

# Toksičnost akrilamida

---

Šušak, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:732005>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Petra Šušak

Toksičnost akrilamida

(The toxicity of acrylamide)

Završni rad

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2021.

## SAŽETAK

Akrilamid ili 2-propenamid važan je kemijski spoj u industrijama koje ga ponajviše koriste za proizvodnju polimera i kopolimera. Prvi je put identificiran u hrani 2002. godine kada se otkrilo da nastaje termičkom obradom hrane koja u sebi sadrži visok udio ugljikohidrata, uz uvjet da je temperatura viša od 120°C. Glavnim mehanizmom nastanka akrilamida smatra se Maillardova reakcija u kojoj sudjeluju aminokiseline i reducirajući šećeri. S obzirom da akrilamid vrlo lako može dospjeti u organizam čovjeka, ali i životinja, nužno je razumjeti njegov toksični i mogući kancerogeni učinak. Mehanizam toksičnosti još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no smatra se da je oksidativni stres glavni čimbenik koji izaziva toksičnost akrilamida. Do sada je kod ljudi dokazano samo neurotoksično djelovanje akrilamida, dok su toksičnosti vezane za reproduktivni sustav i genetički materijal te kancerogenost dokazani samo na životinjama. Glicidamid, metabolički produkt akrilamida, toksičniji je od akrilamida te oba spoja mogu stvarati adukte s hemoglobinom i DNA. Adukti s hemoglobinom i DNA koriste se kao biomarkeri koji pokazuju izloženost akrilamidu. Budući da je akrilamid opasan spoj koji vrlo lako može dospjeti u organizam čovjeka, istražuju se načini smanjenja njegove količine u hrani te se preporučuju vrijednosti dopuštene koncentracije akrilamida u hrani.

**KLJUČNE RIJEČI:** akrilamid, Maillardova reakcija, glicidamid, toksičnost, kancerogenost

# ABSTRACT

Acrylamide or 2-propenamide is important chemical compound in the industry that is mostly used for production of polymers and copolymers. It was firstly identified in 2002 when it was discovered that it is formed by heat treatment of food rich in carbohydrates, provided when the temperature is higher than 120°C. The main mechanism of acrylamide formation is considered to be Maillard reaction involving amino acids and reducing sugars. Since acrylamide can very easily enter the human and animal body, it is necessary to understand its toxic and possible carcinogenic effect. The mechanism of toxicity has not yet been fully explained, but oxidative stress is thought to be a major factor causing acrylamide toxicity. So far only the neurotoxic effects of acrylamide have been demonstrated in humans, while reproductive toxicity, genotoxicity and carcinogenicity have only been demonstrated in animals. Glycidamide, a metabolic product of acrylamide, is more toxic than acrylamide and both compounds can form adducts with hemoglobin and DNA. Adducts with hemoglobin and DNA are used as biomarkers showing acrylamide exposure. Since acrylamide is dangerous compound that can very easily enter the human body, ways to reduce its amount in food are being investigated and the values of the permissible concentration of acrylamide in food are recommended.

**KEY WORDS:** acrylamide, Maillard reaction, glycidamide, toxicity, carcinogenicity

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. ŠTO JE AKRILAMID?.....	2
2.1. OTKRIĆE AKRILAMIDA.....	2
2.2. SVOJSTVA I STRUKTURA AKRILAMIDA.....	3
2.3. DOBIVANJE AKRILAMIDA.....	5
2.3.1. MAILLARDOVA REAKCIJA.....	5
2.3.2. INDUSTRIJSKO DOBIVANJE AKRILAMIDA.....	6
3. IZLOŽENOST ČOVJEKA AKRILAMIDU.....	8
3.1. LJUDSKE DJELATNOSTI.....	8
3.2. HRANA.....	8
3.3. DUHANSKI DIM .....	10
4. TOKSIČNOST AKRILAMIDA .....	11
4.1. DEFINICIJA TOKSIČNOSTI.....	11
4.2. TOKSIKOKINETIKA AKRILAMIDA .....	12
4.3. TOKSIKODINAMIKA AKRILAMIDA .....	14
4.4. TOKSIČNO DJELOVANJE AKRILAMIDA .....	15
4.4.1. NEUROTOKSIČNOST .....	16
4.4.2. REPRODUKTIVNA I RAZVOJNA TOKSIČNOST .....	17
4.4.3. GENOTOKSIČNOST .....	17
4.4.4. KANCEROGENOST.....	19
4.5. BIOMARKERI IZLOŽENOSTI AKRILAMIDU .....	20
5. ANALIZA I SMANJENJE UDJELA AKRILAMIDA.....	22
5.1. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA AKRILAMIDA .....	22
5.2. METODE SMANJENJA UDJELA AKRILAMIDA.....	23
5.2.1. BIOLOŠKE METODE .....	23
5.2.2. FIZIKALNE METODE .....	24
5.2.3. KEMIJSKE METODE.....	24
5.3. DOPUŠTENE RAZINE AKRILAMIDA .....	25
6. ZAKLJUČAK .....	27
7. LITERATURA.....	28

# 1. UVOD

Akrilamid je kemijski spoj molekulske formule  $C_3H_5NO$  koji nastaje zagrijavanjem hrane pri visokim temperaturama iz njezinih prirodnih sastojaka, asparagina i reducirajućih šećera u Maillardovoj reakciji. Najviše se akrilamida stvara u hrani bogatoj škrobom, poput kruha, prženih krumpirića, čipsa, keksa i kave, koja se predugo zagrijava na visokim temperaturama. Također je akrilamid industrijska kemikalija koja se ondje proizvodi hidrolizom akrilonitrila te značajnu ulogu ima u pročišćavanju otpadnih voda, proizvodnji papira, tekstila i boje, a prisutan je i u biološkim istraživanjima kao kemijski reagens. Akrilamid je otkriven 2002. godine te otada privlači pozornost brojnih znanstvenika s obzirom na to da predstavlja opasnost za čovjeka i životinje, a prisutan je u hrani koja se gotovo svakodnevno konzumira. Osim prisutnosti u hrani, akrilamid može dospjeti u okoliš putem ljudskih djelatnosti što je još jedan način kojim čovjek i životinje mogu biti izloženi akrilamidu. Posebnu opasnost akrilamid predstavlja za pušače jer je također pronađen u sastavu duhanskog dima. Pod opasnosti akrilamida podrazumijeva se njegovo toksično i kancerogeno djelovanje. Do sada je dokazano samo toksično djelovanje na središnji živčani sustav čovjeka, dok su ostala toksična djelovanja poput reproduktivne i razvojne toksičnosti i genotoksičnosti dokazana samo na životinjama. Iako je genotoksični i kancerogeni učinak akrilamida dokazan samo na životinjama, Međunarodna agencija za istraživanje raka klasificirala ga je u skupinu vjerojatno kancerogenih spojeva, dok je u Europi klasificiran kao mutagen kategorije 2 što znači da može biti uzročnik nasljednih genetskih poremećaja. Ovakva klasifikacija akrilamida proizlazi iz mnogobrojnih istraživanja koja su objasnila djelovanje akrilamida u organizmu čovjeka. Posebnu zabrinutost izaziva glicidamid, metabolički produkt akrilamida, kojeg karakterizira puno veća reaktivnost i toksičnost od akrilamida. Oba spoja mogu se vezati na hemoglobin te na DNA što se povezuje s genetskim oštećenjima, a osim toga se akrilamid smatra uzročnikom oksidativnih oštećenja. Vezanjem na DNA i hemoglobin nastaju adukti akrilamid–DNA i akrilamid–hemoglobin čijim se mjerenjem može otkriti izloženost akrilamidu. Kako bi se pratila sigurnost i kvaliteta hrane, razvijene su brojne metode kojima se može odrediti njegova prisutnost, a predloženi su i mnogi načini drugačije pripreme hrane s ciljem smanjivanja formiranja akrilamida.

## 2. ŠTO JE AKRILAMID?

Akrilamid je organski spoj s reaktivnom dvostrukom vezom koji se pri normalnom tlaku i temperaturi nalazi u čvrstom agregatnom stanju, a zbog polarnosti se dobro otapa u polarnim otapalima kao što su voda i alkohol. Karakterističan je po brzom polimerizaciji te veliku važnost ima u industrijama gdje se dobiva hidrolizom akrilonitrila, ali uglavnom nastaje kao produkt u Maillardovoj reakciji tijekom zagrijavanja hrane bogate škrobom. Iako je vrlo brzo shvaćeno da je akrilamid otrovan spoj, puno je vremena i napora uloženo kako bi se uopće otkrilo odakle takav spoj potječe i gdje je sve prisutan.

### 2.1. OTKRIĆE AKRILAMIDA

Pedesetih i šezdesetih godina prošloga stoljeća, akrilamid je imao važnu ulogu u industrijama za proizvodnju plastike i papira. Ubrzo su se kod radnika koji su bili izloženi visokim koncentracijama akrilamida počeli javljati simptomi poput zbunjenosti i halucinacija, slabosti u mišićima te gubitka koordinacije [1]. Tada je utvrđeno da akrilamid djeluje neurotoksično što je značilo da ostavlja negativne posljedice na živčani sustav. Istraživanja na glodavcima pokazala su štetan utjecaj na reproduktivni sustav, a nedugo zatim znanstvenici su pokušavali utvrditi djeluje li akrilamid kancerogeno. Na temelju rezultata koji su dobiveni proučavanjem djelovanja akrilamida na glodavce, Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) svrstala je akrilamid u skupinu 2B što znači da je takav spoj vjerojatno kancerogen [1].

Tijekom listopada 1997. godine, iznenadna paraliziranost i uginuće domaćih životinja te sve veći pomor riba počeli su zabrinjavati mještane poluotoka Bjare na jugozapadu Švedske. Vrlo brzo pronađen je uzrok ovih negativnih učinaka, a bio je povezan s radovima na izgradnji tunela. Naime, daljnjim analizama utvrdilo se kako je brtvilo pod nazivom *Rhoca-Gil* uliveno u šupljine tunelskih zidova pri čemu je došlo do onečišćenja podzemnih i površinskih voda [2]. Osim toga, kod radnika su zabilježeni poneki simptomi koji su se odrazili uglavnom na živčani sustav. *Rhoca-Gil* je smjesa dviju tekućina koje se međusobno pomiješaju, potom se otope u vodi, a zatim se raspršuju u šupljine. Upravo jedna od tih dviju tekućina sadržava akrilamid, otrovni kemijski spoj koji je kod švedskog stanovništva unio strah od kontaminacije zbog čega su mliječni proizvodi morali biti uklonjeni, povrće je propadalo na poljima, a sve domaće životinje morale su biti usmrćene [2]. Iako nije prijavljen nijedan slučaj smrtonosnog

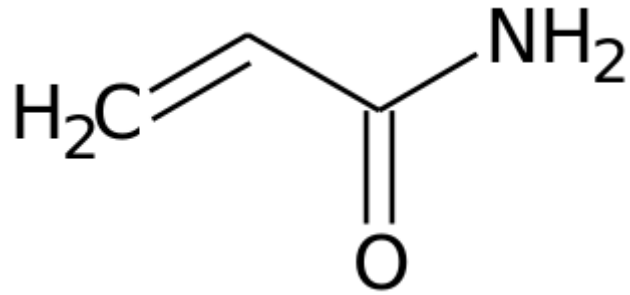
djelovanja akrilamida na ljude, svejedno je postojala opasnost od njegovih dugoročnih učinaka na zdravlje s obzirom na to da ga je IARC svrstala među vjerojatno kancerogene spojeve.

Tada su švedski znanstvenici pozvani da prouče koncentraciju akrilamida u organizmu radnika koji su mu bili izloženi tijekom radova u tunelu. Kako bi se odredila koncentracija akrilamida vezanog na hemoglobin, korištena je masena spektrometrija te su proučavane dvije skupine ljudi, radnici koji su bili izloženi akrilamidu te kontrolna skupina bez izloženosti akrilamidu [2]. Iznenadjujući rezultati koji su pokazivali visoku koncentraciju akrilamida u obje skupine ljudi upućivali su na to akrilamid najvjerojatnije dolazi u organizam i putem hrane. Tek je početkom 21. stoljeća, točnije 2002. godine otkriveno postojanje akrilamida u hrani. Najveće koncentracije akrilamida pronađene su u hrani poput čipsa, krumpirića, keksa i krepera. U bijelom kruhu, žitaricama i kukuruznom čipsu pronađene su nešto manje koncentracije akrilamida [2]. Akrilamid nije pronađen u kuhanoj hrani ili hrani koja nije zagrijavana iz čega se moglo zaključiti da je to spoj čiji nastanak ovisi o temperaturi te da se stvara samo kada su navedeni proizvodi zagrijani na temperaturu koja je viša od 120°C.

## 2.2. SVOJSTVA I STRUKTURA AKRILAMIDA

Akrilamid pripada skupini nezasićenih amida, organskih spojeva čija se funkcionalna skupina sastoji od acilne skupine koja je vezana na dušikov atom što prikazuje Slika 1. Prema IUPAC nomenklaturi, akrilamid se imenuje kao propen-2-amid [3]. Reaktivnost akrilamida proizlazi iz njegove dvostruke veze koja ima veliki afinitet prema -SH i -NH<sub>2</sub> skupinama u proteinima. To je nezapaljivi spoj bez mirisa i boje, molekulske formule C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO i male molekulske mase koja iznosi 71.08 g/mol [4]. Vrije pri temperaturi od 241°C dok mu je točka tališta zabilježena na 84.5°C. Gustoća akrilamida nešto je veća od gustoće vode i iznosi 1.13 g/cm<sup>3</sup>.





Slika 1. Kemijska struktura akrilamida [5]

Akrilamid se može dobiti tijekom hidrolize akrilonitrila, no uglavnom nastaje kada se hrana bogata škrobom zagrijava na visoke temperature. Pri sobnoj temperaturi, akrilamid se nalazi u obliku kristalne krutine (Slika 2.) te postaje izrazito reaktivan tek kada se otopi.



Slika 2. Akrilamid u obliku kristala [6]

S obzirom na polarnost akrilamida, zabilježena je njegova dobra topljivost u vodi, acetonu i etanolu [3]. Vodena otopina akrilamida također je bezbojna, a maseni udio akrilamida u vodenoj otopini najčešće iznosi 40% [4]. Ukoliko takva vodena otopina dospije u tlo, može dovesti do zagađenja podzemnih voda, a sagorijevanjem stvara toksične dušikove okside. Također, otapanjem akrilamida dolazi do brze polimerizacije pri čemu nastaje poliakrilamid. Akrilamid i poliakrilamid imaju široku primjenu u pročišćavanju otpadnih voda, proizvodnji papira, tekstila i boja, preradi rude i mnogim drugim industrijama [4]. Osim toga, akrilamid je značajan u znanstvenim istraživanjima kojima je cilj objasniti strukturu i funkciju proteina, a poznati su i poliakrilamidni gelovi koji su nužni za elektroforezu, metodu koja omogućuje odvajanje proteina [3]. Dok polimer akrilamida nije toksičan, izlaganje samom akrilamidu može ostaviti posljedice na zdravlje čovjeka s obzirom na to da je utvrđena njegova toksičnost i najvjerojatnije kancerogenost.

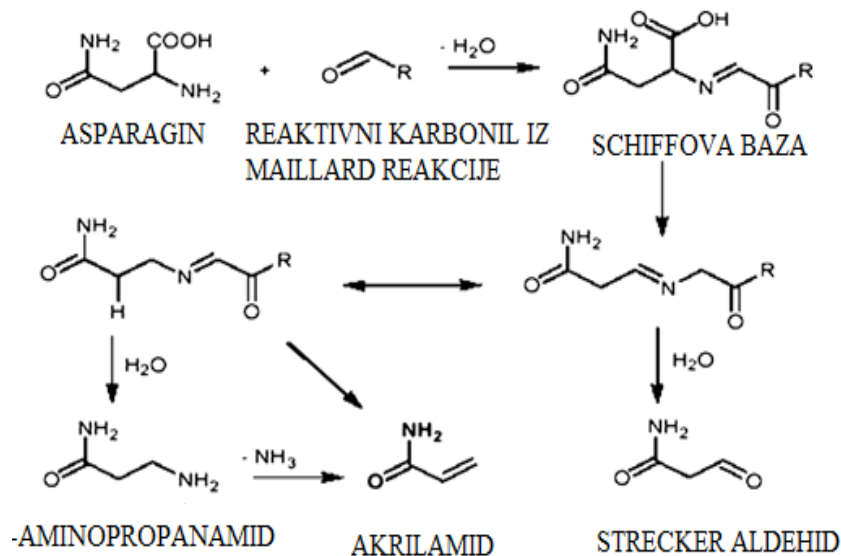
## 2.3. DOBIVANJE AKRILAMIDA

Akrilamid nastaje termičkom obradom mnogih namirnica bogatih škrobom. Prženjem ili pečenjem takvih namirnica dolazi do Maillardove reakcije u kojoj kao reaktanti sudjeluju aminokiseline i reducirajući šećeri. Osim Maillardove reakcije koja objašnjava formiranje akrilamida u hrani, moguće je i industrijsko dobivanje akrilamida koje podrazumijeva hidrolizu polimera akrilonitrila.

### 2.3.1. MAILLARDOVA REAKCIJA

Mehanizam nastanka akrilamida u prehrambenim proizvodima potječe iz Maillardove reakcije u kojoj sudjeluju aminokiseline i reducirajući šećeri. Aminokiselina asparagin dominira u brojnim namirnicama te je upravo ona ključni reaktant u Maillardovoj reakciji čiji produkti daju boju i okus hrani [7]. Uz asparagin, u Maillardovoj reakciji nužna je prisutnost reducirajućih šećera poput glukoze ili fruktoze, a uvjeti koje reakcija zahtijeva jesu povišena temperatura i niska vlažnost (pečenje i prženje). Nadalje, Maillardova reakcija ovisna je o još nekim čimbenicima, poput koncentracije reaktanata, pH vrijednosti i prisutnosti vode [8].

Iako postoje još neki mogući načini nastanka akrilamida, glavnim mehanizmom stvaranja akrilamida u hrani smatra se reakcija između asparagina i karbonilne skupine reducirajućih šećera što je prikazano na Slici 3.



Slika 3. Mehanizam nastanka akrilamida [9]

Mehanizam stvaranja akrilamida ovisan je o temperaturi jer prisutnost akrilamida nije utvrđena u kuhanoj hrani ili hrani koja nije zagrijavana, stoga stvaranje akrilamida potiču procesi prženja hrane na visokim temperaturama. Najveća koncentracija akrilamida stvara se pri temperaturi između 120°C i 170°C, a zatim se smanjuje [10].

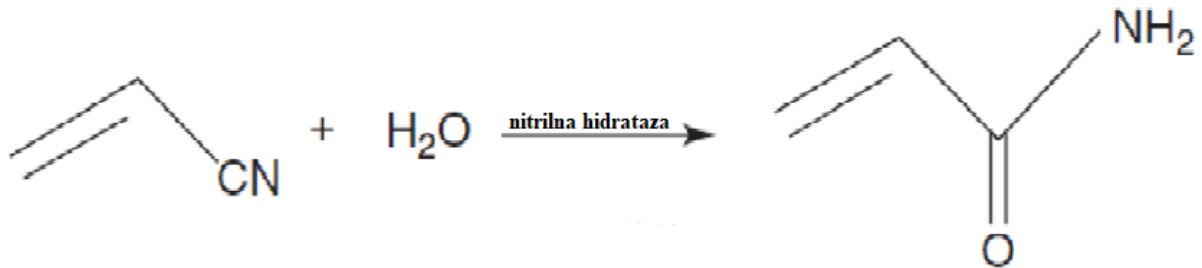
### 2.3.2. INDUSTRIJSKO DOBIVANJE AKRILAMIDA

Akrilamid je u industrijskim područjima prvi put proizveden u Njemačkoj 1893. godine, a tek je 1954. godine započela njegova značajna proizvodnja za industrijske potrebe. Postoje tri načina kojima se akrilamid može proizvesti industrijski, a to su sumporno kiselska proizvodnja, hidroliza akrilonitrila uz djelovanje katalizatora te hidroliza akrilonitrila djelovanjem enzima nitril-hidrataze [11].

Proizvodnja akrilamida pomoću sumporne kiseline najstariji je način dobivanja akrilamida koji je ubrzo zamijenjen katalitičkom hidrolizom akrilonitrila zbog prisustva mnogih nečistoća [11].

Hidroliza akrilonitrila danas je jedan od ključnih procesa dobivanja akrilamida kojim se proizvede 150000 do 200000 tona akrilamida u obliku 30-50% vodene otopine. U ovom procesu se kao katalizator koriste ioni bakra. Ipak, kod ovakve metode dobivanja akrilamida

javljaju se neke poteškoće. Primjerice, brzina nastanka akrilne kiseline veća je od brzine nastanka akrilamida, dvostruka veza prisutna kod reaktanta i produkta stvara brojne međuprodukte te dolazi do polimerizacije dvostruke veze [12]. Stoga hidroliza akrilonitrila u akrilamid djelovanjem enzima koji se naziva nitril-hidrataza (Slika 4.), tj. primjenom biokatalizatora *Rhodococcus rhodochrous* ima prednost u odnosu na ostale načine dobivanja akrilamida [13].



Slika 4. Hidroliza akrilonitrila u akrilamid djelovanjem nitril-hidrataze [14]

Za razliku od reakcije gdje kao katalizator sudjeluju ioni bakra, ovakav biološki proces uz nitril-hidratazu ne zahtijeva visoki tlak i temperaturu niti primjenu teških metala, a uz sve to proizvodnja otpadnih voda značajno je smanjena [13]. Osim navedenih pozitivnih strana mikrobno-enzimskog dobivanja akrilamida, važno je naglasiti da se tom reakcijom čak 99% akrilonitrila prevodi u akrilamid bez stvaranja nepotrebnih međuprodukata [12].

### 3. IZLOŽENOST ČOVJEKA AKRILAMIDU

Postoje tri glavna izvora akrilamida kojima on dolazi u dodir s čovjekom. Ključnim izvorom smatra se hrana, zatim okoliš u kojeg akrilamid dospjeva uglavnom putem ljudskih djelatnosti gdje se koristi za proizvodnju poliakrilamida. Osim toga, pokazano je da duhan uz niz kancerogenih spojeva također sadržava akrilamid te je to još jedan jednostavan način kojim čovjek dolazi u interakciju s akrilamidom.

#### 3.1. LJUDSKE DJELATNOSTI

Čovjek je danas izložen različitim koncentracijama akrilamida koji može kontaminirati vodu, tlo i zrak svakodnevnom proizvodnjom poliakrilamida u poljoprivrednim djelatnostima, rudarstvu, građevinarstvu, proizvodnji papira, kozmetici i sl. Akrilamid je karakterističan po značajnoj pokretljivosti i dobroj topljivosti zbog čega postoji visok rizik od onečišćenja podzemnih i površinskih voda. Njegova razgradnja događa se u vodi djelovanjem mikroorganizama kojima akrilamid služi kao izvor dušika i ugljika. Ovisno o uvjetima vode, razgradnja akrilamida u vodi traje 8 do 12 dana [15].

Također se akrilamid koristi u biomedicinskim istraživanjima da bi se dobio poliakrilamid koji se u konačnici koristi za elektroforezu.

Putem ljudskih djelatnosti, čovjek najčešće unese akrilamid u organizam udisanjem ili direktnim kontaktom putem kože. Unatoč prisutnosti u okolišu, koncentracije akrilamida su male te se smatraju bezopasnim za ljudsko zdravlje [11].

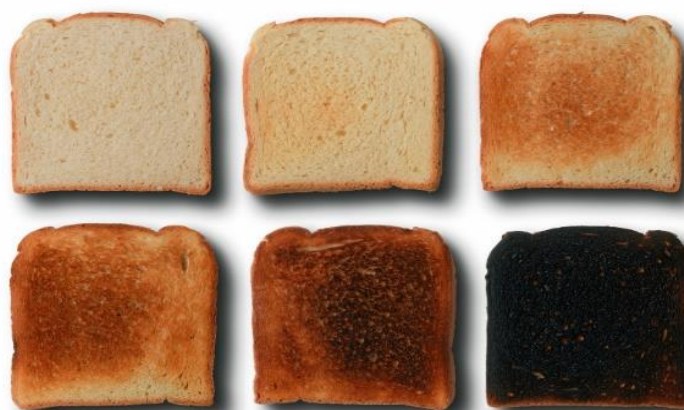
#### 3.2. HRANA

Glavni izvor svakodnevne izloženosti čovjeka akrilamidu je hrana te je u Tablici 1. prikazan prosječni dnevni unos akrilamida iz hrane na temelju istraživanja koje su provele pojedine organizacije.

Tablica 1. Prosječni dnevni unos akrilamida [16]

Organizacija	Prosječni dnevni unos akrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
EPIC	0.38
FINRISK Study	0.44 (žene), 0.41 (muškarci)
NHS - II	0.29
NLCS	0.30
TDS	0.21
Istraživanja u Poljskoj	0.43

Akrilamid ne dospijeva u hranu iz okoliša ili nekog drugog izvora, već se formira u Maillardovoj reakciji iz prirodno prisutnih sastojaka u hrani. Prisutnost akrilamida u nekoj namirnici vrlo lako se može prepoznati po karakterističnoj smeđoj boji koju će hrana poprimiti nakon dugotrajnog zagrijavanja. Najveći udio akrilamida stvara se na kraju procesa prženja pri čemu površina namirnice postaje izrazito suha što pogoduje nastanku akrilamida. Upravo je iz tih razloga površina namirnice tamne boje što se može vidjeti na Slici 5. Najveća količina akrilamida pronađena je u hrani koja se gotovo svakodnevno konzumira, a to su prženi krumpirovi proizvodi, kava, keksi, krekeri i kruh [17].



Slika 5. Stvaranje akrilamida u tostu [18]

Akrilamid se stvara zagrijavanjem različitih namirnica neovisno o tome odvija li se zagrijavanje ili prženje u tavi, pećnici ili mikrovalnoj pećnici, ali u namirnicama koje su sirove ili kuhane nije zabilježena prisutnost akrilamida [19]. Koliko će akrilamida nastati, ovisi o koncentraciji ugljikohidrata u hrani, vremenu zagrijavanja te temperaturi [15]. U Tablici 2. prikazane su koncentracije akrilamida u pojedinim namirnicama.

Tablica 2. Prosječna koncentracija akrilamida u pojedinim namirnicama [20]

Namirnica	Prosječna koncentracija akrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Broj uzoraka
Hrskavi kruh	390	334
Kruh	22	56
Žitarice	121	147
Kava	13	94
Keksi	360	557
Čips	804	529
Grickalice	958	77
Prženi krumpirići	339	715

Osim u hrani, akrilamid može biti prisutan i u vodi za piće, ali takve koncentracije akrilamida su izrazito male, stoga ne bi trebale izazivati zabrinutost.

### 3.3. DUHANSKI DIM

U duhanskom dimu prisutno je više od 8000 kemijskih tvari među kojima se može pronaći akrilamid. Akrilamid nastaje pirolizom duhana što duhan čini jednim od jednostavnih načina kojima je čovjek izložen djelovanju akrilamida. Koncentracije akrilamida u jednoj cigareti kreću se u rasponu od 1100 do 2300 nanograma. Istraživanja su pokazala kako kod pušača prosječna dnevna izloženost akrilamidu iznosi  $3.4 \mu\text{g}/\text{kg}$  [16].

## 4. TOKSIČNOST AKRILAMIDA

S obzirom na to da je postojanost akrilamida u okolišu bezopasna za ljudsko zdravlje, sve veću zabrinutost izaziva njegova prisutnost u hrani koja dopijeva u čovjekov organizam gotovo svaki dan. Stoga je sve više znanstvenih istraživanja usmjereno na toksični i kancerogeni utjecaj akrilamida na ljudski organizam.

### 4.1. DEFINICIJA TOKSIČNOSTI

Toksičnost neke tvari može se definirati kao njezino svojstvo izazivanja štetnih učinaka u organizmu [21]. Da bi neka stvar stvorila toksični učinak, ona mora doći u kontakt s biološkim sustavom, biti prisutna u dovoljnoj količini s obzirom na toksična svojstva te nivo apsorpcije mora prelaziti nivo izlučivanja. Toksične tvari najčešće ulaze u organizam putem pluća, kože, gastrointestinalnog trakta ili intravenozno i intramuskularno [22]. Apsorpcija putem pluća odvija se vrlo brzo pri čemu se toksičnoj tvari izlažu vitalni organi, dok se apsorpcija preko kože odvija malo sporije te podrazumijeva ulazak toksične tvari u perifernu cirkulaciju. Nakon ulaska toksične tvari u organizam, ona se premješta u krvotok odakle se širi po čitavom organizmu. Raspodjela otrova u organizmu nije svuda jednaka, primjerice za droge i lijekove karakteristično je odlaganje u jetri, žuči i kosi, dok se teški metali talože u kosi, noktima i kostima, a većina pesticida završava u masnom tkivu [22]. Nakon raspodjele, slijedi razgradnja, odnosno metabolizam toksične tvari te u konačnici izlučivanje uglavnom putem bubrega, a manjim dijelom kroz debelo crijevo i izdisanjem kroz pluća [22]. Apsorpcija, raspodjela, metabolizam te eliminacija toksične tvari međusobno su povezani procesi te se zajedničkim imenom nazivaju toksikokinetički procesi. Dok se toksikokinetika odnosi na put toksične tvari u organizmu, toksikodinamika nastoji opisati sami mehanizam djelovanja toksične tvari u organizmu te povezanost između doze i toksičnog učinka. Znanost koja podrazumijeva otkrivanje, identifikaciju i kvantifikaciju toksičnih tvari kojima su živa bića izložena naziva se toksikologija. U prošlosti je toksikologija bila jednostavno definirana kao znanost o otrovima, dok se danas može objasniti kao znanost koja se bavi proučavanjem štetnih utjecaja koji su posljedica interakcije živih organizama s toksičnim tvarima [23].

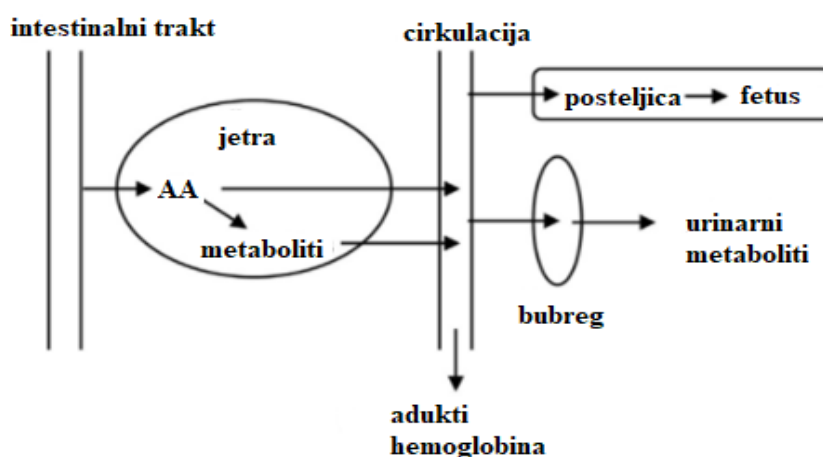


## 4.2. TOKSIKOKINETIKA AKRILAMIDA

Akrilamid može dospjeti u ljudski organizam putem gastrointestinalnog trakta, inhalacijom, ali i transdermalno. Apsorpcija akrilamida preko kože odvija se puno sporije nego apsorpcija putem gastrointestinalnog trakta te znatna količina dermalno primijenjenog akrilamida ostaje prisutna na koži [24]. Uneseni akrilamid apsorbira se vrlo brzo, a s obzirom na to da je riječ o maloj molekuli visoke polarnosti i dobre topljivosti u vodi lako može proći kroz biološke membrane i raspodijeliti se u sva tkiva.

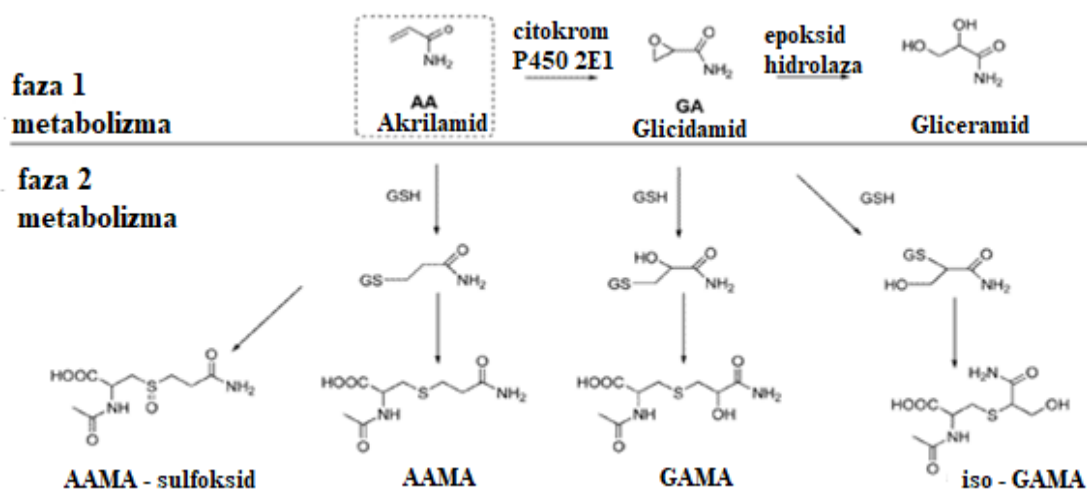
Oko 12% akrilamida skladišti se u eritrocitima, a visoke koncentracije ostaju prisutne i do 10 dana najvjerojatnije zbog reakcije između akrilamida i sulfihidrilne skupine u hemoglobinu [25]. S obzirom na vezanje akrilamida na hemoglobin, moguće je mjeriti izloženost akrilamidu koristeći adukte hemoglobina u eritrocitima.

Određeni udjeli akrilamida pronađeni su u mišićima (48%), koži (15%) te u jetri (7%), ali i u srcu, bubrezima i plućima. Akrilamid može proći kroz posteljicu te doći u kontakt s fetusom, a također je pronađena njegova prisutnost u majčinu mlijeku [16]. Slika 6. prikazuje shematski prikaz apsorpcije, raspodjele, metabolizma i eliminacije akrilamida iz organizma.



Slika 6. Shematski prikaz apsorpcije, raspodjele, metabolizma i izlučivanja akrilamida [26]

Metabolizam akrilamida primarno se odvija u jetri te su nakon apsorpcije moguća njegova dva metabolička puta; pretvorba u reaktivni epoksid glicidamid pomoću citokroma P450 i konjugacija s reduciranim glutationom (GSH) (Slika 7.).



Slika 7. Metabolički putovi akrilamida [27]

U prvom metaboličkom putu dolazi do razgradnje akrilamida pomoću citokroma P450 2E1 (CYP2E1) pri čemu nastaje elektrofilan spoj glicidamid [26]. Glicidamid djelovanjem enzima epoksid hidrolaze može hidrolizirati u manje reaktivni gliceramid koji je netoksičan i koji se eliminira putem bubrega.

Što se tiče drugog metaboličkog puta, ovdje se odvija direktna konjugacija akrilamida s GSH koju katalizira jetreni enzim glutation-S-transferaza (GST) [25]. Rezultat ove reakcije je konjugat merkapturične kiseline (AAMA) koji se iz organizma izlučuje putem urina [26]. Konjugacija s glutationom važna je iz dva razloga te je ujedno i učestaliji metabolički put akrilamida kod ljudi. Naime, prvi razlog jest taj da se smanjuje reaktivnost akrilamida prema staničnim komponentama, a drugi da se na ovaj način puno manje akrilamida prevodi u reaktivni glicidamid koji je najvjerojatnije odgovoran za genotoksičnost.

Nastali glicidamid također može stupiti u reakciju s glutationom gdje kao produkti ponovno nastaju konjugati merkapturične kiseline (GAMA i iso-GAMA). Nastali metabolički produkti eliminiraju se iz organizma putem urina [26].

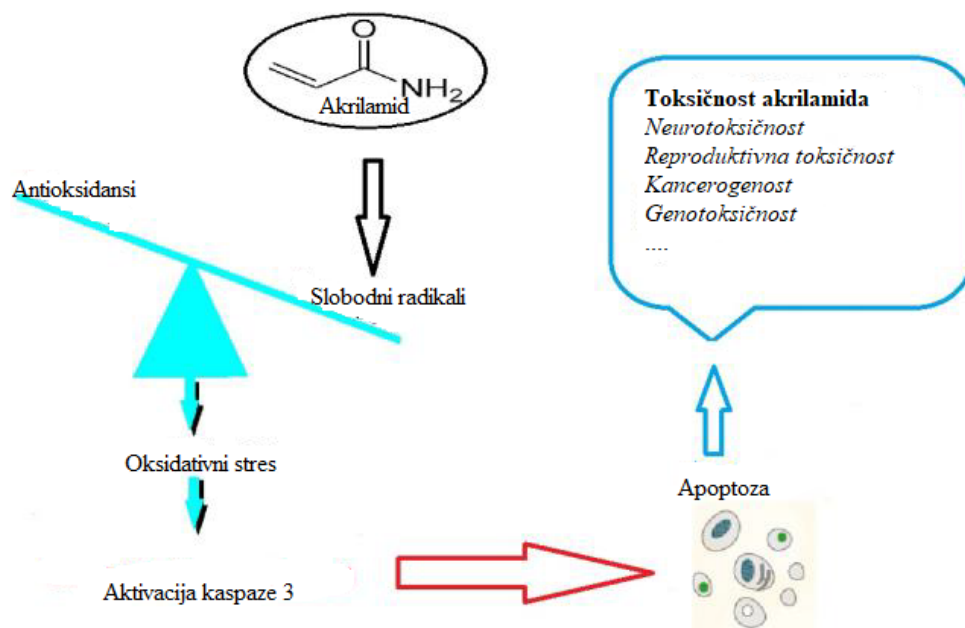
Glavni urinarni metabolit akrilamida je merkapturična kiselina kojom se izluči oko 50% unesene količine akrilamida [25]. Putem ostalih urinarnih metabolita koji još uvijek nisu u potpunosti identificirani eliminira se 14% akrilamida. Također se došlo do zaključaka kako se oko 4 do 6% akrilamida iz organizma izluči u obliku CO<sub>2</sub> [25].

Akrilamid se ne taloži u ljudskom organizmu, već se eliminira u obliku merkapturične kiseline. No, s obzirom na njegovu mogućnost stvaranja adukata s proteinima, ipak se može zadržavati u tijelu u takvom obliku.

### 4.3. TOKSIKODINAMIKA AKRILAMIDA

Akrilamid se epoksidacijom metabolizira do reaktivnog glicidamida kojeg karakterizira puno veća toksičnost od akrilamida. Oba spoja male su organske molekule koje vrlo lako mogu reagirati s velikim brojem bioloških molekula uključujući i hemoglobin [26]. S obzirom na  $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasićenu strukturu, akrilamid lako stupa u reakcije s nukleofilima, dok je za glicidamid karakteristična reakcija s bazama u DNA. Dvostruka veza sadržana u akrilamidu ima veliki afinitet prema -SH, -NH<sub>2</sub> i -OH skupinama. Epoksidni prsten glicidamida reagira na isti način, osim što ima veći afinitet prema -NH<sub>2</sub> skupini te purinskim i pirimidinskim bazama u DNA [26].

Akrilamid je uzročnik oksidativnog stresa u organizmu koji u konačnici uzrokuje brojne poremećaje (Slika 8.). Dolazi do konstantnog stvaranja slobodnih radikala, a kako bi se smanjio njihov štetni utjecaj, organizam posjeduje zaštitne barijere poput antioksidativnih enzima: superoksid dismutaza (SOD), katalaza, GST, glutation peroksidaza i protein GSH [28].



Slika 8. Mehanizam toksičnosti akrilamida [28]

Akrilamid u organizmu stvara reaktivne kisikove jedinice. Kako dolazi do povećanja koncentracije akrilamida, tako se povećava aktivnost antioksidativnih enzima SOD i GST, a GSH se troši zbog reakcije konjugacije s akrilamidom. Smanjene koncentracije GSH uzrokuje povećanje reaktivnih kisikovih jedinica koje potom aktiviraju protein-kinazu aktiviranu mitogenom (MAP-kinazu) [28]. MAP-kinaza je vrsta protein-kinaze koja ima ključnu ulogu u regulaciji staničnih procesa kao što je apoptoza. Dakle, smanjena koncentracija GSH uzrokuje oksidativni stres koji vodi prema staničnoj smrti, tj. apoptozi koja se može smatrati potencijalnim mehanizmom za akrilamidnu toksičnost. Oksidativni stres također aktivira protein kaspazu 3 te tako pokreće apoptozu koja u ovom slučaju rezultira štetnim učincima na neurološki te reproduktivni sustav, genski materijal te izaziva tumor.

#### 4.4. TOKSIČNO DJELOVANJE AKRILAMIDA

Akrilamid može štetno djelovati na organizam čovjeka kao neurotoksin, dok toksičnost za ostale organe kod ljudi nije dokazana. Postoje brojne indikacije koje upućuju na reproduktivnu i razvojnu toksičnost, genotoksičnost i razvoj tumora, ali su takvi slučajevi potvrđeni samo kod životinja.

#### 4.4.1. NEUROTOKSIČNOST

Prve naznake koje su upućivale na potencijalno neurotoksično djelovanje akrilamida bili su simptomi primijećeni kod radnika koji su dulje vrijeme bili profesionalno izloženi akrilamidu. Njihova klinička slika sadržavala je simptome poput utrnulosti ruku i nogu, slabosti u nogama te gubitka osjećaja u nožnim prstima [29]. Cerebralna disfunkcija, pretjerani umor, ataksija i oštećenje perifernih živaca simptomi su koji se javljaju kao rezultat dugotrajnije izloženosti akrilamidu. Toksično djelovanje na živčani sustav jedina je vrsta toksičnosti koja je dokazana kod ljudi te je akrilamid danas klasificiran kao neurotoksin koji negativno utječe na središnji i periferni živčani sustav [30].

Kako bi se objasnio utjecaj akrilamida na neurološki sustav, predložena su ukupno tri mehanizma njegove neurotoksičnosti. Prvi se zasniva na inhibiciji brzog aksonskog transporta, dok se drugi mehanizam dovodi u vezu s utjecajem na otpuštanje neurotransmitera, a posljednji se temelji na direktnoj inaktivaciji neurotransmisije gdje će se neurotransmiter otpustiti, ali njegov učinak izostaje [30].

Prvi mehanizam ujedno se smatra i temeljnim mehanizmom neurotoksičnosti akrilamida. Takva neurotoksična aktivnost temelji se na narušavanju anterogradnog i retrogradnog brzog aksonskog transporta [29]. To se događa zbog utjecaja akrilamida na kinezin, protein iz skupine motornih proteina koji se kreću uzduž mikrotubula i sudjeluju u transportu. U prisutnosti akrilamida dolazi do kovalentnih modifikacija na koje je kinezin osjetljiv, a kao posljedica toga javlja se smanjeni afinitet između kinezina i mikrotubula [30]. Inhibicija motornih proteina te aksonskog transporta onemogućuje prijenos živčanih impulsa od tijela živčane stanice (neurona) do distalnog aksona.

U novije vrijeme, pojavio se drugi mehanizam neurotoksičnosti akrilamida. Taj mehanizam može biti posljedica narušavanja procesa fuzije membrane na živčanom završetku. Posljedica ovakvog djelovanja je nemogućnost da se sinaptički vezikuli povežu sa svojim odgovarajućim membranama, a to u konačnici rezultira smanjenim oslobađanjem neurotransmitera te propadanjem terminalnog živca. Uzrok ovom mehanizmu može biti vezanje akrilamida na sulfhidrilne skupine cisteina, proteina koji sudjeluje u fuziji membrane [29].

Što se tiče trećeg mehanizma, dokazano je djelovanje akrilamida na ekspresiju receptora neurotransmitera te inhibicija neurotransmisije. Uočeni su učinci akrilamida na noradrenalin, dopamin i serotonin, tj. smanjenje njihove koncentracije u prisutnosti akrilamida [30]. Osim

zmanjenja koncentracije navedenih neurotransmitera, smanjuje se razina cerebralnog GSH te se inaktivira djelovanje cerebralnog enzima GST.

Neurotoksični utjecaji pojavljuju se kod ljudi tek pri izloženosti jako visokim razinama akrilamida [30]. Niže razine akrilamida unesene putem prehrambenih proizvoda zasada ne predstavljaju značajnu opasnost od toksičnih učinaka na živčani sustav. Ipak, potrebno je više istraživanja o izloženosti niskoj razini akrilamida s ciljem utvrđivanja kumulativnih učinaka na živčani sustav.

#### 4.4.2. REPRODUKTIVNA I RAZVOJNA TOKSIČNOST

S obzirom na to da je dokazano štetno akrilamidno djelovanje na motorne proteine koji utječu na motilitet spermija, akrilamid se dovodi u vezu s reproduktivnom i razvojnom toksičnošću. Važno je naglasiti kako toksičnost na reproduktivni sustav još uvijek nije dokazana kod ljudi, ali je dokazana kod životinja koje su bile podvrgnute raznim laboratorijskim eksperimentima. Eksperimenti su izvršeni na miševima i štakorima koji su bili izloženi akrilamidu te se reproduktivna i razvojna toksičnost manifestirala poteškoćama prilikom razmnožavanja, smanjenom stopom plodnosti te fetalnom resorpcijom [31]. Kod ženki je utvrđen smanjeni broj legla, a kod mužjaka smanjeni broj spermija.

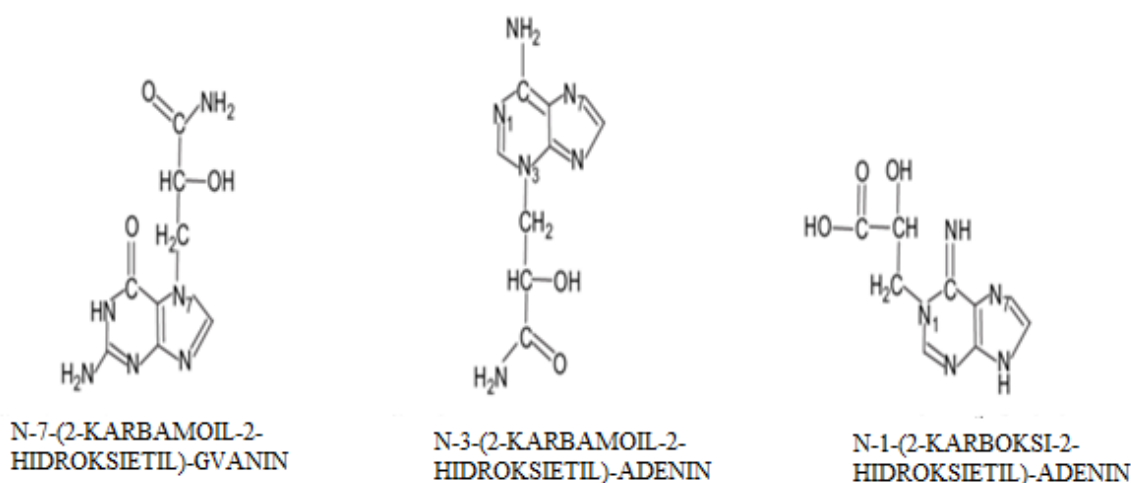
Molekularni mehanizmi reproduktivne i razvojne toksičnosti dovode se u vezu s kromosomskim oštećenjima, alkiliranjem -SH skupina, trošenjem GSH te oštećenjem DNA [31].

#### 4.4.3. GENOTOKSIČNOST

Europska agencija za kemikalije (ECHA) klasificirala je akrilamid u mutagen kategorije 2 što znači da uzrokuje genetska oštećenja koja su nasljedna [16]. Dva su načina uzrokovanja genotoksične aktivnosti. Prvi je metabolička pretvorba akrilamida u glicidamid, reaktivni epoksid koji se smatra odgovornim za mutagenost [31]. Drugi način je mogućnost akrilamida da stvara adukte sa -SH, -OH i -NH<sub>2</sub> skupinom te u manjoj mjeri s nukleofilnim centrima u DNA.

Glicidamid pripada skupini jakih mutagena, karakterizira ga visoka reaktivnost s DNA te uzrokuje točkaste mutacije [31]. Mnogim istraživanjima na glodavcima došlo se do zaključaka kako akrilamid, zajedno s glicidamidom, mutageno djeluje na zametne stanice. Kao razlog akrilamidne genotoksičnosti u zametnim stanicama, navodi se reakcija detoksifikacije u kojoj nastaje glicidamid pomoću enzima CYP2E1 [26]. Najvećim se dijelom genotoksičnost povezuje s klastogenim učinkom akrilamida u zametnim stanicama čime se izaziva poremećaj u kromosomima, tj. njihovo brisanje, dodavanje i preuređivanje [25]. Takve interakcije akrilamida sa zametnim tkivom upućuju na nasljedne mutacije na DNA. Također su pronađeni različiti tipovi mutacija u jetri miševa, a genotoksični učinci akrilamida otkriveni su na ljudskim stanicama HepG2 izlaganjem koncentracijama akrilamida u iznosu od 2.5, 10 i 20 mM [26].

Akrilamid reagira jako sporo s DNA, dok se reakcija s glicidamidom odvija puno brže s obzirom na njegovu elektrofilnu epoksidnu skupinu [26]. Adukti koje glicidamid stvara s DNA pronađeni su u tkivima glodavaca i krvi glodavaca, a prikazani su na Slici 9. Svi su ti adukti također pronađeni u ljudskom tkivu i krvi [26].



Slika 9. Adukti akrilamida s adeninom i gvaninom [32]

Nadalje, istraživanja pokazuju da se kod miševa vezanje na DNA pojavljuje u jetri, plućima, testisima, želucu i koži i to 6 sati nakon oralne ili transdermalne primjene akrilamida [25].

Akrilamid također ima mogućnost alkilacije DNA, a s obzirom na potvrdu činjenice negativnog utjecaja na genski materijal, akrilamid se dovodi u vezu s kancerogenim učincima [25].

#### 4.4.4. KANCEROGENOST

IARC je svrstala akrilamid u skupinu spojeva koji su „vjerojatno kancerogeni za ljude“ (grupa 2A). Također ga je i američka Agencija za zaštitu okoliša (EPA) klasificirala kao tvar koja je „vjerojatno kancerogena za ljude“ (grupa B2). Osim toga, ECHA je postavila akrilamid na popis kancerogenih spojeva iz kategorije 2 te na popis mutagenih spojeva iz kategorije 2 što znači da može biti uzročnik raka i nasljednih genetskih poremećaja [16].

Postoji nekoliko razloga zašto se ne može u potpunosti dokazati kancerogeni učinak akrilamida [29]. Jedan od razloga jest taj što ne postoji dovoljno znanstvenih dokaza koji bi potvrdili izazivanje raka kod ljudi od strane akrilamida. Unatoč tome, akrilamid se karakterizira kao potencijalno kancerogeni spoj za ljude zbog toga što njegova struktura nalikuje strukturi drugih kancerogenih spojeva. Također se pokazao kao genotoksičan za životinje, a osim toga brojne životinje koje su u laboratorijskim eksperimentima bile izložene visokim koncentracijama akrilamida razvile su tumore na različitim mjestima [29].

Iako kancerogeno djelovanje akrilamida nije do danas dovoljno istraženo, ipak postoje pretpostavke kojima se može objasniti kancerogeni učinak akrilamida i njegovog metaboličkog produkta glicidamida. Te pretpostavke temelje se na genotoksičnim mehanizmima te mehanizmima koji nisu genotoksični.

Što se tiče genotoksičnih mehanizama, prilikom laboratorijskih eksperimenata pri kojima su glodavci bili podvrgnuti određenim količinama akrilamida, dokazan je razvoj tumora u životinja. Glodavci su razvijali tumore mliječne žlijezde, središnjeg živčanog sustava, štitnjače, usne šupljine, maternice, testisa, hipofize, nadbubrežne žlijezde itd. [16]. S obzirom da su akrilamid i glicidamid alkilirajuća sredstva, ova dva spoja sposobna su kovalentno se vezati na DNA i proteine pri čemu dolazi do poremećaja replikacije i transkripcije DNA. Takvi učinci u konačnici će dovesti do mutacija i transformacija stanica što rezultira početkom razvoja tumora [16]. Kao što je već spomenuto i prikazano, glicidamid se veže na gvanin i adenin i to najčešće na položajima N7, N1 i N3, dok akrilamid ima nešto manju mogućnost vezanja na DNA, a



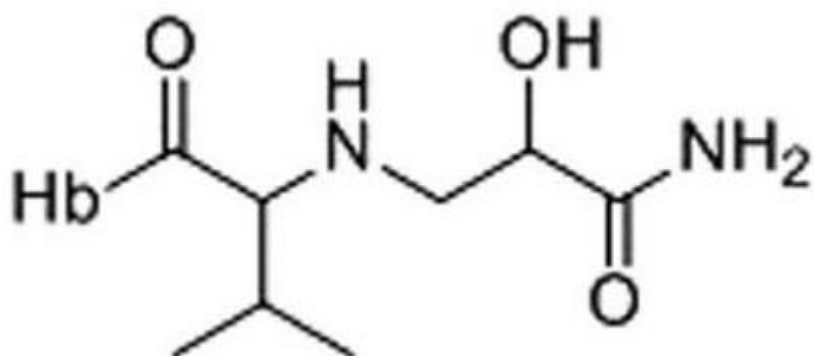
također je sposoban vezati se na sulfhidrilne skupine koje su važne u popravku DNA. Pod utjecaj akrilamida dolaze i kinezin proteini koji imaju bitnu ulogu u diobi stanica i pravilnom odvajanju kromosoma.

Osim genotoksičnih mehanizama, neka istraživanja pokazala su da akrilamid može uzrokovati tumor na načine koji nisu genotoksični. Primjerice, postoje neke pretpostavke kako izlaganje akrilamidu dovodi do smanjenja GSH te istovremenog povećanja oksidiranog GSH. Tim se procesom narušava redoks ravnoteža što za posljedicu može imati utjecaj na ekspresiju gena i poremećaje u transkripciji [16].

#### 4.5. BIOMARKERI IZLOŽENOSTI AKRILAMIDU

Biomarkeri su biološki pokazatelji koji se mogu izmjeriti s ciljem utvrđivanja prisutnosti neke kemijske tvari u organizmu te za praćenje poremećaja fizioloških procesa kod životinja i ljudi. Izloženost i prisutnost akrilamida u organizmu čovjeka i životinja moguće je odrediti mjerenjem koncentracije specifičnih spojeva koji se formiraju prilikom reakcije akrilamida s hemoglobinom i DNA.

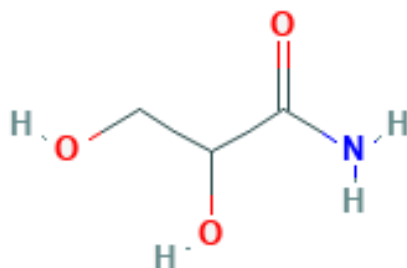
Akrilamid i glicidamid u reakcijama adicije Michael tipa vežu se na aminokiseline prisutne u hemoglobinu te nastaju spojevi glicidamid-hemoglobin i akrilamid-hemoglobin koji je prikazan na Slici 10. Takvi se spojevi s hemoglobinom upotrebljavaju kao biomarkeri koji prikazuju izloženost čovjeka i životinja akrilamidu [31]. Kompleksi s hemoglobinom zadržavaju se u organizmu dulji period te će biti prisutni i 4 mjeseca nakon izloženosti [26].



Slika 10. Adukt akrilamida s hemoglobinom [27]

Što se tiče stvaranja adukata s DNA, akrilamid i glicidamid se razlikuju po reaktivnosti. Glicidamid će reagirati 100 do 1000 puta brže s DNA nego akrilamid i to iz razloga što je kod glicidamida prisutna elektrofilna epoksidna skupina [26]. Glavni adukti koji nastaju jesu N-7-(2-karbamoil-2-hidroksietil)-gvanin i N-3-(2-karbamoil-2-hidroksietil)-adenin. Oba adukta pronađena su u tkivima i organima sisavaca, a kompleks s gvaninom prisutan je u puno većoj mjeri nego kompleks s adeninom. S obzirom da DNA ima mogućnost popravka, ovi biomarkeri pokazuju samo nedavnu izloženost akrilamidu, otprilike izloženost koja se dogodila prije tjedan dana [26].

Kao dodatni biomarkeri, značajni su urinarni metaboliti akrilamida, tj. konjugati merkapturične kiseline AAMA, GAMA i iso-GAMA. Ovi metaboliti merkapturične kiseline ubrajaju se u biomarkere kratkog vijeka te njihova prisutnost upućuje na nedavnu izloženost akrilamidu [26]. Upotreba GAMA i AAMA kao biomarkera uvelike može olakšati identifikaciju akrilamida u organizmu te njegovu povezanost s drugim bolestima. Kao dodatni urinarni biomarker može se koristiti 2, 3-dihidroksi propionamid (OH-PA) koji je produkt hidrolitičke razgradnje glicidamida, a prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Kemijska struktura 2, 3-dihidroksi propionamida [33]

## 5. ANALIZA I SMANJENJE UDJELA AKRILAMIDA

Budući da je akrilamid identificiran u hrani koja je prisutna u svakodnevnom životu čovjeka, nužno je pratiti njegovu koncentraciju te poduzeti sve mjere kako bi se smanjila ili izbjegnula moguća opasnost. Tako su se razvile brojne analitičke metode kojima je u laboratorijima moguće kvantitativno odrediti količinu akrilamida u vodi, biološkim tekućinama i hrani te se ključnim metodama smatraju tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, plinska kromatografija, tekućinska kromatografija-masena spektrometrija (LC-MS) i plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Osim metoda određivanja akrilamida, razvijene su brojne druge biološke, fizikalne i kemijske metode koje se uglavnom odnose na smanjenje prekursora i utjecaja na uvjete potrebne za formiranje akrilamida.

### 5.1. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA AKRILAMIDA

Danas većina laboratorija za analizu akrilamida u hrani upotrebljava metode kao što su GC-MS i LC-MS. Ove dvije metode imaju brojne prednosti nad drugim metodama te ih odlikuju jednostavnost i brza analiza.

GC-MS metoda može se temeljiti na bromiranju analita ili direktnoj analizi bez derivatizacije, tj. bez pretvorbe analita u njegov derivat. Proces bez derivatizacije je mnogo jednostavniji pristup, dok je bromiranje akrilamida u 2, 3-dibrompropionamid puno složeniji proces, no ipak ga karakteriziraju neke pozitivne strane. Primjerice, takav proces identifikacije akrilamida osigurava visoku selektivnost, veću osjetljivost te se smanjuje mogućnost utjecaja smetajućih tvari [34]. GC-MS metoda uz brominaciju smatra se najboljom tehnikom za identifikaciju akrilamida u hrani te je moguće odrediti prisutnost akrilamida čak i ako je prisutan pri niskim koncentracijama.

Ipak, proces derivatizacije može dovesti do gubitka analita te zahtijeva mnogo vremena pa se sve veća pozornost pridaje LC-MS metodi. Prva LC-MS metoda za određivanje akrilamida razvijena je 2002. godine kako bi se provjerili rezultati dobiveni GC-MS metodom [34]. S obzirom da je akrilamid karakterističan po velikoj topljivosti i iz tog razloga ga je vrlo teško identificirati u vodi, LC-MS metoda također se koristi za identifikaciju akrilamida u vodi.

Osim navedenih metoda, za određivanje akrilamida u hrani u upotrebi su kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD), kromatografija visoke djelotvornosti s UV apsorpcijskim detektorom, plinska kromatografija s detektorom zarobljavanja elektrona, kapilarna zonska elektroforeza te enzimski imuno testovi. Također se prisutnost akrilamida u hrani može identificirati pomoću elektrokemijskih biosenzora i primjenom blisko-infracrvene spektroskopije [31].

## 5.2. METODE SMANJENJA UDJELA AKRILAMIDA

Akrilamid je produkt Maillardove reakcije te je odgovoran za boju, okus, teksturu i aromu hrane. Cilj je smanjiti koncentraciju prisutnog akrilamida u hrani, a istovremeno zadržati kvalitetu hrane. Stoga su predložene mnoge metode kojima hrana može istodobno biti ukusna, ali i zdrava za konzumiranje.

### 5.2.1. BIOLOŠKE METODE

Kako bi se smanjila količina akrilamida u hrani, potrebno je smanjiti prekursore koji su odgovorni za njegovo nastajanje, a to su aminokiselina asparagin i reducirajući šećeri. Smatra se da bi smanjena proizvodnja asparagina i reducirajućih šećera putem genetičkog inženjerstva uvelike pridonijela smanjenoj prisutnosti akrilamida u hrani [31].

Primjerice, u pšenici prekomjerna ekspresija gena TaGCN2 utječe na smanjenje koncentracije slobodnih aminokiselina u zrnu pšenice i to posebice asparagina. To znači da se genetičkom manipulacijom ekspresije ovog gena može smanjiti količina slobodnog asparagina u zrnu pšenice te će se ujedno na taj način smanjiti rizik od stvaranja akrilamida u pšeničnim proizvodima [31].

Osim toga, za pripremu krumpirovog čipsa i pomfrita, preporučuje se koristiti one sorte krumpira koje imaju nizak udio šećera. Optimalna razina reducirajućih šećera u krumpiru trebala bi biti niža od 0.7 g/kg te treba voditi računa o skladištenju krumpira. Smatra se kako bi se krumpir trebao skladištiti u uvjetima gdje je temperatura veća od 6°C, a relativna vlažnost trebala bi iznositi 85 do 90% [35].

### 5.2.2. FIZIKALNE METODE

Akrilamid se stvara u hrani tijekom duljeg zagrijavanja pri visokim temperaturama. Tako se stvaranje akrilamida u hrani može smanjiti primjenom nižih temperatura pečenja i prženja, ali ovaj će način rezultirati produljenjem vremena prženja. Zato se preporučuje prženje pomoću dviju temperaturnih zona. Pod dvjema temperaturnim zonama podrazumijevaju se visoka temperatura koja će trajati kratko, npr. temperatura od 170°C do 180°C koja traje jednu minutu ili manje, a zatim slijedi sniženje temperature za 5 do 15°C. Time će se postići željeni izgled i okus hrane uz istodobno nižu količinu akrilamida [35].

Također je sve više raširena upotreba vakuum prženja koja rezultira smanjenjem akrilamida jer sniženi tlak snižava temperaturu vrenja vode ili ulja pa se samim time reducira razina akrilamida u prženim proizvodima.

Osim temperature, važnu ulogu ima i debljina krumpira koji se prži. Primjerice, prženjem tankih štapića krumpira razvija se puno veća koncentracija akrilamida nego prženjem debljih komada krumpira kroz isti vremenski period [35].

### 5.2.3. KEMIJSKE METODE

Najuspješnijom kemijskom metodom za smanjenje akrilamida smatra se dodatak aminokiselina poput glutamina, alanina, lizina, glicina i cisteina. Ukoliko se bijelo brašno ili krumpir prije procesa obrade namače u otopini npr. lizina ili glicina, doći će do smanjenog stvaranja akrilamida jer takav postupak potiče natjecanje između aminokiselina za reakciju s reducirajućim šećerima [31].

Dodatak enzima asparaginaze također može imati utjecaj na razinu akrilamida. To je enzim koji razgrađuje asparagin, a da pri tome ne utječe na okus i izgled hrane. Dodatak asparaginaze pokazao se izrazito uspješnim u proizvodima poput pomfrita i čipsa pri rasponu pH vrijednosti od 5 do 8 [31].

Između ostalog, i puferi poput citratnog i fosfatnog pufera mogu reducirati razine akrilamida na način da se hrana prije termičke obrade natapa u puferskim otopinama [31]. Nadalje, još jedan faktor koji utječe na smanjenje akrilamida jest sniženje pH vrijednosti.

Snižavanjem pH vrijednosti usporit će se Maillardova reakcija, no natapanje hrane u kiselinama pokazalo se nepoželjnom metodom zbog utjecaja na okus.

Antioksidansi iz biljaka također mogu utjecati na koncentraciju akrilamida. Većina antioksidansa utjecat će na reakcije stvaranja akrilamida jer zbog svoje strukture i funkcionalnih skupina mogu reagirati s prekursorima akrilamida. Dodatak biljnih ekstrakata mente umanjuje udio akrilamida za 75%, dok sjemenke kumina i zvjezdanog anisa uzrokuju smanjenje akrilamida za 73% i 69% [31]. Značajan utjecaj imaju vodeni ekstrakti zelenog čaja, cimeta i origana. Upotreba djevičanskog maslinovog ulja također vodi prema smanjenju akrilamida jer prisutni fenoli inhibiraju reakcije nastanka akrilamida.

### 5.3. DOPUŠTENE RAZINE AKRILAMIDA

Unatoč tek nedavnom otkriću, akrilamid je stoljećima u upotrebi različitih industrija i tvornica te je njegova prisutnost u okolini čovjeka svakim danom sve veća. Brojna istraživanja upozorila su na opasnosti koja proizlaze iz djelovanja akrilamida, stoga je bilo nužno odrediti dopuštene razine akrilamida kako bi se izbjegli svi mogući štetni učinci.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) dopuštena razina akrilamida u vodi za piće je 1 µg/L. Američka EPA utvrdila je da koncentracija akrilamida u vodi za piće smije iznositi najviše 0.5 µg/L, a u Europskoj Uniji dopušta se koncentracija akrilamida od 1 µg/L [29].

Dopuštena razina akrilamida u hrani još uvijek nije točno definirana zakonskim propisima niti u jednoj državi. Što se tiče Europske Unije, ondje su postavljene indikativne vrijednosti akrilamida za određene namirnice prema Preporukama komisije (2010/307/EU) i (2013/647/EU). Važno je naglasiti kako te vrijednosti ne čine sigurnosni prag već samo upućuju na potrebe za ispitivanjima [36].

U Republici Hrvatskoj ispitivanje koncentracije akrilamida u hrani nije se vršilo sve do ulaska u Europsku Uniju. Tek se tada pristupilo istraživanjima koja su provedena u suradnji Ministarstva zdravlja s Nastavnim zavodom za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar" iz Zagreba. Analizom određenih namirnica, nastoji se odrediti koncentracija akrilamida u njima te se dobivene vrijednosti uspoređuju s indikativnom vrijednošću što je prikazano u Tablici 3.

Tablica 3. Izmjerene vrijednosti akrilamida u namirnicama u RH za 2014. godinu te indikativne vrijednosti [36]

Namirnica	Zemlja podrijetla	Indikativna vrijednost ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Izmjerena vrijednost ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Keksi i slične namirnice	Hrvatska	500	< 10
Keksi i slične namirnice	Njemačka	500	32
Keksi i slične namirnice	Srbija	200	< 10
Hrana za dojenčad i malu djecu na bazi žitarica	Hrvatska	50	< 10
Kava	Hrvatska	450	< 10
Gotova jela	Hrvatska	600	< 10

Iz rezultata prezentiranih u Tablici 3. vidljivo je kako do sada u RH još nije zabilježen slučaj gdje su izmjerene vrijednosti akrilamida prekoračile indikativne vrijednosti. Pronađene vrijednosti akrilamida bile su daleko ispod indikativnih vrijednosti, a nerijetko se akrilamid nije mogao niti kvantificirati u pojedinim uzorcima.

## 6. ZAKLJUČAK

Akrilamid je toksični kemijski spoj koji se prvenstveno koristio u industrijama i tvornicama gdje se dobivao reakcijom hidrolize akrilonitrila. Karakterističan je po maloj molekularnoj masi, dobroj topljivosti i pokretljivosti zbog čega vrlo lako dospijeva u okoliš gdje zagađuje podzemne i površinske vode. Sve veća pozornost počela se usmjeravati na akrilamid tek kada je 2002. godine identificiran u hrani. Akrilamid nije prisutan u hrani sam od sebe, već je za njegov nastanak nužna Maillardova reakcija koja zahtijeva uvjete smanjene vlažnosti i visoke temperature kako bi u reakciju mogli stupiti asparagin i reducirajući šećer. Najveće koncentracije akrilamida nastaju pečenjem i prženjem hrane koja je bogata ugljikohidratima, a to su npr. kruh, krumpirovi proizvodi i sl. S obzirom na to da je akrilamid sve više prisutan u blizini živih bića, znanstvena istraživanja usmjerena su na njegovu razgradnju u organizmu te potencijalno toksično i kancerogeno djelovanje. Ukoliko dospije u organizam čovjeka, akrilamid se razgrađuje brojnim metaboličkim procesima te u konačnici mogu nastati još toksičniji glicidamid i bezopasni konjugat merkapturične kiseline koji se izlučuje putem urina. Mehanizam toksičnog djelovanja akrilamida još uvijek se istražuje, no do sada se smatra da uzrokuje oksidativni stres koji dovodi do stanične smrti. Djeluje neurotoksično na ljude i životinje, ali predstavlja opasnost tek pri iznimno visokim koncentracijama. Reproaktivna i razvojna toksičnost dokazana je kod životinja, a posljedica je alkiliranja -SH skupina, oštećenja DNA i kromosomskih oštećenja od strane akrilamida. Akrilamid i glicidamid stvaraju adukte u reakcijama s hemoglobinom i DNA te se takvi adukti mogu koristiti kao biomarkeri koji prikazuju razinu izloženosti akrilamidu. Iako kancerogenost akrilamida nije utvrđena kod ljudi, mnogobrojne organizacije klasificirale su akrilamid kao mogućeg uzročnika genetskih poremećaja i tumora. S obzirom na sve navedene opasnosti koje akrilamid izaziva, bilo je nužno pronaći metode kojima se on može odrediti u hrani i vodi. Najboljim metodama pokazale su se plinska i tekućinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Također su predloženi načini pripremanja hrane kojima je moguće spriječiti ili barem umanjiti koncentraciju akrilamida. Osim toga, određene su dopuštene razine akrilamida u vodi za piće. Iako dopuštene koncentracije akrilamida u hrani nisu regulirane zakonskim propisima, ipak su uvedene indikativne vrijednosti kojima se nastoji pratiti prisutnost akrilamida u hrani.



## 7. LITERATURA

- [1] <https://www.britannica.com/science/acrylamide> (16.6.2021.)
- [2] T. Reynolds, Acrylamide and Cancer: Tunnel Leak in Sweden Prompted Studies, *Journal of the National Cancer Institute* 94 (2002) 876-878.
- [3] M. Friedman, Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A review, *Journal of agricultural and food chemistry* 51 (2003) 4504-4526.
- [4] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acrylamide> (16.6.2021.)
- [5] <https://study.com/academy/lesson/what-is-acrylamide-definition-uses-structure.html>  
(17.6.2021.)
- [6] <http://www.acrylamide.cn/> (17.6.2021.)
- [7] D. S. Mottram, B. L. Wedzicha, A. T. Dodson, Acrylamide is formed in Maillard reaction, *Nature* 419 (2002) 448-449.
- [8] H. Lingnert, S. Grivas, M. Jaegerstad, K. Skog, M. Toernqvist, P. Aman, Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods, *Scandinavian Journal of Nutrition* 46 (2002) 159-172.
- [9] J. Keramat, M. Jafari, C. Prost, Acrylamide in Baking Products: A Review Article, *Food and Bioprocess Technology* 4 (2011) 530-543.
- [10] Y. Zhang, 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 (2007) 521-542.
- [11] I. Mandić Andačić, Primjena inovativnih procesnih tehnika radi smanjenja nastanka akrilamida u prženim proizvodima, *Doktorska disertacija*, 2019.
- [12] <https://www.ukessays.com/essays/biology/acrylamide-with-chemical-formula.php>  
(25.6.2021.)

- [13] V. Fičko, Hidroliza (R,S)-1-feniletil acetata u eutekničkim otapalima primjenom korijena mrkve i lipaze kao biokatalizatora, *Završni rad*, 2017.
- [14] A.V. Rane, *Green Chemistry: A Corner stone* Ajay Vasudev Rane, *Indian Rubber* 66 (2014) 1-14.
- [15] Y. Tepe, A. Cebi, *Acrylamide in Enviromental Water: A Review on Sources, Exposure, and Public Health Risks*, *Exposure and Health* 11 (2019) 3-12.
- [16] M. O. Santacana, *Dietary intake and biomarkers of acrylamide exposure and risk of endometrial ovarian cancer, A molecural epidemiologic study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*, Doctoral thesis, 2015.
- [17] [https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/acrylamide150604.pdf](https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/acrylamide150604.pdf) (26.6.2021.)
- [18] <https://www.comunicaffe.com/nordic-countries-take-action-on-acrylamide/> (26.6.2021.)
- [19] T. Krishnakumar, *Acrylamide in Food Products: A Review*, *Journal of Food Processing & Technology* 5 (2014) 1-61.
- [20] C. J. Seal, A. de Mul, G. Eisenbrand, A. J. Havekort, K. Franke, S. P. D.Lalljie, H. Mykkaenen, E. Reimerdes, G. Scholz, V. Somoza, S. Tuijtelaars, M. van Boekel, J. van. Klaveren, S. J. Wilcockson, L. Wilms, *Risk-Benefit Consideration of Mitigation Measures on Acrylamide Content of Foods – A Case Study on Potatoes, Cereals and Coffee*, *British Journal of Nutrition* 99 (2008) 1-46.
- [21] <https://www.medicinenet.com/toxicity/definition.htm> (27.6.2021.)
- [22] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=45911> (27.6.2021.)
- [23] S. Costa, J. P. Teixeira, *Toxicology. Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, 2014.
- [24] R. J. Parod, *Acrylamide. Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, New York, 2005.
- [25] K. L. Dearfield, C. O. Abernathy, M. S. Ottley, J. H. Brantner, P. F. Hayes, *Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity and*

- carcinogenicity, *Mutation Research* 195 (1988) 45-77.
- [26] V. Goekman, *Acrylamide in Food; Analysis, Content and Potential Health Effects*, Elsevier, 2016.
- [27] H. W. Motwani, C. Frostne, M. Toernqvist, Parallelogram based approach for *in vivo* dose estimation of genotoxic metabolite in humans with relevance to reduction of animal experiments, *Scientific Reports* 7 (2017) 1-10.
- [28] E. Zamani, M. Shokrzadeh, M. Fallah, F. Shaki, A review of acrylamide toxicity and its mechanism, *Pharmaceutical and Biomedical Research* 3 (2017) 1-7.
- [29] J. H. Exon, A Review of the Toxicology of Acrylamide, *Journal of Toxicology and Environmental Health* 9 (2006) 397-412.
- [30] P. Erkekoglu, T. Baydar, Acrylamide neurotoxicity, *Nutritional Neuroscience* 17 (2013) 49-57.
- [31] Y. Xu, B. Cui, R. Ran, Y. Liu, H. Chen, G. Kai, J. Shi, Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects, *Food and Chemical Toxicology* 69 (2014) 1-12.
- [32] A. Besaratinia, G. P. Pfeifer, A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity, *Carcinogenesis* 28 (2007) 519-528.
- [33] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_3-Dihydroxypropanamide](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Dihydroxypropanamide) (27.6.2021.)
- [34] I. Blank, R. H. Stadler, A. Studer, S. P. D. Lalljie, A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation, and Control, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44 (2004) 323-347.
- [35] M. Badanjak Sabolović, S. Rimac Brnčić, Utjecaj procesa pripreme na udio akrilamida u prerađenoj hrani, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 11 (2016) 79-84.

[36] <https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/Znanstveno-izvjesce-o-rezultatima-istrazivanja-akrilamida-u-hrani-za-2014-godinu.pdf> (27.6.2021.)