veggie chips. Impact of *in vitro* colonic fermentation on the non-bioaccessible fraction

Lucía González-Mulero, Marta Mesías, Francisco J. Morales, Beatriz Navajas-Porras, José Ángel Rufián Henares, Cristina Delgado-Andrade*

ABSTRACT

Potato-based products contribute largely to the daily intake of acrylamide. In addition to potato crisps, the European Commission has included veggie crisps in the list of foods that should be monitored for their acrylamide content. In the present study, acrylamide content in potato and veggie chips (sweet potato, beetroot and carrot) and their bioaccessibility after *in vitro* digestion was assessed. The non-bioaccessible fraction was also submitted to *in vitro* fermentation under colonic conditions. Faecal samples from volunteers of three age groups (children, adolescents and adults) were used to evaluate the microbiota effect on the acrylamide availability. Sweet potato chips exhibited the highest acrylamide content (2342 µg/kg), followed by carrot (1279 µg/kg), beetroot (947 µg/kg) and potato chips (524 µg/kg). After *in vitro* digestion, acrylamide bioaccessibility was significantly lower in veggie chips (59.7–60.4%) than in potato chips (71.7%). Potato and sweet potato chips showed the significantly lowest acrylamide content in the non-bioaccessible fraction (22.8 and 24.1%, respectively) as compared with beetroot chips (28.4%). After the fermentation step, acrylamide percentage in the soluble fraction of veggie chips ranged from 43.03 to 71.89%, the highest values being observed in sweet potato chips fermented with microbiota from children. This fact would involve that the acrylamide was released from the non-bioaccessible fractions by the microbiota. These findings point out that the levels of potentially absorbable acrylamide after the complete gastrointestinal process could be modulated by both the food matrix composition and the microbiota. These factors should be further considered for a more precise risk assessment of dietary acrylamide in humans.

Keywords:

Acrylamide, *in vitro* digestion, colonic fermentation, bioaccessible fraction, non-bioaccessible fraction, snack products, potato chips, veggie chips

1. Introduction

Snacks are defined as a small amount of food consumed between meals, including chips and other salty snacks, sweets, candies, chewing gum, chocolate bars,

chocolates and nuts. Snack consumption has increased in recent decades (Younginer et al., 2016), with potato chips and other salty snacks standing out as the most consumed products within this category (MAPA, 2021). Despite potato chips have a dominance position on the market, they are often perceived as unhealthy foods (Nguyen et al., 2022). Nowadays, consumer's preferences move towards healthier options for snacking boosting food companies to search for healthier and added-value alternatives, often based on novel vegetables, cereals, roots or legumes (Niva, 2007; Breitling-Utzmann and Hankele, 2019; Mesías et al. 2019). However, knowledge about the potential toxicological effect of the chemical contaminants formed during the thermal treatment applied to novel snacks is still scarce (Nguyen et al., 2022). Acrylamide is a chemical process contaminant generated through the Maillard reaction between reducing sugars and free asparagine in foods treated at temperatures above 120 °C and in low moisture conditions (Mottram & Wedzicha, 2002). Potato chips together with other processed potatoes, coffee and cereal-based products are the main food sources of exposure to acrylamide (EFSA, 2015). The European Commission Regulation (EC) 2017/2158 established control measures and reference levels for acrylamide content in these foodstuffs (EC, 2017) and later, the European monitoring programme of acrylamide was extended to other food products, including vegetable chips (EC, 2019).

The high-water solubility of acrylamide promotes its rapid absorption after consumption and consequently its distribution by the systemic circulation to all human tissues (Fuhr et al., 2006; Koszucka et al, 2020). However, not all ingested acrylamide is necessarily bioavailable, since several factors involved in the digestive process such as mastication, variations of the pH and action of numerous digestive enzymes in mouth, stomach and intestine could affect the bioavailability through structural and chemical changes (Hamzaloğlu & Gökmen, 2015; Sansano et al., 2017). Additionally, another key factor affecting acrylamide accessibility is the food matrix effect, as has been recently demonstrated by our research group (González-Mulero et al., 2022).

In vitro approaches have facilitated nutrient bioaccessibility studies due to its high reproducibility and low cost. Minekus et al. (2014) reported an international standardised *in vitro* digestion protocol with three static phases considering physiological enzyme activities and salt concentrations based on human *in vivo* data. Depending on the target compounds, additional steps to this protocol should be added. In this sense, Pérez-Burillo et al. (2018) showed that considering only the

soluble fraction obtained after *in vitro* digestion could underestimate the antioxidant capacity of foodstuffs, since the undigested fraction may be metabolised by the gut microbiota releasing compounds with additional bioactivity. Therefore, a fermentation step of the undigested fraction could be necessary to get more precise information on the fate of bioactive compounds during the gastrointestinal transit.

Previous studies have evaluated the acrylamide bioaccessibility from the soluble portion after *in vitro* digestion of certain processed foods such as coffee, cereal and potato-based foods (Hamzalıoğlu & Gökmen, 2015; Sansano et al., 2017; Badoud et al., 2020). However, there is no information concerning the effect of colonic fermentation on the acrylamide trapped in the non-soluble portion after digestion. In this sense, the objective of this research was to evaluate the acrylamide bioaccessibility in four different snack samples, including potato and veggie chips, applying the standardised *in vitro* digestion protocol INFOGEST, but also including an *in vitro* fermentation procedure of the undigested fractions using faecal samples from different population groups. Acrylamide was monitored in both soluble and non-soluble fractions after *in vitro* digestion and at the end of the fermentation process to analyse the possible influence of the different colonic microbiota in the final acrylamide potentially absorbable.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals, solvents and reagents used for *in vitro* digestion and fermentation, and acrylamide determination were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise mentioned. All solutions were prepared using deionised water from a Milli-Q Integral 5 water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA).

Specific enzymes used for *in vitro* digestion analyses were α -amylase from human saliva (A1031), pepsin from porcine gastric mucosa (P6887), pancreatin from porcine pancreas (P7545) and bile salts (B8756). The reagents used for *in vitro* fermentation analysis were sodium phosphate monobasic dihydrate (cat. no. 567550), peptone (cat. no. T7293), L-cysteine (cat. no. 168149), resazurin sodium salt (cat. no. 199303) and sodium sulphide hydrate (cat. no. 14738). For acrylamide determination, acrylamide standard (99%), potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (98%, Carrez-I), zinc acetate dihydrate (>99%, Carrez-II) were used. Acrylamide labelled by $^{13}\text{C}_3$ (99%) was acquired from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

Formic acid (98%), methanol (99.5%) and hexane were acquired from Panreac (Barcelona, Spain). Cellulose syringe filter units (0.22 and 0.45 μm) were obtained from Análisis Vínicos (Tomelloso, Ciudad Real, Spain) and Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Food samples

Four different fried snacks (potato, sweet potato, beetroot and carrot chips) were selected and purchased in a local supermarket of Granada (Spain). Samples were coded, photographed, weighed and, as the entire portion was edible, directly homogenised with a hand blender (Taurus, Vital CM, Spain). Finally, each ground sample was aliquoted and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Fig. 1 depicts external appearance of samples. The nutritional composition of the snacks was obtained from the manufacturer declarations recorded in the package labelling (Table 1).

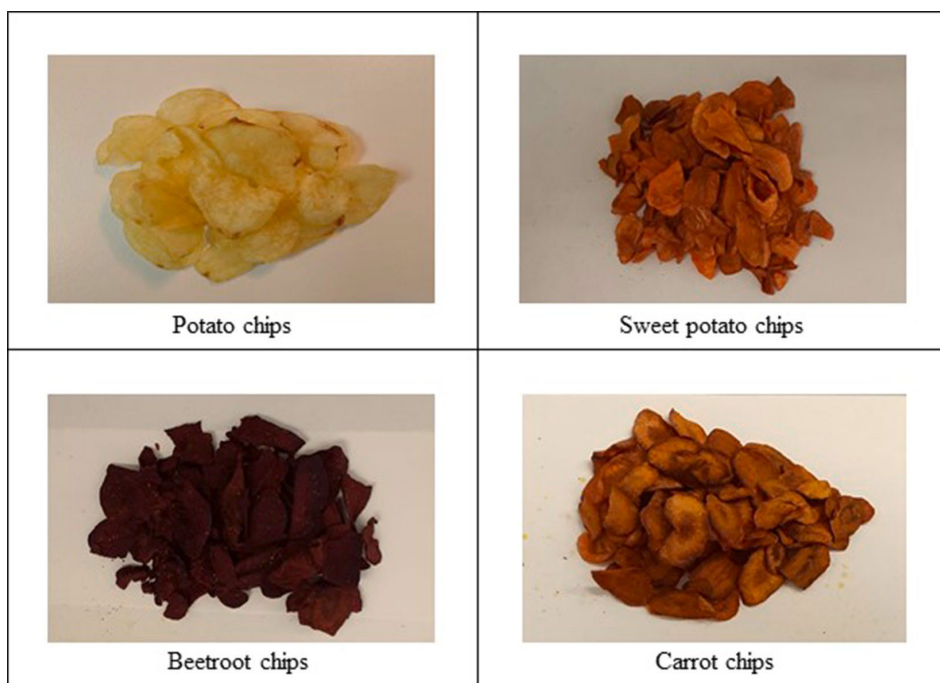


Fig. 1. Snack samples (potato, sweet potato, beetroot and carrot chips) evaluated in the present study.

Table 1

Nutritional composition of snacks according to the information provided by the manufacturer. Data are expressed as g/100 g of sample.

Snack	Total fat	Total Carbohydrate	Sugars	Dietary Fibre	Protein
Potato chips	32.9	50.4	1.1	4.3	6.3
Sweet potato chips	32.8	55.4	11.3	9.3	3.0
Beetroot chips	27.8	57.4	37.5	12.6	4.2
Carrot chips	29.2	48.4	38.5	13.6	3.6

2.3. *In vitro* digestion of the snacks

The *in vitro* digestion method used for the fresh ground snacks was adapted from the INFOGEST protocol, composed by an oral phase, a gastric phase and an intestinal phase (Fig. 2). Simulated salivary (SSF), gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluids were prepared according to Minekus et al. (2014). Fresh sample (4 g) was weighted in polypropylene tubes and Milli-Q water was added to complete a final weigh of 5 g. The enzyme concentrations were maintained as established by the standardised INFOGEST protocol. For the oral phase, 4.5 mL of SSF (without α -amylase) including 25 μ L of 0.3 M CaCl_2 was added to all the samples to make a paste-like consistency. Next, samples were sonicated (Vibracell VCX 130; Sonics & Materials Inc, Danbury, USA) to facilitate the accessibility of lipids during the next steps of the digestion protocol (Teixeira et al., 2022), thus avoiding the addition of the lipase enzyme in the intestinal phase. Next, 0.5 mL of α -amylase enzyme solution was added to the samples (concentration adjusted as established by the standardised protocol to reach 75 U α -amylase/ml SSF) and the mix was incubated at 37 °C for 2 min with mild and continuous agitation (model Julabo ED, Julabo GmgH, Germany). After that, 10 mL of the SGF solution with pepsin and 5 μ L of 0.3 M CaCl_2 were added and the pH was lowered to 3.0 by adding 1 M HCl (final mix pepsin concentration was adjusted to 2000 U/mL). The mixture was again incubated at 37 °C for 2 h with mild and constant agitation. Finally, 20 mL of the SIF solution containing pancreatin, bile salts and 40 μ L of 0.3 M CaCl_2 were added to the samples, followed by the pH raising to 7.0 using 1 M NaOH (final mix pancreatin concentration was adjusted to 13.37 mg/mL, while bile salts were adjusted to 10 mM). Samples were one last time incubated

at 37 °C for 2 h with mild and continuous agitation and then, to halt the enzymatic reactions, were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at least overnight at -20 °C. All samples were defrosted and centrifuged at 3220g and 4 °C for 45 min to carefully separate the soluble and the residual fractions (undigested or non-soluble pellet). Part of these separated soluble and non-soluble fractions of each sample were lyophilised and stored at 4 °C until acrylamide analysis, and the rest were stored at -20 °C until the following *in vitro* fermentation. The procedure was repeated by triplicate.

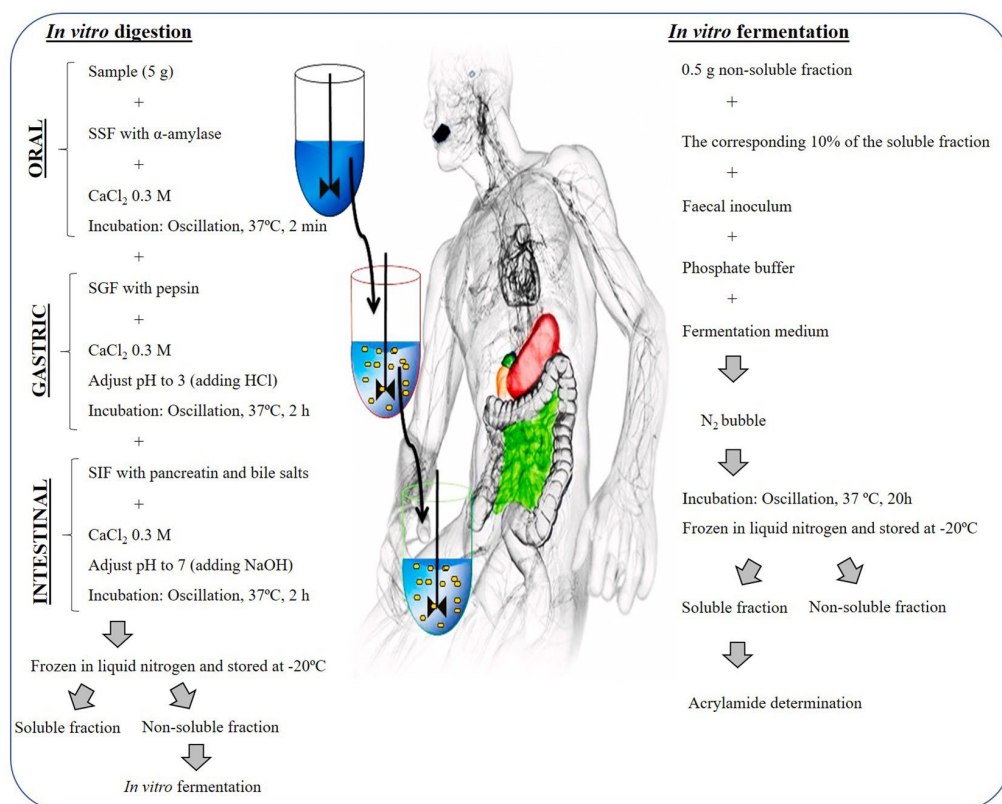


Fig. 2. Schematic description of the methodology used for the *in vitro* digestion and fermentation processes (adapted from Egger et al. (2016) and Pérez-Burillo et al. (2021)).

Blanks of the *in vitro* digestion were prepared with 5 mL of Milli-Q water and the complete protocol was developed. They were shown to be free of acrylamide.

2.4. *In vitro* colonic fermentation

The *in vitro* fermentation method used was established by Pérez-Burillo et al. (2021). Faecal samples were obtained from four donors of three different age groups: children (6 ± 1 yr.-old), adolescents (13 ± 2 yr.-old) and adults (38 ± 12 yr.-old). All donors were healthy, with average body mass indexes (range 18.5–24.5 kg/m²) and followed a normal diet, not taking antibiotics in the previous year. Faecal samples were obtained from the donors in the morning of the analysis day. Faeces of volunteers of the same age group were homogenised to minimize interindividual variations, and pools were placed in sterile containers and stored at 4 °C until the preparation of the inoculum.

The fermentation culture medium (peptone solution pH 7.0) was mixed with resazurin (1 mg/ml), followed by an autoclave sterilization step. A reductive solution made of cysteine and sodium sulphide (since cysteine is sensitive to temperature and cannot be autoclaved) and the faecal inoculum, consisting of a solution of 32% faeces in phosphate buffer 100 mM, pH 7.0 was prepared.

Firstly, 0.5 g of the non-soluble fraction of each digested snack was weighted in a polypropylene tube. Considering that 10% of the soluble fraction obtained after the digestive process passes to colonic fermentation along with the complete non-soluble fraction (Pérez-Burillo et al., 2021), the proportion of soluble fraction corresponding to the 0.5 g of non-soluble fraction was estimated for each digested snack and added to the tube (Fig. 2). An aliquot of 7.5 mL of fermentation culture medium and 2 mL of faecal inoculum were added to the sample tube to reach a final volume of 10 mL (considering also the supernatant volume added). Next, an anaerobic atmosphere was created by bubbling N₂ for 1 min to the samples, which were then incubated at 37 °C for 20 h under mild oscillation. To stop the microbial activity, samples were immersed in ice immediately after the 20 h incubation and centrifuged at 4000g for 10 min. The resulted supernatant (soluble fraction that might be potentially absorbed after a fermentation process in the colon) was collected and stored at -80 °C. The solid residue, representing the non-absorbed fraction after fermentation, was also stored.

Blanks from the *in vitro* digestion were prepared as the food samples. Blank aliquots from the initial *in vitro* fermentation procedure were also prepared to assess the possible input of acrylamide from the faecal inoculum of each donor group tested. Samples (supernatant and solid residue after fermentation, digestion blank and fermentation blank) were lyophilised and stored at 4 °C until acrylamide

determination. All blanks were shown to be free of acrylamide.

The study protocol was conducted in accordance with the ethical recommendations of the Declaration of Helsinki. Ethical approval to work with human faeces was obtained from the Ethic Committee of Human Research belonging to the University of Granada (Spain), registration num. 1080. An information sheet for faecal sample volunteer together with a collection consent were distributed and signed by participants or by parents/guardians in the case of children.

2.5. Acrylamide determination by LC-ESI-MS/MS

Acrylamide formed in the snacks during the industrial frying process was determined following the protocol established by [González-Mulero et al. \(2022\)](#). For the snack samples, 0.5 g were weighted in polypropylene centrifugal tubes and 9.4 mL of Milli-Q water were added. Two mL of hexane were also incorporated to remove the fat content. Samples were spiked with 100 μ L of the acrylamide internal standard solution ($^{13}\text{C}_3$ -acrylamide) and homogenised for 15 min (Ultra Turrax, IKA, Mod-T10 basic, Bohn, Germany). Then, 250 μ L of both Carrez I (15 g of potassium ferrocyanide/100 mL of water) and Carrez II solutions (30 g of zinc acetate/100 mL of water) were added to the tubes and centrifuged at 4 °C, 9000g for 10 min. Hexane was removed.

For the soluble and non-soluble fractions from the *in vitro* digestion, 0.25 g of the lyophilised samples were weighted and mixed with 4.7 mL of Milli-Q water and 50 μ L of the acrylamide internal standard solution.

After homogenizing for 10 min, 125 μ L of both Carrez I and Carrez II solutions were added, and the tubes were centrifuged at 4 °C, 9000g for 10 min. For the soluble and non-soluble fractions from the *in vitro* fermentation, the entire lyophilised samples were used (~0.1 g) and 2.35 mL of Milli-Q water were added. Tubes were spiked with 25 μ L of the acrylamide internal standard solution, homogenised for 10 min and 62.5 μ L of both Carrez I and Carrez II solutions were added. Then, samples were centrifuged at 4 °C, 9000g for 10 min.

All the supernatants were filtered through a 0.22 μ m cellulose filter and cleaned loading 1 mL into an Oasis-HLB cartridge, previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of distilled water, at a flow rate of 2 mL/min. First drops were discharged, and the rest collected into an amberlite LC-MS vial.

Acrylamide was determined by an Agilent 1200 liquid chromatograph coupled to an Agilent Triple Quadrupole MS detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA,

USA) using an Inertsil ODS-3 column (250 × 4.6 mm, 5 µm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) at 30 °C. Mobile phase was formic acid in water (0.2 mL/100 mL) at a flow rate of 0.4 mL/min with an isocratic elution. The injection volume was 5 µL, and the needle was set at 1.0 kV. The positive ionisation mode with electrospray ionisation was used. Under these chromatographic conditions, the acrylamide molecule eluted at 6.1 min. Nitrogen was used as the nebulizer gas (12.0 L/min), and the source temperature was set at 350 °C.

The signal at m/z 72.1– m/z 55.1 and m/z 72.1– m/z 27.1 were isolated for acrylamide and m/z 75.1– m/z 58.1 for ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide. The fragmentation was set at 76 V and the collision energy at 8 V for the transition m/z 72.1 > m/z 55.1, 9 V for m/z 75.1 > m/z 58.1 and 11.0 V for m/z 72.1 > m/z 27.1. Multiple reactions monitoring (MRM) was used to record the masses. The recovery rate of acrylamide spiked to the samples ranged between 100 and 106%. The relative standard deviations (RSDs) of the analysis were < 10% for all the determinations. Precision and repeatability of the analytical method were evaluated by analysing different samples on the same day by similar operators (repeatability) and on different days by different operators (precision). The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated by injecting lower concentrations of standards. A concentration determined as a signal-to-noise ratio of 3 was assigned to LOD (4.5 µg/kg), and that determined as a signal-to-noise ratio of 10 was assigned to LOQ (15 µg/kg).

To avoid quantifying possible interferences commonly found in complex matrices that could lead to an overestimation of acrylamide levels (Desmarchelier et al., 2022), a previous set up of the analytical method for acrylamide determination was carried out, as it is described in González-Mulero et al., 2022. This aspect is especially important in samples coming from *in vitro* gastrointestinal digestion and fermentation due to the enzyme and microorganism actions.

2.6. Acrylamide exposure assessment

Dietary exposure to acrylamide from the four snacks analysed was estimated combining the acrylamide content for each sample with the data of total per capita consumption for these kind of products by the Spanish population according to the 2020 report of the Ministry of Agriculture, Food and Environment (MAPA, 2021). Considering the age of the volunteers and the weight data reported in different studies of the literature (Fernández et al., 2011; AESAN, 2020; Eglitis, 2020; NCD RisC, 2020), average body weights (bw) of 23, 48 and 70 kg were used to estimate the

daily acrylamide exposure for children, adolescents and adults, respectively. Results were expressed as $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ (Equation (1)).

Eq. 1.

$$\text{Daily exposure } (\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}) = \frac{\text{Daily food consumption (g/day)} \times \text{Acrylamide concentration in food } (\mu\text{g}/\text{kg})}{\text{Body weight (kg)}}$$

The acrylamide exposure through the consumption of a normal portion size of these snacks was also estimated, considering an individual bag of chips of 50 g.

2.7. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XVII. A one-way ANOVA test followed by Tukey HSD test were used to identify the overall significance of differences between the initial acrylamide content, after the *in vitro* digestion and after the *in vitro* fermentation of the four snacks. Homogeneity of variances was determined using Levene's test. All statistical parameters were evaluated assuming a level of significance of $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Acrylamide content in the snack samples

The acrylamide content in the snack samples is shown in Table 2. Potato chips exhibited the lowest concentration (524 $\mu\text{g}/\text{kg}$) with a value below the benchmark level of 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ established in the European Regulation (EC, 2017). It is in accordance with the acrylamide levels described for the industrial potato chip sector in the latest years (Mesías et al., 2020; Powers et al., 2021). In contrast, significantly higher levels were observed in the veggie chips, being 947 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1279 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 2342 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for beetroot, carrot and sweet potato chips, respectively. Results are in line, even below in some cases, with levels reported in the literature for carrot (2893 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / 700–3090 $\mu\text{g}/\text{kg}$), beetroot (1267 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / 77–1560 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and sweet potato chips (1110 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / 100–2780 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Nguyen et al., 2022; Oellig et al., 2022). The high acrylamide content in veggie chips corroborates the need of monitoring the presence of acrylamide in these foods (EC, 2019). The higher acrylamide content in veggie chips could be partly explained by the presence of acrylamide precursors in the raw product. Asparagine content has been reported to range between 3.8 and 5.1 mmol/kg in carrot, 6.9–21.7 mmol/kg in beetroot, and 28.7–105.2 mmol/kg in sweet

potato (Elmore et al., 2019) and reducing sugar concentrations from 640 to 1000 mmol/kg for carrot, from 920 to 1080 mmol/kg for beetroot and from 610 to 2730 mmol/kg for sweet potato (Bavec et al., 2010; Baranski et al., 2012; Laurie et al., 2013; Elmore et al., 2015). The highest figures of asparagine and reducing sugars reported for sweet potato explain the greatest acrylamide level found in this veggie chip. In addition, the variability in the composition of the raw material, which is influenced by crop cultivars, soil composition, climatic conditions, harvest season and agronomic practices (FDE, 2019), together with the heat treatments applied, could justify the differences in the acrylamide levels for the different snacks.

Table 2

Acrylamide content in the analysed snacks and distribution in bioaccessible and non-bioaccessible fractions after the *in vitro* enzymatic digestion process. Results are represented as mean \pm standard deviation. Different letters in the same column involve significant differences ($p < 0.05$).

Snacks samples	Acrylamide content in snacks ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Acrylamide in the portion for digestion (μg)	Acrylamide distribution (%)		
			Bioaccessible fraction	Non-bioaccessible fraction	Recovery rate
Potato chips	524 \pm 32a	6.3 \pm 0.4a	71.7 \pm 1.6b	22.8 \pm 0.8a	94.5 \pm 0.8b
Sweet potato chips	2342 \pm 148d	28.1 \pm 1.8d	60.1 \pm 0.6a	24.1 \pm 0.2a	84.2 \pm 0.8a
Beetroot chips	947 \pm 12b	11.4 \pm 0.1b	59.7 \pm 0.1a	28.4 \pm 0.7b	88.0 \pm 0.7ab
Carrot chips	1279 \pm 59c	15.3 \pm 0.7c	60.4 \pm 2.0a	26.8 \pm 1.7ab	87.1 \pm 3.6ab

Considering the acrylamide content in the different snacks and the consumption of this type of products by the Spanish population (MAPA, 2021), the daily dietary acrylamide exposure was estimated in different age groups. Due to the lack of specific consumption data, the category of “potato crisps and other salty snacks” was taken as a reference for all the products (1.09 kg/person/year). Despite being an overestimation, the objective of this calculation was to compare the acrylamide exposure from each snack, assuming that all the consumption corresponded to a specific vegetable product. Due to the lower body weight of children, acrylamide

exposure from snacks would be higher in this age group, ranging between 0.068 and 0.304 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day, followed by adolescents (0.033–0.146 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) and adults (0.022–0.100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day). The high acrylamide levels found in the snacks involve that a high consumption of these products, especially in children and adolescents, should be considered in the estimation of the risk associated with the exposure to acrylamide. However, a more realistic approach should not only contemplate the exposure to acrylamide through food consumption, but also its bioaccessibility, estimating then the real risk associated with the potentially toxic effects of this contaminant on humans (Belhadj Benziane et al., 2019).

3.2. Acrylamide after the *in vitro* enzymatic digestion process

The behaviour of the acrylamide in the different snacks during the digestion process was evaluated by using the internationally standardised *in vitro* digestion protocol INFOGEST. This protocol involves a three-phase static assay and is based on human *in vivo* data, considering physiological enzyme activities and salt concentrations. After the digestion process, acrylamide levels were determined not only in bioaccessible fractions (acrylamide available to be absorbed after the gastrointestinal digestion) but also in non-bioaccessible (non-soluble) fractions. This fact is a novelty of the present research since previous studies have estimated the acrylamide bioaccessibility evaluating only the soluble fraction but disregarding the non-bioaccessible one (Hamzalıoğlu & Gökmen, 2015; Sansano et al. 2017; Badoud et al., 2020). Considering the acrylamide content in both soluble and non-soluble portions, it was possible to estimate the total recovery compared to the initial acrylamide levels and the magnitude of the increment or reduction during the digestive process.

Taking into account the acrylamide level in the snacks, acrylamide content in the portions subjected to the digestive process was calculated (Table 2, Fig. 3). After the digestion, both bioaccessible and non-bioaccessible fractions were analysed. Very similar behaviour was observed in all the samples, acrylamide being distributed mainly in the bioaccessible fraction and in a lower extent in the non-bioaccessible fraction (Fig. 3). Expressed in percentages, acrylamide in the bioaccessible fraction was practically the same in all veggie chips (range: 59.7–60.4%) but significantly higher in potato chips (71.7%). Non-bioaccessible fractions were very close (range: 22.8–28.4%) and in this case, the highest percentage was observed in beetroot chips (28.4%), with significant differences compared to potato and sweet potato chips. The recovery rate

ranged between 84.2 and 94.5%, potato chips showing again the highest values (Table 2).

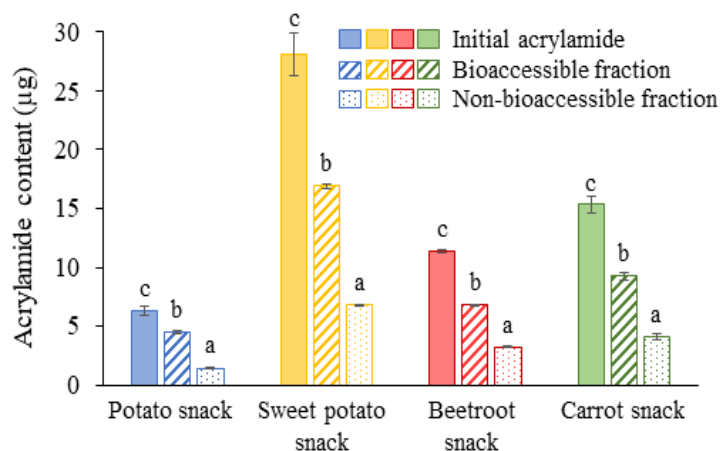


Fig. 3. Acrylamide content before and after the *in vitro* enzymatic digestion of the four vegetable snacks including bioaccessible and non-bioaccessible fractions. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$) in each snack.

As previously reported, acrylamide content in the bioaccessible fraction after the *in vitro* digestion has shown to be highly influenced by the food matrix (Hamzalıoğlu & Gökmen, 2015; Sansano et al., 2017; Badoud et al., 2020; González-Mulero et al., 2022). Components such as starch, proteins and amino acids as well as fibre are important constraints in acrylamide bioaccessibility. The gastrointestinal digestion compromises the food integrity as vegetable cells are broken down, releasing starch, proteins and lipids that could be hydrolysed into smaller molecules and interact with the acrylamide (Pérez-Burillo et al., 2021). High levels of sugars and lipids have been reported to prevent starch gelatinisation, which is the fraction susceptible to enzyme hydrolysis (Agama-Acevedo et al., 2012), leading then to a lower digestibility of the matrix and probably involving a reduced acrylamide bioaccessibility. In contrast, an increase of the starch hydrolysis is associated with the lack of protein matrix, which produces a more porous structure with a more accessibility to the enzymes for the digestion process (Marti & Pagani, 2013).

In the present study, fried snacks exhibited similar fat content (27.8–32.9 g/100 g), whereas the sugar content showed the highest variability of up to 30-fold (Table 1). In this case, potato and sweet potatoes presented the lowest levels and beetroot and carrot chips the highest, which could explain the higher acrylamide percentage in non-soluble fraction for these last samples. Although differences in the protein content

were also minor (3.0–6.3 g/100 g) as compared to sugars (Table 1), variations in the amino acid composition for these food matrices cannot be discarded. According to USDA, (2019a, b, c, d), lysine, histidine, methionine and cysteine contents for potatoes, sweet potatoes, beetroots and carrots, respectively, are as follows: lysine (0.114, 0.066, 0.058, 0.101 g/100 g), histidine (0.041, 0.031, 0.021, 0.040 g/100 g), methionine (0.030, 0.029, 0.018, 0.020 g/100 g) and cysteine (0.024, 0.022, 0.019, 0.083 g/100 g). It is known that amino groups of certain free amino acids such as lysine and histidine, *N*-terminal amino acid residues of proteins, and -SH groups of cysteine or methionine could lead to the formation of nucleophilic molecules after the protein digestion (Friedman, 2003; Hidalgo et al., 2010; Zamora et al., 2010). Acrylamide is an electrophilic compound with an α , β -unsaturated structure and an amide group (Kocadağlı & Gökmen, 2016), making it prone to react with those released nucleophile compounds at the pH conditions of the intestinal digestion through the Michael reaction (Hidalgo et al., 2010). Due to this fact, a possible interaction between acrylamide and nucleophilic compounds leading to the formation of acrylamide adducts may not be discarded, affecting in different proportion to different snacks and consequently to the acrylamide recovery.

Another aspect to consider is a possible effect of the fibre content in the food matrix. Fibre has been suggested to adsorb acrylamide in the gastrointestinal tract (Woo et al., 2007) and to reduce the bioaccessibility of the contaminant in the final stages of the digestion process (Vázquez-Sánchez et al., 2018). This fact could explain the higher non-bioaccessible fraction in beetroot and carrot chips, both with the highest fibre content (12.6 and 13.6 g/100 g, respectively), compared with the other snacks (4.3 g/100 g in potato, 9.3 g/100 g in sweet potato chips) (Table 1).

In summary, after the *in vitro* digestion, acrylamide bioaccessibility was close to 72% in the potato chips and around 60% in the other snacks, possibly being affected by the composition of the food matrix. Similar or even higher percentages have been reported by Hamzahoğlu & Gökmen (2015) in the acrylamide bioaccessible fraction of fried potatoes digested, ranging from 78.2 to 96.8% in the duodenal phase.

3.3. *In vitro* fermentation

After the digestion, a simulation of the fermentation step carried on by the gut microbiota was developed. Following the information reported by Pérez-Burillo et al. (2021), the complete undigested residue (insoluble non-bioaccessible portion) obtained after the *in vitro* digestion together with the 10% of the total

soluble fraction is used as fermentation substrate for the colonic microbiota. As only 0.5 g of the non-soluble fraction was subjected to the fermentation step in the experimental conditions, the proportional amount of the soluble fraction was calculated and added to the samples to be submitted to the fermentation process.

It is known that the human microbiota composition is associated with the host subject, which means that each individual seems to harbour a specific core (a subset of bacteria that is preserved throughout time). This core consists on specific phylotypes distributed within anaerobic and ecosystem-specific genera that include: *Allistipes*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Dorea* and *Ruminococcus* (Rajilic-Stojanovic et al., 2013). In addition to individual variations, the proportions of bacteria which constitute the human microbiome usually vary throughout life. Hopkins et al. (2002) observed that the faecal microbiota of children was bacteriologically less complex with a predomination of *Bifidobacterium* and *Enterobacteriaceae*, and while growing age, these bacteria decreased and *Bacteroides* species increased. Although from the two years old the microflora in infants is stabilised reaching the 'adult-like' colonic microbiota, the diet fluctuations, the physiological variations that occur in the body decreasing acid secretion by the gastric mucosa and enhancing the permeability of mucosal membranes in the gut (Hopkins et al., 2002), along with the use of antibiotics, during the childhood, adolescence and adulthood, could change this microflora. Taking these facts into account, the present study was designed to analyse possible differences between three populations, children, adolescents and adults, recruiting four volunteers per group to donate faecal material. Faeces from those four donors were pooled to embrace the maximum types of bacterial strains, reducing the interindividual variability and reinforcing the results. Acrylamide released after *in vitro* fermentation of non-bioaccessible fractions of the snack samples is shown in Table 3. Once the *in vitro* fermentation was finished, beside a soluble portion, an insoluble pellet was obtained. After analytical determination, acrylamide was not detected in that pellet, which might be due to several reasons: i) our analytical methodology for acrylamide determination did not detect such negligible amount (below our detection limit); ii) acrylamide was not present in this pellet due to its release in the accessible fraction after fermentation; iii) acrylamide present in non-accessible fraction after fermentation was combined with nucleophilic compounds of the food matrix via Michael addition (such as the amino acids from the peptides or also the fibre

components), then it was not detectable as free acrylamide. Therefore, only levels of the contaminant in the soluble portion (released at colonic level) is included in the Table 3. Released acrylamide after fermentation ranged between 43.03 and 71.89% for different veggie chips and populations. In the case of potato chips, acrylamide levels subjected to the fermentation step were very low and after this process, concentrations were below the limit of detection. Consequently, no information is included for this sample and results cannot be discussed in detail.

Table 3

Acrylamide levels in the soluble fraction after the *in vitro* fermentation of digested snack samples.

Snack	Acrylamide before <i>in vitro</i> fermentation (ng)	Acrylamide released after <i>in vitro</i> fermentation					
		Children		Adolescents		Adults	
		(ng)	(%)*	(ng)	(%)*	(ng)	(%)*
Potato	34 ± 4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Sweet potato	119 ± 6c	86 ± 4b	71.89 ± 3.40B	76 ± 3ab	63.42 ± 2.17A	70 ± 2a	58.82 ± 1.42A
Beetroot	53 ± 1b	34 ± 2a	65.22 ± 4.11B	31 ± 3a	59.52 ± 4.77A	32 ± 3a	60.91 ± 6.38A
Carrot	78 ± 1b	33 ± 1a	43.03 ± 0.43A	39 ± 6a	50.15 ± 7.27A	43 ± 3a	55.75 ± 3.75A

*Initial acrylamide before *in vitro* fermentation was taken as 100%. Results are mean ± standard deviation. Different lowercase letters mean significant differences ($p < 0.05$) between the acrylamide content before and after *in vitro* fermentation by using faeces from different population groups (children, adolescents and adults). Different capital letters mean significant differences ($p < 0.05$) in percentages of accessible acrylamide after *in vitro* fermentation between different vegetable chips in each population group.

As described in the case of the acrylamide bioaccessibility after *in vitro* digestion, the food matrix could also affect the release of acrylamide during the fermentation process, mainly due to the differences in the protein and fibre content. In addition, possible variations in the microbiota of the different population groups could also condition the release of acrylamide from the non-bioaccessible fraction. The most remarkable effect in the colon phase could be the hydrolysis of remaining proteins and peptides due to the proteolytic activity of the enzymes of the microbiota, promoting then the Michael addition of amino

acids to acrylamide. Although the protein content was very similar between all these veggie snacks, the amino acid profile has been shown to be significantly different in these vegetables, especially regarding to lysine, histidine, methionine and cysteine content (USDA, 2019a, b, c, d). This fact would also lead to different formation rates of Michael adducts at colonic level, explaining the lower detection of acrylamide after the *in vitro* fermentation in potato chips, similarly to results reported by Hamzalioglu & Gökmen (2015) in a multistep enzymatic digestion process. Probably, the fibre content had a deeper impact in the release of acrylamide during fermentation than other components, since some microorganisms such as *Bifidobacterium* and *Bacteroides* are able to degrade undigested fibre at colon (Sun et al., 2021) and then release the trapped contaminant. The higher presence of fibre in the portion submitted to fermentation in the case of carrot and beetroot chips could suppose a greater substrate for the degradation by specific microbiota compared to the other snacks, perhaps leading to higher release of acrylamide after the fermentation step. However, this fact did not happen in the present study neither in the children nor the adolescent populations, which exhibited their maximum percentage of acrylamide released after fermentation of sweet potato (71.89 and 63.42%, respectively) compared to the beetroot (65.22 and 43.03%, respectively) and carrot (59.52 and 50.15%, respectively). In the KOALA Birth Cohort Study developed in Dutch children, Zhong et al. (2019) stated that the higher levels of *Bifidobacterium* present in the microbiota of 6 to 9 years old kids compared to adults could lead to increased fibre fermentation. If this happened in our study, it would explain the higher acrylamide release observed in our younger population. Additionally, we observed that the adult group also showed good ability to degrade these food matrices (58.82 and 60.91% for sweet potato and beetroot, respectively), and almost better than children in the case of the carrot (55.75%) (Table 3).

Other aspect to consider is the influence of the food matrix on the microbiota profile. The high sugar content in the non-bioaccessible fraction of these vegetables could provide high availability of glucose, used as substrate for the growing of lactic acid bacteria and certain *Firmicutes*, whose cell walls contain proteins and peptidoglycan able to bind little amounts of acrylamide (Shen et al., 2019; Albedwawi et al., 2021) and thus causing its removal through the faeces, together with the bacteria (dos Reis et al., 2017). These low amounts could be

undetectable in this study with our methods and equipment.

In summary, different profiles of bacterial species in each population group together with the food matrix composition, may influence the acrylamide release during the colonic phase. Our data suggest that acrylamide released from the non-bioaccessible fraction of sweet potato during the fermentative process was significantly favoured in the children (71.89%) compared to adolescents (63.42%) and adults (58.82%). Unmodified values of acrylamide release were observed for beetroot chips in the three population groups. On the contrary, although without significant differences, children microbiota exhibited a worse efficiency to release acrylamide from the non-bioaccessible fraction of carrot than adults (43.03% < 50.15% < 55.75% for children, adolescents and adults, respectively).

3.4. Total amounts of absorbable acrylamide after the *in vitro* digestion and fermentation

The total percentages of acrylamide potentially available to be absorbed are depicted in Fig. 4. These data include the acrylamide available after *in vitro* digestion and colonic fermentation. It is important to bear in mind that bioaccessible acrylamide values after *in vitro* digestion of snacks are the same for all age groups (solid bars), children, adolescents and adults, since food was only digested once and then fermented with the faecal material from each one of the populations considered. For the representation, the percentage of bioaccessible acrylamide after *in vitro* digestion of each snack (subtracting the 10% that reaches the colon and goes through fermentation) was added to the percentage of acrylamide released after the colonic fermentation in the presence of faeces from the three population groups (excepting potato chips since the amount was not detectable). Globally, the lowest total available acrylamide was shown in potato chips and the highest in beetroot and sweet potato chips when fermented with faeces from the children group, while the rest of the foods and fermentation groups did not show significant differences. Therefore, considering the global gastrointestinal transit (digestion + fermentation) of sweet potato and beetroot, the youngest population seemed to be more prone to an increased acrylamide absorption from these veggie chips.

Taking these results and the consumption data by the Spanish population previously mentioned (MAPA, 2021), the daily acrylamide potentially absorbed after the digestion and fermentation step of each snack was estimated. After the

digestion process, bioaccessible acrylamide would be 1.1 $\mu\text{g}/\text{day}$ in the potato chips, 4.2 $\mu\text{g}/\text{day}$ in sweet potato chips, 1.7 $\mu\text{g}/\text{day}$ in beetroot chips and 2.3 $\mu\text{g}/\text{day}$ in carrot chips. In the same way, after the fermentation step, the acrylamide available to be absorbed from sweet potato chips would range between 1.2 and 1.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ for children, adolescents and adults. Levels of acrylamide released at colon would be almost equal in beetroot and carrot chips (ranges: 0.5–0.6 $\mu\text{g}/\text{day}$ for children, 0.6 $\mu\text{g}/\text{day}$ for adolescents and 0.6–0.7 $\mu\text{g}/\text{day}$ for adults).

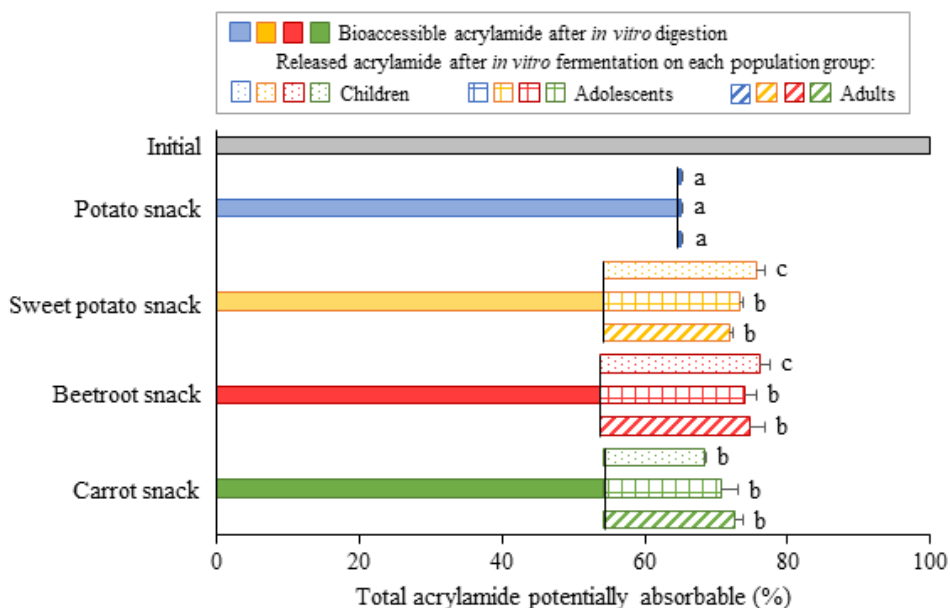


Fig. 4. Total percentage of acrylamide potentially absorbable after *in vitro* digestion and fermentation of snacks. Solid bars represent the percentage of bioaccessible acrylamide after the *in vitro* digestion subtracting the 10% that will reach the colon together with the non-bioaccessible fraction. Dashed bars represent the percentage of released acrylamide after the *in vitro* fermentation corresponding to the three age groups tested (dots for children, squares for adolescents and stripes for adults). Different letters mean significant differences ($p < 0.05$) between the total potentially absorbed acrylamide percentages obtained for each population comparing the four types of vegetable chips.

As a realistic example, the consumption of an individual commercialised snack bag (50 g) was considered to estimate the acrylamide potentially absorbable after digestion and colonic fermentation (Table 4), exhibiting a range between 18.8 and 88.7 μg per bag depending on the population. The highest acrylamide intake through a bag of sweet potato chips compared with the rest of

the snacks would lead to increased bioaccessible and released contaminant after fermentation (25.3, 22.4 and 20.8 μg per bag for children, adolescents and adults), involving a potentially greater acrylamide absorption (mean value for the three populations: 86.2 μg per bag). A bag of beetroot or carrot chips would provide similar *in vivo* amounts of the compound (mean value for the three populations: 35.5 μg and 45.2 μg per bag, respectively), whereas the same portion of the traditional potato chips would suppose the lowest levels of potentially absorbable acrylamide in the organism (18.8 μg per bag). These data should be available for consumers and producers so that they could make healthier decisions when buying/designing snacks, taking into account not only nutritional criteria but also the risk associated with the exposure of this processing contaminant.

Table 4

Estimation of the acrylamide potentially absorbable after the digestion and colonic fermentation through the consumption of an individual commercial snack bag (50 g).

Snack	Ingested acrylamide (μg)	Bioaccessible after digestion (μg)	Released after fermentation (μg)*	Total acrylamide potentially absorbable (μg)*
Potato	26.2	18.8	n.d.	18.8
Sweet potato	117.1	70.4	22.9 \pm 2.3 (20.8 - 25.4)	86.2 \pm 2.3 (84.1 - 88.7)
Beetroot	47.4	28.3	10.1 \pm 0.5 (9.7 - 10.6)	35.5 \pm 0.5 (35.1 - 36.1)
Carrot	63.9	38.6	10.4 \pm 1.4 (9.0 - 11.7)	45.2 \pm 1.3 (43.8 - 46.4)

* Mean value \pm sd and range pooling data from children, adolescents and adults

4. Conclusions

In this study, the acrylamide bioaccessibility after *in vitro* digestion and its release after colonic fermentation of potato and veggie chips was assessed. The aim was to evaluate the influence of the food matrix and the microbiota from three age stages of the population (childhood, adolescence and adulthood) on the potentially absorbable acrylamide.

Acrylamide bioaccessibility of potato and veggie chips after *in vitro*

digestion ranged from 59.7 to 71.7% and the non-bioaccessible fraction between 22.8 and 28.4%. After *in vitro* fermentation, the acrylamide percentage in the soluble fraction was between 43.03 and 71.89%, suggesting that acrylamide present in the non-bioaccessible fractions could be released by the microbial action during the colon phase. The highest values were observed in sweet potato chips fermented with faecal samples from children, indicating that the specific microbiota profile in each population group together with the food matrix composition may influence the acrylamide levels potentially absorbable after the whole gastrointestinal digestive process. Results confirm the importance of considering not only the acrylamide exposure from foods, but also its availability during the digestion and colonic fermentation processes. This fact should be considered in the estimation of the real risk associated with the potentially toxic effects of this contaminant on humans.

Funding: This work is part of the R&D project ACRINTAKE (RTI2018-094402-B-I00), financed by MCIN/AEI/<https://doi.org/10.13039/501100011033/> and Fondo Europeo de Desarrollo Regional ("FEDER") A way to make Europe.

CRedit authorship contribution statement: **L. González-Mulero:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Software, Writing - original draft. **M. Mesías:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing - review & editing. **F.J. Morales:** Conceptualization, Investigation, Resources, Software, Supervision, Visualization, Writing - review & editing. **B. Navajas-Porras:** **J.A. Rufián-Henares:** **C. Delgado-Andrade:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing - review & editing.

Acknowledgments: The authors wish to thank Ms I. Alvarez for her technical assistance. We also thank faecal donors for their selfless participation.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). (2020). Estudio ALADINO. Estudio sobre Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España 2019. Ministerio de Consumo. Chapter 4 (pp 50). Available online: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/observatorio/Informe_Aladino_2019.pdf (Accessed 20 September 2022).
- Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J. J., Pacheco-Vargas, G., Osorio-Díaz, P., & Bello-Pérez, L. A. (2012). Starch digestibility and glycemic index of cookies partially

- substituted with unripe banana flour. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.010>
- Albedwawi, A. S., Turner, M. S., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Liu, S. Q.,...Ayyash, M. M. (2021). An overview of microbial mitigation strategies for acrylamide: Lactic acid bacteria, yeast, and cell-free extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 143, Article 111159. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111159>
- Badoud, F., Goeckener, B., Severin, K., Ernest, M., Romero, R., Alzieu, T., ... Delatour, T. (2020). Fate of acrylamide during coffee roasting and *in vitro* digestion assessed with carbon 14- and carbon 13-labeled materials. *Food Chemistry*, 320, Article 126601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126601>
- Baranski, R., Allender, C., & Klimek-Chodacka, M. (2012). Towards better tasting and more nutritious carrots: Carotenoid and sugar content variation in carrot genetic resources. *Food Research International*, 47, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.006>
- Bavec, M., Turinek, M., Grobelnik-Mlakar, S., Slatnar, A., & Bavec, F. (2010). Influence of industrial and alternative farming systems on contents of sugars, organic acids, total phenolic content, and the antioxidant activity of red beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* Rote Kugel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11825–11831. <https://doi.org/10.1021/jf103085p>
- Belhadj Benziane, A., Dilmi Bouras, A., Mezaini, A., Belhadri, A., & Benali, M. (2019). rats Effect of oral exposure to acrylamide on biochemical and hematologic parameters in Wistar. *Drug and Chemical Toxicology*, 42, 157–166. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1450882>
- Breitling-Utzmann, C. M., & Hankele, S. (2019). Formation of acrylamide in vegetable crisps - Influence of processing conditions and reducing sugars. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 115, 265–270.
- Desmarchelier, A., Bebius, A., Reding, F., Griffin, A., Ahijado Fernandez, M., Beasley, J.,... Delatour, T. (2022). Towards a consensus LC-MS/MS method for the determination of acrylamide in food that prevents overestimation due to interferences. *Food Additives & Contaminants Part A*, 39, 653–665. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.2022773>
- dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Siquiera, N. P., Rosa, D. D., da Silva, L. L., & Peluzio, M. C. G. (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research*, 37, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.11.009>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2015). Scientific Opinion on Acrylamide in Food. *European Food Safety Authority Journal*, 13, 4104. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4104> (Accessed 8 June 2022).
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... Portmann, R. (2016). The harmonised INFOGEST *in vitro* digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006>
- Eglitis, L. (2020). Retrieved from <https://www.datosmundial.com/estaturapromedio.php>. (Accessed 3 June 2022).
- Elmore, J. S., Briddon, A., Dodson, A. T., Muttucumar, N., Halford, N. G., & Mottram, D. S. (2015). Acrylamide in potato crisps prepared from 20 UK-grown varieties: Effects of variety and tuber storage time. *Food Chemistry*, 182, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.006>

doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.103

- Elmore, J. S., Xu, F., Maveddat, A., Kapetanou, R., Qi, H. & Oruna-Concha, M. J. (2019). Acrylamide content of vegetable chips. In: Granvogl M, MacMahon S (eds) Food-borne toxicants: formation, analysis, and toxicology. American Chemical Society, vol 1306, Chapter 2 (pp 15–26). DOI: 10.1021/bk-2019-1306.ch002.
- EC (European Commission). (2017). Commission Regulation (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 Establishing Mitigation Measures and Benchmark Levels for the Reduction of the Presence of Acrylamide in Food. Official Journal of the European Union, 304, 24–44. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>.
- EC (European Commission). (2019). Commission Recommendation (EU) 2019/1888 of 7 November 2019 on the monitoring of the presence of acrylamide in certain foods. Official Journal of the European Union, 290, 31–33. <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32019H1888>.
- Fernández, C., Lorenzo, H., Vrotsou, K., Aresti, U., Roca, I. & Sánchez, E. (2011). Estudio de crecimiento de Bilbao. Curvas y tablas de crecimiento (Estudio transversal) in Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre. Bilbao. (Eds). Instituto de investigación sobre crecimiento y desarrollo. (Pp 12, 26) https://www.fundacionorbegozo.com/wp-content/uploads/pdf/estudios_2011.pdf.
- Fuhr, U., Boettcher, M. I., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., ... Schömig, E. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15, 266–271. <https://doi.org/10.1158/10559965.EPI-05-0647>
- FDE (FoodDrinkEurope). (2019). Acrylamide Toolbox 2019. Available online: https://www.fooddrinkeuropa.eu/uploads/publications_documents/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf (Accessed 7 September 2022).
- Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4504–4526. <https://doi.org/10.1021/jf030204+>
- González-Mulero, L., Mesías, M., Morales, F. J., & Delgado-Andrade, C. (2022). Assessment of the acrylamide bioaccessibility in cereal and potato-based foods after *in vitro* digestion. *Food Research International*, 161, Article 111820. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111820>
- Hamzalıoğlu, A., & Gökmen, V. (2015). Investigation of the reactions of acrylamide during *in vitro* multistep enzymatic digestion of thermally processed foods. *Food & Function*, 6, 109–114. <https://doi.org/10.1039/C4FO00884G>
- Hidalgo, F. J., Delgado, R. M., & Zamora, R. (2010). Role of mercaptans on acrylamide elimination. *Food Chemistry*, 122(3), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.016>
- Hopkins, M. J., Sharp, R., & Macfarlane, G. T. (2002). Variation in human intestinal microbiota with age. *Digest Liver Disease*, 34(2), 512–518. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(02\)80157-8](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80157-8)
- Kocadağlı, T. & Gökmen, V. (2016). Metabolism of Acrylamide in Humans and Biomarkers of Exposure to Acrylamide in Elsevier Inc (Eds), Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects. Chapter. 6 (pp 109-128).

- Koszucka, A., Nowak, A., Nowak, I., & Motyl, I. (2020). Acrylamide in human diet, its metabolism, toxicity, inactivation and the associated European Union legal regulations in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1677–1692. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1588222>
- Laurie, S. M., Faber, M., Calitz, F. J., Moelich, E. I., Muller, N., & Labuschagne, M. T. (2013). The use of sensory attributes, sugar content, instrumental data and consumer acceptability in selection of sweet potato varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1610–1619. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5932>
- MAPA (Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods). (2021). Report on food consumption in Spain in 2020. Available online: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-anual-consumo-2020-v2-nov2021-baja-res_tcm30-562704.pdf (accessed 11 July 2022).
- Marti, A., & Pagani, M. A. (2013). What can play the role of gluten in gluten free pasta? *Trends Food Science and Technology*, 31, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.001>
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2019). Risk/benefit evaluation of traditional and novel formulations for snacking: Acrylamide and furfurals as process contaminants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 79, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.03.011>
- Mesías, M., Nouali, A., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2020). How far is the Spanish snack sector from meeting the acrylamide regulation 2017/2158? *Foods*, 9 (2), 247. <https://doi.org/10.3390/foods9020247>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function*, 5, 1113. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mottram, D. S., & Wedzicha, B. L. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448–449. <https://doi.org/10.1038/419448a>
- NCD RiskC (NCD Risk Factor Collaboration). (2020). Height and body-mass index trajectories of school-aged children and adolescents from 1985 to 2019 in 200 countries and territories: a pooled analysis of 2181 population-based studies with 65 million participants. *Lancet*, 396, 1511–1524. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31859-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31859-6).
- Nguyen, K. H., Fromberg, A., Duedahl-Olesen, L., Christensen, T., & Granby, K. (2022). Processing contaminants in potato and other vegetable crisps on the Danish market: Levels and estimation of exposure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 108, Article 104411. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104411>
- Niva, M. (2007). All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite*, 48, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2006.10.006>
- Oellig, C., Gottstein, E., & Granvogl, M. (2022). Analysis of acrylamide in vegetable chips after derivatization with 2-mercaptobenzoic acid by liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food research and Technology*, 248, 937–946. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03898-5>
- Pérez-Burillo, S., Rufián-Henares, J. A., & Pastoriza, S. (2018). Towards an improved global antioxidant response method (GAR+): Physiological-resembling *in vitro* digestion-fermentation method. *Food Chemistry*, 239, 1253–1262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.024>

- Pérez-Burillo, S., Molino, S., Navajas-Porras, B., Valverde-Moya, A. J., Hinojosa-Nogueira, D., López-Maldonado, A., ... Rufián-Henares, J. A. (2021). An *in vitro* batch fermentation protocol for studying the contribution of food to gut microbiota composition and functionality. *Nature protocols*, 16, 3186–3209. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Powers, S. J., Mottram, D., Curtis, A., & Halford, N. (2021). Progress on reducing acrylamide levels in potato crisps in Europe, 2002 to 2019. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38, 782–806. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1871083>
- Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G. H. J., Tims, S., Zoetendal, E. G., & de Vos, W. M. (2013). Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental Microbiology*, 15(4), 1146–1159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12023>
- Sansano, M., Heredia, A., Peinado, I., & Andrés, A. (2017). Dietary acrylamide: What happens during digestion. *Food Chemistry*, 237, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.104>
- Shen, Y., Zhao, S., Zhao, X., Sun, H., Shao, M., & Xu, H. (2019). *In vitro* adsorption mechanism of acrylamide by lactic acid bacteria. *LWT – Food Science and Technology*, 100, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.058>
- Sun, Y., Hu, J., Zhang, S., He, H., Nie, Q., Zhang, Y., ... Nie, S. (2021). Prebiotic characteristics of arabinogalactans during *in vitro* fermentation through multi-omics analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 156, Article 112522. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112522>
- Teixeira, J. L. P., Lima Pallone, J. A., Delgado Andrade, C., Mesias, M., & Seiquer, I. (2022). Bioavailability evaluation of calcium, magnesium and zinc in Brazilian cheese through a combined model of *in vitro* digestion and Caco-2 cells. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, Article 104365. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104365>
- USDA (U.S. Department of Agriculture). (2019a). FoodData Central. Carrots, Raw (SR LEGACY, 170393). Available online: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170393/nutrients> (Accessed 12 September 2022).
- USDA (U.S. Department of Agriculture). (2019b). FoodData Central. Potatoes, boiled, cooked in skin, flesh, without salt (SR LEGACY, 170438). Available online: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170438/nutrients> (Accessed 12 September 2022).
- USDA (U.S. Department of Agriculture). (2019c). FoodData Central. Beets, Raw (SR LEGACY, 169145). Available online: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169145/nutrients> (Accessed 12 September 2022).
- USDA (U.S. Department of Agriculture). (2019d). FoodData Central. Sweet potato, raw, unprepared (includes foods for USDA's food distribution program) (SR LEGACY, 168482). Available online: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168482/nutrients> (Accessed 12 September 2022).
- Vázquez-Sánchez, K., Martínez-Saez, N., Rebollo-Hernanz, M., del Castillo, M. D., Gaytán-Martínez, M., & Campos-Vega, R. (2018). *In vitro* health promoting properties of antioxidant dietary fiber extracted from spent coffee (Coffee arabica L.) grounds.

Food Chemistry, 261, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.064>

- Woo, G. H., Shibutani, M., Kuroiwa, K., Lee, K. Y., Takahashi, M., Inoue, K., ... Hirose, M. (2007). Lack of preventive effects of dietary fibers or chlorophyllin against acrylamide toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1507–1515. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.02.010>
- Younginer, N. A., Blake, C. E., Davison, K. K., Blaine, R. E., Ganter, C., Orloski, A., & Fisher, J. O. (2016). “What do you think of when I say the word ‘snack’?” towards a cohesive definition among low-income caregivers of preschool-age children. *Appetite*, 98, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.12.002>
- Zamora, R., Delgado, R. M., & Hidalgo, F. J. (2010). Model reactions of acrylamide with selected amino compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1708–1713. <https://doi.org/10.1021/jf903378x>
- Zhong, H., Penders, J., & Shi, Z. (2019). Impact of early events and lifestyle on the gut microbiota and metabolic phenotypes in young school-age children. *Microbiome*, 7, 2. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0608-z>

Discusión integradora

Estilo de vida actual, cambios en el patrón alimentario y exposición a acrilamida

En los últimos años, la sociedad ha experimentado diversos cambios a nivel económico y sociocultural que han resultado en la aparición de nuevos estilos de vida y hábitos de consumo. Esta modificación en los patrones de comportamiento ha incidido de manera relevante en el entorno doméstico o privado del individuo. La creciente falta de tiempo y el escaso interés en mantener las formas más tradicionales de cocinado, especialmente entre las nuevas generaciones, han dado lugar a hábitos alimentarios alternativos en los países desarrollados, recurriéndose en mayor medida a servicios de catering, comedores de empresas, restaurantes y otros servicios de suministro de alimentos (Monteiro y col., 2018). Esto ha supuesto un aumento en el consumo de alimentos procesados y comidas preparadas (Younginer y col., 2016; Monteiro y col., 2018; FDE, 2019; MAPA, 2023), sobre todo entre los más jóvenes (Li y col., 2020; Moosburger y col., 2020). La connotación negativa del término “alimento procesado” se debe a la relación del consumo de este tipo de elaboraciones con la mayor prevalencia de enfermedades como la obesidad, diabetes, hipertensión o hipercolesterolemia (Filgueiras y col., 2019; Nardocci y col., 2019). El Reglamento (CE) 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios define como “alimento procesado” *todo aquel producto alimenticio obtenido a partir de la transformación de productos frescos, los cuales pueden contener ingredientes necesarios para su elaboración o para conferirles unas características específicas*, entendiendo como “transformación” *cualquier acción que altere sustancialmente el producto inicial (tratamiento térmico, ahumado, curado, maduración, secado, marinado, extracción, extrusión o una combinación de los mismos)* (Reglamento (CE) N° 852/2004).

Actualmente, existen diversos sistemas de clasificación de los alimentos según la composición y grado de procesado con la finalidad última de ayudar a las políticas de salud pública en la prevención y control de enfermedades crónicas no transmisibles vinculadas con la alimentación, y en especial contra la obesidad, diabetes y enfermedad cardiovascular. Entre ellos se encuentran los sistemas IARC-EPIC (a nivel europeo), UNC (Estados Unidos), NIPH (México), IFPRI (Guatemala),

NOVA (Brasil) y SIGA (Francia) (Carretero y col., 2020). El sistema NOVA fue desarrollado por el centro de estudios epidemiológicos en salud y nutrición de la Universidad de Sao Paulo (Brasil) en el año 2010 (Monteiro y col., 2019). Este sistema es el más utilizado en el ámbito académico y de investigación, así como en las actuaciones en materia de salud pública desde que la OMS asumió la utilidad de su implantación. Sin embargo, el uso generalizado del sistema NOVA no está exento de controversia entre los tecnólogos de alimentos, la industria y las entidades regulatorias.

Durante el cocinado de los alimentos se emplean elevadas temperaturas que, junto con la propia composición de la matriz alimentaria y las condiciones de procesado, pueden dar lugar a la formación de contaminantes químicos de procesado. La mayoría de ellos están vinculados al desarrollo de la RM, siendo la acrilamida el contaminante más ampliamente distribuido. Por tanto, los nuevos hábitos alimentarios han podido contribuir a un aumento en la exposición dietética de dicho contaminante. Por consiguiente, es necesaria una labor de vigilancia activa, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, de la presencia de este contaminante en los grupos de alimentos, menús y técnicas de cocinado/procesado, para prever un posible impacto negativo sobre la salud humana.

Considerando este contexto de interacción entre los patrones alimentarios actuales y la gran oferta de alimentos y platos preparados disponibles en el mercado, esta memoria de tesis doctoral ha tratado de abordar la exposición a acrilamida tomando en cuenta la diversidad de entornos de elaboración de los alimentos, las diferentes poblaciones de consumidores a las que van dirigidos e incluso profundizando en la bioaccesibilidad de este compuesto a lo largo del proceso digestivo. Hasta el momento este último aspecto ha sido poco explorado, pero es indudable su papel modulador de la absorción y, por tanto, su impacto en la salud.

Presencia de acrilamida en preparaciones culinarias procedentes del entorno doméstico, la restauración colectiva y la industria alimentaria

Las patatas procesadas, los alimentos de base cereal y la bebida de café conforman las principales fuentes de exposición a acrilamida en la dieta debido a la combinación de la presencia del contaminante y la tasa de consumo del alimento. Entre los hábitos de consumo, podemos encontrar diferentes situaciones donde pueden existir (i) altos niveles del contaminante en un alimento de alto consumo, (ii) altos niveles en un alimento de bajo consumo, (iii) bajos niveles del contaminante en un alimento de alto consumo, (iv) bajos niveles en un alimento de bajo consumo, así como (v) no presencia detectable del contaminante. Los niveles de precursores de acrilamida en la matriz alimentaria y las diferentes técnicas de cocinado utilizadas en la elaboración del alimento en cada entorno culinario son determinantes en la formación del contaminante. La selección y manipulación de la materia prima y el control de los procesos culinarios son muy diferentes en los entornos domésticos, de restauración colectiva y en el industrial. Para este último, existen unas directrices específicas que tratan de mitigar la formación de acrilamida en los alimentos (Reglamento (UE) 2017/2158; FDE, 2019) y que son de menor aplicabilidad en el entorno de restauración colectiva, y prácticamente inexistentes en el entorno doméstico.

En el primer estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral se analizó el contenido de acrilamida en alimentos procesados de consumo habitual preparados en el ámbito doméstico, industrial y de restauración colectiva. El objetivo fue evaluar si la presencia del contaminante en el alimento estaba relacionada con el entorno de preparación del alimento. De todos los productos analizados se observó un contenido significativamente mayor de acrilamida en aquéllos elaborados con patatas procesadas (patatas fritas y tortilla de patatas). Entre los alimentos de base cereal, los elaborados con masas (pizza, empanada o empanadilla) o algún recubrimiento tipo rebozado o enharinado (filete empanado, croqueta o san jacob) presentaron niveles moderados. En este tipo de alimentos, la presencia del contaminante se concentra mayoritariamente en las masas y recubrimientos, viéndose reducido en el alimento completo por el efecto de mezcla con el resto de los ingredientes (Perera y Embuscado, 2014). En estos productos se hizo patente que las diferencias observadas

entre los distintos alimentos se deben no sólo a la composición de la matriz alimentaria, sino también a la técnica de cocinado, que pudo ser muy variable en cuestión de temperaturas empleadas, tiempos de aplicación y condiciones de humedad. En cuanto al entorno culinario, los menores niveles de acrilamida se obtuvieron en la mayor parte de los alimentos procedentes del entorno industrial, en comparación con aquéllos procedentes de la restauración colectiva y el ámbito doméstico. Esta evidencia sugiere que en el entorno industrial se están aplicando algunas de las medidas de mitigación establecidas en la regulación (Reglamento (UE) 2017/2158). Además, los valores de acrilamida observados en la restauración colectiva resultaron más elevados que los del entorno doméstico, hecho que ha sido previamente documentado en la literatura (Delgado y col., 2012; Branciarri y col., 2020). Los resultados de este estudio subrayan, por un lado, la necesidad, de ampliar el abanico de alimentos procesados que deberían incluirse en la regulación para que sean representativos de la dieta, independientemente del entorno de elaboración, así como, establecer niveles de referencia de su contenido en acrilamida. Por otro, es necesario implementar un mayor control sobre las técnicas de cocinado en los ámbitos doméstico y de restauración colectiva, fomentando la educación del manipulador de alimentos en materia de seguridad alimentaria.

Evaluación de la exposición a acrilamida en diferentes grupos poblacionales y entornos de restauración colectiva

Según el informe de consumo alimentario del año 2022 en España (MAPA, 2023), el consumo de alimentos en el hogar supone un 11,6%, frente al 69,1% en la restauración colectiva, que se reparte sobre todo en almuerzos (36,0%) y cenas (20,7%), y en menor medida en desayunos (10,6%) y meriendas (9,7%). Estos datos resaltan la importancia de los comedores externos al hogar (centros escolares, universitarios o de trabajo, entre otros) en el actual estilo de vida de la población, ya que sustentan buena parte del consumo de alimentos de determinados grupos poblacionales, principalmente durante el almuerzo.

Para evaluar la adecuación de los menús de la restauración colectiva a las necesidades nutricionales de la población, es importante tener en cuenta las

recomendaciones establecidas por AESAN para seguir una dieta saludable y sostenible en todas las etapas de la vida (AESAN, 2022a; 2023). Los menús recogidos en la presente tesis doctoral, procedentes de comedores de centros escolares, universitarios, centros de trabajo y centros de mayores, se ajustaron a dichas recomendaciones, aportando al menos 1 ración diaria de hortalizas y frutas; alrededor de 2 raciones de lácteos; 1-2 raciones de huevos; 2-4 raciones de carne y pescado; y un máximo de 2 raciones de cereales, aumentando hasta 3 en los centros escolares al considerar los desayunos. En relación con las legumbres, aunque se recomienda un consumo de hasta 2 raciones de forma semanal, los centros universitarios incluidos en el estudio no siempre proporcionaron este alimento entre sus menús.

Teniendo en cuenta aquellos grupos de alimentos de los que se tiene constancia que contribuyen en mayor medida a la exposición a acrilamida, se identificaron los alimentos/preparaciones que podían haber sido sometidos a un tratamiento térmico más severo, ya que eran susceptibles a mayores tasas de formación del contaminante. En los menús de todas las colectividades, la presencia de alimentos con algún grado de procesado frente a los alimentos de consumo en fresco puede llegar a representar hasta un 70% del total. Entre ellos, los productos elaborados a base de cereales como las galletas, en el caso de los comedores escolares, o las patatas procesadas (patatas fritas, patatas asadas, tortilla de patatas o croquetas de patata rellenas) en el resto de los centros, destacaron por presentar los mayores niveles de acrilamida. En las residencias de cuidado de mayores, además, se incluyó el café soluble como una fuente importante de exposición al contaminante. Estos hallazgos concuerdan con los datos proporcionados por los organismos oficiales sobre las principales fuentes de exposición a acrilamida en la dieta (EFSA, 2015; FDE, 2019) y por otros estudios científicos similares (El Tawila y col., 2017; Branciari, 2020). Es importante destacar que los platos compuestos por guisos y/o verduras sofritas o procesadas mostraron niveles notables de acrilamida, coincidiendo con resultados de investigaciones previas (Lambert y col., 2018; Yu y col., 2018; Başaran, 2022). En ellos hay que considerar la posible contribución de las especias y condimentos utilizados durante el cocinado, tales como el pimentón, la cúrcuma o la pimienta negra (Jeong y col., 2020; Wongthanyakram y col., 2020).

Ingesta de acrilamida en distintos escenarios de exposición

El consumo diario de los menús de cada colectividad supuso un intervalo de ingesta de acrilamida muy amplio, que osciló entre 0 y 171,6 $\mu\text{g}/\text{día}$ (**Figura 20**), siendo los valores medios de 14,5 $\mu\text{g}/\text{día}$ en centros escolares, 15,7 $\mu\text{g}/\text{día}$ en centros universitarios, 18,2 $\mu\text{g}/\text{día}$ en centros de trabajo y 34,0 $\mu\text{g}/\text{día}$ en centros de mayores.

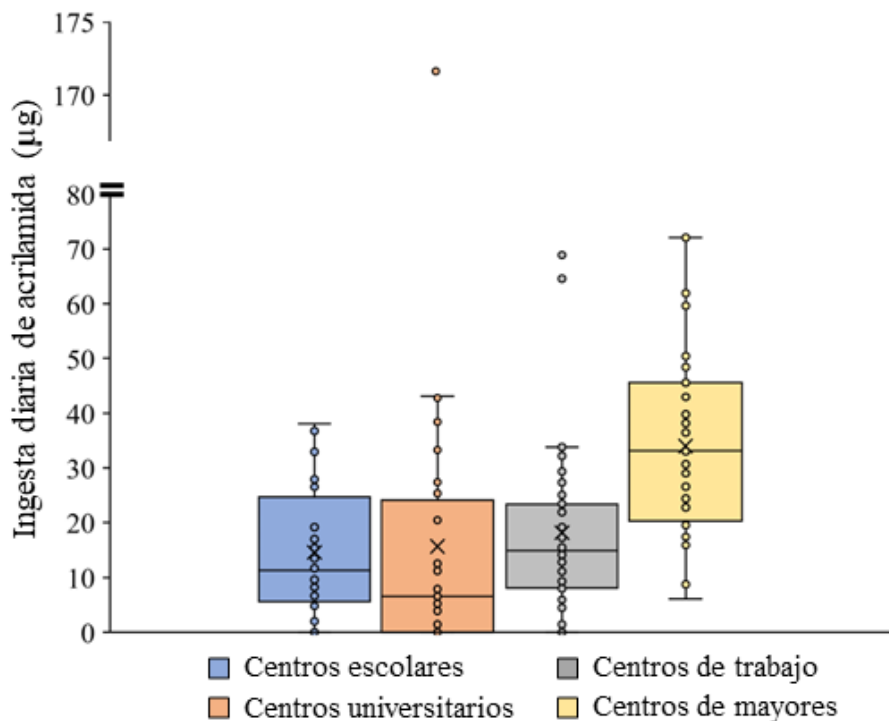


Figura 20. Rango de/variabilidad de ingesta diaria de acrilamida en las distintas colectividades durante el período de estudio.

Para el cálculo de la ingesta diaria de acrilamida se asumió el consumo completo de la porción comestible recogida y, por tanto, estos datos representarían la ingesta máxima esperada de acrilamida. Por otra parte, la recogida diaria de la dieta total (desayuno, almuerzo, merienda y cena) únicamente se realizó en el centro de mayores. Por este motivo, la ingesta media de acrilamida observada en estos centros fue superior al resto de colectividades. Nematollahi y col. (2020) describieron una ingesta media de acrilamida de 37,11 $\mu\text{g}/\text{día}$ en la población iraní de 61 a 96 años,

similar a la estimada en nuestro estudio. Sin embargo, una de las limitaciones del anterior estudio es que sólo consideraron el consumo de alimentos basados principalmente en productos de panadería y bollería, diferentes tipos de snacks, frutos secos y comidas “fast food” (pizza, hamburguesa y salchichas). Esta misma investigación estableció ingestas medias en otras colectividades cercanas a las observadas en esta tesis, a pesar de las particularidades de cada ensayo. Rangos similares de consumo del contaminante han sido igualmente descritos en niños de Australia (19 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Tong y col., 2004), Polonia (13,2 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Mojska y col., 2010), Turquía (16,62 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Cengiz y Boyacı Gündüz, 2013) y Estados Unidos (14,2-53,8 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Tran y col., 2010), y en adultos de Polonia (23,1 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Mojska y col., 2010), Japón (4,7-15,8 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Kito y col., 2020), Estados Unidos (18,1-71,4 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Tran y col., 2010), Italia (33,6 $\mu\text{g}/\text{día}$) y Australia (22,8 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Pelucchi y col., 2017), siendo incluso superiores en población europea (261 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Lujan-Barroso y col., 2014).

En los comedores de centros universitarios y de centros de trabajo se observó mayor variabilidad en la ingesta diaria de acrilamida, a pesar de que en estas colectividades sólo se evaluaron los almuerzos (**Figura 20**). En ambos centros se consideraron distintos escenarios de exposición en función del alimento o plato seleccionado por el consumidor. En los comedores universitarios, se contempló la selección de patatas fritas como guarnición, siempre que fuera ofertada dentro del menú. En los centros de trabajo, se consideraron todos los platos o alimentos incluidos en el menú, realizando distintas combinaciones entre ellos para evaluar todas las ingestas de acrilamida posibles según la elección del consumidor. Los resultados ponen de manifiesto la importancia del criterio de selección por parte del consumidor de los alimentos que conforman el menú sobre la exposición a acrilamida en la dieta.

De forma global, los alimentos con mayor contribución a la ingesta diaria de acrilamida fueron las galletas en los centros escolares (27,1 μg), las patatas fritas en los centros universitarios y de mayores (hasta 160,1 y 32,0 μg , respectivamente), y los guisos o verduras procesadas en los centros de trabajo (hasta 54,4 μg). Estos productos/preparaciones también han sido señalados por diferentes autores como los

principales contribuidores a la exposición del contaminante en la dieta (Mucci y Wilson, 2008; Normandin y col., 2013; Kotemori y col., 2018; Kito y col., 2020).

Estimación de la exposición a acrilamida y su riesgo asociado

A partir de los estudios de dieta duplicada llevados a cabo en las diferentes colectividades, se estimó la exposición a acrilamida y el riesgo asociado a su consumo. Junto con los niveles del contaminante evaluados en los menús de cada colectividad, la exposición estuvo relacionada con el peso corporal de los sujetos asignados a cada franja de edad, de ahí que los mayores niveles de exposición se asocien a los escolares de menor edad y a las mujeres en los colectivos adultos, en línea con la información general incluida en estudios previos (Lambert y col., 2018; Lee y Kim., 2020; Barón Cortés y col., 2021; Fenández y col., 2022).

La mayoría de los estudios de exposición a acrilamida descritos en la bibliografía, utilizan encuestas para conocer el consumo de alimentos por parte de la población y bases de datos del contenido de acrilamida en los alimentos consumidos (Kito y col., 2020; Almeida Costa y col., 2022). Sin embargo, son muy escasas las investigaciones que llevan a cabo estudios de dieta duplicada y prácticamente inexistentes sobre grupos de edad y colectividades en la población española (Delgado-Andrade y col., 2012; Branciari y col., 2020). La estimación del consumo de acrilamida a partir de estudios de dieta duplicada aporta precisión, ya que se recogen datos reales de los alimentos consumidos, incluyendo la determinación de los niveles del contaminante y el peso de las raciones. La desventaja radica en el mayor esfuerzo que requiere el diseño experimental y la logística que conlleva tanto la extensa recogida de alimentos como su posterior conservación, procesado (fracción comestible y no comestible) y análisis. Éste puede ser uno de los motivos por el cual la mayoría de los trabajos en este área únicamente contemplan el análisis de alimentos individuales para evaluar la exposición a acrilamida. Además, sólo incluyen una selección de los mismos, evaluando exclusivamente determinadas matrices alimentarias o aquellos alimentos considerados como principales fuentes de exposición al contaminante. Otro factor a considerar es que en la mayoría de los estudios previos no se incluyen preparaciones culinarias, ni formulaciones más

complejas de alimentos que son también representantes de una parte relevante de la dieta habitual de la población. Tener sólo en cuenta el consumo de determinados alimentos por la población hace que la estimación de la exposición a acrilamida a través de la dieta resulta una estimación incompleta y sesgada (Jakobsen y col., 2016; Jeong y col., 2020; Nematollahi y col., 2020; Barrios-Rodríguez y col., 2021).

Por todo lo anterior, es complicado establecer una comparativa entre los resultados de exposición a acrilamida a través de la dieta entre distintos grupos poblacionales y distintos países, viéndose afectada por la metodología aplicada, los alimentos evaluados, la estimación de la ingesta y la consideración o no de la dieta total (Figura 21).

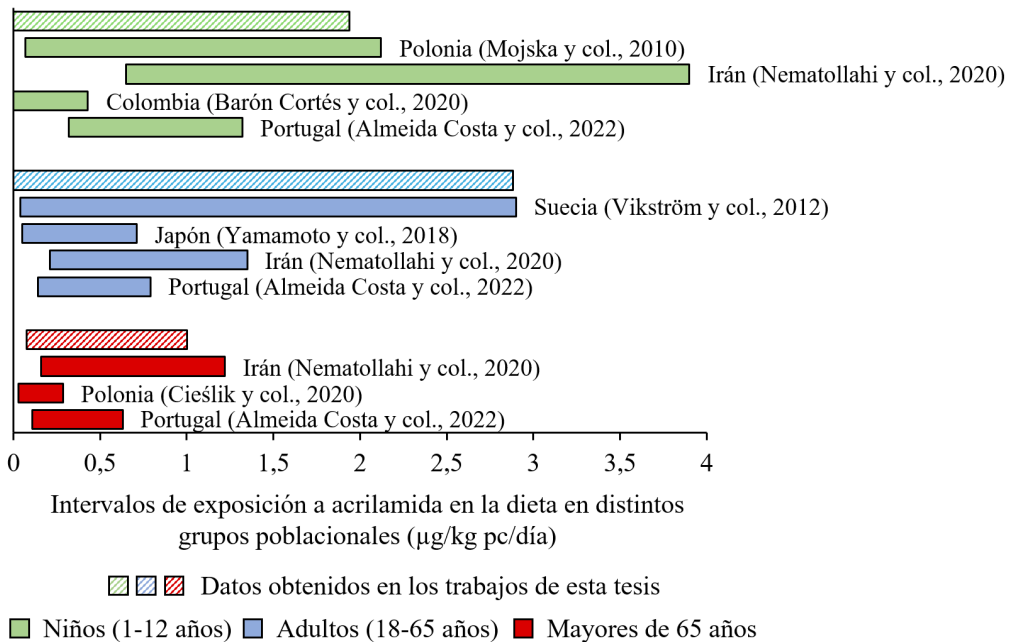


Figura 21. Intervalos de exposición a acrilamida en distintas franjas de edad descritos en la bibliografía.

En este sentido, nuestros estudios tan sólo han tenido en cuenta datos de ingesta de desayunos y almuerzos en centros escolares y de almuerzos en comedores universitarios y centros de trabajo, incluyendo únicamente la dieta completa en el colectivo de mayores. A pesar de esta limitación, los datos de exposición a acrilamida descritos en esta tesis doctoral son únicos en la población española y están en línea

con los observados por otros autores que han utilizado un diseño experimental y un plan de muestreo similar (Mojska y col., 2010; Vikström y col., 2012; Yamamoto y col., 2018; Ciešlik y col., 2020; Jeong y col., 2020; Almeida Costa y col., 2022).

En la estimación del riesgo asociado a la exposición a acrilamida, en todas las colectividades se obtuvieron valores de MOE superiores a 125 para efectos neurológicos, indicando ausencia de riesgo (EFSA, 2015). Sin embargo, para efectos neoplásicos, todos los resultados de MOE estuvieron muy por debajo del límite de seguridad de 10.000, indicando un mayor riesgo. Dado que no se consideró la dieta diaria completa (desayuno + almuerzo + merienda + cena) en todas las colectividades, los datos resultan aún más llamativos, especialmente en la población más joven, donde se observaron los niveles de MOE más bajos. Escenarios similares han sido descrito en la mayor parte de estudios recogidos en la literatura que consideran el consumo de alimentos individuales o comidas aisladas (Branciani y col., 2020; Barón Cortés y col., 2021; Nematollahi y col., 2020; Almeida Costa y col., 2022; González y col., 2022).

Los resultados derivados de los menús recogidos en las distintas colectividades sugieren que, a pesar de consumir dietas variadas y equilibradas, el consumo regular de productos derivados de patata (frita u horneada), así como alimentos de base cereal (pan, galletas o cereales de desayuno) o vegetales procesados presentes en guisos, puede aumentar la ingesta diaria de acrilamida entre 25-83% y, por tanto, aumentar el riesgo de efectos neoplásicos asociados a la exposición de este contaminante. Este resultado pone de manifiesto, una vez más, la necesidad de proporcionar al consumidor no sólo educación nutricional que le ayude a seguir una dieta equilibrada sino, además, instruirlo en aspectos básicos de seguridad alimentaria que fomenten la selección de alimentos que no incidan en una mayor exposición a acrilamida. Kowalska y col. (2017) describieron que, en Polonia, sólo el 20% de la población entre 16 y 35 años, las más susceptible de tener una elevada exposición a acrilamida por sus hábitos dietéticos, tiene en cuenta el contenido de compuestos potencialmente dañinos a la hora de elegir los alimentos consumidos. En otros países, como España, la elección de compra y consumo viene condicionada principalmente por la composición nutricional del producto (Ballco y Gracia, 2022; Pettigrew y col., 2024).

Nuestros estudios recomendarían, además, tener en cuenta el riesgo de exposición a acrilamida como parte de la elección de una dieta saludable. Por otro lado, es importante considerar la responsabilidad de los manipuladores de alimentos en las cocinas de los establecimientos de restauración colectiva para mitigar la exposición a acrilamida, reduciendo su contenido en los productos finales, con especial énfasis en las patatas fritas (Mestdagh y col., 2007; Mesías y col., 2019b; 2020). Por tanto, las actividades formativas dirigidas a este personal deberían ser una prioridad para las autoridades con responsabilidad en materia de seguridad alimentaria.

Estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de la acrilamida durante la digestión gastrointestinal y efecto de la fermentación colónica

La alta solubilidad de la acrilamida en agua favorece su rápida absorción y distribución a los tejidos tras la ingesta de los alimentos (Kocadağlı y Gökmen, 2016). Sin embargo, es importante señalar que no todo el compuesto presente en los alimentos va a estar necesariamente biodisponible. Esto se debe a que durante el proceso digestivo los alimentos van a sufrir distintas transformaciones por la acción de la masticación y la motilidad gastrointestinal, las variaciones del pH y las actividades de diversas enzimas digestivas en la boca, en el estómago y en el intestino, promoviendo cambios químicos y estructurales que afectan la bioaccesibilidad del compuesto y, a su vez, su biodisponibilidad (Hamzaloğlu y Gökmen, 2015; Sansano y col., 2017). Además, al final del proceso gastrointestinal, tiene lugar una fermentación anaeróbica a nivel del colon gracias a la acción de la microbiota, capaz de liberar compuestos que quedaron atrapados en el residuo no digerido del alimento. De este modo, la fracción de acrilamida residual que permaneciera inaccesible tras la digestión podría liberarse de la matriz, absorberse y ejercer efectos a nivel local o sistémico. Por tanto, la liberación del contaminante de la matriz alimentaria en el colon podría ser un modulador de las tasas finales de bioaccesibilidad.

Diversos estudios han demostrado cómo interfiere la composición de la matriz alimentaria en la acrilamida bioaccesible durante la digestión de los alimentos. En el caso del huevo, se ha descrito la interacción entre la acrilamida y las proteínas a través

de la reacción de adición de Michael, reduciéndose así su bioaccesibilidad final y, por consiguiente, su absorción (Friedman, 2003; Schabacker y col., 2004; Hidalgo y col., 2010; Zamora y col., 2010). En otras matrices alimentarias como las galletas, también se ha mostrado un descenso en la bioaccesibilidad de la acrilamida a lo largo del proceso digestivo (Hamzalıođlu y Gökmen, 2015). Sin embargo, la acrilamida parece incrementar su bioaccesibilidad en las patatas fritas, posiblemente debido a la liberación favorecida en las condiciones de pH ácido durante la digestión gástrica (Hamzalıođlu y Gökmen, 2015; Sansano y col., 2017). La revisión pormenorizada de la escasa bibliografía existente en este campo pone de manifiesto que los estudios sobre la bioaccesibilidad del contaminante se han desarrollado mayoritariamente en alimentos aislados. Por tanto, es necesario investigar sobre el destino de la acrilamida durante el proceso digestivo en el seno de alimentos combinados o comidas completas.

Partiendo de esta premisa, el primer trabajo sobre bioaccesibilidad desarrollado en esta tesis se diseñó considerando alimentos individuales y combinados con fuentes proteicas, con el objetivo de estudiar las posibles interacciones entre los componentes de la matriz alimentaria y su efecto sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida. Los resultados evidenciaron que la fracción bioaccesible aumentaba a lo largo del proceso digestivo incrementándose, por tanto, la porción potencialmente absorbible. Este hecho posiblemente se debe al efecto de enzimas como la α -amilasa, que durante la fase oral actúa sobre el almidón presente en los alimentos dando lugar a la liberación de la acrilamida unida a éste; la pepsina, que actuaría a nivel gástrico sobre los complejos proteína-acrilamida; así como a las fuerzas mecánicas del tubo digestivo. Además, el efecto del pH ácido estomacal puede promover la formación de acrilamida *in situ* a través de compuestos intermedios de la RM generados en el alimento durante su procesado (Hamzalıođlu y Gökmen, 2015; Hamzalıođlu y Gökmen, 2020).

Los resultados de este primer ensayo mostraron que la combinación de los alimentos con una fuente proteica puede disminuir la bioaccesibilidad de la acrilamida entre un 53% y un 76% debido a las interacciones entre el contaminante y los componentes de la matriz alimentaria. Así, se observó que las muestras con un

alto contenido en proteína y fibra constituyen matrices más complejas que obstaculizan la acción enzimática, pudiendo además interactuar con el compuesto y disminuir su bioaccesibilidad (Rannou y col., 2016; Vázquez-Sánchez y col., 2018; Li y col., 2021). Paralelamente, los grupos nucleófilos de péptidos y aminoácidos liberados en la fase gástrica podrían interactuar con la acrilamida a pH intestinal a través de la reacción de adición de Michael, disminuyendo de nuevo la fracción del contaminante en su forma libre y redundando en el descenso de su bioaccesibilidad (Adams y col., 2010). Este efecto no se observó en el sistema cereales con yogur, pero sí en las galletas combinadas con leche y en los alimentos de base patata combinados con huevo y filete de ternera. La mayor presencia de aminoácidos liberados durante la digestión de estas fuentes proteicas pudo propiciar la reacción de adición de Michael a pH intestinal, reduciéndose la bioaccesibilidad en estos sistemas comparado con los alimentos digeridos de forma individual.

En un segundo trabajo, además de evaluar la bioaccesibilidad de la acrilamida tras la digestión gastrointestinal, se añadió un paso de simulación de fermentación colónica de la porción no digerida del alimento una vez finalizado el proceso digestivo. Este estudio se diseñó empleando muestras con un mayor contenido en acrilamida, de forma que fuera analíticamente cuantificable y precisa la evaluación de los efectos del proceso fermentativo en la liberación del contaminante desde la fracción no bioaccesible. Para ello, se seleccionaron chips de patatas y chips de vegetales, que fueron sometidas a digestión *in vitro* seguida de fermentación colónica simulada. El objetivo fue valorar la influencia de la matriz alimentaria y la acción de la microbiota intestinal en la acrilamida potencialmente absorbible tras el proceso digestivo gastrointestinal completo (digestión + fermentación). El estudio se llevó a cabo empleando inóculos fecales de niños, adolescentes y adultos, evaluando así el efecto de la microbiota propia de estas tres etapas de la vida.

Los resultados mostraron que es posible la liberación de la acrilamida atrapada en las fracciones no bioaccesibles resultantes de la digestión *in vitro* por parte de la microbiota intestinal. En concreto, en las muestras de snacks, la acrilamida presente en la fracción no bioaccesible (23-28%) incrementó hasta un 43-72% en la fracción bioaccesible después de la fermentación. Este aumento pudo deberse a la liberación,

durante el proceso fermentativo, de la acrilamida ligada a la fibra presente en estos alimentos gracias a la abundancia de *Bifidobacterium*, género capaz de degradar la fibra no digerida en el colon y liberar así el contaminante atrapado (Zhong y col., 2019b; Sun y col., 2021). Aunque este aspecto no ha sido evaluado en el presente trabajo, también habría que considerar cómo la propia matriz alimentaria puede influir sobre el perfil de la microbiota y, a su vez, sobre la liberación de la acrilamida. Los snacks vegetales seleccionados en este estudio contienen altos niveles de azúcares, que podrían proporcionar glucosa como sustrato para el crecimiento de bacterias acidolácticas y ciertos *Firmicutes*. Las paredes celulares de estos microorganismos contienen proteínas y peptidoglicanos, cuya habilidad para atrapar pequeñas cantidades de acrilamida ha sido previamente demostrada (Rivas y col., 2016; Zhang y col., 2017b; dos Reis y col., 2017; Shen y col., 2019; Albedwawi y col., 2021), pudiendo provocar de esta forma su eliminación a través de las heces junto con las bacterias (dos Reis y col., 2017). Además, estos microorganismos disminuyen el pH intestinal, lo que, junto con las enzimas amidasas, podría inducir la degradación del compuesto a nivel intestinal (Albedwawi y col., 2021). En resumen, los resultados de este segundo ensayo indican que los niveles de acrilamida potencialmente absorbible después del proceso gastrointestinal completo pueden verse modulados tanto por la composición de la matriz alimentaria como por la microbiota del colon.

Los hallazgos observados en ambos estudios destacarían la importancia de considerar no sólo la exposición a acrilamida a través de los alimentos, sino también su biodisponibilidad a lo largo de los procesos de digestión y fermentación colónica para evaluar de forma más precisa del riesgo asociado al consumo de este contaminante.

Conclusiones

Los resultados derivados de la presente tesis doctoral han dado lugar a las siguientes conclusiones:

Primera: La exposición a acrilamida a través del consumo de alimentos y preparaciones culinarias provenientes tanto de entornos industriales, domésticos y de restauración colectiva puede variar considerablemente. Este hecho sugiere diferencias en la composición y en los niveles de compuestos precursores de acrilamida presentes en la materia prima, así como en las técnicas de cocinado empleadas.

Segunda: Los menores niveles del contaminante registrados en las elaboraciones procedentes del ámbito industrial sugieren que en este entorno se están aplicando eficazmente algunas de las medidas de mitigación establecidas en el Reglamento (UE) 2017/2158. Por el contrario, las concentraciones más altas observadas en el ámbito doméstico y de restauración colectiva señalan la necesidad de implementar un mayor control de los procesos empleados en estos sectores, promoviendo la educación sobre seguridad alimentaria entre los manipuladores de alimentos.

Tercera: El hallazgo de la presencia de acrilamida en alimentos y platos de consumo habitual entre la población española indica que es necesario vigilar los niveles de este contaminante en nuevas matrices alimentarias, e incluso considerar la inclusión de recomendaciones de valores de referencia en futuras revisiones del reglamento.

Cuarta: La estimación de la exposición a acrilamida en los entornos de restauración colectiva realizada a través de estudios de dieta duplicada revela que, a pesar de que los menús sean variados y equilibrados, el consumo regular de patatas y vegetales procesados, alimentos de base cereal, y platos compuestos por guisos y/o verduras, puede aumentar la ingesta diaria de acrilamida en un rango entre el 25% y el 83%.

Quinta: La exposición a acrilamida presente en los menús de todas las colectividades se asoció con un elevado riesgo de desarrollar efectos neoplásicos, siendo las mujeres en la población adulta y los niños de menor edad los grupos poblacionales más vulnerables debido a su menor peso corporal.

Sexta: Con el objetivo de reducir el riesgo asociado a la presencia de acrilamida en determinados alimentos, como las patatas fritas, se recomienda promover entre la población medidas educativas en materia de seguridad alimentaria. Esto permitirá, no solo que los manipuladores de alimentos implementen estrategias de mitigación durante el cocinado, sino que el consumidor también puede realizar una selección de platos y alimentos de forma más segura y saludable.

Séptima: La bioaccesibilidad de la acrilamida durante el proceso de digestión gastrointestinal se ve afectada por la composición de la matriz alimentaria, y en especial, por la presencia de fibra, carbohidratos complejos y proteínas.

Octava: Para realizar una estimación más precisa del riesgo asociado a la exposición a acrilamida través de la dieta, es necesario tener en cuenta la bioaccesibilidad final del compuesto. Esto requiere considerar no sólo el alimento aislado, sino también la combinación de alimentos ingeridos simultáneamente debido a la posible interacción entre los componentes de la matriz a lo largo del proceso digestivo.

Novena: Los estudios *in vitro* de bioaccesibilidad total de acrilamida indican que la fermentación colónica podría liberar la acrilamida no bioaccesible tras el proceso digestivo, permitiendo su acción *in situ* o su absorción en los tramos finales del intestino. Por tanto, considerar la bioaccesibilidad total del contaminante es esencial para evaluar de manera más realista el impacto sobre la salud de la exposición dietética a acrilamida.

Décima: La microbiota presente en la población infantil parece tener una mayor capacidad para liberar la acrilamida no bioaccesible tras la digestión, sugiriendo que, además de la variabilidad individual, la franja de edad de los sujetos podría condicionar la bioaccesibilidad total del contaminante.

Como conclusión general, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la utilidad del método de dieta duplicada para estimar la exposición a acrilamida en la población, considerando tanto los alimentos individuales como los menús completos. Igualmente, sugieren la conveniencia de incluir niveles de referencia para ciertos alimentos en futuras modificaciones de la reglamentación sobre acrilamida, debido a su relevancia en los hábitos actuales de consumo en la población. Dado el riesgo asociado a la exposición a este contaminante, es importante implementar estrategias de mitigación durante el cocinado de los alimentos, no sólo en el ámbito industrial, sino también a nivel doméstico y de restauración colectiva. Así mismo, se debe promover una educación adecuada del consumidor en términos de seguridad alimentaria para realizar una selección de alimentos segura y saludable. Además de la exposición, es esencial considerar la bioaccesibilidad del contaminante a lo largo del proceso digestivo, lo que condicionará la absorción final del compuesto, su acción *in vivo* y, en consecuencia, el riesgo real asociado a su consumo. Por tanto, son necesarias futuras investigaciones más específicas que profundicen en el efecto de la matriz alimentaria sobre la biodisponibilidad de la acrilamida.

Referencias bibliográficas

A

- Abt, E., Robin, L.P., McGrath, S. C., Srinivasan, J., Dinovi, M., Adachi, Y., & Chirtel, S.J. (2019). Acrylamide levels and dietary exposure from foods in the United States, an update based on 2011-2015 data. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(10), 1475-1490.
[doi:10.1080/19440049.2019.1637548](https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1637548)
- Adani, G., Filippini, T., Wise, L. A., Halldorsson, T.I., Bláha, L., & Vinceti, M. (2020). Dietary intake of acrylamide and risk of breast, endometrial, and ovarian cancers: A systematic review and dose–response meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 29(6), 1095-1106.
[doi:10.1158/1055-9965.epi-19-1628](https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-19-1628)
- Adams, A., Hamdani, S., Van Lancker, F., Mějri, S., & De Kimpe, N. (2010). Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. *Food Research International*, 43(5), 1517–1522.
[doi:10.1016/j.foodres.2010.04.033](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.033)
- AECOSAN. (2018). Acrylamide in food, new standards and recommendations for your health. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2018/CUADRIPTICO_ACRILAMIDA_AECOSAN.PDF
- AESAN. (2020). Estudio ALADINO. Estudio sobre Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España 2019. Ministerio de Consumo. Capítulo 4 (pp 50). Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/observatorio/Informe_Aladino_2019.pdf
- AESAN. (2022a). Recomendaciones dietéticas saludables y sostenibles complementadas con recomendaciones de actividad física para la población española. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/RECOMENDACIONES_DIETETICAS.pdf
- AESAN. (2022b). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre recomendaciones dietéticas sostenibles y recomendaciones de actividad física para la población española. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 36, 11-70. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/RECOMENDACIONES_DIETETICAS.pdf
- AESAN. (2023). Recomendaciones dietéticas para las personas mayores que reciben atención institucionalizada. Orientaciones para la elaboración de menús saludables y

- medioambientalmente sostenibles en centros residenciales y centros de día para personas mayores. Disponible en:
https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/RECOMENDACIONES_MAYORES.pdf
- Al-Attabi, Z., D'Arcy, B.R., & Deeth, H.C. (2014). Volatile sulfur compounds in pasteurised and UHT milk during storage. *Dairy Science & Technology*, 94(3), 241-253.
[doi:10.1007/s13594-013-0157-y](https://doi.org/10.1007/s13594-013-0157-y)
- Alanazi, I.S., Emam, M., Elsabagh, M., Abdel-Daim, M.M., & Abdel-Daim, M.M. (2021). The protective effects of 18 β -glycyrrhetic acid against acrylamide-induced cellular damage in diabetic rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(41), 58322-58330.
[doi:10.1007/s11356-021-14742-4](https://doi.org/10.1007/s11356-021-14742-4)
- Albedwawi, A.S., Seed, P.T., Olaimat, A.N., Osaili, T.M., Al-Nabulsi, A. A., Liu, S., Shah, N.P., & Liu, S. (2021). An overview of microbial mitigation strategies for acrylamide: Lactic acid bacteria, yeast, and cell-free extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 143, 111159.
[doi:10.1016/j.lwt.2021.111159](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111159)
- Almeida Costa, S., Correia, D., Carvalho, C., Vilela, S., Severo, M., Lopes, C., & Torres, D. (2022). Risk characterization of dietary acrylamide exposure and associated factors in the Portuguese population, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39(5), 888-900.
[doi:10.1080/19440049.2022.2047540](https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2047540)
- Ames, J.M. (1992). The Maillard reaction In B.J.F. Hudson (ed), *Biochemistry of food proteins*. Elsevier Applied Science. pp 99-153.
- Ames, J.M. (2003). Browning: nonenzymatic. In Caballero, B., Trugo, L. and Finglas, P.M. (ed). *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Academic Press, London, pp. 665-672.
- Annola, K., Karttunen, V., Keski-Rahkonen, P., Myllynen, P., Segerbäck, D., Heinonen, S., & Vähäkangas, K. (2008). Transplacental transfer of acrylamide and glycidamide are comparable to that of antipyrine in perfused human placenta. *Toxicology Letters*, 182(1-3), 50-56.
[doi:10.1016/j.toxlet.2008.08.006](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.08.006)
- Aranceta-Bartrina, J., Pérez-Rodrigo, C., Alberdi-Aresti, G., Ramos-Carrera, N., & Lázaro-Masedo, S. (2016). Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25–64 años) 2014–2015: estudio ENPE. *Revista Española De Cardiología*, 69(6), 579-587.
[doi:10.1016/j.recesp.2016.02.010](https://doi.org/10.1016/j.recesp.2016.02.010)
- Aranceta-Bartrina, J., Gianzo-Citores, M., & Pérez-Rodrigo, C. (2020).

- Prevalencia de sobrepeso, obesidad y obesidad abdominal en población española entre 3 y 24 años. Estudio ENPE. *Revista Española De Cardiología*, 73(4), 290-299.
[doi:10.1016/j.recesp.2019.07.011](https://doi.org/10.1016/j.recesp.2019.07.011)
- Arribas-Lorenzo, G., & Morales, F. J. (2012). Recent insights in acrylamide as carcinogen in foodstuffs. In *Advances in Molecular Toxicology*. Elsevier BV. pp. 163-193.
[doi:10.1016/b978-0-444-59389-4.00005-7](https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59389-4.00005-7)
- B**
- Bagdonaite, K., Derler, K., & Murkovic, M. (2008). Determination of acrylamide during roasting of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6081-6086.
[doi:10.1021/jf073051p](https://doi.org/10.1021/jf073051p)
- Ballco, P., & Gracia, A. (2022). Tackling nutritional and health claims to disentangle their effects on consumer food choices and behaviour: A systematic review. *Food Quality and Preference*, 101, 104634.
[doi:10.1016/j.foodqual.2022.104634](https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2022.104634)
- Baranowski, T. (2012). 24-Hour recall and diet record methods In Willett WC, (ed). *Nutritional Epidemiology*. New York, Oxford University Press. pp 49-69.
- Barón Cortés, W.R.P., Mejía, S.E., & Mahecha, H.S. (2021). Consumption study and margin of exposure of acrylamide in food consumed by the Bogotá population in Colombia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 100, 103934.
[doi:10.1016/j.jfca.2021.103934](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103934)
- Barrios-Rodríguez, Y.F., Pedreschi, F., Rosowski, J., Gómez, J.P., Figari, N., Castillo, O., & Salome Mariotti Celis, M. (2021). Is the dietary acrylamide exposure in Chile a public health problem?, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(7). 1126-1135.
[doi:10.1080/19440049.2021.1914867](https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1914867)
- Başaran, B. (2022). The effect of different orders of vegetables in frying on acrylamide levels. *Turkish Journal of Agricultural Research*, 9, 49–59.
[doi:10.19159/tutad.1034713](https://doi.org/10.19159/tutad.1034713)
- Başaran, B., & Faiz, Ö. (2022). Determining the levels of acrylamide in some traditional foods unique to Turkey and risk assessment. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 21(1), 123948.
[doi:10.5812/ijpr.123948](https://doi.org/10.5812/ijpr.123948)
- Belkova, B., Hradecky, J., Hurkova, K., Forstova, V., Vaclavik, L., & Hajslova, J. (2018). Impact of vacuum frying on quality of potato crisps and frying oil. *Food Chemistry*, 241(C), 51-59.
[doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.062](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.062)

- Bertuzzi, T., Siena, S., Mulazzi, A., & Rastelli, S.E. (2020). Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars. *Food Chemistry*, 303, 125372. [doi:10.1016/j.foodchem.2019.125372](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125372)
- Bjellaas, T., Ølstørn, H.B., Becher, G., Alexander, J., Knutsen, S.H., & Paulsen, J.E. (2007). Urinary Metabolites as Biomarkers of Acrylamide Exposure in Mice Following Dietary Crisp Bread Administration or Subcutaneous Injection. *Toxicological Sciences*, 100(2), 374-380. [doi :10.1093/toxsci/kfm234](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm234)
- Branciari, R., Roila, R., Ranucci, D., Altissimi, M.S., Mercuri, M.L., & Haouet, N.M. (2020). Estimation of acrylamide exposure in Italian schoolchildren consuming a canteen menu: Health concern in three age groups. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71, 122-131. [doi:10.1080/09637486.2019.1624692](https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1624692)
- Bråthen, E., Kita, A., Knutsen, S.H., & Wicklund, T. (2005). Addition of glycine reduces the content of acrylamide in cereal and potato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3259-3264. [doi:10.1021/jf048082o](https://doi.org/10.1021/jf048082o)
- Bråthen, E., & Knutsen, S.H. (2005). Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chemistry*, 92(4), 693-700. [doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.030](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.030)
- Bellicha, A., Wendeu-Foyet, M. G., Coumoul, X., Koual, M., Pierre, F., Guéraud, F., Zelek, L., Debras, C., Srour, B., Sellem, L., Kesse-Guyot, E., Julia, C., Galan, P., Hercberg, S., Touvier, M., & Touvier, M. (2022). Dietary exposure to acrylamide and breast cancer risk: results from the NutriNet-Santé cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 116(4), 911-919. [doi:10.1093/ajcn/nqac167](https://doi.org/10.1093/ajcn/nqac167)
- BOE. (2011). Boletín Oficial del Estado. Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición. BOE núm. 160 de 6 de julio de 2011. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2011/BOE-A-2011-11604-consolidado.pdf>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Weitschies, W., & Recio, I. (2019). INFOGEST static *in*

vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14, 991-1014.

[doi:10.1038/s41596-018-0119-1](https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1)

C

- Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 793-810.
[doi:10.1016/j.lwt.2010.11.002](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002)
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155-171.
[doi:10.1111/1541-4337.12049](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049)
- Cardoso, H.F., Wierenga, P.A., Gruppen, H., & Schols, H.A. (2018). Maillard induced glycation behaviour of individual milk proteins. *Food Chemistry*, 252, 311-317.
[doi:10.1016/j.foodchem.2018.01.106](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.106)
- Carretero, C., Clotet, R., Colomer, Y., García de Fernando, G., Frías, J., Guamis, B., González Vaqué, L., Mariné, A., Martínez, A., Moreno Rojas, R., Periago, M.J., Rodrigo, D., Romero Rodríguez, M.A., Salvador, A., & Talens Oliag, P. (2020). Food classification report: The concept "ULTRA-PROCESSED"-Triptolemos Foundation (Spain). *World Food Regulation Review*, 30(6), 28-32.
- Cengiz, M.F., & Boyacı Gündüz, C.P. (2013). Acrylamide exposure among Turkish toddlers from selected cereal-based baby food samples, *Food and Chemical Toxicology*, 60, 514-519.
[doi:10.1016/j.fct.2013.08.018](https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.018)
- Cerny, C. (2008). The aroma side of the Maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126(1), 66-71.
[doi:10.1196/annals.1433.011](https://doi.org/10.1196/annals.1433.011)
- Cerón-Carrillo, T.G., Palou, E., & López-Malo, A. (2010). Pulsos eléctricos: fundamentos y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(1), 9-26. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/267098717_Pulsos_electricosfundamentos_y_aplicaciones_en_alimentos
- Cha, J., Debnath, T., & Lee, K. (2019). Analysis of α -dicarbonyl compounds and volatiles formed in Maillard reaction model systems. *Scientific Reports*, 9(1), 5325.
[doi:10.1038/s41598-019-41824-8](https://doi.org/10.1038/s41598-019-41824-8)
- Chawla, S., Chander, R., & Sharma, A. (2009). Antioxidant properties of

- Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins. *Food Chemistry*, 116(1), 122-128.
[doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.097](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.097)
- Cieślík, I., Cieślík, E., Topolska, K., & Wiczkowski, W. (2020). Dietary acrylamide exposure from traditional food products in Lesser Poland and associated risk assessment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27(2), 225-230.
[doi:10.26444/aaem/109063](https://doi.org/10.26444/aaem/109063)
- Claus, A., Weisz, G.M., Schieber, A., & Carle, R. (2006a). Pyrolytic acrylamide formation from purified wheat gluten and gluten-supplemented wheat bread rolls. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(1), 87-93.
[doi:10.1002/mnfr.200500152](https://doi.org/10.1002/mnfr.200500152)
- Claus, A., Schreiter, P., Weber, A., Graeff, S., Herrmann, W., Claupein, W., Schieber, A., & Carle, R. (2006b). Influence of agronomic factors and extraction rate on the acrylamide contents in yeast-leavened breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8968-8976.
[doi:10.1021/jf061936f](https://doi.org/10.1021/jf061936f)
- Claeys, W.L., De Vleeschouwer, K.M., & Hendrickx, M. (2005). Kinetics of acrylamide formation and elimination during heating of an asparagine-sugar model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9999-10005.
[doi:10.1021/jf051197n](https://doi.org/10.1021/jf051197n)
- Claeys, W.L., De Meulenaer, B., Huyghebaert, A., Scippo, M., Hoet, P., & Matthys, C. (2016). Reassessment of the acrylamide risk: Belgium as a case-study. *Food Control*, 59, 628-635.
[doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.051](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.051)
- Codex Alimentarius. (2009). Code of practice for the reduction of acrylamide in foods. CAC/RCP 67-2009. Disponible en:
https://www.fao.org/input/download/standards/11258/CXP_067e.pdf
- Cotier, J.P., & Morón, C. (1997). Hojas de Balance Alimentario en Morón, In Zacarías y de Pablo (ed), *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Dirección de Alimentación y Nutrición Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. Disponible en:
<https://www.fao.org/3/ah833s/Ah833s07.htm>
- Costa, S.S., Correia, D.M., Carvalho, C., Vilela, S., Severo, M., Lopes, C., & Torres, D. (2022). Risk characterization of dietary acrylamide exposure and associated factors in the Portuguese population. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39(5), 888-900.
[doi:10.1080/19440049.2022.2047540](https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2047540)

Courraud, J., Berger, J., Cristol, J., & Avallone, S. (2013). Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 136(2), 871-877.
doi:[10.1016/j.foodchem.2012.08.076](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.076)

D

Da Costa, G.G., Churchwell, M.I., Hamilton, L.P., Von Tungeln, L.S., Beland, F.A., Marques, M.M., & Doerge, D.R. (2003). DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chemical Research in Toxicology*, 16(10), 1328-1337.
doi:[10.1021/tx034108e](https://doi.org/10.1021/tx034108e)

Dario, A., Buonanno, M., Fiore, A., Monti, S.M., & Fogliano, V. (2016). Evolution of protein bound Maillard reaction end-products and free Amadori compounds in low lactose milk in presence of fructosamine oxidase I. *Food Chemistry*, 212, 722-729.
doi:[10.1016/j.foodchem.2016.06.037](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.037)

Das, A., & Srivastav, P.P. (2012). Acrylamide in snack foods. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(3), 163-169.
doi:[10.3109/15376516.2011.623329](https://doi.org/10.3109/15376516.2011.623329)

Davidek, T., & Davidek, J. (2004). Chemistry of the Maillard reaction in

foods. In: Tomasik, P. (ed), *Chemical and functional properties of food saccharides*. CRC Press, Boca Raton, Chapter 18.

De Vleeschouwer, K.M., Van Der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Kinetics of acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnology Progress*, 23(3), 722-728.
doi:[10.1021/bp060389f](https://doi.org/10.1021/bp060389f)

Delgado-Andrade, C. (2016). Carboxymethyl-lysine: thirty years of investigation in the field of AGE formation. *Food & Function*, 7(1), 46-57.
doi:[10.1039/c5fo00918a](https://doi.org/10.1039/c5fo00918a)

Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M.P., & Morales, F.J. (2007a). Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(3), 341-351.
doi:[10.1002/mnfr.200600070](https://doi.org/10.1002/mnfr.200600070)

Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. Á., & Morales, F.J. (2007b). Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chemistry*, 100(2), 725-731.
doi:[10.1016/j.foodchem.2005.10.031](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.031)

Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Nieto, R., & Navarro, M.P. (2004). Effects of

- heated glucose-lysine and glucose-methionine model-systems on mineral solubility. *Food Chemistry*, 87(3), 329-337.
doi:10.1016/j.foodchem.2003.12.002
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., & Navarro, M.P. (2008). Maillard reaction products consumption: Magnesium bioavailability and bone mineralization in rats. *Food Chemistry*, 107(2), 631-639.
doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.055
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., García, M.R., Galdó, G., & Navarro, M.P. (2011). Increased intake of Maillard reaction products reduces phosphorous digestibility in male adolescents. *Nutrition*, 27(1), 86-91.
doi:10.1016/j.nut.2009.10.009
- Delgado-Andrade, C., Mesías, M., Morales, F.J., Seiquer, I., & Navarro, P. (2012). Assessment of acrylamide intake of Spanish boys aged 11-14 years consuming a traditional and balanced diet. *LWT-Food Science and Technology*, 46, 16-22.
doi:10.1016/j.lwt.2011.11.006
- Deppe, V., Bongaerts, J., O'Connell, T. M., Maurer, K., & Meinhardt, F. (2011). Enzymatic deglycation of Amadori products in bacteria: mechanisms, occurrence and physiological functions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), 399-406.
doi:10.1007/s00253-010-3083-4
- De Wilde, T., De Meulenaer, B., Mestdagh, F., Govaert, Y., Vandeburie, S., Ooghe, W., Fraselle, S., Demeulemeester, K., Van Peteghem, C., Calus, A., Degroodt, J., & Verhé, R. (2006). Influence of fertilization on acrylamide formation during frying of potatoes harvested in 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 404-408.
doi:10.1021/jf0521810
- Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 1998, L330/32. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/1998/330/L00032-00054.pdf>
- Directiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2020, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (versión refundida). *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2020, L435/1. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/2020/435/L00001-00062.pdf>
- Doerge, D.R., Young, J., McDaniel, L.P., Twaddle, N.C., & Churchwell, M.I. (2005). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208(3), 199-209.
doi:10.1016/j.taap.2005.03.003

- Doroshenko, O., Fuhr, U., Kunz, D., Frank, D., Kinzig, M., Jetter, A., Reith, Y., Lazar, A., Taubert, D., Kirchheiner, J., Baum, M., Eisenbrand, G., Berger, F., Bertow, D., Berkessel, A., Sörgel, F., Schömig, E., & Tomalik-Scharte, D. (2009). *In vivo* role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(2), 433-443.
[doi:10.1158/1055-9965.epi-08-0832](https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0832)
- dos Reis, S.A., da Conceição, L.L., Siquiera, N.P., Rosa, D.D., da Silva, L.L., & Peluzio, M.C.G. (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research*, 37, 1-19.
[doi:10.1016/j.nutres.2016.11.009](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.11.009)
- Dybing, E., Farmer, P.B., Andersen, M., Fennell, T.R., Lalljie, S.P.D., Muller, D.R., Olin, S.S., Petersen, B., Schlatter, J., Scholz, G., Scimeca, J., Slimani, N., Törnqvist, M., Tuijelaars, S., & Verger, P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(3), 365-410.
[doi:10.1016/j.fct.2004.11.004](https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.004)
- E**
- EC (European Commission). (2011). Commission adopted on 10 January 2011 a Recommendation on investigations into the levels of acrylamide in food. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/recommendation_10012011_acrylamide_food_en.pdf
- EC (European Commission). (2013). Commission recommendation of 8 November 2013 on investigations into the levels of acrylamide in food. *Official Journal of the European Union*, 301/15. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:301:0015:0017:EN:PDF>
- EFSA. (2009). Scientific Report of EFSA prepared by Data Collection and Exposure Unit (DATEX) on “Monitoring of acrylamide levels in food”. The EFSA Scientific Report, 285, 1-26.
[doi:10.2903/j.efsa.2009.285r](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.285r)
- EFSA. (2010a). Scientific report of EFSA: Update of results on the monitoring of furan levels in food. *EFSA Journal*, 8(7), 1702.
[doi:10.2903/j.efsa.2010.1702](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1702)
- EFSA. (2010b). Results on acrylamide levels in food from monitoring year 2008. *EFSA Journal*, 8(5), 1599.

- [doi:10.2903/j.efsa.2010.1599](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1599)
- EFSA. (2011). Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009. *EFSA Journal*, 9(4), 2133. [doi:10.2903/j.efsa.2011.2133](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2133)
- EFSA. (2012a). Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal*, 10(3), 2579. [doi:10.2903/j.efsa.2012.2579](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2579)
- EFSA. (2012b). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal*, 10, 2938. [doi:10.2903/j.efsa.2012.2938](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2938)
- EFSA. (2012c). Statement on the applicability of the Margin of Exposure approach for the safety assessment of impurities which are both genotoxic and carcinogenic in substances added to food/feed. *EFSA Journal*, 10(3), 2578. [doi :10.2903/j.efsa.2012.2578](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2578)
- EFSA. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6), 4104. Disponible en: [doi :10.2903/j.efsa.2015.4104](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104)
- EFSA. (2022). Scientific Report. Assessment of the genotoxicity of acrylamide. *EFSA Journal*, 20(5), 7293. [doi:10.2903/j.efsa.2022.7293](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7293)
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, A., Comi, T., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M.J., LeFeunteun, S., JanssenDuijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A. R., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Mirray, B.S., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C.N, Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L.E., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E.K., Vergarud, G.E., Vergères, G., & Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217–225. [doi:10.1016/j.foodres.2015.12.006](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006)
- Eglitis, L. (2020). Disponible en: <https://www.datosmundial.com/estatura-promedio.php>.
- Ehlers, A., Lenze, D., Broll, H., Zagon, J., Hummel, M., & Lampen, A. (2013). Dose dependent molecular effects of acrylamide and glycidamide in human cancer cell lines and human primary hepatocytes. *Toxicology Letters*, 217(2), 111-120. [doi:10.1016/j.toxlet.2012.12.017](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.12.017)
- Elmore, J.S., Mottram, D.S., Muttucumaru, N., Dodson, A., Parry, M.A.J., & Halford, N.G. (2007). Changes in free amino acids and sugars in potatoes due to sulfate fertilization and the effect on

acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5363-5366.

[doi:10.1021/jf070447s](https://doi.org/10.1021/jf070447s)

El Tawila, M., Al-Ansari, A.M., Al-Rasheedi, A.A., & Neamatallah, A.A. (2017). Dietary exposure to acrylamide from cafeteria foods in Jeddah schools and associated risk assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(13), 4494–4500.

[doi:10.1002/jsfa.8314](https://doi.org/10.1002/jsfa.8314)

Encuesta Nacional de Salud de España, Ministerio de Sanidad y Consumo. (2017). Disponible en:

<https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/home.htm>

Eriksson S. (2005). Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology. [Doctoral thesis]. Stockholm University. Disponible en:

<https://su.diva-portal.org/smash/get/diva2:197454/FULLTEXT01.pdf>

Erkekoğlu, P., & Baydar, T. (2010). Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 323-333.

[doi:10.1017/s0954422410000211](https://doi.org/10.1017/s0954422410000211)

Exon, J. H. (2006). A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of*

Toxicology and Environmental Health-part B-critical Reviews, 9(5), 397-412.

[doi:10.1080/10937400600681430](https://doi.org/10.1080/10937400600681430)

F

Fadel, H.H.M., & Farouk, A. (2002). Caramelization of maltose solution in presence of alanine. *Amino Acids*, 22(2), 199-213.

[doi:10.1007/s007260200008](https://doi.org/10.1007/s007260200008)

Fagúndez, L.J.M., Torres, A.R., Sánchez, M.L.Z., De Torres Aured, M. L., Rodrigo, C., y Rocamora, J.A.L. (2015). Diet history: Method and applications. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), 57-61.

[doi:10.3305/nh.2015.31.sup3.8752](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup3.8752)

FAO/WHO. (2008). Consultations and workshops: dietary exposure assessment of chemicals in food: report of a joint FAO/WHO consultation, Annapolis, Maryland, USA, 2-6 May 2005. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44027>

FAO. (2018). Dietary Assessment: A resource guide to method selection and application in low resource settings. Rome. Disponible en:

<https://www.fao.org/3/i9940en/I9940EN.pdf>

Fardet, A., Lakhssassi, S., & Briffaz, A. (2018). Beyond nutrient-based food

- indices: a data mining approach to search for a quantitative holistic index reflecting the degree of food processing and including physicochemical properties. *Food & Function*, 9(1), 561-572.
doi:10.1039/c7fo01423f
- FDA. (2016). Guidance for industry acrylamide in foods. FDA, Rockville. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/87150/download>.
- FDE. (2019). Food drink Europe acrylamide toolbox. Disponible en: https://www.fooddrinkeurope.eu/wp-content/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf
- Felton, J. S., Jagerstad, M., Knize, M. G., Skog, K., & Wakabayashi, K. (2000). Contents in foods, beverages and tobacco In M. Nagao & T. Sugimura (ed). *Food borne carcinogens heterocyclic amines*. John Wiley & Sons Ltd. pp 31-71.
- Fennell, T. R., Sumner, S., Snyder, R. W., Burgess, J. P., & Friedman, M. A. (2006). Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences*, 93(2), 256-267.
doi:10.1093/toxsci/kfl069
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751-760.
doi:10.1016/j.nutres.2009.09.016
- Fernández, C., Lorenzo, H., Vrotsou, K., Aresti, U., Rica, I., Sánchez, E. (2011). Curvas y tablas de crecimiento (Estudio transversal). In Instituto de Investigación sobre Crecimiento y Desarrollo. Estudio de crecimiento de Bilbao. pp. 12–26.
- Fernández, F.S., Pardo, O., Coscollà, C., & Yusà, V. on behalf of the BETTERMILK project. (2022). Exposure assessment of Spanish lactating mothers to acrylamide via human biomonitoring. *Environmental Research*, 203, 111832.
doi:10.1016/j.envres.2021.111832
- Filgueiras, A.R., Pires de Almeida, V.B., Koch Nogueira, P.C., Alvares Domene, S.M., Eduardo da Silva, C., Sesso, R., & Sawaya, A.L. (2019). Exploring the consumption of ultra-processed foods and its association with food addiction in overweight children. *Appetite*, 135, 137-145.
doi:10.1016/j.appet.2018.11.005
- Fiore, A., Mogol, B. A., Roullier, V., Gourdon, A., Jian, S.E.M., Hamzahoglu, B.A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Controlling the Maillard Reaction by Reactant Encapsulation: Sodium Chloride in Cookies. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry, 60(43), 10808-10814.
[doi:10.1021/jf3026953](https://doi.org/10.1021/jf3026953)
- Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 631-653.
[doi:10.1021/jf950394r](https://doi.org/10.1021/jf950394r)
- Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4504-4526.
[doi:10.1021/jf030204+](https://doi.org/10.1021/jf030204+)
- Fogliano, V., & Morales, F.J. (2011). Estimation of dietary intake of melanoidins from coffee and bread. *Food & Function*, 2, 117-123.
[doi:10.1039/C0FO00156B](https://doi.org/10.1039/C0FO00156B)
- ## G
- Gerrard, J.A., Brown, P., & Fayle, S.E. (2003). Maillard crosslinking of food proteins III: the effects of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde upon bread and croissants. *Food Chemistry*, 80(1), 45-50.
[doi:10.1016/s0308-8146\(02\)00233-9](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00233-9)
- González, N., Marquès, M., Calderón, J., Collantes, R., Corraliza, L., Timoner, I., Bosch, J., Castell, V., Domingo, J. L., & Nadal, M. (2022). Occurrence and dietary intake of food processing contaminants (FPCs) in Catalonia, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106, 104272.
[doi:10.1016/j.jfca.2021.104272](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104272)
- Gooderham, N.J., Murray, S., Lynch, A. M., Yadollahi-Farsani, M., Zhao, K., Boobis, A.R., & Davies, D.S. (2001). Food-Derived heterocyclic amine mutagens: variable metabolism and significance to humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(4), 529-534. Disponible en: <http://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/29/4/529.full.pdf>
- Granda, C., Moreira, R.L., & Tichy, S.E. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. *Journal of Food Science*, 69(8), E405-E411.
[doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb09903.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09903.x)
- Granvogl, M., Jezussek, M., Koehler, P., & Schieberle, P. (2004). Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes - A minor but potent precursor in acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4751-4757.
[doi:10.1021/jf049581s](https://doi.org/10.1021/jf049581s)
- Gu, W., Zhang, J., Ren, C., Gao, Y., Zhang, T., Long, Y., Wei, W., Hou, S., Sun, C., Wang, C., Jiang, W., & Zhao, J. (2022). The association between biomarkers of acrylamide and cancer mortality in U.S. adult population: Evidence from NHANES

2003-2014. *Frontiers in Oncology*, 12, 970021.
[doi:10.3389/fonc.2022.970021](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.970021)

H

- Habinshuti, I., Chen, X. R., Yu, J., Mukeshimana, O., Duhoranimana, E., Karangwa, E., Muhoza, B., Zhang, M., Xia, S., & Zhang, X.Y. (2019). Antimicrobial, antioxidant and sensory properties of Maillard reaction products (MRPs) derived from sunflower, soybean and corn meal hydrolysates. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 101, 694-702.
[doi:10.1016/j.lwt.2018.11.083](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.083)
- Halford, N.G., Curtis, T.Y., Muttucumaru, N., Postles, J., Elmore, J.S., & Mottram, D.S. (2012a). The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 2841-2851.
[doi:10.1093/jxb/ers011](https://doi.org/10.1093/jxb/ers011)
- Halford, N.G., Muttucumaru, N., Powers, S.J., Gillatt, P., Hartley, L., Elmore, J. S., & Mottram, D.S. (2012b). Concentrations of free amino acids and sugars in nine potato varieties: effects of storage and relationship with acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12044-12055.
[doi:10.1021/jf3037566](https://doi.org/10.1021/jf3037566)
- Hamzalıoğlu, A., & Gökmen, V. (2015). Investigation of the reactions of acrylamide during *in vitro* multistep enzymatic digestion of thermally processed foods. *Food & Function*, 6(1), 108-113.
[doi:10.1039/c4fo00884g](https://doi.org/10.1039/c4fo00884g)
- Hamzalıoğlu, A., & Gökmen, V. (2020). 5-Hydroxymethylfurfural accumulation plays a critical role on acrylamide formation in coffee during roasting as confirmed by multiresponse kinetic modelling. *Food Chemistry*, 318, 126467.
[doi:10.1016/j.foodchem.2020.126467](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126467)
- Heaney, R.P. (2001). Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *Journal of Nutrition*, 131(4), 1344S-1348S.
[doi:10.1093/jn/131.4.1344s](https://doi.org/10.1093/jn/131.4.1344s)
- Hemmler, D., Roullier-Gall, C., Marshall, J.R., Rychlik, M., Taylor, A.M., & Schmitt-Kopplin, P. (2018). Insights into the chemistry of non-enzymatic browning reactions in different ribose-amino acid model systems. *Scientific Reports*, 8, 16879.
[doi:10.1038/s41598-018-34335-5](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34335-5)
- Henle, T. (2005). Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids*, 29(4), 313-322.
[doi:10.1007/s00726-005-0200-2](https://doi.org/10.1007/s00726-005-0200-2)

- Hidalgo, F.J., Delgado, R.M.G., & Zamora, R. (2009). Degradation of asparagine to acrylamide by carbonyl-amine reactions initiated by alkadienals. *Food Chemistry*, 116(3), 779-784.
[doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.020](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.020)
- Hidalgo, F.J., Delgado, R.M., & Zamora, R. (2010). Role of mercaptans on acrylamide elimination. *Food Chemistry*, 122(3), 596-601.
[doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.016](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.016)
- Hillman, M., Weström, B., Aalaei, K., Erlanson-Albertsson, C., Wolinski, J., Lozinska, L., Sjöholm, I., Rayner, M., & Landin-Olsson, M. (2019). Skim milk powder with high content of Maillard reaction products affect weight gain, organ development and intestinal inflammation in early life in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 78-84.
[doi:10.1016/j.fct.2018.12.015](https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.015)
- Hodge, J.E. (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(15), 928-943.
[doi:10.1021/jf60015a004](https://doi.org/10.1021/jf60015a004)
- Hofmann, T. (1998). Acetylformoin a chemical switch in the formation of colored Maillard reaction products from hexoses and primary and secondary amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 3918-3928.
[doi:10.1021/jf980512l](https://doi.org/10.1021/jf980512l)
- Hogervorst, J.G.F., De Bruijn-Geraets, D., Schouten, L.J., Van Engeland, M., De Kok, T.M., Goldbohm, R.A., Van Den Brandt, P.A., & Weijnenberg, M.P. (2014). Dietary acrylamide intake and the risk of colorectal cancer with specific mutations in KRAS and APC. *Carcinogenesis*, 35(5), 1032-1038.
[doi:10.1093/carcin/bgu002](https://doi.org/10.1093/carcin/bgu002)
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73-82.
[doi:10.1016/j.copbio.2008.03.003](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.003)
- Hradecky, J., Kludská, E., Belkova, B., Wagner, M., & Hajslova, J. (2017). Ohmic heating: A promising technology to reduce furan formation in sterilized vegetable and vegetable/meat baby foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43(C), 1-6.
[doi:10.1016/j.ifset.2017.07.018](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.018)
- Hurrel, R. F. (1990). Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of food. In P.A. Finot, H. V. Aeshbacher, K. F. Hurrel, K. Liardon (ed), *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.

I

Ibarz, A., Garvín, A., Garza, S., & Pagán, J. (2009). Toxic effect of melanoidins from glucose–asparagine on trypsin activity. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2071-2075. doi:10.1016/j.fct.2009.05.025

IARC. (1986). Some chemicals used in plastic and elastomers. IARC monographs on the evaluation of carcinogens risk of chemical to humans, (volume 39). Disponible en: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Chemicals-Used-In-Plastics-And-Elastomers-1986>

IARC. (1994). Some industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation for carcinogenic risk of chemicals to humans, 60, 489–425. Disponible en: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono60.pdf>

IARC. (2010). World Health Organization. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans In Some nonheterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, (Volume 92). Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/index.php>

J

Jackson, L.S., & Al-Taher, F. (2005). Effects of consumer food preparation on acrylamide formation In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Nature. pp.447-465. doi:10.1007/0-387-24980-x_34

Jakobsen, L., Granby, K., Knudsen, V., Nauta, M., Pires, S., & Poulsen, M. (2016). Burden of disease of dietary exposure to acrylamide in Denmark. *Food and Chemical Toxicology*, 90, 151–159. doi:10.1016/j.fct.2016.01.021

Jalón, M. (2006). Estimación de la ingesta de nutrientes mediante los estudios de dieta total. *Endocrinología y Nutrición*, 52(5), 300-308. Disponible en: <http://www.elsevier.es/en/node/2046205>

Jeong, H., Hwang, S., & Kwon, H. (2020). Survey for acrylamide in processed foods from Korean market and individual exposure estimation using a non-parametric probabilistic model. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37, 916–930. doi:10.1080/19440049.2020.1746410

Jibril, H., Abdulkarim, S.M., Iliayau, R., & Abubakar, S.A. (2022). Factors that influence acrylamide formation in fried foods: A review. *Dutse Journal*

of Pure and Applied Sciences, 8(3b), 55-67.

[doi:10.4314/dujopas.v8i3b.6](https://doi.org/10.4314/dujopas.v8i3b.6)

Jin, C., Wu, X., & Zhang, Y. (2013). Relationship between antioxidants and acrylamide formation: A review. *Food Research International*, 51(2), 611-620.

[doi:10.1016/j.foodres.2012.12.047](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.047)

K

Kadawathagedara, M., Botton, J., De Lauzon-Guillain, B., Meltzer, H.M., Alexander, J., Brantsæter, A.L., Haugen, M., & Papadopoulou, E. (2018). Dietary acrylamide intake during pregnancy and postnatal growth and obesity: Results from the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Environment International*, 113, 325-334.

[doi:10.1016/j.envint.2018.01.004](https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.01.004)

Kaspchak, E., Mafra, L.I., & Mafra, M. R. (2022). Antinutrient and sugar type effect on structure and Maillard reaction of bovine serum albumin submitted to mild heating. *ACS food science & technology*, 2(9), 1468-1476.

[doi:10.1021/acsfoodscitech.2c00180](https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.2c00180)

Katen, A.L., & Roman, S. D. (2015). The genetic consequences of paternal acrylamide exposure and potential for amelioration. *Mutation Research: Fundamental And Molecular*

Mechanisms Of Mutagenesis, 777, 91-100.

[doi:10.1016/j.mrfmmm.2015.04.008](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.04.008)

Katragadda, H. R., Fullana, A., Sidhu, S., & Carbonell-Barrachina, A.A. (2010). Emissions of volatile aldehydes from heated cooking oils. *Food Chemistry*, 120(1), 59-65.

[doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.070](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.070)

Kaye, Y. K., Easa, A. M., & Ismail, N. (2001). Reducing weight loss of retorted soy protein tofu by using glucose- and microwave-pre-heating treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(4), 387-392.

[doi:10.1046/j.1365-2621.2001.00471.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00471.x)

Kettlitz, B., Scholz, G., Theurillat, V., Cselovszky, J., Buck, N., Hagan, S. O., Mavromichali, E., Ahrens, K., Kraehenbuehl, K., Scozzi, G., Weck, M.M., Vinci, C., Sobieraj, M., & Stadler, R.H. (2019). Furan and methylfurans in foods: An update on occurrence, mitigation, and risk assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 738-752.

[doi:10.1111/1541-4337.12433](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12433)

Kita, A., & Lisińska, G. (2005). The influence of oil type and frying temperatures on the texture and oil content of French fries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2600-2604.

- [doi:10.1002/jsfa.2319](https://doi.org/10.1002/jsfa.2319)
- Kito, K., Ishihara, J., Yamamoto, J., Hosoda T., Kotemori, A., Takachi, R., Nakamura, K., Tanaka, J., Yamaji, T., Shimazu, T., Ishii, Y., Sawada, N., Iwasaki, M., Iso, H., Sobue, T., & Tsugane, S. (2020). Variations in the estimated intake of acrylamide from food in the Japanese population. *Nutritional Journal*, 19, 1-9.
[doi:10.1186/s12937-020-00534-y](https://doi.org/10.1186/s12937-020-00534-y)
- Knol, J., Van Loon, W.A.M., Linssen, J. P. H., Ruck, A., Van Boekel, M.A., & Voragen, A.G.J. (2005). Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose–asparagine reaction system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 6133-6139.
[doi:10.1021/jf050504m](https://doi.org/10.1021/jf050504m)
- Kocadağlı, T., & Gökmen, V. (2016). Metabolism of acrylamide in humans and biomarkers of exposure to acrylamide In Elsevier Inc (ed). *Acrylamide in food: Analysis, content and potential health effects*. Chapter 6. pp 109-128.
[doi:10.1016/B978-0-12-802832-2.00006-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00006-1)
- Kotemori, A., Ishihara, J., Zha, L., Liu, R., Sawada, N., Iwasaki, M., Sobue, T., & Tsugane, S. & JPHC Study Group. (2018). Dietary acrylamide intake and risk of breast cancer: The Japan public health center-based prospective study. *Cancer Science*, 109, 843–853.
[doi:10.1111/cas.13496](https://doi.org/10.1111/cas.13496)
- Konings, E.J.M., Baars, A.M., Van Klaveren, J., Spanjer, M.C., Rensen, P., Hiemstra, M., Van Kooij, J.A., & Peters, P. (2003). Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food and Chemical Toxicology*, 41(11), 1569-1579.
[doi:10.1016/s0278-6915\(03\)00187-x](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00187-x)
- Kowalska, M., Zbikowska, A., Onacik-Gür, S., & Kowalska, D. (2017). Acrylamide in food products, eating habits and consumer awareness among Medical School students. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24, 570–574.
[doi:10.5604/12321966.1232764](https://doi.org/10.5604/12321966.1232764)
- Kukuminato, S., Koyama, K., & Koseki, S. (2021). Antibacterial properties of melanoidins produced from various combinations of Maillard reaction against pathogenic bacteria. *Microbiology spectrum*, 9(3), e01142-21.
[doi:10.1128/spectrum.01142-21](https://doi.org/10.1128/spectrum.01142-21)
- Kumar, D., Singh, B.P., & Kumar, P. (2004). An overview of the factors affecting sugar content of potatoes. *Annals of Applied Biology*, 145(3), 247-256.
[doi:10.1111/j.1744-7348.2004.tb00380.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00380.x)

- Kwak, E.J., & Lim, S.S. (2004). The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. *Amino Acids*, 27, 85-90.
[doi:10.1007/s00726-004-0067-7](https://doi.org/10.1007/s00726-004-0067-7)
- Kukurová, K., Morales, F.J., 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.
[doi:10.1002/mnfr.200800600](https://doi.org/10.1002/mnfr.200800600)
- ## L
- Lambert, M., Inthavong, C., Hommet, F., Leblanc, J.C., Hulin, M., & Guérin, T. (2018). Levels of acrylamide in foods included in ‘the first French total diet study on infants and toddlers’. *Food Chemistry*, 240, 997–1004.
[doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.035](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.035)
- Lee, S., & Kim, H.J. (2020). Dietary exposure to acrylamide and associated health risks for the Korean population. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 7619.
[doi:10.3390/ijerph17207619](https://doi.org/10.3390/ijerph17207619)
- Lertittikul, W., Benjakul, S., & Tanaka, M. (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 100(2), 669-677.
[doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.085](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.085)
- Li, H.T., Li, Z., Foxc, G. P., Gidleya, M. J., & Dhital, S. (2021). Protein-starch matrix plays a key role in enzymic digestion of high-amylose wheat noodle. *Food Chemistry*, 336, 127719.
[doi:10.1016/j.foodchem.2020.127719](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127719)
- Li, Y., Liu, J., Wang, Y., & Wei, Q. (2022). Cancer risk and disease burden of dietary acrylamide exposure in China, 2016. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113551.
[doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113551](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113551)
- Li, Y., Skibsted, L.H., Andersen, M.L., Davies, M.J., & Lund, M.N. (2016). Quinone-induced protein modifications: Kinetic preference for reaction of 1,2-benzoquinones with thiol groups in proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, 148-157.
[doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.019](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.019)
- Li, L., Sun, N., Zhang, L., Xu, G., Liu, J., Hu, J., Zhang, Z., Lou, J., Deng, H., Shen, Z. & Han, L. (2020). Fast food consumption among young adolescents aged 12–15 years in 54 low- and middle-income countries. *Global Health Action*, 13, 1795438.
[doi:10.1080/16549716.2020.1795438](https://doi.org/10.1080/16549716.2020.1795438)

- Lineback, D.R., Coughlin, J.R., & Stadler, R.H. (2012). Acrylamide in foods: A review of the science and future considerations. *Annual review of food science and technology*, 3(1), 15-35.
[doi:10.1146/annurev-food-022811-101114](https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101114)
- Ling, A.R. (1908). Malting. *Journal of The Institute of Brewing*, 14(6), 494-521.
[doi:10.1002/j.2050-0416.1908.tb02233.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1908.tb02233.x)
- Lingnert, H., Grivas, S., Jägerstad, M., Skog, K., Törnqvist, M., & Åman, P. (2002). Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 46(4), 159-172.
[doi:10.1080/110264802762225273](https://doi.org/10.1080/110264802762225273)
- Liu, H., Han, Y., Wang, N., Zheng, Y., & Wang, X.Z. (2020). Formation and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from different sugar-amino acid aqueous model systems of sesame roasting. *Journal of Oleo Science*, 69(4), 391-401.
[doi:10.5650/jos.ess19336](https://doi.org/10.5650/jos.ess19336)
- LoPachin, R.M. (2004). The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 25(4), 617-630.
[doi:10.1016/j.neuro.2004.01.004](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2004.01.004)
- LoPachin, R.M., Schwarcz, A.I., Gaughan, C.L., Mansukhani, S., & Das, S. (2004). *In vivo* and *in vitro* effects of acrylamide on synaptosomal neurotransmitter uptake and release. *Neurotoxicology*, 25(3), 349-363.
[doi:10.1016/s0161-813x\(03\)00149-9](https://doi.org/10.1016/s0161-813x(03)00149-9)
- Luevano-Contreras, C., & Chapman-Novakofski, K. (2010). Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*, 2(12), 1247-1265.
[doi:10.3390/nu2121247](https://doi.org/10.3390/nu2121247)
- Lujan-Barroso, L., González, C.A., Slimani, N., Obón-Santacana, M., Ferrari, P., Freisling, H., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Racine, A., Katzke, V., Kühn, T., Tjønneland, A., Olsen, A., Quirós, J.R., Sánchez-Cantalejo, E., Amiano, P., Navarro, C., Barricarte, A., Khaw, K.T., Wareham, N., Travis, R.C., Trichopoulou, A., Bamia, C., Benetou, V., Saieva, C., Gioni, S., Tumino, R., Vineis, P., Mattiello, A., Bueno-de-Mesquita, H.B., Siersema, P.D., Numans, M.E., Peeters, P.H., Ericson, U., Wirfält, E., Sund, M., Johansson, M, Weiderpass, E., Skeie, G., Riboli, E., Boeing, H., & DuellTj, E.J. (2014). Dietary intake of acrylamide and esophageal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Cancer Causes Control*. 2014, 25, 639–646.
[doi:10.1007/s10552-014-0359-5](https://doi.org/10.1007/s10552-014-0359-5)

- Lund, M.N., & Ray, C. (2017). Control of Maillard reactions in foods: Strategies and chemical mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(23), 4537-4552.
[doi:10.1021/acs.jafc.7b00882](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00882)
- Luo, Y., Long, T., Chiang, S.Y., & Wu, K. (2021). Characterization of primary glutathione conjugates with acrylamide and glycidamide: Toxicokinetic studies in Sprague Dawley rats treated with acrylamide. *Chemico-Biological Interactions*, 350, 109701.
[doi:10.1016/j.cbi.2021.109701](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109701)
- ## M
- Maan, A.A., Anjum, M.A., Khan, M.U. G., Nazir, A., Saeed, F., Afzaal, M., & Aadil, R.M. (2020). Acrylamide formation and different mitigation strategies during food processing - A review. *Food Reviews International*, 38(1), 70-87.
[doi:10.1080/87559129.2020.1719505](https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1719505)
- Maillard, L. C. (1912). Action des acides amines sur les sucres: formation des melanodines par voie methodique. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 154, 66-68.
- Malec, L.S., Gonzales, A.P., Naranjo, G.B., & Vigo, M.S. (2002). Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk like system. *Food Research International*, 35(9), 849-853.
[doi:10.1016/s0963-9969\(02\)00088-1](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(02)00088-1)
- Marlowe, C., Clark, M.A., Mast, R.W., Friedman, M.A., & Waddell, W.R. (1986). The distribution of [¹⁴C]-acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 86(3), 457-465.
[doi:10.1016/0041-008x\(86\)90373-x](https://doi.org/10.1016/0041-008x(86)90373-x)
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2021). Informe del consumo alimentario en España en 2020. Disponible en:
https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-anual-consumo-2020-v2-nov2021-baja-res_tcm30-562704.pdf
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2023). Informe del consumo alimentario en España en 2022. Disponible en:
https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-2022-baja-res_tcm30-655390.pdf
- Marsh, G.M., Lucas, L.J., Youk, A.O., & Lc, S. (1999). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occupational and Environmental Medicine*, 56(3), 181-190.
[doi:10.1136/oem.56.3.181](https://doi.org/10.1136/oem.56.3.181)

- Martínez-Montegudo, S.I., & Saldaña, M.D. (2014). Chemical reactions in food systems at high hydrostatic pressure. *Food Engineering Reviews*, 6(4), 105-127.
[doi:10.1007/s12393-014-9087-6](https://doi.org/10.1007/s12393-014-9087-6)
- Martins, S., Jongen, W.M., & Van Boekel, M.A. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9-10), 364-373.
[doi:10.1016/s0924-2244\(01\)00022-x](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(01)00022-x)
- Mauron, J. (1981). The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint. *Progress in food & nutrition science*, 5(1-6), 5-35.
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., & Morales, F.J. (2019a). Alternative food matrices for snack formulations in terms of acrylamide formation and mitigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 2048-2051.
[doi:10.1002/jsfa.9354](https://doi.org/10.1002/jsfa.9354)
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F., & Morales, F.J. (2019b). Acrylamide content in French fries prepared in food service establishments. *LWT*, 100, 83-91.
[doi:10.1016/j.lwt.2018.10.050](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.050)
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F., & Morales, F.J. (2020). Acrylamide in French fries prepared at primary school canteens. *Food & Function*, 11, 1489-1497.
[doi:10.1039/C9FO02482D](https://doi.org/10.1039/C9FO02482D)
- Mesías, M., Holgado, F., Márquez-Ruiz, G., & Morales, F.A.J. (2015). Effect of sodium replacement in cookies on the formation of process contaminants and lipid oxidation. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 62(1), 633-639.
[doi:10.1016/j.lwt.2014.11.028](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.028)
- Mesías García, M., Seiquer, I., Delgado-Andrade, C., Galdó, G., & Navarro, M.P. (2009). Intake of Maillard reaction products reduces iron bioavailability in male adolescents. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(12), 1551-1560.
[doi:10.1002/mnfr.200800330](https://doi.org/10.1002/mnfr.200800330)
- Mesías, M., Seiquer, I., & Navarro, M.P. (2009). Influence of diets rich in Maillard reaction products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9532-9538.
[doi:10.1021/jf9018646](https://doi.org/10.1021/jf9018646)
- Mesías, M., Seiquer, I., & Navarro, M.P. (2012). Consumption of highly processed foods: Effects on bioavailability and status of zinc and copper in adolescents. *Food Research International*, 45(1), 184-190.
[doi:10.1016/j.foodres.2011.09.030](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.030)

- Mestdagh, F., Lachat, C., Baert, K., Moons, E., Kolsteren, P., Van Peteghem, C., & De Meulenaer, B. (2007). Importance of a canteen lunch on the dietary intake of acrylamide. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 509–516.
[doi:10.1002/mnfr.200600253](https://doi.org/10.1002/mnfr.200600253)
- Mojska, H., Gielecińska I, Szponar, L., & Oltarzewski, M. (2010). Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2090–2096.
[doi:10.1016/j.fct.2010.05.009](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.009)
- Moliní Cabrera, D. (2007). Repercusiones de la comida rápida en la sociedad. Trastornos de la conducta alimentaria, 6, 635-659. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2480144>
- Monteiro, C.A., Cannon, G., Lawrence, M., da Costa Louzada, M.L., & Pereira Machado, P. (2019). Ultra-processed foods, diet quality, and health using the NOVA classification system. FAO. Roma. Disponible en:
<https://www.fao.org/3/ca5644en/ca5644en.pdf>
- Monteiro, C.A., Moubarac, J.C., Levy, R.B., Canella, D.S., Louzada, M.L.D.C. & Cannon, G. (2018). Household availability of ultra-processed foods and obesity in nineteen European countries. *Public Health Nutrition*, 21, 18–26.
[doi:10.1017/S1368980017001379](https://doi.org/10.1017/S1368980017001379)
- Moosburger, R., Lage Barbosa, C., Haftenberger, M., Brettschneider, A, Lehmann, F., Kroke, A., & Mensin, G.B.M. (2020). Fast food consumption among 12- to 17-year-olds in Germany – Results of EsKiMo II. *Journal of Health Monitoring*, 5(1), 3-18.
[doi:10.25646/6398](https://doi.org/10.25646/6398)
- Morales, F.J., Mesías, M. & Delgado-Andrade, C. (2018). Acrilamida en alimentos: una visión desde la investigación científica. Resumen de la charla ofrecida en la Jornada sobre Acrilamida: bases científicas y novedades reglamentarias, ACTA/CL, Palencia, abril 2018. Disponible en:
<http://hdl.handle.net/10261/203194>
- Morales, F.J., Somoza, V., & Fogliano, V. (2012). Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, 42(4), 1097-1109.
[doi:10.1007/s00726-010-0774-1](https://doi.org/10.1007/s00726-010-0774-1)
- Moreno Navarro, I., Armendáriz, C.R., Fernández, Á.M., Fernández, A.I., & De La Torre, A.H. (2007). La acrilamida, contaminante químico de procesado. *Revista de toxicología*, 24(1), 1-9. Disponible en:
<https://idus.us.es/handle/11441/26098>
- Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., & Dodson, A. (2002). Acrylamide is

- formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419(6906), 448-449.
doi:[10.1038/419448a](https://doi.org/10.1038/419448a)
- Mucci, L.A., & Wilson, K.M. (2008). Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6013-6019.
doi:[10.1021/jf703747b](https://doi.org/10.1021/jf703747b)
- Murata, M. (2021). Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction. *Glycoconjugate Journal*, 38(3), 283-292.
doi:[10.1007/s10719-020-09943-x](https://doi.org/10.1007/s10719-020-09943-x)
- Murkovic, M., & Derler, K. (2006). Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 69(1-2), 25-32.
doi:[10.1016/j.jbbm.2006.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.02.001)
- N**
- Nardocci, M., Leclerc, B.S., Louzada, M.L., Monteiro, C.A., Batal, M., & Moubarac, J.C. (2019). Consumption of ultra-processed foods and obesity in Canada. *Canadian Journal of Public Health*, 110 (1), 4-14.
doi:[10.17269/s41997-018-0130-x](https://doi.org/10.17269/s41997-018-0130-x)
- Navarro, M.P., Aspe, T., & Seiquer, I. (2000). Zinc transport in Caco-2 cells and zinc balance in rats: Influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3589-3596.
doi:[10.1021/jf990832k](https://doi.org/10.1021/jf990832k)
- NCD RisC (NCD Risk Factor Collaboration). (2020). Height and body-mass index trajectories of school-aged children and adolescents from 1985 to 2019 in 200 countries and territories: a pooled analysis of 2181 population-based studies with 65 million participants. *Lancet*, 396, 1511-1524.
doi:[10.1016/S0140-6736\(20\)31859-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31859-6)
- Nelson, M., & Bingham, S. (1997). Assessment of food consumption and nutrient intake In Margetts BM, Nelson M (ed). *Design concepts in nutritional epidemiology*. Second edition Oxford: Oxford University Press. pp 123-169.
- Nematollahi, A., Kamankesh, M., Hosseini, H., Ghasemi, J., Hosseini-Esfahani, F., Mohammadi, A. & Mousavi Khaneghah, A. (2020). Acrylamide content of collected food products from Tehran's market: a risk assessment study. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 30558-30570.
doi:[10.1007/s11356-020-09323-w](https://doi.org/10.1007/s11356-020-09323-w)
- Nooshkam, M., Varidi, M., & Verma, D. K. (2020). Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical

and food: A review. *Food Research International*, 131, 109003.

[doi:10.1016/j.foodres.2020.109003](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109003)

Normandin, L., Bouchard, M., Ayotte, P., Blanchet, C., Becalski, A., Bonvalot, Y., Phaneuf, D., Lapointe, C., Gagné, M., & Courteau, M. (2013). Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 75–83. [doi:10.1016/j.fct.2013.03.005](https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.005)

Nursten, H.E. (1986). Concentration and Drying of Foods In D. MacCarthy (ed), *Maillard browning reaction in dried food*. Elsevier Applied Science. pp 53-68.

Nursten, H.E. (2005). Introduction In H.E. Nursten (ed). *The Maillard reaction. Chemistry, biochemistry and implications*. The Royal Society of Chemistry. pp 5-30.

O

Obón-Santacana, M., Kaaks, R., Slimani, N., Lujan-Barroso, L., Freisling, H., Ferrari, P., Dossus, L., Chabbert-Buffet, N., Baglietto, L., Fortner, R. J., Boeing, H., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Menéndez, V., Molina-Montes, E., Larrañaga, N., Chirlaque, M.D., Ardanaz, E., Khaw, K.T., Wareham, N.J., Travis, R.C., Lu, Y., Merritt, M.A., Trichopoulou, A., Benetou, V., Trichopoulos, D., Saieva, C., Sieri, S., Tumino, R., Sacerdote, C., Galasso, R., Bueno de

Mesquita, H.B., Wirfält, E., Ericson, U., Idahl, A., Ohlson, N., Skeie, G., Gram, I.T. Widerpass, E., Onland-Moret, N.C., Riboli, E., & Duell, E.J. (2014). Dietary intake of acrylamide and endometrial cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *British Journal of Cancer*, 111(5), 987-997.

[doi:10.1038/bjc.2014.328](https://doi.org/10.1038/bjc.2014.328)

O'Brien, J.T., & Morrissey, P.A. (1989). Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(3), 211-248.

[doi:10.1080/10408398909527499](https://doi.org/10.1080/10408398909527499)

Oliver, C., Melton, L.D., & Stanley, R. (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(4), 337-350.

[doi:10.1080/10408690590957250](https://doi.org/10.1080/10408690590957250)

Olsen, A., Christensen, J., Outzen, M., Olesen, P.T., Frandsen, H.L., Overvad, K., & Halkjær, J. (2012). Pre-diagnostic acrylamide exposure and survival after breast cancer among postmenopausal Danish women. *Toxicology*, 296(1-3), 67-72.

[doi:10.1016/j.tox.2012.03.004](https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.03.004)

Omofuma, O.O., Turner, D.P., Peterson, L.L., Merchant, A.T., Zhang, J., & Steck, S.E. (2020). Dietary Advanced

- glycation End-products (AGE) and risk of breast cancer in the prostate, lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial (PLCO). *Cancer Prevention Research*, 13(7), 601-610. doi:10.1158/1940-6207.capr-19-0457
- Ortega, R.M., Pérez-Rodrigo, C., & López-Sobaler, A.M. (2015). Dietary assessment methods: dietary records. *Nutrición Hospitalaria*, 31, 38-45. doi:10.3305/nh.2015.31.sup3.8749
- Öste, R., Dahlqvist, A., Sjoestroem, H., Norén, O., & Miller, R. (1986). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. *In vitro* studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(2), 355-358. doi:10.1021/jf00068a051
- Öste, R.E., Miller, R., Sjoestroem, H., & Norén, O. (1987). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(6), 938-942. doi:10.1021/jf00078a020
- P**
- Parzefall, W. (2008). Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1360-1364. doi:10.1016/j.fct.2007.08.027
- Pastoriza, S., Rufián-Henares, J. Á., & Morales, F. J. (2012). Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 198-203. doi:10.1016/j.lwt.2011.08.004
- Patrignani, M., Rinaldi, G., & Lupano, C. E. (2016). *In vivo* effects of Maillard reaction products derived from biscuits. *Food Chemistry*, 196, 204-210. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.038
- Pedersen, M., Von Stedingk, H., Botsivali, M., Agramunt, S., Alexander, J., Brunborg, G., Chatzi, L., Fleming, S., Fthenou, E., Granum, B., Gützkow, K.B., Hardie, L.J., Knudsen, L.E., Kyrtopoulos, S.A., Mendez, M.A., Merlo, D.F., Nielsen, J.K., Rydberg, P., Segerbäck, D., Sunyer, J., Wright, J., Törnqvist, M., Kleinhans, J.C., & Kogevinas, M. (2012). Birth weight, head circumference, and prenatal exposure to acrylamide from maternal diet: The European Prospective Mother-Child Study (NewGeneris). *Environmental Health Perspectives*, 120(12), 1739-1745. doi:10.1289/ehp.1205327
- Pedreschi, F. (2009). Fried and dehydrated potato products. In *Advances in potato chemistry and technology*; Jaspreet, S., Lovedeep, K. (ed). Academic Press: San Diego, CA, USA. pp. 319-337.
- Pedreschi, F., Kaack, K., & Granby, K. (2008). The effect of asparaginase on

- acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry*, 109(2), 386-392.
[doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.057](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.057)
- Pedreschi, F., Mariotti, M.S., & 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.
[doi:10.1002/jsfa.6349](https://doi.org/10.1002/jsfa.6349)
- Pelucchi, C., Rosato, V., Bracci, P.M., Li, D., Neale, R.E., Lucenteforte, E., Serraino, D., Anderson, K.E., Fontham, E., Holly, E.A., Hassan, M.M., Polesel, J., Bosetti, C., Strayer, L. Su, J., Boffetta, P., Duell, E.J., & La Vecchia, C. (2017). Dietary acrylamide and the risk of pancreatic cancer in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology*, 28, 408-414.
[doi:10.1093/annonc/mdw618](https://doi.org/10.1093/annonc/mdw618)
- Perera, C., & Embuscado, M.E. (2014). Texture design for breaded and battered foods In Dar, Y.L., Light, J.M. (ed). *Food texture design and optimization*. Wiley Blackwell: Chicago, IL, USA. pp. 128-158.
- Pérez-Burillo, S., Molino, S., Navajas-Porras, B., Valverde-Moya, A.J., Hinojosa-Nogueira, D., López-Maldonado, A., Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J.A. (2021). An *in vitro* batch fermentation protocol for studying the contribution of food to gut microbiota composition and functionality. *Nature protocols*, 16, 3186-3209.
[doi:10.1038/s41596-018-0119-1](https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1)
- Pérez-Rodrigo, C., Gianzo, M., Bárbara, G.H., y Aranceta-Bartrina, J. (2022). Prevalencia de obesidad y obesidad abdominal en la población española de 65 y más años de edad: estudio ENPE. *Medicina Clínica*, 158(2), 49-57.
[doi:10.1016/j.medcli.2020.10.025](https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.10.025)
- Pettigrew, S., Jongenelis, M., Maganja, D., Hercberg, S., & Julia, C. (2024). The ability of nutrition warning labels to improve understanding and choice outcomes among consumers demonstrating preferences for unhealthy foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 124(1), 58-64.
[doi:10.1016/j.jand.2023.08.135](https://doi.org/10.1016/j.jand.2023.08.135)
- Pieczonka, S.A., Hemmler, D., Moritz, F., Lucio, M., Zarnkow, M., Jacob, F., Rychlik, M., & Schmitt-Kopplin, P. (2021). Hidden in its color: A molecular-level analysis of the beer's Maillard reaction network. *Food Chemistry*, 361, 130112.
[doi:10.1016/j.foodchem.2021.130112](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130112)
- Porca Fernández, C., Tejera Pérez, C., Bellido Castañeda, V., García Almeida, J. M. y Bellido Guerrero, D. (2016). Nuevo enfoque en la valoración de la ingesta dietética.

Nutrición Clínica en Medicina, 2, 95-107.
doi:10.7400/NCM.2016.10.2.5040

in foods. Food Research International, 90, 154–176.
doi:10.1016/j.foodres.2016.10.037

Prasad, S.N., & Muralidhara. (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.
doi:10.1016/j.jinsphys.2013.10.003

Real Decreto 1047/2002, de 18 de Octubre por el que se regula el proceso de elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. Ministerio de la Presidencia. B.O.E. nº 259/2002 - 29 de Octubre. Disponible en:
<https://www.boe.es/eli/es/rd/2002/10/18/1074>

Pruser, K.N., & Flynn, N.E. (2011). Acrylamide in health and disease. Frontiers in bioscience, 3(1), 41-51.
doi:10.2741/s130

Recomendación (UE) 2019/1888 de la Comisión, de 7 de noviembre de 2019, relativa al control de la presencia de acrilamida en determinados alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea L nº 290/31, de 11 de noviembre de 2019. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/2019/290/L00031-00033.pdf>

Q

Quan, W., Li, M., Jiao, Y., Zeng, M., He, Z., Shen, Q., & Chen, J. (2022). Effect of dietary exposure to acrylamide on diabetes-associated cognitive dysfunction from the perspectives of oxidative damage, neuroinflammation, and metabolic disorders. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 70(14), 4445-4456.
doi:10.1021/acs.jafc.2c00662

Recomendación (UE) 2022/495 de la Comisión de 25 de marzo de 2022 sobre el seguimiento de la presencia de furano y alquilfuranos en los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea L nº 100/60, de 28 de marzo de 2022. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/2022/100/L00060-00061.pdf>

R

Rannou, C., Laroque, D., Renault, E., Prost, C., & Sérot, T. (2016). Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction

Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. Del 30 de abril de 2004. Diario Oficial

- de la Unión Europea, L139/1. 1-54. Disponible en:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02004R0852-20210324>
- Reglamento (UE) 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L n° 365, de 20 de diciembre de 2006. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/2006/364/L00005-00024.pdf>
- Reglamento (UE) 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea L n° 12, de 15 de enero de 2011. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/2011/012/L00001-00089.pdf>
- Reglamento (UE) 835/2011 de la Comisión, de 10 de agosto de 2011, que modifica el Reglamento (CE) n.º 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L n° 215, de 20 de agosto de 2011. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/2011/215/L00004-00008.pdf>
- Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión, de 20 de noviembre de 2017, por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 1881/2006 por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea L n° 304, de 21 de noviembre de 2017. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/2017/304/L00024-00044.pdf>
- Reglamento (UE) 2018/290 de la Comisión, de 26 de febrero de 2018, por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 1881/2006 por lo que respecta a los contenidos máximos de ésteres glicidílicos de ácidos grasos en los aceites y grasas vegetales, los preparados para lactantes, los preparados de continuación y los alimentos para usos médicos especiales destinados a los lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea L n° 55, de 27 de febrero de 2018. Disponible en:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A32018R0290&from=ES>
- Reglamento de Ejecución (UE) 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) n.º 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas. Diario Oficial de la Unión Europea, 2011, L153/1. Disponible en:

- <https://www.boe.es/doue/2011/153/L00001-00186.pdf>
- Reglamento de ejecución (UE) 2019/989 de la Comisión de 17 de junio de 2019 por el que no se renueva la aprobación de la sustancia activa clorprofam con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y se modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) n.º 540/2011 de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, 2019, L160/11. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2019/160/L00011-00013.pdf>
- Rein, M., Renouf, M., Cruz-Hernández, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S.K., & Da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x
- Reis, A.R.D., Favarin, J.L., Gallo, L.A., Moraes, M. O., Tezotto, T., & Rabêlo, F.H.S. (2011). Influence of nitrogen fertilization on nickel accumulation and chemical composition of coffee plants during fruit development. *Journal of Plant Nutrition*, 34(12), 1853-1866. doi:10.1080/01904167.2011.600412
- Rérat, A., Calmes, R., Vaissade, P., & Finot, P. (2002). Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat-treated milk in the pig. *European journal of nutrition*, 41(1), 1-11. doi:10.1007/s003940200000
- Reynolds, T. (2002). Acrylamide and cancer: Tunnel leak in Sweden prompted studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(12), 876-878. doi:10.1093/jnci/94.12.876
- Rivas-Jimenez, L., Ramírez-Ortiz, K., González-Córdova, A., Vallejo-Cordoba, B., Garcia, H., & Hernandez-Mendoza, A. (2016). Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system. *Microbiological Research*, 190, 19–26. doi:10.1016/j.micres.2016.04.016
- Rufián-Henares, J.A., & De La Cueva, S.P. (2009). Antimicrobial activity of coffee melanoidins—A study of their metal-chelating properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 432-438. doi:10.1021/jf8027842
- Ruiz López, M.D., & Artacho Martín-Lagos, R. (2010) Guía para estudios dietéticos. Álbum fotográfico de alimentos In Editorial Universidad de Granada (ed).

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. doi:10.1021/jf034649

S

Saboktakin, M.R. (2012). Acrylamide, Synthesis and Properties In *Advances in chemistry research* (ed) Nova publishers. pp. 1–46.

Sansano, M., Heredia, A., Peinado, I., & Andrés, A. (2017). Dietary acrylamide: What happens during digestion. *Food Chemistry*, 237, 58-64. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.104

Schabacker, J., Schwend, T., & Wink, M. (2004). Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a Caco-2 gut model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4021–4025. doi:10.1021/jf035238w

Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., Nestares, T., Hoyos, A. M.A., Galdó, G., & Navarro, M.P. (2006). Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11–14 y. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(5), 1082-1088. doi:10.1093/ajcn/83.5.1082

Şengül, E., Gelen, V., Yildirim, S., Tekin, S., & Dag, Y. (2021). The effects of selenium in acrylamide-induced nephrotoxicity in rats: Roles of oxidative stress, inflammation, apoptosis, and DNA damage. *Biological Trace Element Research*, 199(1), 173-184. doi:10.1007/s12011-020-02111-0

Serra Majem, Ll., y Aranceta Bartrina, J. (2006). *Nutrición y salud pública: Métodos, bases científicas y aplicaciones* in Masson (ed). Elsevier.

Shen, Y., Zhao, S., Zhao, X., Sun, H., Shao, M., & Xu, H. (2019). *In vitro* adsorption mechanism of acrylamide by lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 100, 119–125. doi:10.1016/j.lwt.2018.10.058

Shim, J., Oh, K., & Kim, H. C. (2014). Dietary assessment methods in epidemiologic studies. *Epidemiology and Health*, 36, e2014009. doi:10.4178/epih/e2014009

Shipp, A.M., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T.P., Bartow, H., Bounds, J.A., MacDonald, N.C., Clewell, H. J., Allen, B.W., & Van Landingham, C. (2006). Acrylamide: Review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(6-7), 481-608. doi:10.1080/10408440600851377

- Siroto, V., Hommet, F., Tard, A., & Leblanc, J. (2012). Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 889-894.
doi:10.1016/j.fct.2011.12.033
- Smuda, M., & Glomb, M.A. (2013). Maillard degradation pathways of vitamin C. *Angewandte Chemie*, 52(18), 4887-4891.
doi:10.1002/anie.201300399
- SNT. (2002). Report from the Scientific Committee of the Norwegian Food Control Authority. Risk assessment of acrylamide intake from foods with special emphasis on cancer risk. Disponible en: <http://www.snt.no>
- Somoza, V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(7), 663-672.
doi:10.1002/mnfr.200500034
- Sörgel, F., Weissenbacher, A., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A.R., Illauer, M., Skott, A., & Landersdorfer, C.B. (2002). Acrylamide: Increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy*, 48(6), 267-274.
doi:10.1159/000069715
- S&P Global Commodity Insights. (2021). Acrylamide. Disponible en: <https://www.spglobal.com/commodityinsights/en/ci/products/acrylamide-chemical-economics-handbook.html>
- Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P.A., Robert, M., & Riediker, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419(6906), 449-450.
doi:10.1038/419449a
- Stadler, R. H., Verzeznassi, L., Varga, N., Grigorov, M., Studer, A., Riediker, S., & Schilter, B. (2003). Formation of Vinylogous Compounds in Model Maillard Reaction Systems. *Chemical Research in Toxicology*, 16(10), 1242-1250.
doi:10.1021/tx034088g
- Stadler, R.H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J., & Blank, I. (2004). In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5550-5558.
doi:10.1021/jf0495486
- Stadler, R.H., & Studer, A. (2016). Acrylamide formation mechanisms In V. Gökmen (ed). *Acrylamide in food: Analysis, content and potential health effects*. Academic Press. pp 8-11.

Summa, C., De La Calle, B., Brohée, M., Stadler, R.H., & Anklam, E. (2007). Impact of the roasting degree of coffee on the *in vitro* radical scavenging capacity and content of acrylamide. *LWT - Food Science and Technology*, 40(10), 1849-1854.
[doi:10.1016/j.lwt.2006.11.016](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.016)

Sumner, S., Williams, C., Snyder, R.W., Król, W., Asgharian, B., & Fennell, T. R. (2003). Acrylamide: A comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicological Sciences*, 75(2), 260-270.
[doi:10.1093/toxsci/kfg191](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg191)

Sun, Y., Hu, J., Zhang, S., He, H., Nie, Q., Zhang, Y., Chen, C., Geng, F., & Nie, S. (2021). Prebiotic characteristics of arabinogalactans during *in vitro* fermentation through multi-omics analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 156, 112522.
[doi:10.1016/j.fct.2021.112522](https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112522)

Swaen, G.M.H., Haidar, S., Burns, C.J., Bodner, K.M., Parsons, T., Collins, J. J., & Baase, C.M. (2006). Mortality study update of acrylamide workers. *Occupational and Environmental Medicine*, 64(6), 396-401.
[doi:10.1136/oem.2006.030130](https://doi.org/10.1136/oem.2006.030130)

T

Tareke, E., Rydberg, P.A., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4998-5006.
[doi:10.1021/jf020302f](https://doi.org/10.1021/jf020302f)

Teixeira, J.L.D.P., Pallone, J.A.L., Andrade, C.T., Mesias, M., & Seiquer, I. (2022). Bioavailability evaluation of calcium, magnesium and zinc in Brazilian cheese through a combined model of *in vitro* digestion and Caco-2 cells. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, 104365.
[doi:10.1016/j.jfca.2021.104365](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104365)

Teodorowicz, M., Hendriks, W.H., Wichers, H.J., & Savelkoul, H.F.J. (2018). Immunomodulation by processed animal feed: The role of Maillard reaction products and Advanced Glycation End-Products (AGEs). *Frontiers in Immunology*, 9, 2088.
[doi:10.3389/fimmu.2018.02088](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02088)

Thornalley, P.J. (2003). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419(1), 31-40.
[doi:10.1016/j.abb.2003.08.013](https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.013)

- Tian, Z., Chen, S., Shi, Y., Wang, P., Wu, Y., & Li, G. (2023). Dietary advanced glycation end products (dAGEs): An insight between modern diet and health. *Food Chemistry*, 415, 135735. doi:10.1016/j.foodchem.2023.135735
- Tong, P., Fuentes, D., & Hambridge, T. (2004). Australian survey of acrylamide in carbohydrate-based foods. *Food Additives & Contaminants*, 21, 721–736. doi:10.1080/02652030412331272458
- Törnqvist, M., Paulsson, B., Vikström, A., & Granath, F. (2008). Approach for cancer risk estimation of acrylamide in food on the basis of animal cancer tests and *in vivo* dosimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6004-6012. doi:10.1021/jf800490s
- Totlani, V.M., & Peterson, D.G. (2007). Influence of epicatechin reactions on the mechanisms of Maillard product formation in low moisture model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 414-420. doi:10.1021/jf0617521
- Tran, N., Barraji, L., Murphy, M., & Bi, X. (2010). Dietary acrylamide exposure and hemoglobin adducts—National Health and Nutrition Examination Survey (2003–04). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3098–3108. doi:10.1016/j.fct.2010.08.003.
- Valderrama Gutiérrez, F.F. (2018). Calentador óhmico para extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas. *Scientia et Technica*, 23(2), 160-167. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6643331.pdf>
- Van Boekel, M. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 24(2), 230-233. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.11.004
- Van Boekel, M.A., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S.P., Somoza, V., Knorr, D., Jasti, P., & Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 1215-1247. doi:10.1002/mnfr.200900608
- Vázquez-Sánchez, K., Martínez-Saez, N., Rebollo-Hernanz, M., del Castillo, M. D., Gaytán-Martínez, M., & Campos-Vega, R. (2018). *In vitro* health promoting properties of antioxidant dietary fiber extracted from spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds. *Food Chemistry*, 261, 253–259. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.064
- Vikström, A.C., Warholm, M., Paulsson, B., Axmon, A., Wirfält, E., & Törnqvist, M. (2012) Hemoglobin adducts as a measure of variations in

exposure to acrylamide in food and comparison to questionnaire data. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2531–2539.

[doi:10.1016/j.fct.2012.04.004](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.004)

Virk-Baker, M. K., Nagy, T. R., Barnes, S., & Groopman, J. D. (2014). Dietary acrylamide and human cancer: A systematic review of literature. *Nutrition and Cancer*, 66(5), 774-790. [doi:10.1080/01635581.2014.916323](https://doi.org/10.1080/01635581.2014.916323)

Von Mühlendahl, K. E., & Otto, M. (2003). Acrylamide: more than just another food toxicant? *European Journal of Pediatrics*, 162(7-8), 447-448.

[doi:10.1007/s00431-003-1206-y](https://doi.org/10.1007/s00431-003-1206-y)

W

Wada, K., Nakashima, Y., Yamakawa, M., Hori, A., Seishima, M., Tanabashi, S., Matsushita, S., Tokimitsu, N., & Nagata, C. (2022). Dietary advanced glycation end products and cancer risk in Japan: From the Takayama study. *Cancer Science*, 113(8), 2839-2848.

[doi:10.1111/cas.15455](https://doi.org/10.1111/cas.15455)

Wagner, K., Reichhold, S., Koschutnig, K., Cheriot, S., & Billaud, C. (2007). The potential antimutagenic and antioxidant effects of Maillard reaction products used as “natural antibrowning” agents. *Molecular*

Nutrition & Food Research, 51, 496-504.

[doi:10.1002/mnfr.200600141](https://doi.org/10.1002/mnfr.200600141)

Wang, H., Qian, H., & Yao, W. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), 573-584.

[doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.075](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.075)

Wedzicha, B. L., Mottram, D. S., Elmore, J. S., Koutsidis, G., & Dodson, A. (2005). Kinetic Models as a Route to Control Acrylamide Formation in Food. In *Advances in experimental medicine and biology*. Springer Nature. pp. 235-253.

[doi:10.1007/0-387-24980-x_18](https://doi.org/10.1007/0-387-24980-x_18)

WHO. (2002). Health implications of acrylamide in food, Geneva. Disponible en:

<https://iris.who.int/handle/10665/42563>

WHO. (2003). Instructions for electronic submission of data on chemical contaminants in foods-appendix 4: Evaluation of low-level contamination in foods. Disponible en:

http://www.who.int/foodsafety/chem/instructions_GEMSFood_january_2012.pdf?ua=1

WHO. (2011). Safety evaluation of certain contaminants in food. WHO Food Additives Series N°: 63. FAO

- Food and Nutrition Paper. Disponible en:
<https://www.fao.org/3/at881e/at881e.pdf>
- WHO. (2023a). Child growth standards. Weight-for-age. Disponible en:
<https://www.who.int/toolkits/child-growth-standards/standards/weight-for-age>
- WHO. (2023b). Weight-for-age (5 to 10 years) Disponible en:
<https://www.who.int/tools/growth-reference-data-for-5to19-years/indicators/weight-for-age-5to10-years>
- Willett, W. C., & Lenart, E. B. (2012). Reproducibility and validity of food-frequency questionnaires In Willett WC (ed). *Nutritional Epidemiology*. 3rd ed New York, Oxford University Press. pp 96–141.
- Wilson, T.G., Guttieri, M.J., Nelson, N., Fritz, A.K., & Tilley, M. (2020). Nitrogen and sulfur effects on hard winter wheat quality and asparagine concentration. *Journal of Cereal Science*, 93, 102969.
[doi:10.1016/j.jcs.2020.102969](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.102969)
- Wong, D.F.K., Cheng, K., & Wang, M. (2012). Inhibition of heterocyclic amine formation by water-soluble vitamins in Maillard reaction model systems and beef patties. *Food Chemistry*, 133(3), 760-766.
[doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.089](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.089)
- Wongthanyakram, J., Kheamphet, P., & Masawat, P. (2020). Fluorescence determination of acrylamide in snack, seasoning, and refreshment food samples with an IOS gadget-based digital imaging colorimeter. *Food Analytical Methods*, 13, 2290–2300.
[doi:10.1007/s12161-020-01835-y](https://doi.org/10.1007/s12161-020-01835-y)
- ## Y
- Yamamoto, J., Ishihara, J., Kotemori, A., Nakadate, M., & Sobue, T. (2018). Validity of estimated acrylamide intake by the dietary record method and food frequency questionnaire in comparison with a duplicate method: A pilot study. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64, 340–346.
[doi:10.3177/jnsv.64.340](https://doi.org/10.3177/jnsv.64.340)
- Yan, S., Wu, L., & Xue, X. (2023a). α -Dicarbonyl compounds in food products: Comprehensively understanding their occurrence, analysis, and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(2), 1387-1417.
[doi:10.1111/1541-4337.13115](https://doi.org/10.1111/1541-4337.13115)
- Yan, F., Wang, L., Zhao, L., Wang, C., Lu, Q., & Liu, R. (2023b). Acrylamide in food: Occurrence, metabolism, molecular toxicity mechanism and detoxification by phytochemicals. *Food and Chemical Toxicology*, 175, 113696.
[doi:10.1016/j.fct.2023.113696](https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113696)

- Yaylayan, V.A. (2003). Recent advances in the chemistry of strecker degradation and Amadori rearrangement: Implications to aroma and color formation. *Food Science and Technology Research*, 9(1), 1-6.
[doi:10.3136/fstr.9.1](https://doi.org/10.3136/fstr.9.1)
- Yaylayan, V.A., Wnorowski, A.A., & Locas, C.P. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1753-1757.
[doi:10.1021/jf0261506](https://doi.org/10.1021/jf0261506)
- Yaylayan, V.A., Haffenden, L.J.W., Chu, F.L., & Wnorowski, A. (2005a). Oxidative pyrolysis and postpyrolytic derivatization techniques for the total analysis of Maillard model systems: Investigation of control parameters of Maillard reaction pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), 41-54.
[doi:10.1196/annals.1333.005](https://doi.org/10.1196/annals.1333.005)
- Yaylayan, V.A., Locas, C.P., Wnorowski, A., & O'Brien, J.T. (2005b). Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. In Springer eBooks. pp. 191-203.
[doi:10.1007/0-387-24980-x_15](https://doi.org/10.1007/0-387-24980-x_15)
- Yedier, S.K., Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu, V., & Aydın, B. (2022). Cytotoxic, genotoxic, and carcinogenic effects of acrylamide on human lung cells. *Food and Chemical Toxicology*, 161, 112852.
[doi:10.1016/j.fct.2022.112852](https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112852)
- Yıldız, H.G., Palazoğlu, T.K., Miran, W., Kocadağlı, T., & Gökmen, V. (2017). Evolution of surface temperature and its relationship with acrylamide formation during conventional and vacuum-combined baking of cookies. *Journal of Food Engineering*, 197(C), 17-23.
[doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.11.001](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.001)
- Yin, J., Hedegaard, R.S.V., Skibsted, L.H., & Andersen, M.L. (2014). Epicatechin and epigallocatechin gallate inhibit formation of intermediary radicals during heating of lysine and glucose. *Food Chemistry*, 146, 48-55.
[doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.032](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.032)
- Younginer, N.A., Blake, C.E., Davison, K.K., Blaine, R.E., Ganter, C., Orloski, A., & Fisher, J.O. (2016). "What do you think of when I say the word 'snack'?" towards a cohesive definition among low-income caregivers of preschool-age children. *Appetite*, 98, 35–40.
[doi:10.1016/j.appet.2015.12.002](https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.12.002)
- Yu, J., Zhang, S., & Zhang, L. (2018). Evaluation of the extent of initial Maillard reaction during cooking some vegetables by direct measurement of the Amadori compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 190–197.

[doi:10.1002/jsfa.8455](https://doi.org/10.1002/jsfa.8455)

Z

- Zamora, R., & Hidalgo, F.J. (2008). Contribution of lipid oxidation products to acrylamide formation in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6075-6080.
[doi:10.1021/jf073047d](https://doi.org/10.1021/jf073047d)
- Zamora, R., Delgado, R.M.G., & Hidalgo, F.J. (2010). Model reactions of acrylamide with selected amino compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1708-1713.
[doi:10.1021/jf903378x](https://doi.org/10.1021/jf903378x)
- Zamora, R., Delgado, R.M.G., & Hidalgo, F.J. (2011). Strecker aldehydes and α -keto acids, produced by carbonyl-amine reactions, contribute to the formation of acrylamide. *Food Chemistry*, 128(2), 465-470.
[doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.054](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.054)
- Zajac, J., Bojar, I., Helbin, J., Kolarzyk, E., Potocki, A., Strzemecka, J., & Owoc, A. (2013). Dietary acrylamide exposure in chosen population of South Poland. *PubMed*, 20(2), 351-355. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23772590>
- Zhang, Y., & Zhang, Y. (2007). Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: A review based on the current state of knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(5), 521-542.
[doi:10.1080/10408390600920070](https://doi.org/10.1080/10408390600920070)
- Zhang, B., Shao, H., Wang, X., Chen, X. D., Li, Z., Cao, P., Zhu, D., Yang, Y., Xiao, J., & Li, B. (2017a). Acrylamide-induced subacute neurotoxic effects on the cerebral cortex and cerebellum at the synapse level in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 30(6), 432-443.
[doi:10.3967/bes2017.057](https://doi.org/10.3967/bes2017.057)
- Zhang, D., Liu, W., Li, L., Zhao, H.Y., Sun, H.Y., Meng, M.H., & Shao, M.L. (2017b). Key role of peptidoglycan on acrylamide binding by lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 26, 271-277.
[doi:10.1007/s10068-017-0036-z](https://doi.org/10.1007/s10068-017-0036-z)
- Zhang, Y., Huang, M., Zhuang, P., Jiao, J., McElroy, M. B., Wang, J., & Wu, Y. (2018). Exposure to acrylamide and the risk of cardiovascular diseases in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006. *Environment International*, 117, 154-163.
[doi:10.1016/j.envint.2018.04.047](https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.047)
- Zhao, M., Zhang, B., & Deng, L. (2022). The mechanism of acrylamide-

- induced neurotoxicity: Current status and future perspectives. *Frontiers in Nutrition*, 9, 859189.
[doi:10.3389/fnut.2022.859189](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.859189)
- Zhong, C., Tan, S., & Langrish, T. A. G. (2019a). Redness generation via Maillard reactions of whey protein isolate (WPI) and ascorbic acid (vitamin C) in spray-dried powders. *Journal of Food Engineering*, 244, 11-20.
[doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.09.020](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.020)
- Zhong, H., Penders, J., & Shi, Z. (2019b). Impact of early events and lifestyle on the gut microbiota and metabolic phenotypes in young school-age children. *Microbiome*, 7, 2.
[doi:10.1186/s40168-018-0608-z](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0608-z)
- Zhou, P., Zhao, Y., Liu, H., Jian, Y., Li, X., Yang, X., & Wu, Y. (2013). Dietary exposure of the Chinese population to acrylamide. *PubMed*, 26(6), 421-429.
[doi:10.3967/0895-3988.2013.06.002](https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.06.002)
- Zhu, L., Jia, W., Wang, Q., Zhuang, P., Wan, X., Yu, P., & Zhang, Y. (2021). Nontargeted metabolomics-based mapping urinary metabolic fingerprints after exposure to acrylamide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112625.
[doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112625](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112625)
- Žilić, S., Aktağ, I.G., Dodig, D., Filipovic, M., & Gökmen, V. (2020). Acrylamide formation in biscuits made of different wholegrain flours depending on their free asparagine content and baking conditions. *Food Research International*, 132, 109109.
[doi:10.1016/j.foodres.2020.109109](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109109)
- Zyzak, D.V., Sanders, R.D., Stojanovic, M., Tallmadge, D.H., Eberhart, B.L., Ewald, D.K., Gruber, Morsch, T.R., Strothers, M.A., Rizzi, G.P., & Villagran, M.D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4782-4787.
[doi:10.1021/jf034180j](https://doi.org/10.1021/jf034180j)

