



Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Evaluación de la capacidad de consorcios microbianos para reducir la disponibilidad de acrilamida (AA) en un modelo digestivo simulado.

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.I.A. Margarita Torres Gregorio

Asesores:

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dr. Adrián Hernández Mendoza

Dr. Aarón Fernando González Córdova

RESUMEN

Margarita Torres Gregorio. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Enero 2018. **Evaluación de la capacidad de consorcios microbianos para reducir la disponibilidad de Acrilamida (AA) en un modelo digestivo simulado.** Asesores: Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Adrián Hernández Mendoza, Dr. Aaron Fernando González Córdoba.

La acrilamida (AA), es un xenobiótico dietario con potencial efecto neurotóxico, genotóxico y carcinogénico. Estudios *in vitro* han evaluado la capacidad de bacterias probióticas específicas para reducir la biodisponibilidad de la AA como estrategia para mitigar sus efectos tóxicos. Sin embargo, dichos estudios no han considerado que, a nivel intestinal, estas bacterias co-existen con otras especies bacterianas propias de la microbiota nativa, de las cuales se desconoce el papel que podrían desempeñar como modelo biológico de descontaminación de AA. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar las posibles interacciones de consorcios conformados por cepas probióticas específicas y/o cepas representativas de la microbiota nativa, de la primera porción del intestino delgado, para fijar acrilamida en un sistema digestivo simulado. Para ello primero se evaluó la capacidad individual de fijación de AA de 10 cepas probióticas (CP) y 6 cepas nativas del duodeno (CND) bajo diferentes condiciones, a saber; tiempo de exposición a la AA (4 y 12 h), fase de crecimiento bacteriano (exponencial, estacionaria), concentración de AA (5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) y pH del medio de reacción (5 y 7). A partir de estos ensayos se seleccionaron las mejores condiciones para evaluar la capacidad de fijación de AA de tres consorcios (CP, CND y CP+CND). Finalmente, dicha capacidad de fijación fue evaluada en un sistema digestivo simulado.

En general, los resultados mostraron que las cepas evaluadas presentaron una mayor capacidad ($p>0.05$) de fijación de AA en fase de crecimiento estacionaria con un tiempo de exposición a AA de 12 h y una concentración de 5 μg AA/mL. Entre las bacterias probióticas, *B. coagulans*, *L. casei* Shirota, *L. fermentum* JB3 y *L. pentosus* JB4, exhibieron el mayor porcentaje de fijación de AA (80-87%). Mientras que, entre las bacterias de la flora nativa, fueron *S. salivarius*, *B. catenolatum* y *S. gallolyticus* (ca. 68%). Por lo tanto, estas bacterias fueron seleccionadas para la conformación de los consorcios. Ambos consorcios (CP y CP+CND) constituidos con bacterias probióticas mostraron mayor ($p>0.05$) capacidad de fijación (>90 %) que las bacterias individuales, mientras que el CND mostró menor ($p>0.05$) capacidad de fijación (60 %). Este mismo comportamiento se observó en condiciones gastrointestinales simuladas. Estos resultados sugieren que los consorcios formados por cepas probióticas específicas podrían desempeñar un papel importante en la reducción de la disponibilidad de acrilamida a nivel intestinal.

ABSTRACT

Torres Gregorio Margarita. Master of Science and Engineering Biochemistry. Technical Institute of Veracruz, México. Evaluation of the capacity of bacterial consortia to reduce the availability of Acrylamide in a simulated digestive system. Advisers: Hugo S. García Galindo, Ph.D., Adrián Hernández Mendoza, Ph.D., and Aaron Fernando González Córdova, Ph.D.

Acrylamide (AA) is a dietary xenobiotic with a potential neurotoxic, genotoxic and carcinogenic effects. *In vitro* studies have evaluated the ability of specific probiotic bacteria to reduce the bioavailability of AA as a strategy to mitigate its toxic effects. However, these studies have not considered that at the intestinal level, these bacteria co-exist with other bacterial species native to the microbiota, of which the role they could play as a biological model of AA decontamination is unknown. That is why the objective of this work was to determine the possible interactions of consortia made up of specific probiotic strains and/or representative strains of the native microbiota, of the first portion of the small intestine, to fix acrylamide in a simulated digestive system. To this end, the individual AA fixation capacity of 10 probiotic strains (CP) and 6 native strains of the duodenum (CND) were evaluated under different conditions, namely; time of exposure to AA (4 and 12 h), bacterial growth phase (exponential, stationary), AA concentration (5 and 10 $\mu\text{g/mL}$) and pH of the reaction medium (5 and 7). From these trials, the best conditions were selected to evaluate the AA fixation capacity of three consortia (CP, CND and CP + CND). Finally, said fixation capacity was assessed in a simulated digestive system.

In general, the results showed that the evaluated strains presented a greater capacity ($p > 0.05$) of fixation of AA in stationary growth phase with a time of exposure to AA of 12 h and a concentration of 5 $\mu\text{g AA / mL}$. Among the probiotic bacteria, *B. coagulans*, *L. casei* Shirota, *L. fermentum* JB3 and *L. pentosus* JB4 exhibited the highest percentage of AA fixation (80-87%). While among the bacteria of the native flora, were *S. salivarius*, *B. catenolatum* and *S. gallolyticus* (ca. 68%). Therefore, these bacteria were selected for the conformation of the consortiums. Both consortia (CP and CP + CND) constituted with probiotic bacteria showed higher ($p > 0.05$) fixation capacity (>90%) than the individual bacteria, while CND showed lower ($p > 0.05$) fixation capacity (60%). This same behavior was observed in simulated gastrointestinal conditions. These results suggest that consortia formed by specific probiotic strains could play an important role in reducing the availability of acrylamide at the intestinal level.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Generalidades.....	3
2.2. Compuestos tóxicos formados por el proceso térmico de alimentos	4
2.2.4 Reacción de Maillard	4
2.3. Acrilamida (AA)	6
2.3.2. Mecanismo de formación de AA en alimentos	7
2.3.1. Exposición dietaria y ocurrencia en alimentos	11
2.3.2 Metabolismo de la acrilamida.....	15
2.3.4 Riesgo para la salud de la acrilamida en la dieta.....	17
2.4. Estrategias empleadas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos.....	20
2.6.2 Uso de bacterias ácido lácticas como modelo biológico de descontaminación de acrilamida.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. General	32
5.2. Específicos.....	32
6. MATERIALES Y METODOS.....	33
6.1. Cepas de estudio	33
6.2. Propagación de bacterias y preparación de los cultivos de trabajo.....	34
6.3. Determinación de los tiempos de crecimiento de cada bacteria para el estudio <i>in vitro</i>	35
6.5 Alimento modelo-papas fritas comerciales.....	36

6.6. Evaluación del efecto de la fase de crecimiento bacteriano, concentración de AA y tiempo de incubación en la remoción de la toxina por bacterias lácticas y bacterias nativas del duodeno humano.....	36
6.7. Selección de las mejores condiciones (pH, tiempo, temperatura, fase de crecimiento bacteriano y concentración de AA)	37
6.8. Capacidad de consorcios de cepas probióticas y/o bacterias representativas de la microbiota nativa (MN) para fijar acrilamida en condiciones <i>in vitro</i>	37
6.9. Determinación de la concentración de AA en el alimento modelo.	37
6.10. Cuantificación de acrilamida por HPLC.....	37
6.11. Modelo gastrointestinal simulado en ayuno	38
6.11.1. Procedimiento del modelo de digestión en ayuno.	41
6.12. Análisis estadístico.....	41
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1. Establecimiento del tiempo de incubación de las bacterias de manera individual.	42
7.2. Estandarización del método de cuantificación por HPLC de acrilamida	44
7.3. Evaluación de la capacidad de dieciséis cepas para remover acrilamida mediante condiciones <i>in vitro</i>	44
7.4. Selección de las cepas para la formación de consorcios.....	50
7.5. Evaluación de la interacción toxina-bacteria por cepas individuales.....	53
7.6. Determinación de la concentración de acrilamida en el alimento modelo (papas fritas comerciales)	55
7.7. Evaluación de la capacidad de consorcios formados por bacterias seleccionadas para reducir AA <i>in vitro</i>	56
7.8. Evaluación de 3 consorcios bacterianos para reducir la biodisponibilidad de AA en un sistema digestivo simulado.....	59
8. CONCLUSIONES.....	58
9. BIBLIOGRAFÍA	59
8. APENDICE	67
Apéndice A: Composición de medios de cultivo	67
Apéndice B: Preparación de soluciones buffer utilizadas.....	73
Apéndice C: Curva estándar de acrilamida.....	74
Apéndice D: Columna de extracción de fase solida (SPE-C18).....	75

Apéndice E: Componentes y concentraciones de los diversos jugos sintéticos del modelo de digestión <i>in vitro</i> que representan las condiciones de alimentación	76
Apéndice F: Cromatograma representativo de la presencia de acrilamida mediante HPLC.....	77
Apéndice G: Efecto combinatorio por pares de factores sobre el % de fijación .	78

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.3.1.1. Niveles de Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a en diferentes tipos de alimentos evaluados por la ESFA durante el period 2007-2008.....	12
TABLA 2.3.1.2. Concentración de acrilamida en diferentes muestras de papas fritas comerciales.	14
TABLA 2.3.1.3. Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) en varios alimentos producidos en México	14
TABLA 6.1.1. Cepas empleadas en el estudio.....	33
TABLA 7.4.1. Selección de cepas para la formación de consorcios.....	52
TABLA 7.5.1. Interacción toxina-bacteria en la fijación de AA por bacterias individuales.....	54
TABLA 7.6.1. Concentración de Acrilamida en el alimento modelo	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.3.1. Estructura química de la acrilamida.....	7
FIGURA 2.3.2.1 Mecanismo de formación de acrilamida a través de la ruta asparagina-azúcar reductor (hidroxicarbonilo).	11
FIGURA 2.3.2.1. Principales rutas metabólicas de la acrilamida.....	16
FIGURA 2.4.1. Estrategias de reducción de acrilamida en alimentos.	20
FIGURA 6.11.1. Representación esquemática del sistema digestivo simulado utilizado.....	39.
FIGURA 6.11.2. Representación del modelo de digestión en condiciones de ayuno.	40
FIGURA 7.1.1. Curvas de crecimiento de bacterias ácido lácticas (a) y bacterias representativas de la flora nativa del duodeno (b). 37 °C por 24 horas.	43
FIGURA 7.3.1. Porcentaje de AA fijada por cepas probióticas y cepas representativas de la microbiota nativa en diferentes fases de crecimiento, exponencial (12h) y estacionaria (16h). Concentración inicial de AA = 5 µg/mL, tiempo de exposición a la AA= 4h, 37°C y pH=7.....	45
FIGURA 7.3.2. Porcentaje de AA fijada por cepas probióticas y cepas nativas a diferentes tiempos exposición a la AA (4 y 12 h). Concentración inicial de AA = 5 µg/mL, 37°C, pH = 7, fase exponencial = 12 h	47
FIGURA 7.3.3. Porcentaje de AA fijada por cepas probióticas y cepas nativas expuestas a diferentes concentraciones de AA (10 Y 5 µg/mL). T=37°C, tiempo de incubación con la AA= 4h, pH=7 y en fase exponencial (12 h).	49
FIGURA 7.4.1. Efecto de los factores sobre el % de fijación de AA por 16 bacterias.....	50

FIGURA 7.4.2. Modelo ajustado de los factores sobre el % de fijación de AA por 16 bacterias.....	51
FIGURA 7.7.1. Porcentaje de AA fijada por los diferentes consorcios <i>in vitro</i> (5 µg de AA/mL, 16 h de crecimiento de cada cepa, 4 h de incubación con la toxina).....	57
FIGURA 7.8.1. Porcentaje de AA removida por los distintos consorcios bacterianos al final del proceso digestivo simulado.....	59

1. INTRODUCCIÓN

La acrilamida (AA) es un compuesto químico formado por la interacción de precursores clave como azúcares reductores (e.g. fructosa, glucosa) y el aminoácido asparagina, en alimentos que se someten a altas temperaturas (≥ 120 °C) durante su preparación (e.g. freído, tostado, horneado) (Tareke *et al.*, 2002; Wei Chi *et al.*, 2012; FAO RAP 2013). Estudios han demostrado que el consumo de AA tiene un potencial efecto neurotóxico, genotóxico y carcinogénico, por lo que su presencia en los alimentos es considerado como un problema de salud pública (Capuano *et al.*, 2011). A pesar de esto, en la actualidad no existen normas oficiales que rijan los niveles máximos permitidos de AA en los alimentos, por lo que la recomendación es que la exposición a esta sustancia debe ser tan baja como sea posible. Las estrategias para reducir la exposición de AA a través de los alimentos se han centrado en: a) mitigar su formación mediante el control de la concentración de sus precursores o las temperaturas de cocción, y b) reducir su biodisponibilidad (Seal *et al.*, 2008; Rivas, 2016). En este último sentido, investigaciones recientes han demostrado que bacterias probióticas específicas son capaces de reducir la disponibilidad *in vitro* de AA, aun en condiciones gastrointestinales simuladas (Serrano, 2013; Rivas-Jimenez *et al.*, 2016). Sin embargo, hay que considerar que a nivel intestinal, estas bacterias probióticas coexisten con otras especies bacterianas propias de la microbiota nativa, de las cuales se desconoce el papel que podrían desempeñar como modelo biológico de descontaminación de AA, por lo que una mejor comprensión de las interacciones sinérgicas implicadas en cultivos multi-bacteria podría conducir al descubrimiento o desarrollo de consorcios bacterianos altamente eficientes que podrían servir como eliminadores de cancerígenos dietarios presentes de forma natural o no en los alimentos. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar las posibles interacciones de consorcios conformados por cepas probióticas específicas y/o cepas representativas de la microbiota nativa, de la primera

porción del intestino delgado, para fijar acrilamida en un sistema digestivo simulado.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

Los alimentos de consumo humano son tradicionalmente considerados como seguros. Sin embargo, ocasionalmente, éstos pueden ser vehículo de diversos contaminantes químicos (orgánicos o inorgánicos) que en concentraciones significativas pueden causar anomalías fisiológicas y/o anatómicas. Dichos contaminantes, también conocidos como xenobióticos dietarios, pueden estar presentes de forma natural en los alimentos (e.g. micotoxinas, glucósidos cianogénicos), pueden haber sido añadidos de forma intencional (e.g. Tartracina, benzoato de sodio) o accidental (e.g. plaguicidas, metales), o pueden haber sido generados durante el procesamiento del alimento, sin que esta clasificación asigne estrictamente a un xenobiótico a una sola categoría; ya que éstos pueden pertenecer a más de una. Cabe señalar que la contaminación puede ocurrir durante el manejo pre- y postcosecha de la materia prima del alimento, o durante el procesamiento, distribución y/o almacenamiento del mismo.

Este documento está orientado a discutir sobre la acrilamida, un xenobiótico generados durante el procesamiento del alimento. Además, dará un bosquejo de las diferentes estrategias para reducir la exposición de AA a través de los alimentos, dando particular énfasis en el uso de bacterias probióticas específicas capaces de reducir la disponibilidad *in vitro* de AA, y discutirá el potencial que podrían tener consorcios bacterianos conformados por bacterias específicas de la microbiota nativa o probióticos, como modelo biológico de descontaminación de AA.

2.2. Compuestos tóxicos formados por el proceso térmico de alimentos

Durante la industrialización y preparación de la mayoría de los alimentos, comúnmente se emplean distintos tratamientos térmicos como la pasteurización, la esterilización, la cocción, el horneado, el freído, entre otros (Badui, 2004). Cada uno de estos procesos se realiza bajo distintas condiciones de temperatura, y originan una serie de transformaciones que conducen a la formación de nuevos compuestos que impactan la palatabilidad de los alimentos. Sin embargo, en algunas ocasiones, estas transformaciones también pueden generar la formación de una gran variedad de compuestos mutágenos y carcinógenos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclica, N-nitrosaminas, furanos, hidroximetilfurfural (HMF) y acrilamida que comprometen el valor biológico e inocuidad de los alimentos (Capuano, *et al.*, 2009; Zoghi *et al.*, 2014).

Entre las diversas reacciones que se suscitan durante el procesamiento térmico de los alimentos, las reacciones de Maillard desempeña un papel importante en la formación de éstos compuestos tóxicos indeseables.

2.2.4 Reacción de Maillard

Durante mucho tiempo los alimentos han sido cocinados, la reacción de Maillard ha jugado un importante rol en el mejoramiento del sabor y la apariencia de los alimentos. Esto ha sido el mayor reto central en la industria alimentaria, ya que la reacción de Maillard se relaciona con aroma, sabor y color, en particular en los procesos tradicionales, tales como el tostado de los granos de café y cacao, la cocción de pan y pasteles, el tostado de cereales y la cocción de la carne. Por otra parte, durante la reacción de Maillard se forma una amplia gama de productos de reacción con una importancia significativa para el valor nutritivo de los alimentos. Esto se puede reducir por la disminución de la digestibilidad y, posiblemente, la formación de compuestos tóxicos y mutagénicos, pero también

se puede mejorar mediante la formación de productos antioxidantes (Martins *et al.*, 2001).

La química subyacente de la reacción de Maillard es muy compleja ya que abarca no una ruta de reacción, si no toda una red de diversas reacciones que desencadenan un gran número de productos que en algunos casos son responsables del aroma y color de los alimentos. El esquema de la reacción completa original de Hodge ha sido desarrollado y elaborado por tecnólogos de alimentos desde entonces, por lo que la comprensión de la reacción está avanzando continuamente. Sin embargo, la reacción de Maillard es muy difícil de controlar. Varios factores que intervienen en la elaboración de alimentos influyen en ella y pueden ser considerados como variables de procesamiento de alimentos. El enfoque cinético tiende a presentar una visión complementando este mecanismo, ya que considera los pasos que determinan la velocidad de la reacción. Es de gran alcance debido a los pasos que determina la velocidad proporcionan puntos de control (Martins *et al.*, 2001).

Para que esta reacción de oscurecimiento no enzimático ocurra es necesario que se cuente con la presencia de un compuesto carbonílico (azúcar reductor) y de una amina (aminoácido, péptido o proteína). Esta reacción depende del pH, temperatura, concentración de los sustratos y tiempo, y se puede dividir en tres etapas, a saber: I) Etapa inicial, que incluye reacciones de condensación azúcar-amina, reordenamiento de Amadori y reacciones por radicales libres; II) Etapa intermedia, que involucra reacciones de deshidratación de azúcares, fragmentación de azúcares y Degradación de aminoácidos (Degradación de Strecker); y III) Etapa final, que incluye condensación aldólica y condensación aldehído-amina y formación de compuestos heterocíclicos nitrogenados (Go, 2007; Tech *et al.*, 2016).

La reacción de Maillard se inicia con la formación de los productos de reacción de Amadori, formado a través de la reacción de azúcares reductores con aminoácidos. Los N-glucósidos pueden someter a los compuestos de Amadori

para convertirlos a dicarbonilos (1-deoxysona o 3-deoxysona) a través de enolización y reacciones de deshidratación/hidrólisis. Estos compuestos se pueden descomponer aún más en la cascada de reacciones para generar color y sabor. Sin embargo, en condiciones secas o en sistemas de baja humedad los compuestos N-glicosilo se reordenan principalmente a través de la base de Schiff. Los primeros modelos de experimentos demostraron que la degradación directa de la N-glicosilamina de la asparagina proporciona rendimientos significativamente mayores de acrilamida en condiciones secas que mezclas de asparagina en azúcar (Stadler *et al.*, 2004).

Como resultado de la reacción de Millard, se generan una gran cantidad de compuestos con una amplia gama de propiedades biológicas, siendo de particular interés la acrilamida por su carácter mutagénico, genotóxico, carcinógeno, neurotóxico u teratogénico (Taeymans *et al.*, 2004).

2.3. Acrilamida (AA)

La acrilamida (2-propenamida, registro CAS no. 79-06-1) químicamente es una amida insaturada (Figura 2.3.1), altamente reactiva utilizada desde 1950 como un intermediario químico en la producción de poliacrilamidas, las cuales son utilizadas como floculantes para la clarificación de agua potable, como sellador para la construcción de presas y túneles, como aglutinante en la industria del papel y de la pulpa, en la síntesis de colorantes, entre otras aplicaciones industriales (Rivas, 2016). La AA es uno de los componentes del humo del tabaco. Es fácilmente polimerizable, lo que indica que puede ser formada por calentamiento de material biológico (SCF, 2002; Chien-Yu *et al.*, 2009; JECFA FAO/OMS, 2011). La exposición humana a la acrilamida se ha atribuido a lo largo de los años a la exposición ocupacional y al humo del tabaco, afectando tanto al fumador activo como al pasivo, siendo la absorción dérmica e inhalación del monómero seco durante la producción de poliacrilamidas, o durante la preparación de geles de poliacrilamida para electroforesis en laboratorios (SCF, 2002). La

exposición de acrilamida a niveles bajos puede ocurrir a través del agua potable contaminada por el uso de floculantes de poliacrilamida durante el tratamiento del agua y de la utilización de poliacrilamida en cosméticos y productos de tocador (SCF, 2002). A pesar de la gran importancia económica de la acrilamida a nivel industrial, ésta representa un grave problema de salud pública cuando la población es expuesta a ella a través de la dieta. Debido a esto, diversos trabajos se han enfocado a la cuantificación del contenido de acrilamida en los alimentos y su ingesta diaria, y la relación de ésta con enfermedades degenerativas como el cáncer (Serrano, 2013).

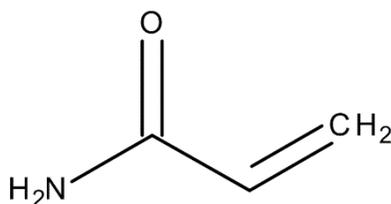


FIGURA 2.3.1. Estructura química de la acrilamida

2.3.2. Mecanismo de formación de AA en alimentos

La acrilamida en los alimentos se deriva en gran parte de las reacciones desencadenadas por el pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) entre aminoácidos y azúcares reductores (Rufián-Henares *et al.*, 2006) inducidas por el calor principalmente entre el grupo amino del aminoácido asparagina libre y el grupo carbonilo de azúcares reductores tales como glucosa durante el calentamiento (hornear, asar, freír, asar) (Friedman *et al.*, 2008). Los alimentos ricos en ambos de estos precursores se derivan en gran medida de fuentes vegetales como las papas y cereales (cebada, arroz, trigo), pero al parecer no de los alimentos de origen animal como las aves de corral, carne y pescado. La mayoría de acrilamida se acumula durante las etapas finales del calentamiento debido a que el contenido de humedad de los alimentos disminuye, la temperatura

de la superficie se incrementa rápidamente ocurriendo algo muy similar con el pH, siendo estas condiciones las que favorecen las reacciones complejas para su formación (Rivas, 2016).

La principal fuente dietaria de acrilamida difiere con los hábitos de alimentación, dependiendo de la abundancia de cualquier fuente de papa o de pan en la dieta, o la ingesta de café. El consumo de acrilamida diaria varía con la edad y el hábito de alimentación, pero las estimaciones son de 0.43 µg/kg para adultos y 1.6 µg/kg en niños de 2 a 5 años de edad. En los Estados Unidos se encontraron niveles de exposición ocupacional de 1.4 a 18.6 µg/kg, mientras que la ingesta de alimentos de consumo fue de aproximadamente 0.43 a 0.75 µg/kg (Orihan *et al.*, 2010).

La principal ruta de formación de AA en alimentos es mediante la reacción de Maillard en donde los productos son responsables de los colores pardos, sabores y aromas en muchos alimentos. Sin embargo, estudios han demostrado que el aminoácido asparagina ha sido quien proporciona el esqueleto de la cadena principal de acrilamida por estudios de espectroscopia de masas demostrando que los átomos de carbono y nitrógeno provienen a partir de dicho aminoácido (Masson *et al.*, 2007; IUFOST 2012; Jin *et al.*, 2013).

Por ello la ruta de la asparagina es una de las principales vías de formación de la acrilamida (Gökmen *et al.*, 2008). Además, otras rutas diferentes han sido sugeridas en conjunto con los sistemas de las reacciones de Maillard en productos alimenticios (Mottram *et al.*, 2002). La asparagina puede ser principalmente convertida a acrilamida por descarboxilación térmica y reacciones de desaminación, pero la presencia de azúcares reductores es esencial para que la reacción se lleve a cabo. Cabe destacar que, en términos relativos, el rendimiento de acrilamida en los sistemas modelo de asparagina en condiciones favorables está en el intervalo de 0,1 a 1% en moles.

Zyzak *et al.*, (2003) fueron los primeros en demostrar que 3-aminopropionamida (3-APA), una amina biogénica formada durante la reacción de

Maillard, puede ser uno de los principales precursores de acrilamida en los productos. Los investigadores también demostraron a través de experimentos con 2-desoxi-glucosa que carbonilos, pero no dicarbonilos, son esenciales en la ruta de Maillard a AA, es decir, los productos de transposición de Amadori no son necesarios. Otros estudios realizados por otros investigadores (Granvogl *et al.*, 2004) corroboraron este primer trabajo con 3-APA, realizado por primera vez en sistemas modelo y luego en muestras reales de alimentos como el queso y el cacao (Granvogl *et al.*, 2006; 2007).

Otros grupos de investigación han confirmado la intermediación de la base de Schiff descarboxilada (imina 2, véase la Figura 2), que es relativamente estable en condiciones de baja humedad, y el compuesto Amadori descarboxilado que libera efectivamente acrilamida y por lo tanto sirve como precursores directos (Zyzak *et al.*, 2003; Yaylayan *et al.*, 2005; Perez-Locas *et al.*, 2008).

Como se muestra en la Figura 2.3.2.1, la descarboxilación de la base de Schiff puede proceder a través de un intermedio cíclico o por una betaína base de Schiff dipolar. La ciclación intramolecular de la base Schiff mediante asistencias de base descarboxilación, formando el iluro de azometina estable (formación de la oxazolidin-5-ona). La descarboxilación de la base de Schiff también puede proceder a través de la betaína base de Schiff a iluros protonados tendiendo a sufrir un cambio de 1,2-prototrópico, para proporcionar la base de Schiff descarboxilada. Zyzak *et al.*, (2003) en su estudio informaron de estudios de la base de Schiff descarboxilada de asparagina en un sistema modelo, a través de mediciones de cromatografía de líquidos acoplado a espectroscopia de masas (LC-MS). La descarboxilación de la base de Schiff después de un reordenamiento conduce al correspondiente producto de Amadori que al β -eliminarse, iniciado por el resto de azúcar, proporciona directamente acrilamida (AA). La base de Schiff descarboxilada (imina 2, Figura 2) a intermediarios de 3-APA en la hidrólisis, o en una ruta directa alternativa a través de 1,2-eliminación acrilamida. La escisión del enlace carbono-nitrógeno por β -eliminación a la acrilamida (importante es la disponibilidad de un β -protón) y la correspondiente cetona amino es

probablemente el paso limitante de la velocidad en esta cascada de reacción (Stadler *et al.*, 2002).

Una ruta de reacción factible es la formación de 3-APA a partir de la imina 2 a través de la hidrólisis. La amina biogénica 3-APA reacciona entonces adicionalmente como se describe anteriormente (por pérdida de amoníaco) para producir acrilamida. La imina 1 en el esquema de reacción conduce a la conocida degradación del aldehído Strecker (3-oxopropoanamida) que puede reaccionar adicionalmente con el alcohol correspondiente y después de la hidrólisis generar acrilamida. Esta secuencia requiere medidas adicionales de reducción / hidrólisis y lo más probable es que representa una vía menor en términos de su contribución al rendimiento global de acrilamida.

Es importante considerar que la estructura del carbonilo de partida puede afectar los rendimientos de la acrilamida, especialmente el grupo funcional en la posición beta con respecto al nitrógeno (Yaylayan, 2005). Un grupo hidroxilo favorece la reordenación del compuesto de Amadori descarboxilado, lo que puede explicar por qué hidroxiacetona (acetol) genera una mayor cantidad de acrilamida (> 4 mmol/mol) que metilglioxal (<0.2 mmol/mol).

ANTECEDENTES

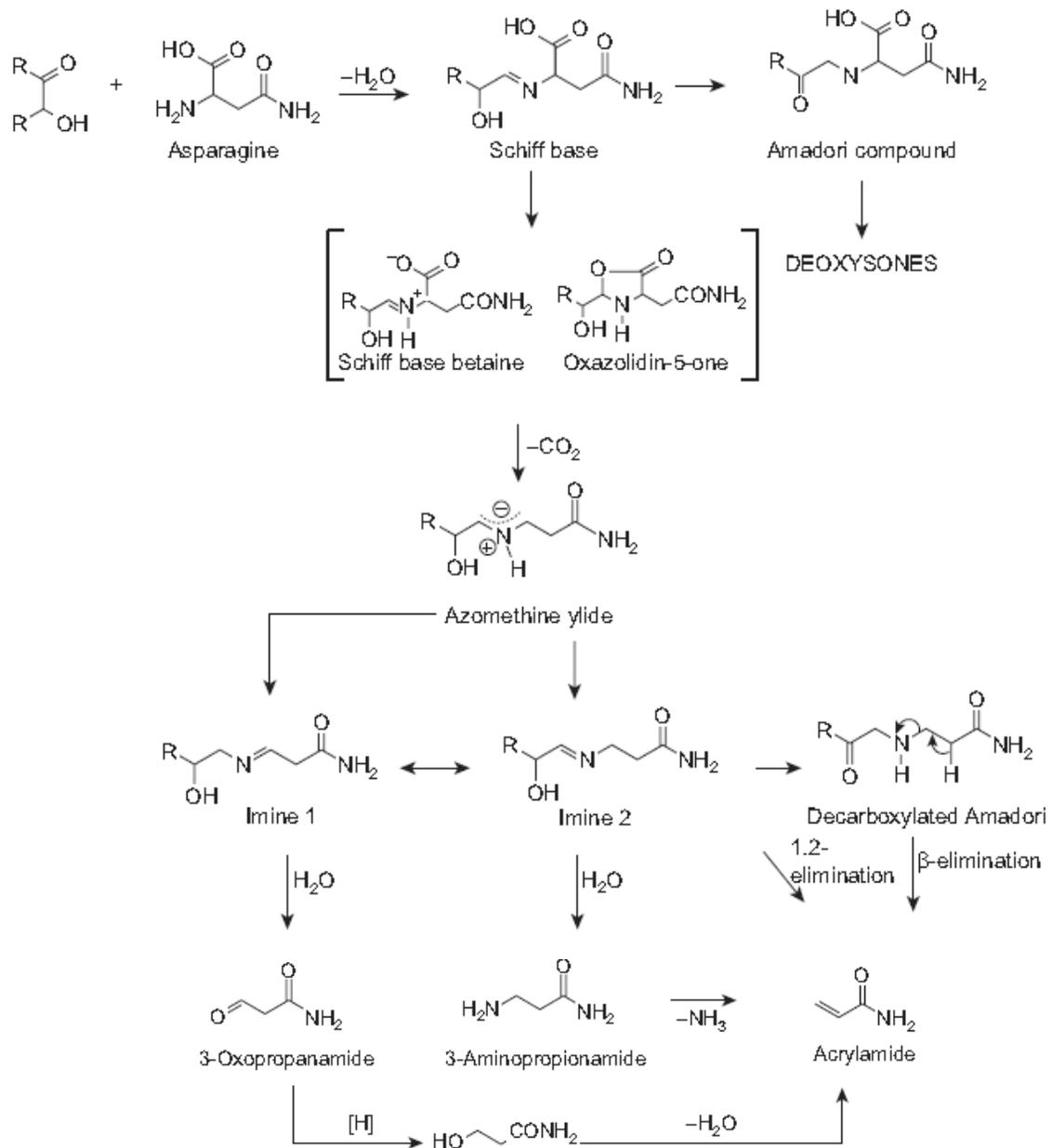


FIGURA 1.3.2.1 Mecanismo de formación de acrilamida a través de la ruta asparagina-azúcar reductor (hidroxicarbonilo).

2.3.1. Exposición dietaria y ocurrencia en alimentos

Desde 2003 los datos de la ocurrencia de Acrilamida en productos alimenticios han sido presentados en el centro de investigación conjunta (JCR) de la comisión Europea por estados miembros ambos de autoridades competentes y

de la industria alimentaria. En abril del 2009 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) reporto los resultados del monitoreo de los niveles de acrilamida en los alimentos en respuesta a una solicitud de la comisión europea (2007/331/EC) (European comisión, 2007). Los datos presentados en el reporte despertaron una preocupación generalizada debido a los altos niveles de AA encontrados en los alimentos evaluados (Tabla 2.3.1.1).

TABLA 2.3.1.1. Niveles de Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)^a en diferentes tipos de alimentos evaluados por la ESFA durante el period 2007-2008.

Producto alimenticio	N ^b	Mediana	Media	Máximo
Galletas	227	169	317	4200
Pan	272	50	136	2430
Cereales de desayuno	128	100	156	1600
Cereales-base de alimento para bebes	76	42	74	353
Café	208	188	253	1158
Papas a la francesa	529	253	350	2668
Comida para bebes	84	31	44	162
Otros productos	854	169	313	4700
Papas crujientes	216	490	628	4180
Productos de papa caseros	121	150	319	2175

^a Valores por debajo de LOD y valores entre LOD y LOQ se establecieron en el LOD o el valor LOQ, respectivamente.

^b Número de datos individuales analizados para cada categoría de alimento.

Aunque existe una gran variabilidad en los niveles de AA entre diferentes alimentos así como en cada categoría, los valores más altos fueron encontrados en productos de papas fritas, pan y productos de panadería, y café. También existen reportes de la presencia de AA en otros productos alimenticios no listados en la Tabla 1 tales como las avellanas y almendras (Amrein *et al.*, 2005). La diferencia en los niveles encontrados puede ser debida a la concentración de los

precursores (asparagina libre y azúcares reductores) en las materias primas, diferencias en la composición del alimento y las condiciones del proceso térmico utilizado (Boon *et al.*, 2005). Además el contenido de acrilamida de un alimento puede variar según sean las condiciones de cocción en el hogar.

Por otra parte la Autoridad Noruega para la Seguridad Alimentaria ha proporcionado datos analíticos sobre las concentraciones de acrilamida en muestras de alimentos noruegos desde 2002. El informe más reciente publicado en 2014 incluía 171 alimentos diferentes y un total de 352 muestras fueron analizadas en el período 2010-2013. De ellos, 51 se incluyeron en la base de datos sobre la presencia de acrilamida en productos alimenticios en Europa utilizados por la EFSA en su dictamen científico de 2015 (EFSA, 2015). Estas muestras noruegas incluían pan, cereales para el desayuno, pan crujiente, galletas, productos de panadería blandos, arroz, pasta, harina, bocadillos, productos de papa procesada, gachas infantiles y leche de fórmula.

En México son pocas las investigaciones sobre el contenido de acrilamida en alimentos, como el realizado por Rivas en 2016 donde evaluó la concentración de AA en 4 muestras de papas fritas comerciales, mostrando que cada una de las muestras evaluadas tuvieron concentraciones variables de AA (Tabla 2.3.1.2), encontrando que la muestra M3 presentó menor contenido de AA ($10,530 \pm 1,100$ $\mu\text{g/Kg}$) y la muestra M4 con una concentración de AA de $80,920 \pm 13,270$ $\mu\text{g/Kg}$. Estos resultados indican valores superiores a los reportados para papas fritas en rebanadas en otros trabajos, los cuales se encuentran en un rango de 170-4,215 $\mu\text{g/Kg}$ de papa (JECFA FAO/WHO; 2005; IUFoST, 2010) y 14,000-40,600 $\mu\text{g/Kg}$ de papa (Brill *et al.*, 2005). Además, superaron los valores indicativos (1,000 $\mu\text{g/Kg}$ de papa) recomendados por la Unión Europea para papas fritas en rebanadas (EFSA, 2010).

TABLA 2.3.1.2. Concentración de acrilamida en diferentes muestras de papas fritas comerciales.

	Papas fritas comerciales			
	M1	M2	M3	M4
Concentración de AA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ de papa)	$19,960 \pm 1.61$	$25,940 \pm 2.09$	$10,530 \pm 1,100$	$80,920 \pm 13,270$

Por otra parte, Sanchez-Sotero *et al.* (2017) estimaron el contenido de acrilamida (AA) en alimentos consumidos por jóvenes en México y calcularon su consumo en este sector poblacional. Quince muestras de alimentos comerciales procesados térmicamente, ampliamente consumidos en México, obtenidos de supermercados y tiendas locales. Se encontraron contenidos significativamente altos de acrilamida en la mayoría de los alimentos evaluados (Tabla 2.3.1.3); los niveles más altos se encontraron en productos fritos ($5,914 \mu\text{g}/\text{kg}$ de producto en papas fritas). En base a los alimentos y las porciones informadas por los sujetos, se estimó una ingesta de acrilamida de $0.68 \mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día. La ingesta diaria estimada podría estar en niveles por encima del límite establecido para evitar el riesgo de neurotoxicidad.

TABLA 2.3.1.3. Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) en varios alimentos producidos en México

CATEGORÍA DE ALIMENTOS	CONTENIDO DE ACRILAMIDA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
	Media
1. Pan de baguette	302 ± 4
2. Galletas de chocolate	304 ± 0.53
3. Galletas Cracker	308 ± 12
4. Pan blanco tostado	320 ± 3
5. Fideos instantáneos	331 ± 3

6. Maníes tostados	347 ± 13
7. Nuggets de pollo frito	364 ± 8
8. Tortilla al horno	373 ± 22
9. Cereal de maíz de desayuno	498 ± 19
10. Palomitas de microondas	607 ± 36
11. Vegetales enlatados	957 ± 47
12. Café molido (tostado medio)	1877 ± 71
13. Plátano verde frito	1923 ± 32
14. Papas a la francesa	3267 ± 142
15. Papas fritas	5802 ± 306

2.3.2 Metabolismo de la acrilamida

Para que la acrilamida ejerza su efecto biológico, es necesario que absorba después de la exposición, para su posterior distribución. El metabolismo de acrilamida se ha investigado a fondo por medio de estudios toxicocinéticos en los seres humanos, ratas y ratones. Una visión general de las principales vías metabólicas para la acrilamida se da en la Figura 2.3.2.1. Después de la ingestión, debido a su polaridad, solubilidad en agua y bajo peso molecular, la acrilamida se absorbe rápidamente y se distribuye en todo el cuerpo vía torrente sanguíneo. Se puede encontrar en muchos órganos tales como el timo, hígado, corazón, cerebro, riñones (Abramson-Zetterberg *et al.*, 2005), así como en la placenta humana (Schettgen *et al.*, 2004) y la leche materna (Sorgel *et al.*, 2002), siendo por lo tanto fácilmente transferible a feto o recién nacidos.

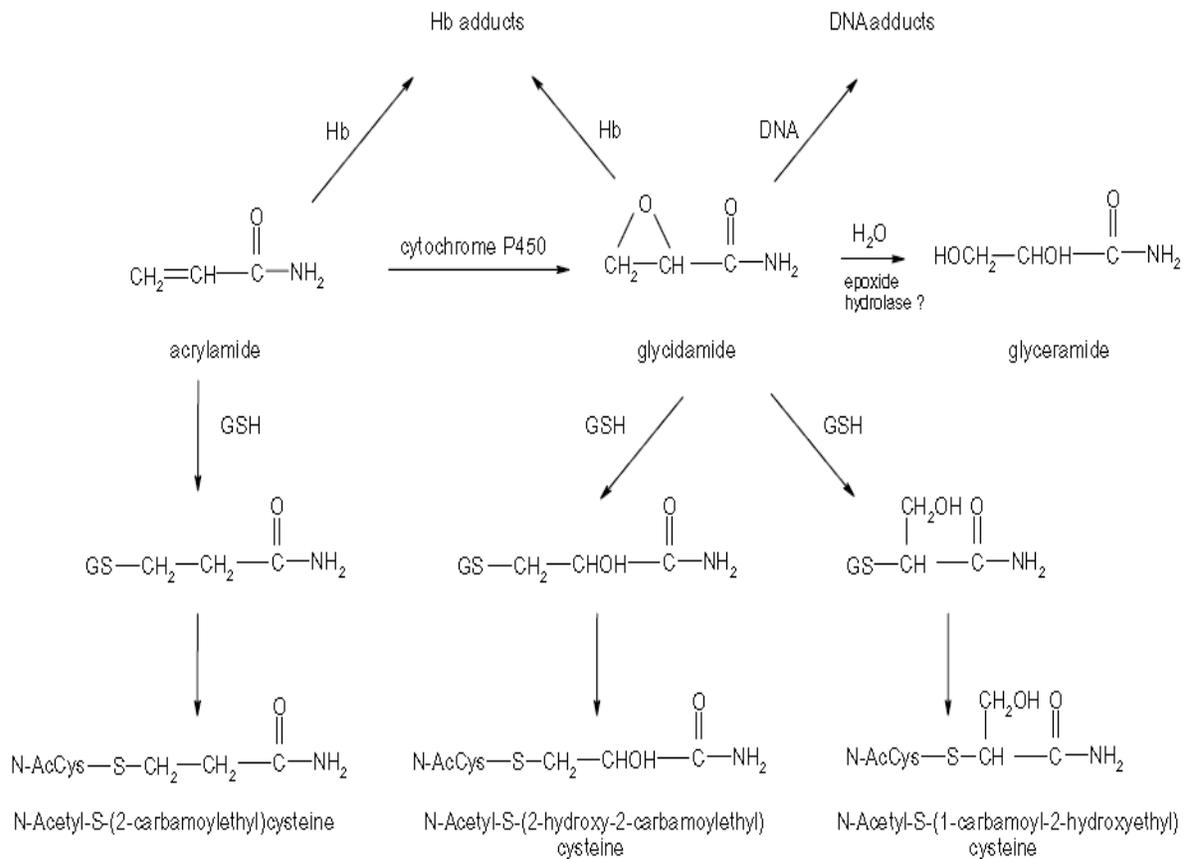


FIGURA 2.3.2.1. Principales rutas metabólicas de la acrilamida.

La acrilamida ingerida es excretada principalmente con la orina. Se ha reportado que el 60 % una dosis de 0.94 mg contenida en una comida de voluntarios se recuperó de la orina después de 72 h (Fuhr *et al.*, 2006). La mayoría de la acrilamida es conjugada con el glutatión y la menor parte se activa por el citocromo P-450 CYP2E1 a un compuesto epóxido reactivo, conocido como glicidamida. La glicidamida es el principal metabolito de la acrilamida, que puede ser más nociva que su predecesor por presentar propiedades carcinogénicas y genotóxicas. Por otra parte, la acrilamida, más que la glicidamida, probablemente sea la responsable de su potencial efecto neurotóxico (Capuano *et al.*, 2011) La ruta metabólica principal de la acrilamida es cualitativamente similar en los humanos y en los animales de laboratorio; sin embargo, deben considerarse las diferencias cuantitativas al evaluar el riesgo para los humanos. Para el rango de

dosis utilizado en estudios de toxicidad en animales, el grado de conversión del compuesto madre a glicidamida está inversamente relacionados con la cantidad de acrilamida en el organismo, cuanto menor sea la dosis, mayor la proporción que se convierte a glicidamida. Debido a que el metabolismo y la eliminación incluyen canales con una variabilidad genética (*por ej.*, conjugación y metabolismo mediado por el P450), puede haber variaciones en la sensibilidad de los humanos a los efectos de la acrilamida ingerida (FAO, 2002).

La conjugación de acrilamida al glutatión, así como su epoxidación en glicidamida en el hígado por la vía del citocromo P450 (Figura 2.3.2.1), representan las principales rutas metabólicas de detoxificación (Sumner *et al.*, 1992). Sin embargo la formación de la glicidamida es considerado el paso crítico para los efectos genotóxicos de acrilamida y sus metabolitos (Wilson *et al.*, 2006). Tanto la acrilamida como la glicidamida se pueden unir a la hemoglobina *in vivo*, albúminas de suero, ADN y enzimas (Doerge *et al.*, 2005; Shipp *et al.*, 2006). La glicidamida es más reactiva hacia el ADN y las proteínas que la acrilamida, por lo que al consumir altas cantidades de acrilamida se podría estar produciendo más glicidamida (Dearfield *et al.*, 1995).

2.3.4 Riesgo para la salud de la acrilamida en la dieta

Diversos estudios indican que la acrilamida es neurotóxica en los animales y los seres humanos. Además, estudios en animales han demostrado que la AA daña los testículos y afecta en forma adversa la fertilidad. Por otra parte, la AA es mutágena y carcinógena *in vivo* en células somáticas y germinales (IARC, 1994; Shipp *et al.*, 2006). Los estudios sugieren que los mecanismos por los cuales la acrilamida causa dichos daños pueden ser una combinación de daño en el ADN, interferencia con la mitosis y meiosis y daño originado por estrés oxidativo (Fennell *et al.*, 2005).

2.3.5.1 Neurotoxicidad

La neurotoxicidad es de los pocos efectos adversos reconocidos de la exposición oral a AA en humanos; aunque también se ha asociado a altos niveles de AA vía inhalación o absorción dérmica en trabajadores ocupacionalmente expuestos (Exon, 2006; LoPachin *et al.*, 2005). Tanto los seres humanos como los animales desarrollan una neuropatía periférica que se caracteriza por ataxia y debilidad muscular esquelética. En estudios en ratas y ratones, el Nivel de Efecto no Observable (NOEL) neurotóxico se ha estimado que varía de 0.2 a 10 mg/kg de peso corporal/día, y está muy por encima de la exposición alimentaria (OMS, 2005). Sin embargo, recientemente se ha postulado que la neurotoxicidad de la acrilamida puede ser acumulativa y por lo tanto que la exposición alimentaria podría no ser insignificante (LoPachin, 2004).

2.3.5.2. Carcinogenicidad

Desde 1994, la AA ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) como un probable carcinógeno para los humanos (IARC, 1994). Varios estudios en roedores apoyan la evidencia de que la acrilamida es un carcinógeno de múltiples órganos, pudiendo causar tumores a diferentes órganos tales como pulmón, útero, piel, glándula de mamífero, cerebro (Rice, 2005). Aunque se ha observado un patrón diferente de los órganos diana en ratones, a saber hígado, pulmón y glándula de Harder (Beland *et al.*, 2013).

Por otra parte, es ampliamente aceptado que la carcinogenicidad de acrilamida podría deberse a su conversión a glicidamida en mamíferos, ya que ésta ha demostrado ser mutagénica y genotóxica en varios ensayos *in vitro* e *in vivo* (Besaratina y Pfeifer, 2007; Carere, 2006; Koyama *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Mei *et al.*, 2008). Los resultados reportados por el Centro Nacional de Investigación Toxicológica (NCTR) bioensayos de cáncer de acrilamida y de su metabolito mutagénico, glicidamida, en los estudios de agua potable dos años recientes con ratas y ratones, y el ensayo del ratón neonatal, apoyan fuertemente

"el papel crucial de glicidamida en mutagénesis directa (que causa la mutación) de ADN como el mecanismo de acción para la capacidad de acrilamida para causar tumores (NCTR, 2008). Puesto que la activación metabólica de acrilamida en glicidamida a través de CYP2E1 es crucial para la toxicidad acrilamida y la enzima se expresa a principios de los seres humanos, existe cierta preocupación acerca de un aumento en el riesgo del cáncer tras la exposición a la acrilamida de los recién nacidos.

La inducción de la formación de aductos de DNA-acrilamida y la consiguiente mutagénesis se ha postulado como el proceso clave en la carcinogénesis de la acrilamida, aunque la cadena de acontecimientos a partir de la formación de aductos de glicidamida-DNA y que conduce a la mutación no se ha investigado directamente (Hartmann *et al.*, 2008). Hasta la fecha, las propuestas sobre el modo de acción (MOA) de la inducción de tumores con acrilamida se han hecho para glándulas mamarias y los testículos en ratas (Shipp *et al.*, 2006).

Aunque hasta la fecha no es posible llegar a la conclusión de que todos los tumores inducidos por acrilamida, en todas las especies ensayadas, son atribuibles al mecanismo genotóxico, tampoco hay evidencia convincente de mecanismos no genotóxicos en dosis relevantes de acrilamida pudieran no estar relacionados. Así lo indica un informe reciente que presenta la primera evidencia de que la acrilamida podría inhibir una proteína glicidamida motor mitótica / meiótica, lo cual sugiere que esto podría ser un mecanismo alternativo para la aducción de ADN en la producción de la división celular y defectos potencial de carcinogenicidad (Chatzizacharias, Kouraklis, y Theocharis, 2008; Sickles, Sperry, Testino, y Friedman, 2007). Adicionalmente, se ha postulado como posible mecanismo un efecto hormonal en glándulas endocrinas (tiroides) y mamarias de rata para la carcinogenicidad de la acrilamida (OMS, 2005).

2.4. Estrategias empleadas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos

Es importante entender que aunque la eliminación de acrilamida en los alimentos es prácticamente imposible, las investigaciones en el campo de la formación y mitigación de acrilamida han puesto de manifiesto varios factores clave que pueden influir en la formación de acrilamida en los alimentos (Friedman, 2003).

Desde 2002, se han desarrollado diversas investigaciones que han sido publicadas respecto a la concentración de acrilamida en diversas matrices alimentarias (Cheng *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2012). Dos enfoques tecnológicos conceptualmente diferentes se consideran como formas de reducir los niveles de esta molécula en los alimentos (Figura 2.4.1).

- a) Intervenciones de mitigación, para evitar la formación de acrilamida tan bajo como sea posible durante el proceso de calentamiento.
- b) Intervenciones de eliminación, con el objetivo de alejarse de la acrilamida ya formada a partir del producto terminado.

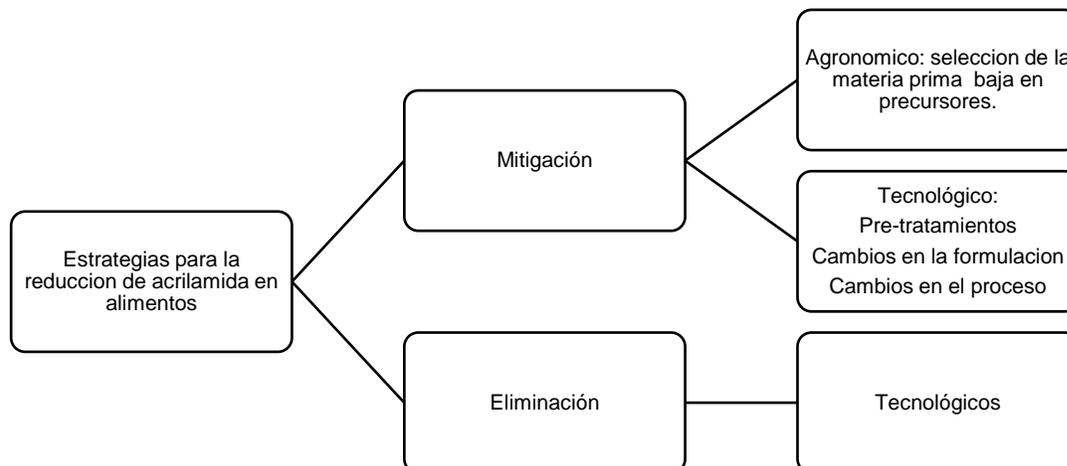


FIGURA 2.2.1. Estrategias de reducción de acrilamida en alimentos.

Los pasos de mitigación incluyen el cambio en las recetas y formulaciones. Por ejemplo, selección de variedades de papas y especies de cereales o variedades bajas de precursores de acrilamida. En este sentido, factores tales como variedades de cultivo, condiciones de almacenamiento y las condiciones climáticas de la temporada se sabe que tienen un efecto sobre los niveles de asparagina y por lo tanto sobre la acrilamida en papas formada cuando están fritas, al horno o asadas. Otros factores agronómicos tales como los niveles de azufre en el suelo y el nitrógeno de la fertilización se han encontrado para tener una influencia en los niveles de asparagina formados en cereales cuando se cocinan. Investigaciones sobre el contenido de asparagina en las variedades de trigo europeos revela al menos un doble rango dentro del mismo año de cosecha, y una variación de hasta cinco veces entre variedades. Los programas de siembra selectiva para obtener nuevas variedades de cultivos (centeno y trigo) que albergan cantidades naturalmente inferiores del aminoácido asparagina libre, tendría un impacto mucho mayor en la reducción de acrilamida que las medidas aplicadas hasta ahora. Por desgracia, las lagunas en la investigación a nivel agronómico no se abordan adecuadamente en el programa de la Dirección General de Investigación (Pedreschi, 2014).

Por otra parte, la adición de proteínas, glicina, cisteína y otros aminoácidos, ácidos orgánicos y acidulantes, iones de calcio, ciclodextrina, antioxidantes naturales o antioxidante extractos, así como la sustitución de azúcares reductores con sacarosa y de bicarbonato de amonio con bicarbonato de sodio, o el uso de inhibidores de la formación de acrilamida como la enzima asparaginasa, han sido empleados para mitigar la presencia de AA en los alimentos (Li *et al.*, 2012).

Modificaciones en las condiciones del proceso, tales como tiempo-temperatura de freído, el cambio en el tipo de horno, y la fermentación prolongada han demostrado que funciona en diversos productos comerciales para la reducción de

acrilamida. Por ejemplo, se ha encontrado que la acrilamida se reduce a temperaturas por encima de 180 °C en algunos alimentos, tales como café y cereales tostados/horneados (Vinci, 2012). La formación de acrilamida en los alimentos también es dependiente del pH, el óptimo para la formación de acrilamida es de aproximadamente 7, por lo que, la disminución del pH del medio desfavorece la reacción de Millard, y por lo tanto la formación de AA (Zhang y Zhang, 2007). Otro factor importante, es la actividad de agua que parece ser un factor crítico para la formación de la acrilamida (Taeyman *et al.*, 2004). La eliminación de acrilamida después de la formación por medio de vacío también se ha propuesto, pero su impacto en las prácticas de fabricación y calidad de los alimentos todavía no se ha establecido claramente (Anese, Suman, y Nicoli, 2010). La "caja de herramientas" creada en por la FDA, y por la Confederación de la Alimentación y Bebidas de la Unión Europea (CIAA), resumen las medidas destinadas a lograr la reducción de acrilamida en las categorías de alimentos pertinentes, utilizando los conocimientos fundamentales alcanzado en estudios mecánicos (FDA, 2006; CIAA, 2007).

Otra posibilidad, que al parecer es prometedora en los productos de panadería, es extender el proceso de fermentación con levaduras capaces de hidrolizar los precursores clave para la formación de AA. En este sentido, diversos estudios (Fredriksson *et al.*, 2004; Lindsay y Jan, 2005; Claus *et al.*, 2008) han demostrado que el tiempo de fermentación tiene un impacto importante sobre los niveles de acrilamida formados. En estos estudios, la levadura de fermentación (*Saccharomyces cerevisiae*) consume altas cantidades de asparagina libre. Se ha reportado una disminución del 60-90% de los precursores de acrilamida en productos de cereales (Fredriksson *et al.*, 2004, Claus *et al.*, 2008). Por lo tanto, el tiempo de fermentación al menos de 1 h es suficiente para que se lleve a cabo la reducción de acrilamida en la producción industrial del pan, mientras que la fermentación superior a 3 h, sugerida por Fredriksson *et al.* (2004) fue inadecuada debido a la degradación de la cadena de gluten y subsecuentemente el aplanamiento de los productos finales (panes). La adición de levadura de bajo

gaseado resulta efectiva en la mitigación del contenido de AA en productos de panadería leudados. De hecho altas cantidades de levadura pueden ser utilizadas para permitir una gran descomposición de la asparagina, mientras causan la misma generación de gas. Aunque el uso de cepas de *Lactobacillus* ha sido planteado para este efecto, actualmente no se ha aplicado en producción industrial (FOOD DRINK EUROPE, 2011).

Aunque las estrategias antes planteadas han sido ampliamente fundamentadas, ninguna de ellas garantiza la eliminación completa de acrilamida en los alimentos, por lo que persiste la necesidad de buscar estrategias que permitan reducir la absorción de acrilamida en el organismo y reducir así su potencial toxigénico.

2.6.2 Uso de bacterias ácido lácticas como modelo biológico de descontaminación de acrilamida

En los últimos años, se han desarrollado investigaciones *in vitro* e *in vivo*, sobre la capacidad de bacterias ácido lácticas (BAL) para la reducir la absorción de acrilamida. Algunos estudios reportan la degradación metabólica a través de una cascada de reacciones enzimáticas como posible mecanismo responsable de la remoción de carcinógenos por las bacterias ácido lácticas (BAL) (Alberts *et al.*, 2006). Otros trabajos sugieren que la actividad anticarcinogénica reside en la pared celular bacteriana (Peltonen *et al.*, 2001; Lahtinen *et al.*, 2004; Zinedine *et al.*, 2005). En este sentido, Serrano *et al.* (2014) evaluaron *in vitro* la capacidad de diferentes cepas de *Lactobacillus*, incluyendo *Lb. casei* Shirota (SHI), *Lb. reuteri* NRRL 14171 (LR), *Lb. johnsonii* ATCC 3200 (JH), *Lb. acidophilus* ATCC 4796 (AC), *Lb. fermentum*, ATCC 11976 (FER), *Lb. rhamnosus* ATCC 13075 (RHA), *Lb. helveticus* ATCC 27558 (HL), *Lb. casei* ATCC 334 (L334), *Lb. casei* L9 (L9), *Lb. casei* L30 (L30), *Lb. casei* 12A (12A), *Lb. casei* 21/1 (L21/1), *Lb. casei* 7R1 (7R1), y *Lb. casei* DPC 3968 (DPC) para remover AA (5 µg/mL) en solución acuosa,

encontrando que las cepas LR y LSI exhibieron la mayor capacidad de remover AA, con un 13.38 y 16.19%, respectivamente.

Posteriormente, los mismos autores demostraron, mediante un ensayo basado en el análisis composicional de la pared celular de estas bacterias, que los oxígenos del grupo carbonilo de la AA podrían interactuar con los grupos hidroxilo de la glucosa o glicerol que conforman los ácidos teicoicos de estas bacterias (Serrano *et al.* 2015).

Posteriormente, Rivas *et al.* (2016) evaluaron la capacidad estas cepas para remover acrilamida bajo condiciones gastrointestinales simuladas en un sistema dinámico. Los resultados del trabajo permitieron evidenciar que ambas bacterias removieron AA bajo las diferentes condiciones gastrointestinales simuladas, siendo *Lactobacillus casei* Shirota la más efectiva (ca. 70 %). Además se determinó que $\geq 10^6$ UFC/mL son suficientes para la remoción de AA. La cepa de *Lactobacillus reuteri* mostró ser la bacteria más sensible al proceso digestivo con una pérdida de viabilidad de entre 3-5 ciclos logarítmicos. En general, ambas bacterias perdieron mayor viabilidad en condiciones de ayuno; sin embargo, al final de ambos procesos las bacterias sobrevivieron en concentraciones suficientes para remover la toxina.

3. JUSTIFICACIÓN

Aunque estos resultados con BAL han mostrado ser muy prometedores, los estudios realizados hasta ahora solo han considerado en su mayoría la población microbiana del genero *Lactobacillus*, evaluando cada cepa de forma individual. Por lo que hasta el momento se desconoce el posible papel que desempeñan otros grupos bacterianos, individuales o en consorcio, propios de la flora nativa del tracto gastrointestinal humano, los cuales interactúan con las BAL en un estado de balance denominado eubiosis, en la biodisponibilidad de la acrilamida. Por tal razón, el presente trabajo plantea la siguiente hipótesis y objetivos.

4. HIPÓTESIS

Consortios bacterianos conformados por cepas probióticas específicas y/o cepas representativas de la microbiota nativa del tracto gastrointestinal podrían desempeñar un papel importante en la reducción de la disponibilidad de acrilamida *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar las posibles interacciones sinérgicas de consorcios conformados por cepas probióticas específicas y/o cepas representativas de la microbiota nativa del tracto gastrointestinal, para fijar acrilamida *in vitro*.

5.2. Específicos

- Evaluar la capacidad individual de diferentes cepas probióticas del género *Lactobacillus* y bacterias representativas de la microbiota nativa del tracto gastrointestinal para fijar acrilamida *in vitro*.
- Determinar la capacidad de mezclas de cepas probióticas y/o bacterias representativas de la microbiota nativa del tracto gastrointestinal para fijar acrilamida *in vitro*.
- Evaluar la reducción de AA de un alimento modelo (papas fritas) por consorcios seleccionados, mediante la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Cepas de estudio

En el presente estudio se utilizaron 16 cepas bacterianas (Tabla 6.1.1), diez de las cuales son BAL probióticas (CP) que previamente han mostrado capacidad de remover AA *in vitro* (Serrano-Niño et al., 2014), y las otras seis, son bacterias nativas del duodeno (CND) humano (Nguyen *et al.*, 2015), las cuales se obtuvieron de la ATCC de manera liofilizada. Las cepas restantes fueron donadas por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) de Hermosillo Son. Estos últimos cultivos permitieron mostrar un campo más amplio de especies probadas para la reducción de AA en sistema *in vitro* y con ello hacer una selección para formar los consorcios o mezclas de bacterias esperadas.

TABLA 6.1.1. Cepas empleadas en el estudio

CEPA	CÓDIGO	ORIGEN/FUENTE
BACTERIAS ACIDO LACTICAS		
<i>L. casei</i> Shirota	L. Shi	
<i>L. reuteri</i> NRRL 14171	L. r.	Lab. Química de Alimentos (UNIDA)
<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	L. p.	
<i>L. casei</i> CRL 431	CRL	
<i>L. fermentum</i> NRRL B-1932	L. f.	
<i>L. fermentum</i> JB3	B3	CIAD Hermosillo, Son.
<i>L. pentosus</i> JB4	B4	

<i>L. plantarum</i> JB5	B5	
<i>L. pentosus</i> J37	B17	
<i>Bacillus coagulans</i>	B. coag	
BACTERIAS REPRESENTATIVAS DE LA MICROBIOTA NORMAL (Nguyen et al., 2015)		
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> ATCC® 27676	B. c.	
<i>Streptococcus gallolyticus</i> ATCC® 9809	S. g.	
<i>Streptococcus salivarius</i> <i>subsp. thermophilus</i> ATCC® 19258	S. st.	ATCC
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43892	E. coli	
<i>Veillonella párvula</i> ATCC® 17745	V. p.	
<i>Enterococcus faecium</i>	E. f.	

6.2. Propagación de bacterias y preparación de los cultivos de trabajo.

Las cepas de *Lactobacillus*, *Bacillus coagulans* y *Bifidobacterium* fueron reactivadas en medio MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, Difco®, México) ajustado a un pH de 5.5 ±1.0. *E. coli* fue reactivada en caldo EC (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), mientras que para las cepas de *Streptococcus*, *Veillonella* y *Enterococcus* se utilizaron los medios BHI (Difco®, México), ATCC® 1252 y ATCC® 188, respectivamente (ver apéndice A). Las bacterias reactivadas fueron propagadas utilizando tres sub-cultivos rutinarios.

Cada sub-cultivo involucró un inóculo del 1%, a 24, 16 y 12 h de incubación, respectivamente, a 37 °C. A partir del tercer sub-cultivo, una alícuota (1%) fue transferida a un matraz Erlenmeyer (Pyrex®) conteniendo 35 mL de sus respectivos medios. Los matraces fueron incubados durante 12 y 16 h a 37 °C, sin

agitación con la finalidad de obtener los cultivos en diferentes fases de crecimiento (exponencial y estacionario). Al final del periodo de incubación, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación ($11200 \times g$, 10 min, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$), y el paquete bacteriano obtenido fue lavado dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS, 5 mmol/L, pH 7.2) (apéndice B). Finalmente, el paquete bacteriano fue resuspendido en 20 mL de PBS estéril. La concentración bacteriana (ca. 10^9 UFC/mL) fue determinada mediante el método de vaciado en placa (Madigan *et al.*, 2004). Se utilizó una alícuota de 8 mL de los cultivos suspendidos en PBS, para llevar a cabo los ensayos correspondientes para cada cepa.

6.3. Determinación de los tiempos de crecimiento de cada bacteria para el estudio *in vitro*

Se realizaron cinéticas de crecimiento mediante un método turbidimétrico (densidad óptica) para cada una de las 16 bacterias mostradas anteriormente. Se inició con una alícuota del 1% para 50 mL de medio para posteriormente ser incubadas a $36\text{-}37^{\circ}\text{C}$ tomando una muestra cada 60 minutos y sometiéndola a medición en un espectro UV-visible (Spectronic Genesys 20™) a 600 nm. Se obtuvieron los datos y se capturaron realizando diluciones para las cepas que sobrepasan la proporcionalidad entre la absorbancia y masa bacteriana que sólo es válida para $>10^7$ UFC/mL.

6.4 Preparación de la solución de trabajo

Una solución madre de AA fue preparada disolviendo 0.05 g de acrilamida grado reactivo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en 100 mL de agua desionizada estéril. Posteriormente, se prepararon diferentes soluciones (0.5 A 100 $\mu\text{g/mL}$) para obtener la curva estándar de acrilamida (Apéndice C), de acuerdo a la metodología reportada por Serrano-Niño *et al.* (2015). Se emplearon soluciones con una concentración de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ para los ensayos *in vitro*.

6.5 Alimento modelo-papas fritas comerciales.

Para este estudio se utilizó un solo lote de papas fritas (en rebanadas) comerciales Chips® sal de mar de la marca Barcel (México). Para ello, 1 g de papas fueron molidas y homogenizadas con un procesador de alimentos (Braun®, KSM2, Alemania). El homogeneizado fue almacenado en congelación en recipientes herméticos hasta su uso posterior.

6.6. Evaluación del efecto de la fase de crecimiento bacteriano, concentración de AA y tiempo de incubación en la remoción de la toxina por bacterias lácticas y bacterias nativas del duodeno humano.

Una alícuota (1 mL) de los respectivos cultivos (en diferentes fases de crecimiento) suspendidos en PBS fue centrifugada (Eppendorf – Netheler – Hinz GmbH 22331 Hamburg) durante 10 min (11200 x g, 4 °C). Los paquetes celulares se re-suspendieron con 1 mL de las distintas soluciones de trabajo (5 y 10 µg/mL) de AA ajustadas a diferentes valores de pH (5 y 7). Posteriormente, cada mezcla fue incubada durante 4 o 12 h a 37 °C, sin agitación. Una vez transcurrido el respectivo periodo de incubación, las mezclas fueron nuevamente centrifugadas. Por una parte, los sobrenadantes fueron recolectados para la posterior cuantificación de AA no removida por HPLC, con las condiciones mencionadas en la sección 6.9.

Por otra parte, los paquetes celulares, con la acrilamida fijada, fueron re-suspendidos en 1 mL de PBS, se agitaron por 1 min y se centrifugaron durante 10 min (11200 x g, 4°C). Los sobrenadantes fueron recuperados para la posterior cuantificación de la AA liberada, y los paquetes bacterianos fueron nuevamente sujetos a 2 lavados adicionales como se describió anteriormente.

6.7. Selección de las mejores condiciones (pH, tiempo, temperatura, fase de crecimiento bacteriano y concentración de AA)

La selección de las condiciones óptimas para el análisis *in vitro* y la obtención de las mejores cepas para la formación de los consorcios fue mediante un análisis de superficie de respuesta con arreglo factorial 2x2x2x16.

6.8. Capacidad de consorcios de cepas probióticas y/o bacterias representativas de la microbiota nativa (MN) para fijar acrilamida en condiciones *in vitro*

De las cepas evaluadas, se seleccionaron aquellas con mejor capacidad de fijación de AA para la formación de diferentes consorcios, a saber CP, CND y CP+CND. Para ello, cada una de las cepas (probióticas y nativas) fueron propagadas y ajustadas a una concentración celular de 10^7 UFC/mL, como se describió anteriormente. Después, las bacterias fueron mezcladas en una proporción 1:1. La evaluación de la capacidad de los distintos consorcios para fijar acrilamida fue llevada a cabo bajo las mejores condiciones determinadas en el ensayo de las cepas individuales.

6.9. Determinación de la concentración de AA en el alimento modelo.

Para determinar la concentración de AA en el alimento modelo se pesó 1.0 g de muestra y se le añadieron 10 mL de ácido fórmico (J.T. Baker, USA) al 0.1 % (v/v), la muestra se homogeneizó con ayuda de un agitador magnético (250 rpm, 20 min). Posteriormente, la muestra fue centrifugada ($12800 \times g$ durante 30 min, a 4°C) y el sobrenadante fue colectado. Posteriormente, una alícuota de 1 mL fue eluida con 1 mL de agua desionizada en una columna SPE C18 (Sigma-Aldrich/Supelco, USA) (Apéndice D), previamente acondicionadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las fracciones colectadas fueron almacenadas para su posterior análisis por HPLC.

6.10. Cuantificación de acrilamida por HPLC

Para la cuantificación de AA en las muestras colectadas y la construcción de curva de calibración, se empleó un método cromatográfico en fase reversa

(RP-HPLC) similar al reportado por Rivas-Jimenez et al. (2016) con algunas modificaciones. El sistema de RP-HPLC (Waters[®], Milford, MA) consistió de una columna C18 ODS spheri-5 (220 nm x 4.6 mm, Supelco[®]), un detector UV/visible (Waters[®] 2487) ajustado a un longitud de onda de 195 nm, un sistema de bombeo binario de solventes con controlador (Waters[®] 600) y Software (Empower Windows XP profesional, Waters[®]) para la adquisición y análisis de datos. Como las muestras microfiltradas (0.45 µm) no requirieron ningún paso de extracción, éstas fueron inyectadas de forma directa al equipo utilizando un auto-muestreador (Waters[®] 717 plus). El volumen de inyección fue de 10 µL, utilizando una fase móvil (isocrática) formada con agua desionizada y 0.1% de ácido fórmico, con una velocidad de flujo de 1 mL/min.

6.11. Modelo gastrointestinal simulado en ayuno

Después de evaluar los consorcios en condiciones *in vitro*, se procedió a exponerlos a condiciones gastrointestinales simuladas.

El modelo utilizado fue similar al propuesto por Oomen *et al.* (2003) siguiendo las modificaciones realizadas por Rivas-Jimenez *et al.* (2016). La composición de las soluciones gástricas (Apéndice E) se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Vensantvoort *et al.* (2005). Este modelo considera diversos factores fisiológicos tales como el tránsito dinámico, a través de movimientos peristálticos regulados, que sufren la matriz alimentaria y las bacterias, así como el flujo y proporción de secreciones salivales, gástricas, biliares y pancreáticas. También toma en cuenta los cambios de pH durante la digestión, así como las condiciones de oscuridad, mismas que existen en el sistema digestivo.

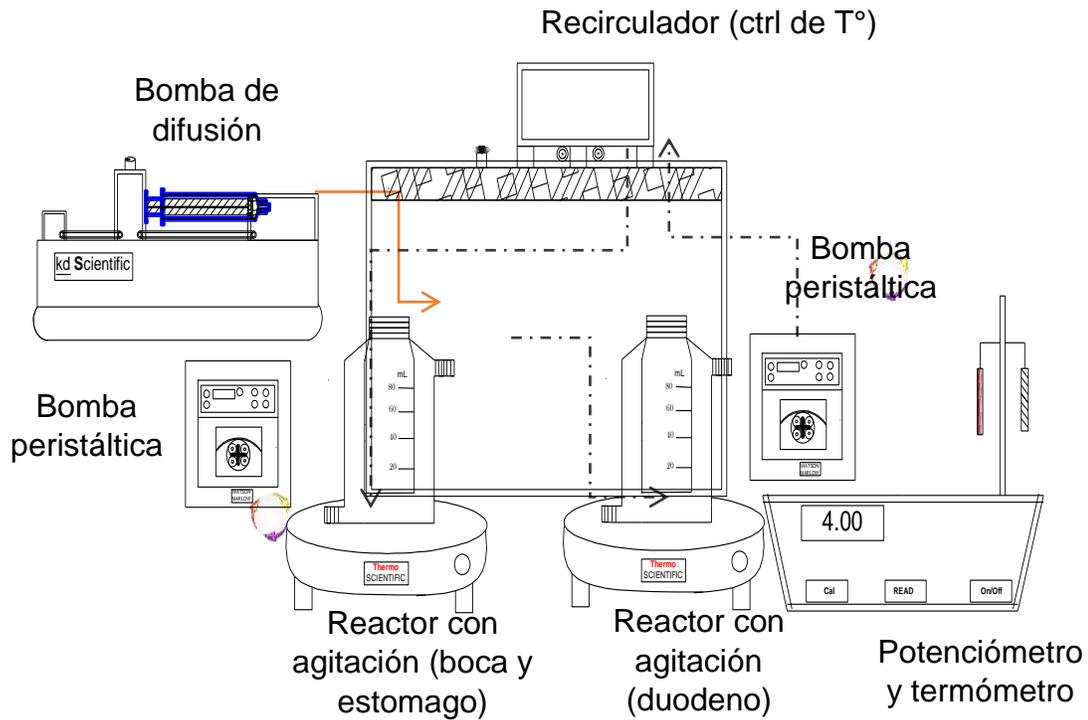


FIGURA 6.11.1. Representación esquemática del sistema digestivo simulado utilizado.

La Figura 6.11.1 muestra la representación esquemática del modelo utilizado, el cual estuvo conformado de 2 frascos de borosilicato graduados (180 y 250 mL) acoplados sistema de recirculación (Cole Parmer Polystat[®] con control de temperatura) con temperatura controlada, dos bombas peristálticas (Watson Marlow 120S/DV control manual variable), una bomba de difusión digital (KD Scientific[™], serie 200, Holliston, MA), un potenciómetro (Ohaus, modelo ST2100) y dos placas de agitación (Thermo Scientific-Magnetic Stirrer RT Basic- 12).

El estudio consistió en un modelo de 3 etapas considerando boca, estómago y duodeno (parte inicial del intestino delgado). El intestino grueso no se consideró ya que la absorción de nutrientes y otros compuestos como las toxinas se lleva a cabo principalmente en el intestino delgado, específicamente en el duodeno. En la Figura 6.11.2 se muestra las condiciones utilizadas para el modelo gastrointestinal en condiciones de ayuno utilizadas en este estudio.

Modelo en ayuno

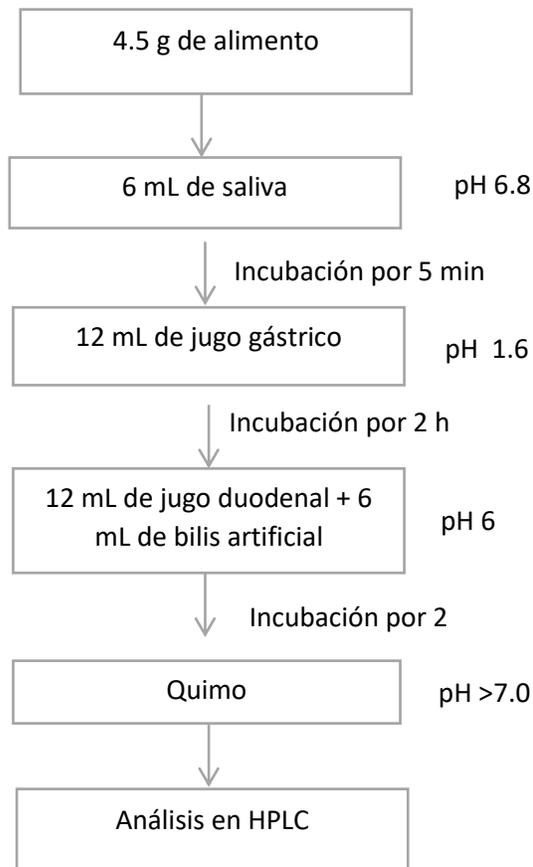


FIGURA 6.11.2. Representación del modelo de digestión en condiciones de ayuno.

6.11.1. Procedimiento del modelo de digestión en ayuno.

El proceso se inició en la etapa simulada por la boca para ello, 4.5 g del homogenizado de papa comercial fue re-suspendida con 8 mL de PBS (Testigo) o del respectivo consorcio de bacterias a evaluar. Posteriormente, se inyectaron 6 mL de saliva (ca. 6-7 mL/min) y la mezcla fue incubada y agitada durante 5 min. En este punto se retiró un alícuota de 1 mL para determinar la concentración bacteriana inicial. Posteriormente, en la etapa que simuló las condiciones del estómago, se inyectaron 12 mL de jugo gástrico (0.33 mL/min). El pH se ajustó gradualmente con HCl hasta alcanzar un pH de 1.6. La mezcla permaneció en incubación y agitación durante 2 h. Como tercer paso, que simuló el proceso digestivo en el intestino delgado, se adicionaron simultáneamente 12 mL de jugo duodenal (0.33 mL/min) y 6 mL de jugo biliar (0.5 mL/min). El pH de las mezclas se ajustó gradualmente con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) hasta llegar a un valor de pH final de 6. Las mezclas fueron incubadas durante 2 h, periodo en el cual fue recirculada con ayuda de una bomba peristáltica para simular el estrés mecánico originado por la motilidad intestinal durante la digestión. Una vez recorrido el tiempo de incubación, el bolo alimenticio fue centrifugado (12857 g, 5 min, 4 °C). Una alícuota (1 mL) del sobrenadante fue colectada y purificada en una columna SPE C18 para la posterior cuantificación de AA por HPLC. Por otra parte, el paquete de residuos alimenticios fue re-suspendido en 14 mL de agua destilada estéril, equivalentes al volumen inicial en la etapa simulada de la boca, y se empleo una alícuota de 1 mL para determinar la concentración bacteriana al final del proceso digestivo simulado para evaluar la resistencia de los consorcios al proceso digestivo simulado.

6.12. Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas en los resultados, se utilizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para evaluar la acrilamida removida por bacterias individuales y un diseño completamente al azar con arreglo factorial para la acrilamida removida por los consorcios formados, ambos tratados

con una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico Minitab v.16. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Establecimiento del tiempo de incubación de las bacterias de manera individual.

Para determinar los tiempos de incubación que serían evaluados en este estudio, se realizaron curvas de crecimiento mediante el método espectrofotométrico. Los resultados de las bacterias ácido lácticas de muestran en la Figura 7.1.1(a) mostraron que la fase estacionaria de este grupo de bacterias se encuentra dentro de un tiempo de 10-16 h de incubación, al igual que las bacterias representativas de la microbiota nativa, aunque estas últimas se observa un crecimiento mas lento para *Veionella parvula* ATCC 17745; sin embargo, la mayoría de este grupo de bacterias mantuvo un crecimiento exponencial hasta las 10-11 h, y su fase estacionaria a las 15-16 horas.

Estudios previos han reportado la influencia de la concentración bacteriana sobre la remoción de distintos xenobióticos dietarios. Por ejemplo, Pizzolitto *et al.* (2011) reportaron que al incrementar de manera gradual la concentración de *Lb. acidophilus* 24 de 10^9 a 10^{10} UFC/mL, se observó un aumento en la capacidad de fijación de la micotoxina AFB₁, desde 0.2 a 0.6 µg/mL. Sin embargo, la concentración utilizada no resultó suficiente para fijar toda la toxina presente en el medio (0.75 µg/mL); el mismo comportamiento fue observado en el estudio de Rivas-Jimenez *et al.* (2016), quien estableció que una concentración de 10^8 - 10^9 UFC/mL puede ser óptima para fijar mas del 50% de AA en un sistema digestivo dinámico.

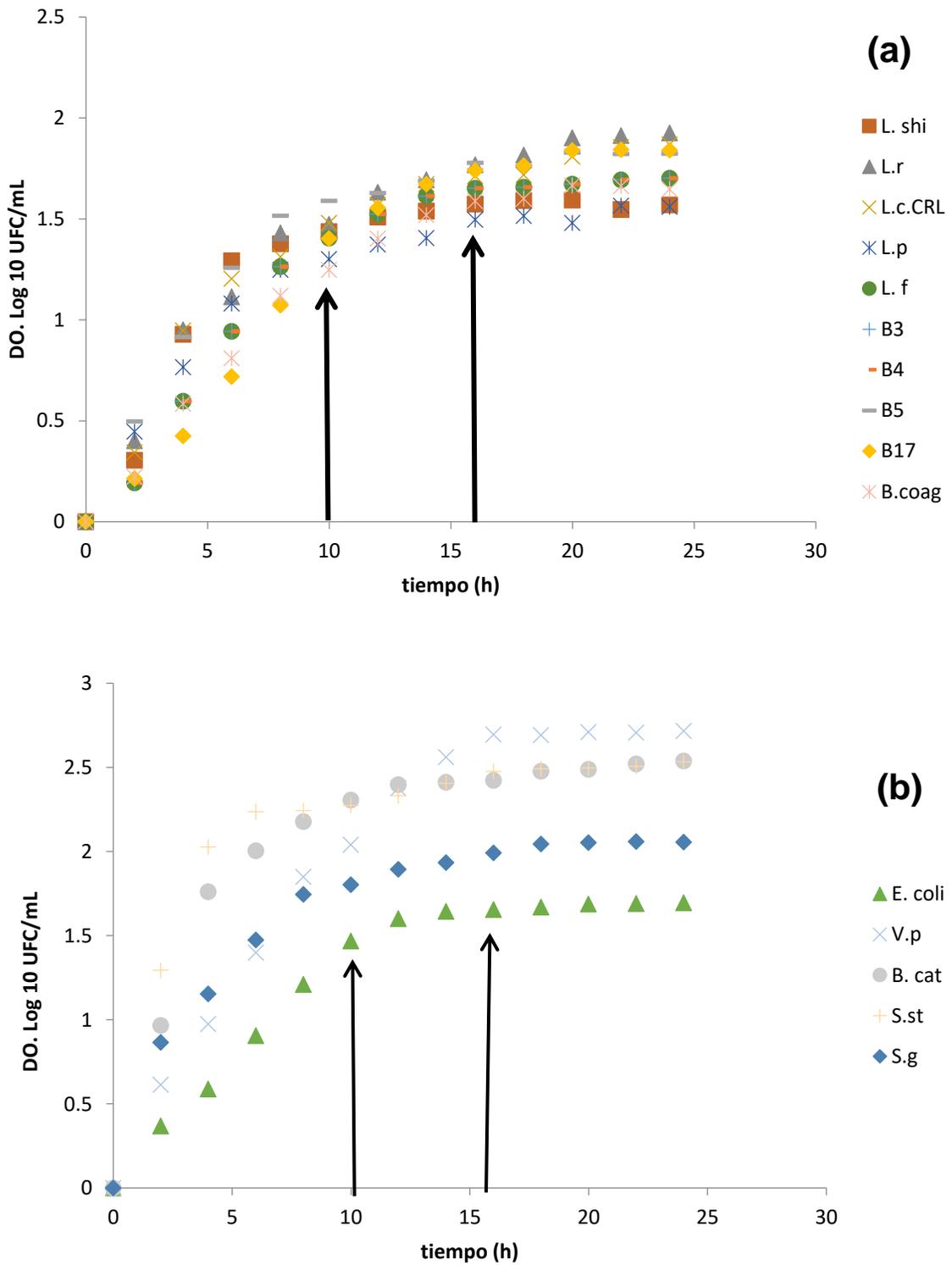


FIGURA 7.1.1. Curvas de crecimiento de bacterias ácido lácticas (a) y bacterias representativas de la flora nativa del duodeno (b). 37 °C por 24 horas.

7.2. Estandarización del método de cuantificación por HPLC de acrilamida

Antes de llevar a cabo la cuantificación de la acrilamida residual evaluada en los sistemas *in vitro*, la estandarización del método de cuantificación se llevó a cabo obteniendo un tiempo de retención de 3.7 min (Apéndice F) y un tiempo de elución total de 10 min.

7.3. Evaluación de la capacidad de dieciséis cepas para remover acrilamida mediante condiciones *in vitro*.

Los resultados del ensayo de fijación de AA revelaron que las cepas que presentaron la mayor capacidad de fijación fueron las 10 bacterias probióticas, siendo *B. coagulans*, *Lb. pentosus* JB4 (B4), *Lb. fermentum* JB3 (B3) y *Lb. casei* Shirota las cepas que fijaron un mayor nivel de AA (89.59, 85.26, 83.78 y 83.18 %, respectivamente) en su fase estacionara. Sin embargo, las cepas nativas no mostraron porcentajes de fijación superiores al 66.64 %, siendo *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC® 19258 la que mostro mayor capacidad de fijación. En contraste, *Veillonella parvula* ATCC® 17745 tuvo la menor capacidad de fijación después de 16 y 12 h de incubación (3.24 y 11.93 %, respectivamente) (Figura 7.3.1).

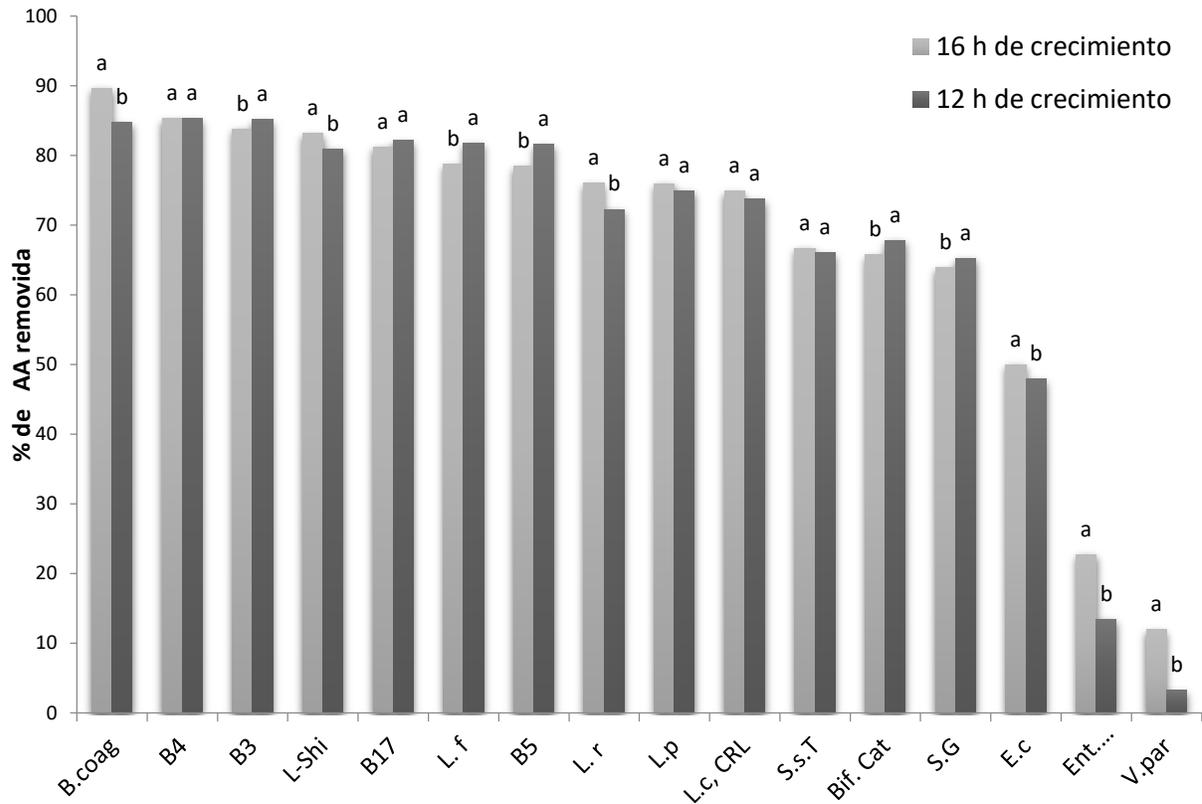


FIGURA 7.3.1. Porcentaje de AA fijada por cepas probióticas y cepas representativas de la microbiota nativa en diferentes fases de crecimiento, exponencial (12h) y estacionaria (16h). Concentración inicial de AA = 5 µg/mL, tiempo de exposición a la AA= 4h, 37°C y pH=7

La cantidad de AA fijada fue específica para cada cepa y los valores oscilaron desde 3.24 hasta 84.73 % a las 12 h de crecimiento de las bacterias. Las cepas de *B. coagulans*, B4, B3 y *Lb. casei* Shirota tuvieron la mayor capacidad de fijación (84.73, 85.30, 85.16 y 80.05 %, respectivamente), por lo que se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la cantidad de AA fijada entre estas cepas. A las 16 h la mejor cepa para fijar AA fue *Bacillus coagulans*, la cual fijó 89.59 % de la toxina. Esta cepa mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a las otras cepas que fijaron entre 11.93 y ca. 90 %. A este tiempo de

crecimiento bacteriano, las cepas representativas de la microbiota nativa (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC® 19258; *Bifidobacterium catenulatum* ATCC® 27676; *Streptococcus gallolyticus* ATCC® 9809; *Escherichia coli* ATCC® 43892; *Enterococcus faecium* ATCC® BAA-2316; *Veillonella parvula* ATCC® 17745) mostraron una capacidad reducida de fijación en ambos ensayos; es decir, a 12 y 16 h (66.02-66.64 %, 67.79-65.72 %, 65.22-63.86 %, 47.93-49.98 %, 13.47-22.73 % y 3.24-11.93 %, respectivamente).

En general, las bacterias ácido lácticas (*Bacillus coagulans* BC30, *Lb. casei* Shirota, *Lb. reuteri* NRRL 14171, *Lb. plantarum* NRRL B-4496, *Lb. casei* CRL 431, *Lb. fermentum* NRRL B-1932, *Lb. fermentum* JB3, *Lb. pentosus* JB4, *Lb. plantarum* JB5, *Lb. pentosus* J37), mostraron mejor capacidad para fijar AA y la cepa *Bacillus coagulans* BC30 fue la que mostró la mejor capacidad de fijar AA en cualquier período de tiempo de crecimiento bacteriano.

Los resultados presentados en este trabajo concuerdan con los reportados en estudios previos en donde se demuestra la capacidad de las bacterias ácido lácticas para fijar diversas toxinas, como el realizado por Serrano-Niño *et al.* (2014), quienes evaluaron la capacidad de 14 cepas de bacterias lácticas para remover acrilamida en solución acuosa a concentración de exposición de AA de 5 y 10 µg/mL. Estos autores determinaron una capacidad de unión a la bacteria de 11.89-29.12% siendo *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei* Shirota, las cepas más eficientes después de 12 h de incubación de la bacteria con la toxina utilizaron un tiempo de crecimiento bacteriano de 16 h y una concentración de 5 µg/mL. En el presente trabajo se tomaron como referencia dichas bacterias; sin embargo, el *Bacillus coagulans* BC30 evidenció mejores resultados que las cepas antes mencionadas.

Por otra parte se ha demostrado la capacidad de fijación de AFB₁ realizada por Hernández Mendoza *et al.* (2009b), donde evaluaron bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En el presente estudio las mismas bacterias (*L. r* y *L.c.* Shi) fueron efectivas para la reducción de AA en

medio líquido *in vitro*, pero al evaluar nuevas cepas lácticas, el *Bacillus coagulans* BC30 demostró que puede llegar a fijar hasta cerca de 90 % en cualquiera de las condiciones estudiadas. En otro estudio, Halttunen *et al.* en el 2006, estudiaron la capacidad de cepas de *Lactobacillus* para eliminar metales pesados del agua, observando una eliminación significativa, y encontraron que la capacidad de eliminación fue específica del metal fijado y también para cada cepa bacteriana. Del mismo modo, en este trabajo, la fijación de AA fue específica para cada cepa de estudio, aun en las cepas representativas de la microbiota nativa.

Otro de los parámetros estudiados fue el tiempo de exposición a la AA. En la Figura 7.3.2 se puede observar el comportamiento de las 16 cepas individuales donde se evaluaron 4 y 12 h de incubación:

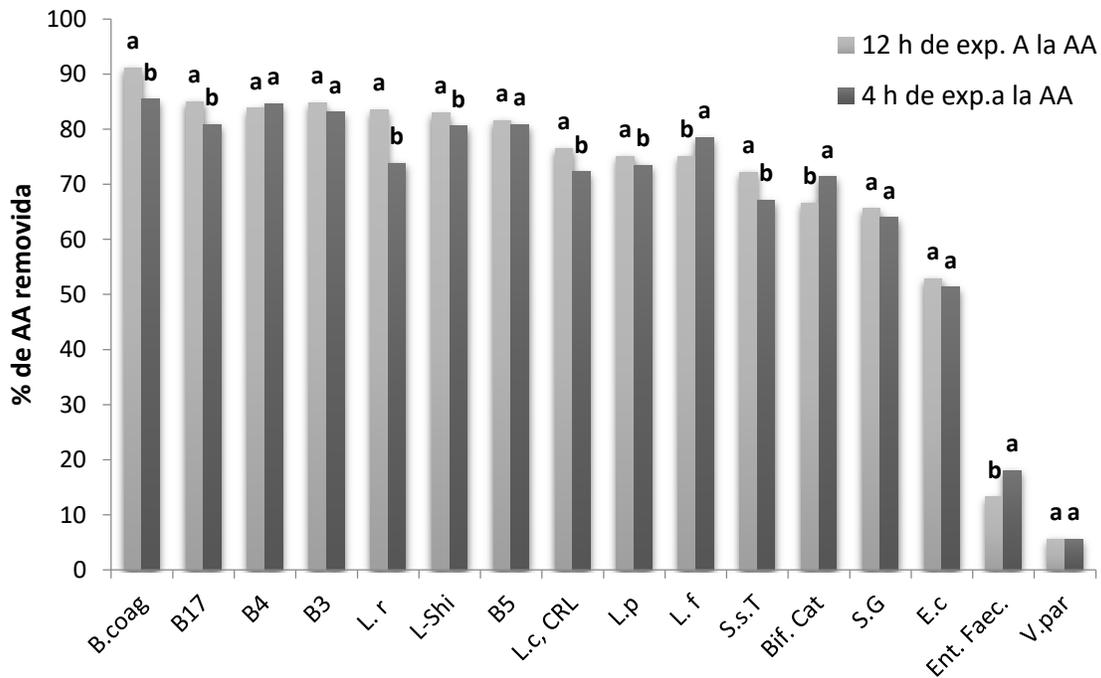


FIGURA 7.3.2. Porcentaje de AA fijada por cepas probióticas y cepas nativas a diferentes tiempos exposición a la AA (4 y 12 h). Concentración inicial de AA = 5 µg/mL, 37°C, pH = 7, fase exponencial = 12 h

Bacillus coagulans BC30 demostró fijar > 90%; además, entre las 10 cepas ácido lácticas no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en comparación con las cepas de la flora nativa; sin embargo, los tiempos de incubación evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el porcentaje de AA fijada al aumentar el tiempo de incubación. Estos resultados son consistentes con los reportados por Serrano-Niño (2013), quien evaluó 3 tiempos de incubación (0, 4 y 12 h) en 14 cepas de bacterias ácido lácticas. Los porcentajes de fijación a las 0 h oscilaron desde 11.89 hasta 19.17 %, lo que sugiere que este es un proceso rápido que podría ocurrir pasivamente en la superficie bacteriana.

De manera general, la cantidad de acrilamida fijada por las cepas: *Bacillus coagulans* BC30, B17 (*L. pentosus* J37), B3 (*L. fermentum* JB3), *L. reuteri* NRRL 14171, *L. casei* Shirota, B5 (*L. plantarum* JB5), *L. casei* CRL431, *L. plantarum* NRRL B-4496 y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC® 19258 aumentó significativamente cuando el tiempo de incubación aumento de 4 a 12 horas. En el caso de B4 (*L. pentosus* JB4), *L. fermentum* NRRL B-1932, *Bifidobacterium catenulatum* ATCC® 27676, *Streptococcus gallolyticus* ATCC® 9809, *Escherichia coli* ATCC® 43892, *Veillonella parvula* ATCC® 17745 y *Enterococcus faecium* ATCC® BAA-2316, no hubo diferencia significativa en los porcentajes de absorción, por lo que las bacterias representativas de la flora nativa de la parte superior del intestino delgado no muestra dicho aumento. Las diferenciaciones entre cada una de las cepas pueden sugerir que cada una tiene sitios de fijación diferente, así como también lo mencionan Serrano-Niño *et al.* en 2015, referente a que la composición de la membrana celular de cada una de las cepas bacterianas difiere de acuerdo a la especie evaluada, donde dichos autores relacionan la presencia de ácidos teicoicos (AT) como los principales componentes que podrían estar implicados en la interacción con las toxinas como la AA y AFB₁ con los grupos hidroxilos de la glucosa y glicerol presentes en los AT, mismos que difieren en cantidad de acuerdo a la cepa existente.

Respecto a la concentración de la solución de AA utilizadas en este estudio, se mostró que el proceso de fijación fue más eficaz con una concentración de 5 µg/mL que a 10 µg/mL (Figura 7.3.3).

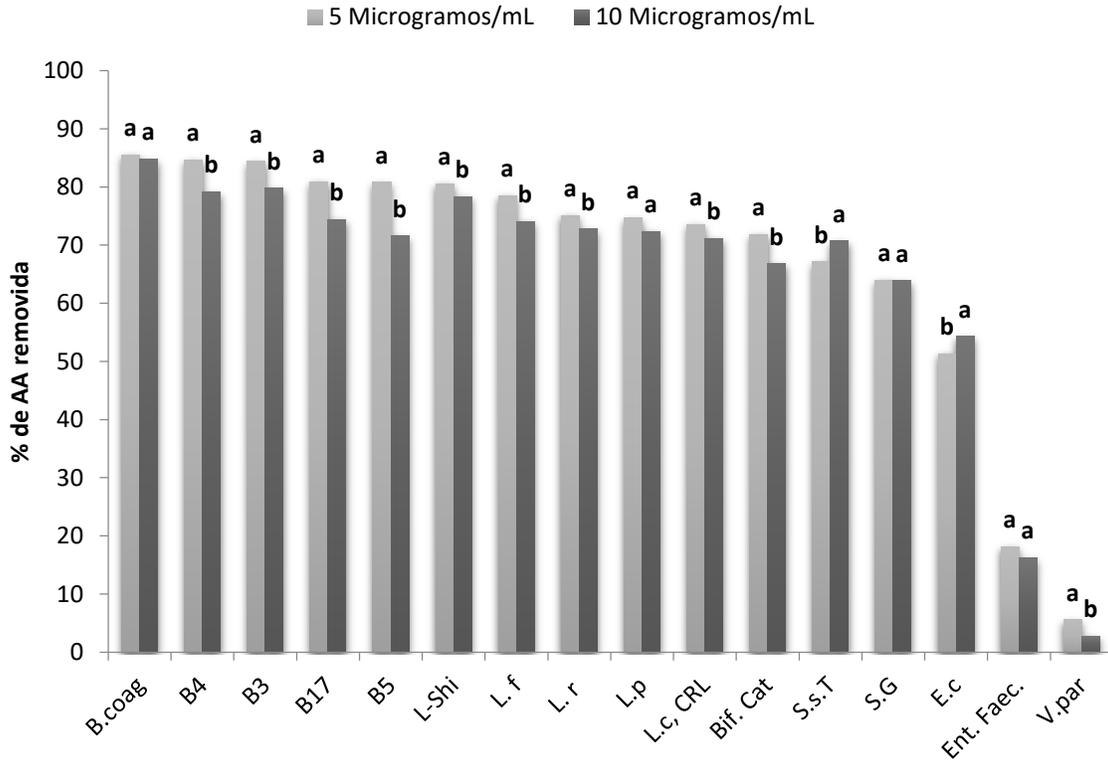


FIGURA 7.3.3. Porcentaje de AA fijada por cepas probióticas y cepas nativas expuestas a diferentes concentraciones de AA (10 Y 5 µg/mL). T=37°C, tiempo de incubación con la AA= 4h, pH=7 y en fase exponencial (12 h).

En la mayoría de los casos, excepto por *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ATCC® 19258 y *Escherichia coli* ATCC® 43892, la concentración que se observó más reducida fue la de 5 µg/mL. Este resultado coincide con el estudio realizado por Rivas-Jiménez *et al.* (2016), donde *Lb. casei* Shirota y *Lb. reuteri*, evidenciaron una fijación de 68 y 53 %, respectivamente, sobre la remoción de AA cuando las bacterias fueron expuestas a la menor concentración de la toxina (10 µg/mL), por lo que al usar una concentración más baja en este

trabajo se obtuvieron mejores porcentajes de remoción (hasta de un 85%). Esto puede explicarse de acuerdo a lo propuesto por Pizzolitto *et al.* (2011), quienes sugirieron que las bacterias sufren un fenómeno de saturación, es decir, que las bacterias evaluadas podrían contar con un limitado número de sitios para ligar AA como anteriormente se explicó que podría estar relacionado con la cantidad de ácidos teicoicos presentes en la membrana de cada cepa (Serrano-Niño *et al.*, 2015).

Otro de los aspectos evaluados fue el efecto del pH sobre la capacidad de fijación de AA por las bacterias estudiadas. Sin embargo, estadísticamente el pH no mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en las 16 cepas utilizadas.

7.4. Selección de las cepas para la formación de consorcios.

Para seleccionar las cepas que formaron los consorcios, se realizó un análisis de superficie de respuesta, donde además, se establecieron las mejores condiciones de estudio para la reducción de acrilamida *in vitro* (concentración de AA, tiempo de incubación, pH y tiempo de crecimiento bacteriano). En la Figura 7.4.1 se puede observar el resumen de los efectos sobre el % de fijación.

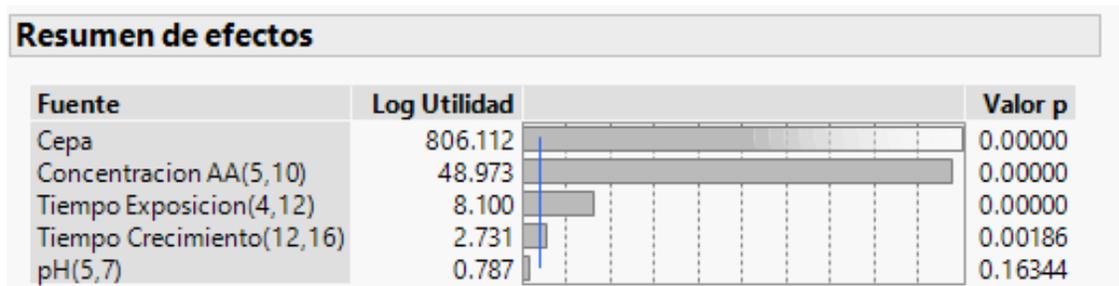


FIGURA 7.4.1. Efecto de los factores sobre el % de fijación de AA por 16 bacterias.

En este análisis se muestra que estadísticamente el pH no tiene diferencia significativa con respecto al % de fijación ($p \geq 0.05$), por lo que se procedió a un ajuste de modelo, ya que el anterior tiene un factor y un nivel de un factor que no son significativos, por lo tanto, se eliminó el valor no significativo, por lo que el nuevo modelo ajustado se describe en la Figura 7.4.2.

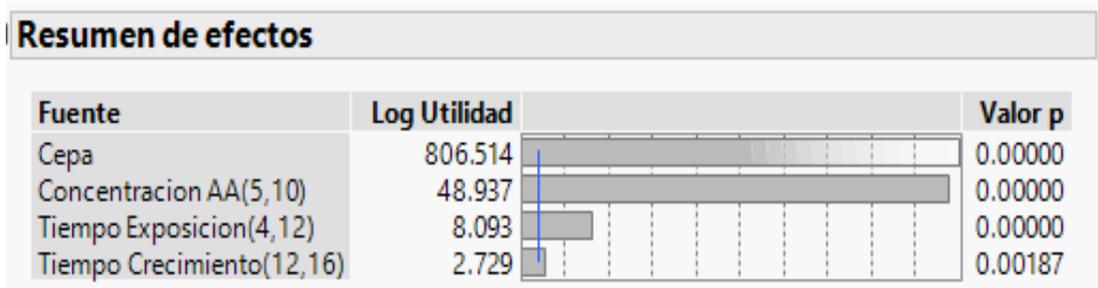


FIGURA 7.4.2. Modelo ajustado de los factores sobre el % de fijación de AA por 16 bacterias.

Después del análisis de los factores estudiados, se observó que a mayor tiempo de exposición (12 h) y mayor tiempo de crecimiento de la cepa bacteriana (16 h) se consigue un mayor porcentaje, aunque no existen diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre estos dos tiempos de incubación, pero sí es notoria la diferencia entre la remoción de AA entre cada cepa. Además, se confirmó que a concentraciones menores de AA (5 $\mu\text{g/mL}$) se tuvo una mayor remoción de AA. En el apéndice G se muestra el efecto combinatorio por pares de los factores sobre el porcentaje de fijación, y donde se puede observar claramente las intersecciones ante las mejores condiciones de estudio. Esto permitió seleccionar las cepas que en la tabla 7.4.1 se muestran para la formación de los consorcios.

TABLA 7.4.1. Selección de cepas para la formación de consorcios

Consortio de probióticos (CP)	Consortios de la flora nativa del duodeno (CND)	Consortio mezcla CP+CND
<i>L. casei</i> Shirota	<i>Bifidobacterium catenolatum</i> ATCC27676	Consiste en la mezcla de las 13 cepas seleccionadas.
<i>L. reuteri</i> NRRL 14171	<i>Streptococcus salivarius</i> var. <i>Termophilus</i> ATCC 19258	
<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	<i>Streptococcus gallolyticus</i> ATCC	
<i>L. casei</i> CRL 431		
<i>L. fermentum</i> NRRL B-1932		
<i>L. fermentum</i> JB3		
<i>L. pentosus</i> JB4		
<i>L. plantarum</i> JB5		
<i>L. pentosus</i> J37		
<i>Bacillus coagulans</i> BC30		

7.5. Evaluación de la interacción toxina-bacteria por cepas individuales

En el presente trabajo, las bacterias probióticas evaluadas no liberaron la acrilamida fijada, aun después de los dos lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Estos datos sugieren que la AA fue fijada de manera irreversible a las bacterias. Por otro lado, las bacterias representativas de la parte superior del intestino delgado (duodeno) mostraron una pérdida de la AA fijada en ambos lavados realizados (ver Tabla 6). Este comportamiento podría deberse a la estructura y composición de la pared celular de cada cepa, aunque en estudios posteriores podría corroborarse dicha composición y relacionarla con la cantidad de acrilamida fijada, ya que aun no existen reportes sobre la posible intervención de las bacterias representativas de la flora nativa del duodeno y con ello entender este comportamiento. Sin embargo, aún no se han reportado estudios donde se describa el papel que desempeñan cepas no probióticas en la unión de toxinas a su pared, o bien si realizan la unión mediante enlaces más débiles de como lo hacen las bacterias probióticas.

TABLA 7.5.1. Interacción toxina-bacteria en la fijación de AA por bacterias individuales

Cepa bacteriana	LAVADO 1	LAVADO 2
<i>L. casei</i> Shirota (Yacult)	ND	ND
<i>L. reuteri</i> NRRL 14171	ND	ND
<i>L. casei</i> CRL431	ND	ND
<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	ND	ND
<i>L. fermentum</i> NRRL B-1932	ND	ND
B3 (<i>L. fermentum</i> JB3)	ND	ND
B4 (<i>L. pentosus</i> JB4)	ND	ND
B5 (<i>L. plantarum</i> JB5)	ND	ND
B17 (<i>L. pentosus</i> J37)	ND	ND
<i>Bacillus coagulans</i>	ND	ND
<i>Bifidobacterium catenolatum</i> ATCC27676	0.93 ± 0.066	0.66 ± 0.0513
<i>Streptococcus salivarius</i> var. <i>Termophilus</i>		
ATCC 19258	0.42 ± 0.0061	0.32 ± 0.0045
<i>Streptococcus gallolyticus</i> ATCC	0.31 ± 0.0014	0.26 ± 0.00042
<i>E. coli</i> ATCC 43892	0.41 ± 0.0055	0.27 ± 0.00040
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC BAA-2316	1.30 ± 0.046	0.92 ± 0.0717
<i>Veionella parvula</i> ATCC 17745	1.21 ± 0.080	0.69± 0.0047

El potencial de retención de AA puede variar de acuerdo al tipo de cepa utilizada. En el caso de las cepas probióticas se observa el mismo comportamiento; sin embargo, en el reporte por Sreekumar y Hosono (1998), los autores sugieren que los mutágenos pirolizados no fueron liberados durante

lavados repetidos con agua destilada. Kawase y Hosono (1995), de igual manera reportaron que el Trp-P-1 y Trp-P-2 fijados a las bacterias ácido lácticas fueron liberados en presencia de sales biliares (oxgall). Reportes anteriores han mostrado que, aunque el proceso de fijación de AFB₁ es efectivo, este podría ser parcialmente reversible, y que, una pequeña parte de la AFB₁ inicialmente fijada podría ser detectada en las soluciones de lavado (Haskard *et al.*, 2001; Peltonen *et al.*, 2001). De manera similar, Hernández-Mendoza *et al.* (2009a), encontraron que cepas de *Lactobacillus casei* liberaron solo una pequeña porción de la AFB₁ fijada, sugiriendo que una porción elevada de AFB₁ fue fijada de manera irreversible. Serrano-Niño *et al.* (2013) reportaron que una unión de la toxina a bacterias lácticas de forma irreversible, ya que después de realizar tres lavados con agua destilada estéril no se detectó acrilamida residual.

En este sentido se puede corroborar la importancia de las bacterias ácido lácticas tanto de fijación como de retención del xenobiótico como la acrilamida, y se demuestra que las bacterias representativas del duodeno podrían estar relacionadas con la adsorción pero de manera indirecta, ya que aun no se tienen reportes sobre el potencial detoxificante de estas cepas sin embargo, puede ser pauta para futuras investigaciones

7.6. Determinación de la concentración de acrilamida en el alimento modelo (papas fritas comerciales)

El lote de papas comerciales evaluado tuvo concentraciones de 13687.3 ± 0.38 µg/Kg de muestra. En la tabla 7.6.1 se muestran los valores obtenidos de acuerdo a las diferentes presentaciones del producto comercial.

TABLA 4.6.1. Concentración de Acrilamida en el alimento modelo

Concentración de acrilamida en papas ($\mu\text{g/g}$ de muestra)	
1g de papas fritas	13.70 \pm 0.38
Presentación de 50g	684.36*
Presentación de 170 g	2326.84*
Por kg de papa	13687.3*

*Estimaciones de acuerdo a lo obtenido por g de muestra.

Este resultado se puede comparar con lo obtenido por Rivas-Jiménez en 2016 donde determinó la cantidad de acrilamida en 4 diferentes tipos de marcas comerciales de papas fritas, dentro de las cuales el alimento modelo de este estudio también fue estimado, el valor obtenido en el estudio fue de 10530 \pm 1100 $\mu\text{g/kg}$ cercano el valor obtenido en este trabajo.

7.7. Evaluación de la capacidad de consorcios formados por bacterias seleccionadas para reducir AA *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el ensayo de fijación *in vitro* utilizando las mejores condiciones de estudio (5 μg de AA/mL, 16 h de crecimiento de cada cepa, 4 h de incubación con la toxina), para los tres consorcios evaluados mostraron un efecto positivo ante la remoción de AA (Figura 7.7.1).

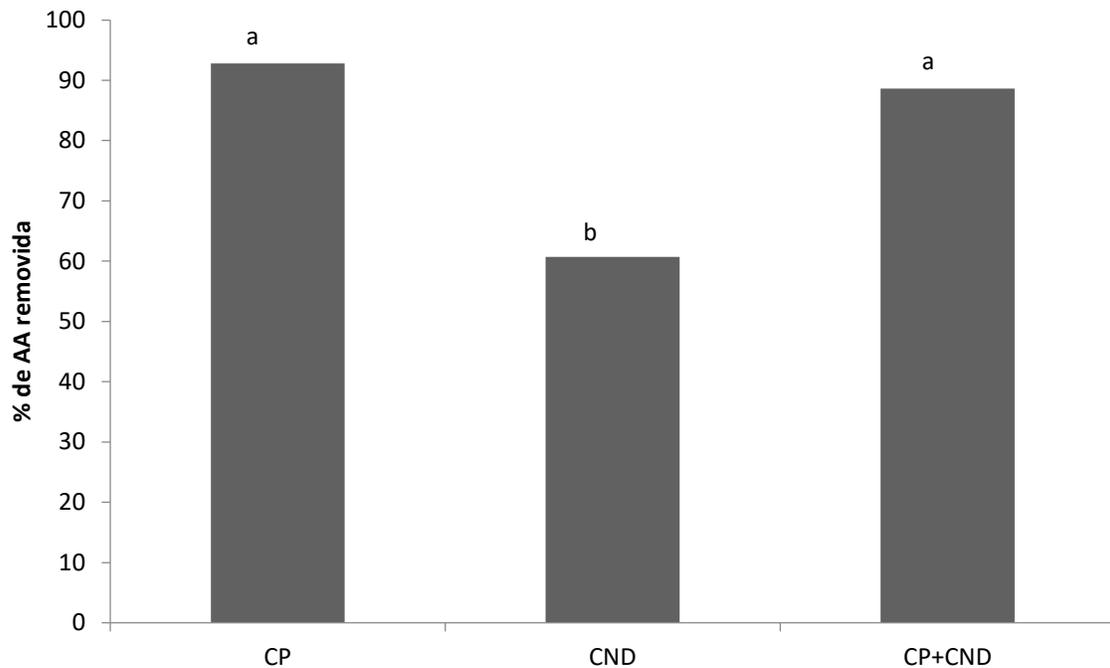


FIGURA 7.7.1. Porcentaje de AA fijada por los diferentes consorcios *in vitro* (5 μ g de AA/mL, 16 h de crecimiento de cada cepa, 4 h de incubación con la toxina).

Se tiene conocimiento que las BAL, evaluadas de forma individual, pueden remover diferentes xenobióticos dietarios, incluyendo metales pesados (Halttunen *et al.*, 2008), cianotoxinas (Nibom *et al.*, 2007) y micotoxinas (El-Nezami *et al.*, 1998), en soluciones acuosas *in vitro*. Sin embargo, combinaciones de las cepas probióticas pueden conducir a un tratamiento más efectivo que una sola cepa, dependiendo de los objetivos específicos (Schell *et al.*, 2002; Timmerman *et al.*, 2004), pero pueden llegar a reducir su capacidad de eliminación de toxinas. En este trabajo el consorcio formado por las cepas probióticas (CP) logró reducir 92.77 % de la AA inicial en medio acuoso. En contraste, el consorcio formado por bacterias representativas del intestino delgado (CND) mostró una menor capacidad de remoción de la AA (60%). Por otra parte, la mezcla de ambas bacterias pretendía estudiar el comportamiento de las cepas de acuerdo a como se encuentran en su ambiente natural, y con ello se obtuvo una reducción de la toxina del 88.64% demostrando un efecto no significativo ($p \leq 0.05$) sobre la

reducción de acrilamida en comparación con las cepas individuales. En este sentido, un estudio realizado por Halttune *et al.* (2008), compararon la eliminación de cadmio, plomo, aflatoxina B1 y microcistina-LR de la solución acuosa por *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *Propionibacterium freudenreichii shermanii* JS y *Bifidobacterium breve* Bbi99/E8, por separado y en combinación, y mostraron que la capacidad de eliminación de toxinas de una combinación de cepas de bacterias ácido lácticas no esta dada necesariamente por la suma de sus capacidades individuales. Sin embargo, se pueden usar cepas simples puras cuando el objetivo es eliminar compuestos únicos. El uso de combinaciones de cepas puede ser benéfico cuando se eliminan varios compuestos juntos. Esto necesita ser estudiado en futuros experimentos.

7.8. Evaluación de 3 consorcios bacterianos para reducir la biodisponibilidad de AA en un sistema digestivo simulado.

La capacidad del consorcio formado por probióticos (CP), del consorcio formado por bacterias representativas de la microbiota nativa de la parte superior del intestino delgado (CND) y el consorcio formado por la mezcla de los consorcios antes mencionados (CP+CND), para remover acrilamida en papas comerciales se muestra en la Figura 7.8.1. Los resultados obtenidos evidenciaron que los tres consorcios evaluados mostraron capacidad de remoción de la AA al final del proceso digestivo simulado, lo que indicaría una posible reducción de la acrilamida en modelos *in vivo*. Para este estudio se evaluaron condiciones de ayuno simulado. Los resultados mostraron el mismo comportamiento que en condiciones *in vitro*, pero en este caso, el consorcio con bacterias probióticas (CP) solo removió 62.30% de la AA inicial, mientras que los consorcios CND y CP+CND mostraron valores de 11.67 y 40.75 %, respectivamente.

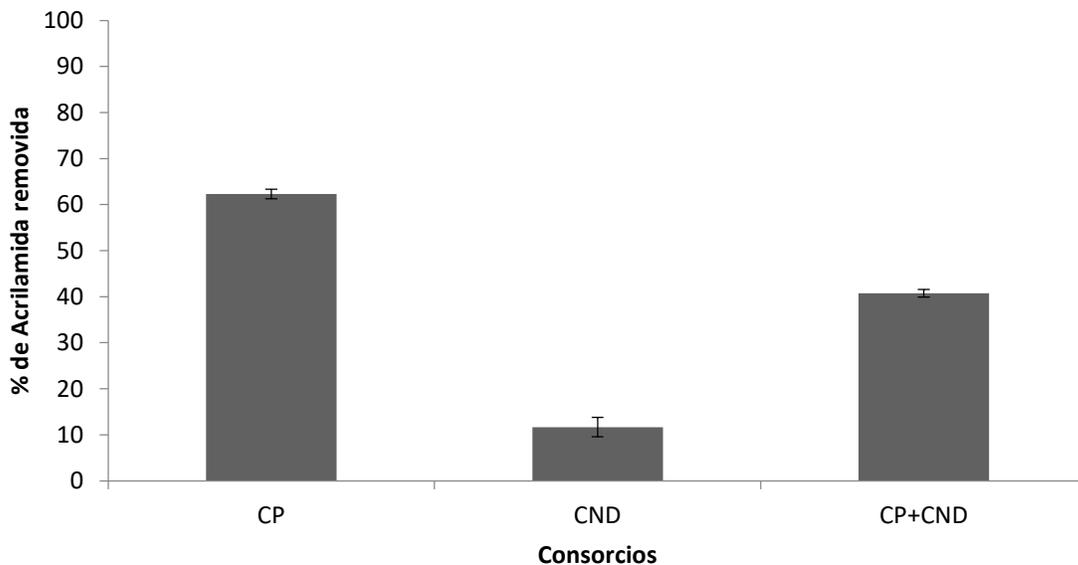


FIGURA 7.8.1. Porcentaje de AA removida por los distintos consorcios bacterianos al final del proceso digestivo simulado.

En este caso, se corrobora la eficacia de los probióticos para reducir acrilamida al ver que el consorcio de probióticos (CP) fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a los otros consorcios. Así mismo, se observó que existe gran diferencia con el consorcio CND porque al ser bacterias diferentes a los probióticos algunos componentes de la pared celular podrían variar; como lo propuesto por Serrano *et al.* (2015), quienes determinaron una correlación significativa entre el porcentaje de unión de dos toxinas (AFB₁ y acrilamida) y el contenido de algunos constituyentes de los ácidos teicoicos de la pared celular. Los autores propusieron las posibles interacciones de unión entre los sustituyentes unidos a los polímeros de polirribitol y ambas toxinas.

Aunque aún no se tiene conocimiento sobre las cantidades exactas de ácidos teicoicos en bacterias como *Bifidobacterium catenolatum* ATCC27676 y *Streptococcus salivarius* var. *Termophilus* ATCC 19258 *Streptococcus gallolyticus* ATCC se podría pensar que no están directamente relacionadas con la fijación de componentes tóxicos, ya que al ser bacterias comensales de la parte superior del intestino delgado (duodeno) mantienen el equilibrio poblacional con la producción de otras sustancias o componentes que benefician a las demás poblaciones bacterianas, como las ácidos lácticos, logrando mantener un equilibrio benéfico para nuestro organismo.

8. CONCLUSIONES

Este estudio de tesis se realizó para evaluar la capacidad de consorcios de bacterias ácido lácticas y de la flora nativa para remover acrilamida mediante un modelo de digestión simulada (ayuno) y se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Todas las cepas demostraron fijar acrilamida en los dos tiempos de exposición (4 y 12 h); sin embargo, el tiempo óptimo fue de 12 h, además las bacterias mostraron mejor fijación en condiciones de 16 horas de crecimiento (fase estacionaria) y a una concentración de 5 µg/mL, pero en caso del pH no mostraron diferencia significativa.

Las cepas de *Bacillus coagulans*, *Lb. casei* Shirota, B3 (*Lb. fermentum* JB3) B4 (*Lb. pentosus* JB4) demostraron la mayor capacidad de fijación (80-87%).

La participación de bacterias de la flora nativa no mostró un valor significativo en la reducción de AA (ca. 68%). Además, la interacción toxina-bacteria se ve afectada por los lavados al perder entre ca.1-3 % de AA.

Por lo tanto, la formación de consorcios utilizando bacterias probióticas aumenta la efectividad para reducir AA, ya que se alcanzó una reducción en solución acuosa de ca. 92%. Por lo tanto, esta mezcla de bacterias podría desempeñar un papel protector al reducir la biodisponibilidad de toxinas transmitidas por los alimentos como la acrilamida.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, L., Wong, J. y Ilbäck, N. G. 2005. Acrylamide tissue distribution and genotoxic effects in a common viral infection in mice. *Toxicology* 211: 70-76.
- Amrein, T., Bachmann, S., Noti, A., Biedermann, M., Barbosa, M. F., y Biedermann-Brem. 2003. Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: A comparison of cultivars and farming systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5556–5560.
- Amrein, T., Andres, L., Escher, F., y Amado, R. 2007. Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options. *Food Additives and Contaminants* 24: 23-25.
- Anese, M., Suman, M., y Nocoli, M. 2009. Technological Strategies to Reduce Acrylamide Levels in Heated Foods. *Food Engineering Reviews* 1: 169-179.
- Badui, D. S. 2006. *Química de los Alimentos 4a. Ed.* Pearson Educación, México, pp 565-596.
- Becalski, A., Lau, B. P., Lewis, D., y Seaman, S. 2003. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 802–808.
- Besaratinia, A. y Pfeifer, G. 2007. A review of mechanism of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis* 28: 519-528.
- Capuano, E. y Flogiano, V. 2011. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Food Science and Technology* 44: 793-810.
- Capuano, E. y Fogliano, V. 2011. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Food Science and Technology* 44: 793-810.
- Carere, A. 2006. Genotoxicity in carcinogenicity of acrylamide: A critical review. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità.* 42: 144-155.
- Cheng, W., Hsiao, W., Chou, L., Sun-Hwang, L., y Yeh, A. 2006. Determination of acrylamide in Chinese foods by GC-ion trap MS using 2-bromopropenamide and 2-bromopropenamide-¹³C₃. *Journal of Food and Drug Analysis* 14:207–214.

- CIAA. 2007. Acrylamide toolbox. Confederation of the food and Drink Industries. [www. CIAA.be](http://www.CIAA.be). Acces: 13 may 2016.
- Chatzizacharias, N. A., Kouraklis, G. P. y Theocharis, S. E. 2008. Disruptions of FAK signaling: A side mechanism in cytotoxicity. *Toxicology* 245: 1- 10.
- Dybing, E., Farmer, P. B., Andersen, M., Fennell, T. R., Lalljie, S. P. D., Müller, D. J. G. y Verger, P. 2005. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 43: 365-410.
- EFSA. 2015. Scientific Opinion on acrylamide in food. EFSA panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal* 12 (6): 1-321.
- Exon, J. 2006. A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 9:397–412.
- FAO/OMS. 2002. Consultation on the health implicattion of acrylamide in food. Geneva Summary Report 24: 1-12.
- FAO/WHO.2003. Safety assessment of foods derived from genetically modified animals, including fish. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on food derived from biotechnology.15: 17-21.
- Fennell, T., Sumner, S., Snyder, R., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W. 2005. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicology Science* 85:447–59.
- Friedman, M., Levin, C. 2008. Review of methods for reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6113- 6140.
- Fuhr, U., Boettcher, M. I. Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, D., Tomalik-Scharte, D., Pournara, P., Verena, J., Harlfinger, S., Klaassen, T., y Berkessel, A. 2006. Toxicokinetic of Acrylamide in Humans after Ingestion of a Defined Dose in a Test Meal to Improve Risk Assessment for Acrylamide Carcinogenicity. *Cancer Epidemiology Biomarkers* 15(2): 1012-1026.
- Fredriksson, H., Talving, J., Rosén, J. y Aman, P. 2004. Fermentation Reduces Free Asparagine in Dough and Acrylamide content in bread. *Cereal Chemistry* 81(5): 650- 653.
- Claus, A., Mongili, M., Weisz, G. Schieber, A. y Carle, R. 2008. Impact of formulation and technological factor on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *Journal of Cereal Science* 47: 546-554.

- Quigley, E. M. M. 2011. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 11: 593-603.
- Guarner, F. y Malagelada, J. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512-519.
- Gordon, J. y Ley, R. E. 2002. Extending of View of self: the human Gut Microbiome Initiative (HGMI). Washington University. 23(2): 1-10.
- Go, V. 2007. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry* 103: 196–203.
- Gökmen, V., y Senyuva, H. Z. 2007. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry* 103: 196-203.
- 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: 4751–7.
- Granvogl, M., Schieberle, P. 2006. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5933–8.
- Granvogl, M., Schieberle, P. 2007. Quantification of 3-aminopropionamide in cocoa, coffee and cereal products. *European Food Technology* 225: 857–63.
- Halttunen, T.; Collado, M. C.; El-Nezami, H.; Meriluoto, J.; Salminen, S. 2007. Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous. *Applied Microbiology* 46 (2): 160-165.
- Halttunen, T., Collado, M. C., El-Nezami, H., Meriluoto, J. 2008. Salminen, Mixin of lactic acid bacteria strains may reduce their toxin removal efficiency from aqueous solution. *Applied Microbiology* 46(2): 160-165.
- Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S. y Steele, J. L. (2009). Screening of *Lactobacillus casei* strain for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology* 47: 134-145.
- IFST (Institute of Food Science and Technology). (2012). Information statement: Acrylamide in foods, 1-12.
- IARC. (1994). Summary and evaluation, 60. (pp. 389).
- Jin, C., Wu, X., y Zhang, Y. 2013. Relationship between antioxidants and acrylamide formation: A review. *Food Research* 51: 611-620.

- Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., y Hayashi, M. 2006. Genotoxicity of acrylamide in glycinamide in human lymphoblastoid TK6. *Mutation Research* 603: 151-168.
- Lee Y. K., y Mazmanian S. K. 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 330:1768-1773
- Eckburg P. B., Bik, E. M., Bernstein C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., y Relman, D. A. 2005. Diversity of the human microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
- Lindsay, R. C. y Jang, S. 2005. Methods for suppressing acrylamide formation and restoring browned color and flavor. Patent US20050214411.
- Lopachin, R. M. 2004. Changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology* 25: 617- 630.
- LoPachin, R. Acrylamide neurotoxicity: neurological, morphological and molecular endpoints in animal models. *Advanced and Experimental Medical Biology*. 561: 21–37.
- Martins, C., Oliveira, N. G., Pingarilho, M., Gamboa da Costa, G., Martins, V., y Marques, M. M. 2007. Cytogenetic damage induced by acrylamide in glycinamide in mammalian cells: Correlation with specific glycinamide- DNA adducts. *Toxicological Science* 95: 1383-1390.
- Mei, N., Hu, J., Churchwell, M. I., Guo, L., Moore, M. M., y Doerge, D. R. 2008. Genotoxic Effects of acrylamide in glycinamide in mouse lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 46: 628- 636.
- Martins, S., Jongen, W., y van Boekel, M. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology* 11: 364–373.
- Masson, L., Muñoz, R., Romero, N., Camilo, C., Encina, C., Hernández, L., Castro, J. y Robert, J. 2007. Acrilamida en papas fritas: Revisión actualizada. *Grasas y Aceites* 58: 185-195.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L. y Dodson, A. T. 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419: 448–449.
- NCTR. 2008. Cancer bioassays for acrylamide and disposition of furfural and alcohol in rats. *Drug Metabolism in Disposition*. 20 (2): 198- 204.
- Nicholson, J. K., Holmes, E. y Wilson, I. D. 2005. *Nature Reviews in Microbiology* 3: 431-438.

- Nybom, S. M. K.; Salminen, S. J.; y Meriluoto, J. A. O. 2002. Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiology* 270 (1): 27-33.
- OMS. 2005. Health implication of acrylamide in food report of a joint FAO/WHO Consultations, 25-27.
- Perez, C., Yaylayan, V. A. 2008. Further insight into thermally and pH induced generation of acrylamide from glucose/asparagine model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6069–74.
- Parzefall, W. 2008. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1360-1364.
- Pedreschi, F. 2014. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94: 123-132.
- Quigley, E. 2011. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 11: 593–603.
- Rice, J. M. (2005). Carcinogenicity of acrylamide. *Mutations Research* 580: 3-20.
- Rivas-Jimenez, L., Ramírez-Ortiz, K., González-Cordova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Garcia, H. S. y 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.
- Sánchez-Otero, M., Méndez-Santiago, M., Luna-Vazquez, F., Soto-Rodriguez, I., García, H. S., Serrano-Niño. J. C. 2017. Assessment of the Dietary Intake of Acrylamide by Young Adults in Mexico. *Journal of Food and Nutrition Research* 5(12): 894-899.
- Schell, M., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P. y Delley, M. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22): 14422-14427.
- Schettgen, T., Kütting, B., Horning, M., Beckmann, M. W., Weiss, T., y Dexler, H. 2004. Trans-placental exposure of neonates to acrylamide-a pilot study. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 77: 213-216.
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M. G., SanMartin-Gonzalez, M. F., y Garcia. H. S. 2013. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of

- aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control* 31: 202-207.
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Cantú-Cornelio, F., Gonzalez-Cordova, A., Vallejo-Cordoba, B., Hernandez-Mendoza, A., y García, H. S. 2015. In vitro reduced availability of aflatoxin B1 and acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from lactobacillus strains. *Food Science and Technology* 64: 1334-1341.
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Gonzalez-Cordoba, A. F., Vallejo-Córdoba, B., y Hernández-Mendoza, A. 2014. *In vitro* study of the potential protective role of Lactobacillus strain by acrylamide binding. *Journal of Food Safety* 34: 62-68.
- Seal, C., De Mul, A., Eisenbrand, G., Haverkort, J., Franke, K., Lalljie, S. Wilms, L. 2008. Risk-benefit considerations of mitigation measures on acrylamide content of foods-- a case study on potatoes, cereals and coffee. *The British Journal of Nutrition* 99 (2): S1–S46.
- Shanahan F. 2003. Probiotics: a perspective on problems and pitfalls. *Journal of Gastroenterology* 38: 34–36.
- Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., y Bounds, J. 2006. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 481–608.
- Ship, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., Bounds, J. 2006. Acrylamide: Review toxicity data and dose-responds analyses for cancer and noncancer effect. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 481- 608.
- Sickles, D. W., Sperry, A. O., Testino, A. y Friedman, M. 2007. Acrylamide effect on kinesin related proteins of the mitotic/meiotic spindle. *Toxicology in Applied Pharmacology* 222: 111-121.
- Sorgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M. y Skott, A. 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.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J. y Riediker, S. 2004. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogues compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5550–5.
- Stadler, R., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., y Riediker, S. 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419(6906): 449–450.

- Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R., Gondé, P., Van Eijck, P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Müller, D., Tallmadge, D., O'brien, J., Thompson, S., Silvani, D. y Whitmore, T. 2004. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44: 323–347.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M. 2005. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:4998–5006.
- Timmerman, H. M., Koning, C. J., Mulder, L., Rombouts, F. M., Beynen, A. C. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics a comparison of functionality and efficacy. *International Journal Food Microbiology*.96 (3): 219-233.
- FAO. 2013. Technical training on risk analysis for Saarc countries. Thailand quality council of India Delhi, India, June. 17–21.
- U.S. FDA. 2006. The 2006 Exposure Assessment for Acrylamide. Accessed online <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodbornellnessContaminants/UCM197239.pdf>.
- Vinci, R. M. 2012. Acrylamide formation in fried potato products – Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry* 133: 1138-1154.
- Wei, D., Shin, Y. 2012. Acrylamide Content Distribution and Possible Alternative Ingredients for Snack Foods. *Journal of Food Protection*. 75 (12): 2158–2162.
- Yaylayan, V.A. y Stadler, R. H. 2005. Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *Journal of AOAC International*. 88: 262–267.
- Yaylayan, V. A., Locas, C. P., Wronowski, A., y O'Brien, J. 2005. Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. In: Friedman M, Mottram DS, eds. *Chemistry and safety of acrylamide in food*. New York: Springer; 191–204.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D., Eberhart, B. L., Ewald, D. K. 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4782–7.
- Zhang, Y. 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: 521–542.

8. APENDICE

Apéndice A: Composición de medios de cultivo

MRS (*Lactobacillus*, *Bacillus coagulans* y *Bifidobacterium catenolatum* ATCC® 27676*)

Reactivo	Cantidad g/L
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Tween 80	1 mL
KH ₂ PO ₄	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	15
pH	5.5 ± 1.0
*Cisteína hidroclorehídrica	0.5

*Solo se utiliza cuando el medio es utilizado para *Bifidobacterium*.

NOTA: El pH del medio fue ajustado con NaOH (0.1 N) o ácido acético según el caso.

Medio *E. coli*

Composición (g/L)	
Tripteína	20.0
Lactosa	5.0
Sales biliares N° 3	1.9
Fosfato dipotásico	4.0
Fosfato monopotásico	1.5
Cloruro de sodio	5.0
pH	6.0

Preparación:

Suspender 37,4 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar hasta su total disolución. Distribuir en tubos de ensayo con 5mL o en matraces con 35 mL, según sea el caso, y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Medio BHI (Brain Heart Infusion)

Composición g/L	
Infusión de cerebro y corazón de (sólidos)	8.0
Digerido péptico de tejido animal	5.0
Digerido pancreático de caseína	16.0
Cloruro sódico	5.0
Glucosa	2.0
Fosfato disódico de hidrógeno	2.5
Agar	15
pH	7.4 ± 0.2

Preparación:

Suspender 37,4 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar hasta su total disolución. Distribuir en tubos de ensayo con 5mL o en matraces con 35 mL, según sea el caso, y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Medio ATCC® 1252 (*Veillonella*)

Reactivo	Cantidad (g/L)
Extracto de levadura	13
Peptona de caseína	10
Glucosa	5
Almidón soluble	1
Cloruro de sodio	5
Acetato de sodio	3
Cisteína hidroclorehídrica	0.5
pH	5.5 – 6.0

Nota: Preparar una solución de lactato de sodio al 60% y adicionar al 1.5% al medio, posteriormente ajustar pH y someter el medio a esterilización.

Medio ATCC® 188 (*Enterococcus*)

Reactivo	Cantidad g/L
Peptona tripticasa	5
Extracto de levadura	3
Lactato de sodio	15
Tioglicolato de sodio	0.75
Tween 80	1 mL

Glucosa	1
pH	5.5 – 6.0

Apéndice B: Preparación de soluciones buffer utilizadas

Buffer de fosfato (PB)

Preparar una solución de fosfato de sodio dibásico 0.5 M (A) y una solución de fosfato de sodio monobásico 0.5 M (B). Se mezclan 87 mL de la solución A con 13 mL de la solución B y se aforan a 100 mL con un pH final de 7.0 - 7.2

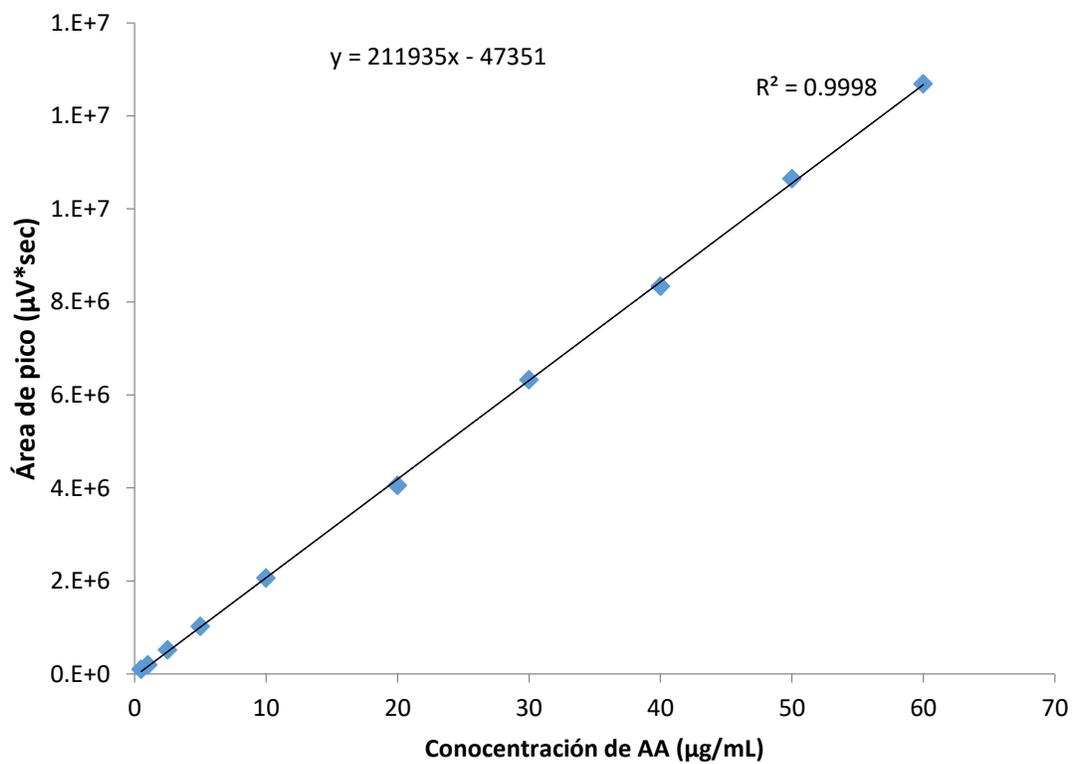
Buffer de fosfato de sodio (PBS)

Diluir 7 g de NaCl en 20 mL de la solución PB, aforar a un volumen total de 1 L con agua destilada estéril. El pH se ajusta a un valor de 7.0 con NaOH o ácido acético según sea el caso.

Buffer carbonato/bicarbonato de sodio:

Preparar soluciones de carbonato de sodio y bicarbonato de sodio a 0.2 M cada una, posteriormente se mezclan 4 mL de la solución de carbonato de sodio junto con 46 mL de la solución de bicarbonato de sodio aforando a 200 mL con agua desionizada estéril.

Apéndice C: Curva estándar de acrilamida



Apéndice D: Columna de extracción de fase sólida (SPE-C18)

La extracción en fase sólida SPE es una técnica preparativa que el analista utiliza para “limpiar” la muestra previa la cuantificación y/o para futura concentración del analito que está presente en la muestra. El término “extracción en fase sólida” es debido a que el material de soporte utilizado es un sólido, a través del cual pasa un líquido o un gas. Los analitos son absorbidos en el soporte y luego eluidos de acuerdo a sus diferentes afinidades entre el material absorbente y la fase móvil utilizada.

Protocolo general de extracción (fase reversa)

A: Acondicionamiento de las columnas

- Enjuagar el empaque con 3-5 mL de metanol
- Realizar un segundo enjuague con 3-5 mL de MeOH. No permita que el empaque se seque antes de agregar la muestra.

B: Aplicación de la muestra

- Aplicar la muestra en la parte superior de la cama de embalaje; empujar o extraer la muestra a través del lecho a una velocidad de flujo de 1-5 mL/min. Recoger la muestra para la cuantificación del compuesto deseado (cuando no sea retenido)

C: Lavado

- Si el compuesto deseado es retenido, lavar cualquier compuesto interferente débilmente retenido con un disolvente polar

D: Elución

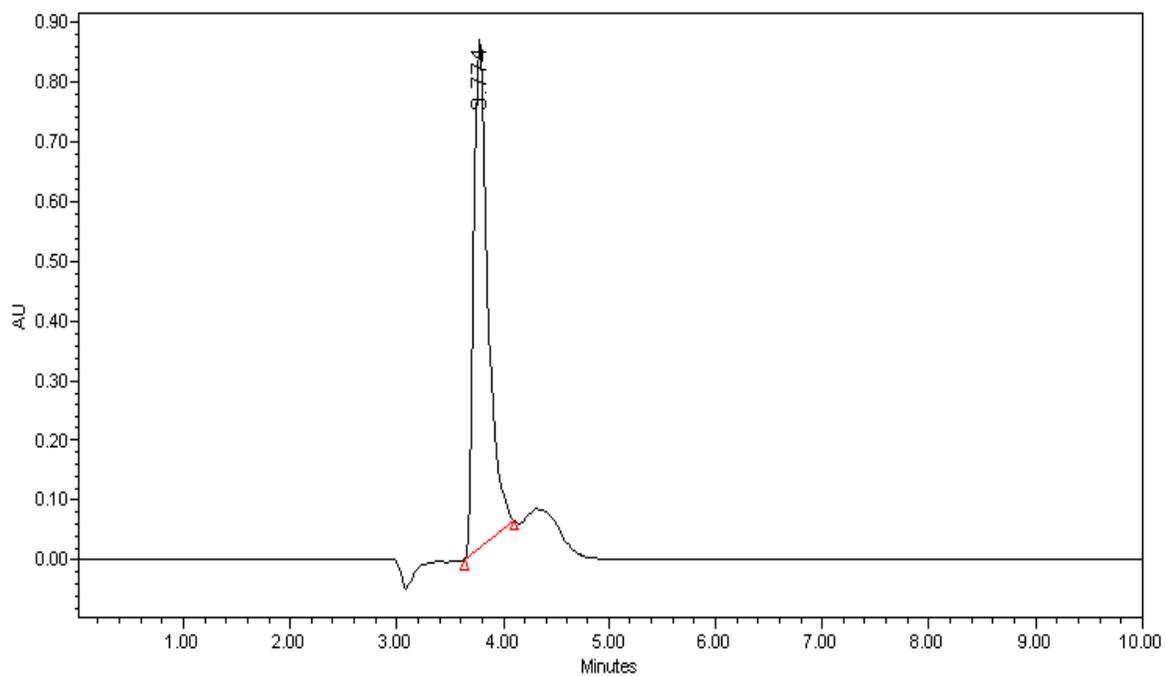
- Eluir el compuesto deseado con 1-2 mL de disolvente no polar y recoger para el análisis.

Apéndice E: Componentes y concentraciones de los diversos jugos sintéticos del modelo de digestión *in vitro* que representan las condiciones de alimentación

	Saliva	Jugo Gástrico	Jugo Duodenal	Jugo biliar
Solución inorgánica	10 mL KCl [89.6 g/L] 10 mL KSCN [20 g/L] 10 mL NaH ₂ PO ₄ [88.8 g/L] 10 mL NaSO ₄ [57 g/L] 1.7 mL NaCl [175.3 g/L] 20 mL NaHCO ₃ [84.7 g/L]	15.7 mL NaCl [175.3 g/L] 3.0 mL NaH ₂ PO ₄ [88.8 g/L] 9.2 mL KCl [89.6 g/L] 18 mL CaCl ₂ · 2H ₂ O [22.2 g/L] 10 mL NH ₄ Cl [30.6 g/L] 6.5 mL HCl 37% g/g	40 mL NaCl [175.3 g/L] 40 mL NaHCO ₃ [84.7 g/L] 10 mL KH ₂ PO ₄ [8g/L] 6.3 mL KCl [89.6 g/L] 10 mL MgCl ₂ [5g/L] 180 µL HCl 37% g/g	30 mL NaCl [175.3 g/L] 68.3 mL NaHCO ₃ [84.7 g/L] 4.2 mL KCl [89.6 g/L] 150 µL HCl 37% g/g
Solución orgánica	8 mL de urea [25 g/L]	10 mL de glucosa [65 g/L] 10 mL de ácido D-glucurónico [2 g/L] 3.4 mL de urea [25 g/L] 10 mL de Hidrocloruro de glucosamina [33 g/L]	4 mL de urea [25 g/L]	10 mL de urea [25 g/L]
Añadir a la mezcla orgánica + solución inorgánica	290 mg de α-amilasa 15 mg de ácido úrico 25 mg de mucina	1 g de BSA (Álbumina Sérica Bovina) 2.5 g de pepsina 3 mg de mucina	9 mL CaCl ₂ · 2H ₂ O [22.2 g/L] 1 g de BSA (Álbumina Sérica Bovina) 9 g pancreatina 1.5 g lipasa	10 mL CaCl ₂ · 2H ₂ O [22.2 g/L] 1.8 g de BSA (Álbumina Sérica Bovina) 30 g bilis
pH	6.8 ± 0.2	1.30 ± 0.02	8.1 ± 0.02	8.2 ± 0.02

La soluciones orgánica e inorgánica son aforadas a 500 mL con agua desionizada. Después de mezclar las soluciones inorgánica y orgánica algunos de los constituyentes se agregan y se disuelven. Si es necesario, el pH de los jugos se ajusta al intervalo apropiado.

Apéndice F: Cromatograma representativo de la presencia de acrilamida mediante HPLC



	RT	Area	% Area	Height
1	3.774	7941841	100.00	855473

Apéndice G: Efecto combinatorio por pares de factores sobre el % de fijación

