



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**“Empleo de técnicas electroquímicas para la detección y
cuantificación de acrilamida generada en el procesamiento de
alimentos”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctora en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M. C. Fanny Jaqueline González Fuentes

Dirigida por:

Director: Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Co-director: Dr. Jesús Alberto Escarpa Miguel

SINODALES

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Presidente

Dr. Jesús Alberto Escarpa Miguel
Secretario

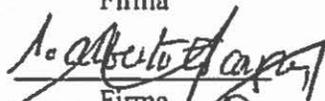
Dr. Luis Arturo Godínez Mora-Tovar
Vocal

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Suplente

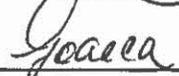
Dr. Juan Manríquez Rocha
Suplente


M.S.P. Sergio Pacheco Hernandez
Director de la Facultad


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dr. Fanny Jaqueline González Fuentes
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio de 2014
México



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la
República (PROPAC)

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**“Empleo de técnicas electroquímicas para la detección y
cuantificación de acrilamida generada en el
procesamiento de alimentos”**

Tesis

que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctora en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

Fanny Jaqueline González Fuentes

Dirigida por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Dr. Jesús Alberto Escarpa Miguel

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Julio de 2014

México

Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni te desanimas, porque yo soy tu Dios y estaré contigo a dondequiera que vayas. Josue 1:9

Ofrezco este logro a:

Mi papá Dios

Quien ha estado conmigo durante toda esta travesía, durante toda esta aventura llamada doctorado, quien fue, es y seguirá siendo por siempre mi escudo, mi fortaleza, mi esperanza, mi ayuda. . . mi razón de ser. De no haber sido por ti papi Dios habría desfallecido en el primer conflicto, no habría resistido las dificultades, no me habría sobrepuesto ante la desesperación, la oposición y ante innumerables situaciones que finalmente no son más que aprendizajes de vida y que conceden la transformación de un estudiante aspirante a doctor en un investigador.

No me cansaré de agradecerte cada palabra que me hacías llegar durante todo este tiempo, que me animaban y me fortalecían día a día. Sin ti no habría sido posible pero estando en ti, la palabra "imposible" no existe

Cuan bueno es Dios y cuán grande es su amor.

Ofrezco este fruto a:

Mi esposo Charly

Gracias a Dios por tu vida, por cruzar nuestros caminos en el momento y en el lugar perfecto, por la hermosa familia que hoy formamos. Te ofrezco este logro que es nuestro logro pues fuiste pieza clave que me alentó, me animó, me echó porras, que estuvo apoyándome en todo momento. Que linda bendición ser tu esposa pues eres un excelente amigo, un excelente esposo, un excelente padre, un excelente ejemplo para mí y para nuestra hijita y los hijos que Dios nos conceda tener. Te amo con todo mi corazón.

Siempre serás my sweet bubble

Ofrezco este fruto a:

Mi pequeña Jacky

Quien ha llegado a mi vida para cambiarsa para quedarse en lo más profundo de mi corazón y para enseñarme el amor del bueno de ese amor que solo se puede tener hacia un hijo. Gracias a Dios por tu vida. Ahora eres muy pequeñita pero quiero que en un futuro que leas esto, aprendas que debes fijar metas en tu vida, dejarlas en manos de Dios y en su voluntad; pero esfuérzate y no descanses hasta alcanzarlas y Él te ayudará. Siempre esfuérzate y sé muy valiente, Dios irá a donde quiera que tú vayas. Te amo con todo mi corazón mi pequeña princesa.

Agradecimientos

Agradezco a mi esposo, Charly por tooodooo tu apoyo, por tu comprensión porque cuando comparto contigo momentos de alegría tú te alegras conmigo, cuando estuve desanimada tú me diste palabras de aliento y ánimo, si estuve triste me alegraste el día porque siempre encuentras la manera de apoyarme en tooodooo no me cansaré de agradecer todo lo que haces por mí y por nuestra pequeña pero linda y formidable familia. Gracias por ser esa personita hermosa que Dios usa para bendecir todas las áreas de mi vida. Sé que ya lo mencioné pero no me canso de decir lo mucho que te amo. Eres mi dulce burbuja porque cuando estoy contigo todo está bien.

Agradezco a mis padres: Mely y Angel sólo Dios sabe cuánto los amo y cuanto se agradezco por sus vidas, por darme los mejores padres del mundo ponerlos en mi vida siendo ejemplo para mí. Gracias por apoyarme en tooodo de manera incondicional y porque en esta locura llamada doctorado no fue la excepción, por su amor por sus oraciones y por su bendición. Les ofrezco todos mis logros gracias por ese amor que me demuestran cada día. Los amo, los amo, los amo.

A mis suegros: Naty y Fidel.

Infinitas gracias por todo su apoyo, por aceptarme en su familia como una hija más, por compartir conmigo tantas cosas, por alegrarse con mis alegrías, porque si estuve preocupada se preocuparon conmigo, si estuve triste se entristecieron conmigo, por estar siempre de mi lado por todas sus oraciones. Gracias infinitas a Dios por sus vidas y por darme los mejores suegros del mundo. Que hermoso regalo tener unos suegros tan lindos como ustedes. Los amo a mares.

A mi hermano: Migue, Caray hermanito lindo que puedo decir de ti si siempre me apoyaste, me enseñaste, me compartiste siempre desde niña te he visto como el mejor ejemplo a seguir. No me canso de dar gracias a Dios por ese hermano que me dio y a quien quiero tanto. Gracias por todo tu apoyo. Te amo hermanito.

A mis cuñados: Yitzel y Tomas; a Ivan y Eglan; a Aty. Gracias por formar parte de este sueño y estar al pendiente de mis avances en él.

A todos mis primos y a mis sobrinos (Montserrat, Luisa, Jaqueline, Casandra, Ariel, Jobany, Yair, Abril, Marianita, Angy, Miguelsito, Heydi) Gracias por sus sonrisas lindas y sinceras, que animan a cualquiera. Que este logro mío les sirva de

ejemplo para salir adelante y llegar a tener también sus propios logros. Dios sea su guía y les bendiga siempre. Les amo a mares.

A toda mi familia: Fuentes Rodríguez y González Fuentes. Gracias por todo su apoyo por las porras, por ser el impulso perfecto para lograr mis metas. Gracias a Dios por sus vidas, que Él sea su guía y su bendición. Los amo, mil veces, los amo.

A mis asesores, los doctores: Sandra Mendoza, Loarca, Alberto Escarpa, Luis Godínez, Juan Manríquez mil gracias por todo su apoyo, su enseñanza, su paciencia por su disposición para transmitir sus conocimientos y por sus atinados comentarios y aportaciones para la realización de este proyecto de tesis. Es un gusto y un orgullo tenerlos como asesores los aprecio y admiro a todos.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Un agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de doctorado.

A mis amigos: Raquel y Miguel, que les puedo decir, caray los quiero a montones mis amigos de siempre y para siempre. Gracias a Raquel por todo el apoyo en el HPLC por sus consejos y comentarios a la tesis. A Miguelito por todo su apoyo, por los artículos por sus consejos. A Los dos por tu amistad incondicional, doy gracias a Dios por ponernos en el mismo camino y por la amistad tan bonita que formamos por toda su ayuda por los buenos momentos que compartimos y por los no tan buenos que a final de cuentas cuando los compartíamos juntos no eran tan malos, por todas las charles, los café's en fin... que digo los quiero, los amo a mares mis amigos que son más que eso, mis hermanos. Cuentan siempre conmigo. Gracias, gracias, gracias.

A mis CCQ amigos: Pastora Michelle, Pastor West, Paola, Grecia, Yadira, Wendy, Miriam, Nely, Evelyn, Evelyn, Diana Amaya, Diana Dector, Liz Balderas, Liz Chavero, Laura Tenorio, Erika, Erika Vargas, Vicky, Andres, Paco, Gerardo, Pancho, Arturo, Alan R, Alan Anseu, Gracias por su amistad, su apoyo, consejos y oraciones los quiero mil.

Resumen

La dieta humana juega un papel importante en la salud. Algunos alimentos desarrollan compuestos nocivos durante su procesamiento, los cuales pueden generar desordenes en el organismo tal como toxicidad, daños neurológicos, cáncer entre otros. La Acrilamida (AA) es un compuesto cancerígeno que puede ser generado durante el procesamiento de los alimentos a altas temperaturas, 120°C o más. Dicho monómero es analizado principalmente por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas o bien a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); sin embargo, se requieren técnicas confiables, baratas y rápidas para su detección, los métodos electroquímicos cumplen con estas características, por lo que fueron empleados en el desarrollo de la presente investigación. El uso de la técnica se fundamenta en que la molécula de AA es capaz de electro-polimerizarse a través de su reducción catódica en la superficie del electrodo (A mayor cantidad de AA polimerizada, mayor concentración). Se realizó el análisis del estándar mediante voltamperometría cíclica (VC) sobre electrodos de carbón vítreo (cv), cv-dendrímeros e impresos de carbono modificados con nanotubos de carbono de pared sencilla (NTbCPs). La papa frita es considerada como un sistema modelo en el que se genera la AA, por lo que los análisis en muestra real se llevaron a cabo en este tubérculo. Los electrodos NTbCPs mostraron ser los más eficientes. Se realizó una curva de calibración del estándar empleando NTbCPs, 10-200 uM ($y=0.0093x \text{ (mM)}+0.9187$, $r^2 = 0.993$, $n=5$). El límite de detección calculado como $S/N3$ y el límite de cuantificación ($S/N10$) fue de 0.03 mM and 0.04 mM, respectivamente. Se realizaron estudios de interferencia con los principales precursores de AA, los cuales no muestran cambios significativos en su respuesta. Se logró la detección y cuantificación de AA en el extracto de papa frita mediante NTbCPs ($29.7\pm 0.2 \text{ mg/Kg}$). De igual manera, se realizó el análisis a través de HPLC, La concentración detectada fue $23.9\pm 0.1 \text{ mg/Kg}$. La técnica electroquímica tiene grandes ventajas sobre el método convencional tal como el empleo de pequeños volúmenes de muestra, análisis rápido y amigable con el medio ambiente.

Palabras clave: Acrilamida, papas fritas, Técnicas electroquímicas.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
2 Antecedentes	2
2.1 Fuentes de exposición a la acrilamida y niveles máximos permitidos.....	3
2.2 Mecanismo de formación de la acrilamida	5
2.3 Acrilamida en alimentos	9
2.3.1 Acrilamida en papas	11
2.3.2 Acrilamida en café	12
2.4 Métodos para inhibir o disminuir la formación de AA en alimentos	14
2.4.1 Control en la concentración de los precursores de acrilamida	14
2.4.2 Bloqueo de la reacción.....	16
2.4.3 Eliminación al final del proceso.....	16
2.5 Métodos para el análisis y detección de acrilamida	17
2.5.1 Métodos convencionales.....	17
2.5.2 Técnicas electroquímicas.....	18
2.5.2.1. Voltamperometría cíclica.....	19
2.5.2.2 Voltamperometría diferencial de pulso	20
2.5.2.3 Voltamperometría de onda cuadrada	20
2.5.2.4 Empleo de técnicas electroquímicas en alimentos	22
2.5.2.5 Detección de AA mediante técnicas electroquímicas	25
2.6. Dendrímeros	32
2.6.1 Síntesis de dendrímeros	35
2.6.2 Dendrímeros PAMAM	37
3. Hipótesis.....	46
4. Justificación.....	46
5. Objetivo general.....	47
6. Objetivos específicos.....	47
7. Materiales y métodos.....	47
7.1 Reactivos.....	47
7.2 Métodos.....	47

7.2.1 Métodos electroquímicos	47
7.2.2 Caracterización por espectroscopía RAMAN	49
7.2.3 Extracción de AA de muestras de papas fritas	49
7.2.4 Análisis de AA por HPLC	50
7.3 Resultados y discusión	50
7.3.1. Sistema convencional de tres electrodos (carbón vítreo).....	50
7.3.2 Sistema de tres electrodos (carbón vítreo-dendrimeros).....	52
7.3.3 Electrodo impreso de carbono modificado con NTbCPS	57
7.3.4 Estudio de interferencias en la detección electroquímica de AA	62
7.3.5 Estudio de electrodos NTbCPS mediante espectroscopía RAMAN ...	66
7.3.6 Análisis de AA en papas fritas mediante HPLC-DAD	68
7.3.7 Análisis de AA en papas fritas mediante VC	69
8. Conclusiones.....	70
9. Referencia bibliográfica.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Estructura química de acrilamida.....	1
2. Propuesta de la formación de AA en la reacción de Maillard	6
3. Tipo de perturbación en voltamperometría cíclica.....	10
4. Señal de excitación para voltamperometría diferencial de pulso.....	20
5. Señal de excitación para voltamperometría de onda cuadrada.....	21
6. Voltamperogramas de estándares fenólicos.....	24
7. Voltamperograma DP de jugo de manzana y jugo de pera	25
8. VC de AA empleando un electrodo de pasta de carbón modificado con hemoglobina y liposomas.....	27
9. Mecanismo de la polimerización química de AA.....	30
10. Procesos electroquímicos en la electropolimerización.....	32
11. Historia de las modificaciones en los polímeros	33
12. Componentes en los dendrímeros.....	35
13. Grupos funcionales presentes en los dendrímeros.....	35
14. Síntesis divergente de los dendrímeros.....	36
15. Síntesis convergente de los dendrímeros.....	37
16. Configuración de dendrímeros PAMAM a pH alto, neutro y bajo.....	40
17. Mecanismo de acción de los dendrímeros como antivirales.....	42
18. Voltamperograma cíclico de H ₂ SO ₄ con un electrodo de carbón vítreo anodizado y sin anodizar	51
19. VC de AA Sobre carbón vítreo (0-4 mM).....	52
20. VC de H ₂ SO ₄ empleando un electrodo de carbón vítreo modificado con G3.5.....	54

21. Voltamperograma cíclico de AA empleando un electrodo de carbón vítreo modificado con dendrímero G3.5.....	55
22. Voltamperograma cíclico de AA empleando un electrodo de carbón vítreo modificado con dendrímero G4.5.....	55
23. Comparación de las pendientes obtenidas con los diferentes tratamientos y modificaciones en el electrodo.....	57
24. Voltamperograma cíclico del ácido sulfúrico sobre un electrodo impreso de NTbCPS.....	58
25. VC de AA sobre NTbCPS (0 - 200 μ M).....	59
26. VC de AA sobre NTbCPS. (300 μ M - 8mM).....	60
27. VC de la molécula $(\text{FeCN})_6^{-3}/(\text{FeCN})_6^{-4}$ sobre NTbCPS y NTbCPS con acrilamida adsorbida a 200 μ M.....	61
28. VC de AA y de la mezcla equimolar de asparagina y AA.....	62
29. VC de AA y de la mezcla equimolar de glucosa y AA.....	63
30. VC de AA, AC y mezcla equimolar de AA y ácido acrílico.....	64
31. VC de H_2SO_4 y de la mezcla equimolar de AA y AC.....	65
32. Espectroscopía Raman de NTbCPS Sin y con AA y AC adsorbidos.....	65
33. VC de la mezcla de AA a 50 μ M y AC a diferentes concentraciones.....	66
34. Espectroscopía Raman de NTbCPS con diferentes concentraciones de AA adsorbida	68
35. Cromatograma del extracto de papas fritas	69
36. VC del extracto de papas fritas y del estándar de AA a 50 μ M	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de la acrilamida de acuerdo a su peligrosidad	2
2. Valores de Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de acrilamida	3
3. Mecanismos reportados de formación de acrilamida	5
4. Efecto de soluciones amortiguadoras	8
5. Niveles de acrilamida detectados en diferentes alimentos	10
6. Características de algunas técnicas de potencial controlado	18
7. Coeficientes de actividad antioxidante	23
8. Propiedades de los dendrímeros con terminación aminada PAMAM.....	38
9. Patentes de dendrímeros y aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.....	43
10. Fases clínicas y preclínicas de los dendrímeros	44

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la relación alimentación-salud ha dado lugar al análisis de compuestos presentes en alimentos que generan daño al organismo humano. De esta manera se ha logrado tener información amplia sobre el tipo de alimentación que debemos seguir para mejorar la salud y evitar enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo, estos estudios no son suficientes y se complementan con aquellos enfocados al análisis de los compuestos presentes en los alimentos de manera natural como en los generados durante los tratamientos de proceso que pudieran ocasionar efectos tóxicos.

En los alimentos procesados pueden generarse diversos tipos de contaminación y una de ellas es la química que puede provenir de medios externos o de la reacción de compuestos existentes inicialmente que al ser expuestos a cambios físicos o químicos tienen como producto final un compuesto tóxico capaz de generar enfermedades posteriores. A estos compuestos se les denomina contaminantes químicos derivados del procesamiento. Algunos de ellos son las aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas y la acrilamida (2-propenamida).

La acrilamida (Figura 1) es un producto químico, un polvo blanco cristalino que solubiliza en agua, etanol, metanol, dimetiléter y acetona. Se usa en la industria para sintetizar poliacrilamida principalmente en el tratamiento de agua potable, en el procesamiento de la pulpa de papel, para retirar sólidos en suspensión de las aguas residuales de la industria, como aditivo en cosméticos, acondicionador de suelos, procesamiento de minerales, y en la formulación de agentes selladores para diques, túneles, represas y alcantarillados. También se emplea en los laboratorios como gel para cromatografía (Valenzuela y Ronco, 2007, Moreno *et al.*, 2007). Así, estos productos al ser capaces de contener al monómero aislado, se convierten en fuentes de exposición a la acrilamida (Jiménez *et al.*, 2007).

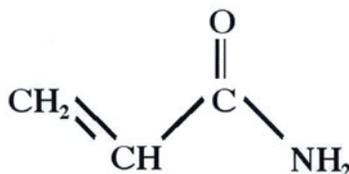


Figura 1. Estructura química de acrilamida.

2. ANTECEDENTES

La acrilamida es tóxica y tiene propiedades mutagénicas y carcinogénicas, también puede ocasionar daños al sistema nervioso incluso a bajas concentraciones y se clasifica como un pro-cancerígeno en humanos (LoPachin, 1994, Costa, 1992). La Norma Oficial Mexicana clasifica a la acrilamida como carcinógeno en animales y sugiere que no es posible que cause cáncer en humanos excepto en niveles de exposición elevados. Recomienda el cuidado absoluto de los trabajadores de tal manera que se expongan al monómero lo menos posible (*NOM-010-STPS-1999*).

En el Cuadro 1 se muestran diferentes clasificaciones de la acrilamida en cuanto a su peligrosidad. La categoría 2 de la Unión Europea indica que los compuestos deben ser tratados como si fueran carcinógenos en humanos y la Clasificación Noruega de carcinógenos los clasifica dependiendo de su capacidad para inducir tumores (Moreno *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Clasificación de la acrilamida de acuerdo a su peligrosidad

Origen de la clasificación	Clasificación
Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1994)	Probable carcinógeno para los humanos
Unión Europea	Mutágeno y cancerígeno en la categoría 2
Unión Europea	tóxico para la reproducción en la categoría 3
Clasificación noruega de carcinógenos	Carcinógeno de alta potencia

Moreno *et al.*, 2007

Se han realizado análisis que demuestran que la administración prolongada de este monómero induce tumores en ratas y ratones, mientras que cuando los estudios fueron realizados en células de mamífero se encontró que la acrilamida es capaz de dañar el material genético (Valenzuela y Ronco, 2007). En ratas expuestas a dosis de 2 mg/kg en agua potable hubo generación de tumores en tiroides, testículos, glándulas adrenales y mamas. La acrilamida puede también generar tumores en cerebro, médula espinal y otros tejidos (OMS, 2002).

La acrilamida es una molécula altamente hidrofílica y esto la hace capaz de unirse a los grupos nucleofílicos como los de la guanina con lo cual se genera neurotoxicidad (Lopachin, 2004, Atay *et al.*, 2005). La neuropatía periférica es uno de los principales problemas que resulta de la formación de dichos aductos. Los efectos neurotóxicos causados por la acrilamida se deben a que ésta inhibe el transporte quinésico axonal rápido y la neurotransmisión (Friedman, 2003, Otlés, 2004).

2.1 FUENTES DE EXPOSICIÓN A LA ACRILAMIDA Y NIVELES MÁXIMOS PERMITIDOS

Anteriormente se pensaba que la exposición a la acrilamida se daba únicamente por cuestiones laborales; sin embargo, en 2002 la Agencia Sueca de Seguridad Alimentaria informó que habían sido detectados altos niveles de acrilamida en ciertos alimentos ricos en almidón que eran procesados a altas temperaturas (más de 120 °C); como papas fritas o asadas, galletas y pan (Swedish National Food Authority, 2004). Los niveles excedían ampliamente las recomendaciones de 0.5µg/kg de la OMS para agua de consumo y de los 10 µg/kg de la legislación europea sobre migración química en envolturas plásticas. Estos resultados fueron rápidamente confirmados por diversas agencias de seguridad alimentarias y organismos mundiales de control alimentario (International Agency for Research on Cancer, 1994). En el Cuadro 2 muestra el índice de ingesta diarios tolerables de acrilamida.

Cuadro 2. Valores de Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de acrilamida

Organismo	IDT	
OMS en 1985	12 µg/kg de peso corporal por día	Debido a los resultados encontrados de neurotoxicidad generada en ratas expuestas a dosis repetidas del monómero
OMS en 1996	0.5 µg/L en agua potable	Correspondiendo a la ingesta de 1 µg/día suponiendo un consumo de 2L diarios de agua
OMS en 2002	NOAEL (Nivel con Efecto Adverso no Observado) 0.5 mg/kg de peso corporal por día	Para neuropatía por acrilamida
OMS en 2002	NOAEL 2 mg/kg	Para afecciones en la fertilidad (mayora que para neuropatía periférica)

OMS, 1985; OMS, 1996; OMS, 2002

La FDA (Food and Drugs Administration, por sus siglas en inglés) ha regulado el uso de acrilamida y poliacrilamida en los alimentos. El agua con más de 10 mg/L de poliacrilamida puede ser empleada para lavar o pelar frutas y vegetales, pero el monómero de acrilamida no debe exceder del 0.2%. Las resinas de acrilamida que se pueden añadir al agua como vapor pueden tener contacto con los alimentos. Es por esto que el monómero no debe exceder del 0.05% en peso. La poliacrilamida y los polímeros de acrilamida se pueden emplear en las cápsulas de gelatina y en los envoltorios o envases de los alimentos, respectivamente, siempre y cuando el monómero no esté presente en una cantidad superior al 0.2%.

Debido a que no es posible determinar un nivel de exposición a la acrilamida se debe asumir que su presencia incluso en cantidades muy bajas produce riesgos a la salud (Valenzuela y Ronco, 2007). La norma NMX-AA-137-SCFI-2007 menciona que los productos no deben contener más de 250 mg de acrilamida por kg de producto.

Por otra parte, en el caso de personas que se encuentran en contacto constante con este monómero, la mayoría de ellos pueden estar expuestos a una concentración promedio de acrilamida de 0.03 mg/m^3 , en una jornada de ocho horas diarias y una semana laboral de cuarenta horas, sin sufrir daños a su salud y de 0.06 mg/m^3 como máximo de manera continua, durante un periodo superior a quince minutos, con intervalos de al menos una hora de no exposición entre cada periodo (*NOM-010-STPS-1999*). Los trabajadores mas expuestos pueden desarrollar cáncer de páncreas (OMS, 2002).

2.2 MECANISMO DE FORMACIÓN DE LA ACRILAMIDA

Se han propuesto diversos mecanismos de la formación de acrilamida (Cuadro 3) sin embargo, el más aceptado es el de Stadler en el 2004 (Figura 2). En éste se enfatiza la formación de N-glicósidos al inicio de la reacción de Maillard como intermediario clave.

Cuadro 3. Mecanismos reportados de formación de acrilamida

Mecanismo	Autor
Descarboxilación de la base de Schiff vía el intermediario oxazolidin-5-ona, tautomerización al producto descarboxilado de Amadori y posterior β -eliminación.	Yaylayan <i>et al.</i> , 2003
Descarboxilación de la base de Schiff y anclaje heterocíclico de la imina.	Zyzak <i>et al.</i> , 2003
Acido acrílico + NH_3	Stadler <i>et al.</i> , 2003
Acroleína + asparagina, acroleína + NH_3 , acido acrílico + NH_3	Yasuhara <i>et al.</i> , 2003
Acido acrílico + 2-propenal \rightarrow reacción con NH_3	Vattem y Shetly, 2003
Intermediario clave: N-glicosilados	Stadler <i>et al.</i> , 2004

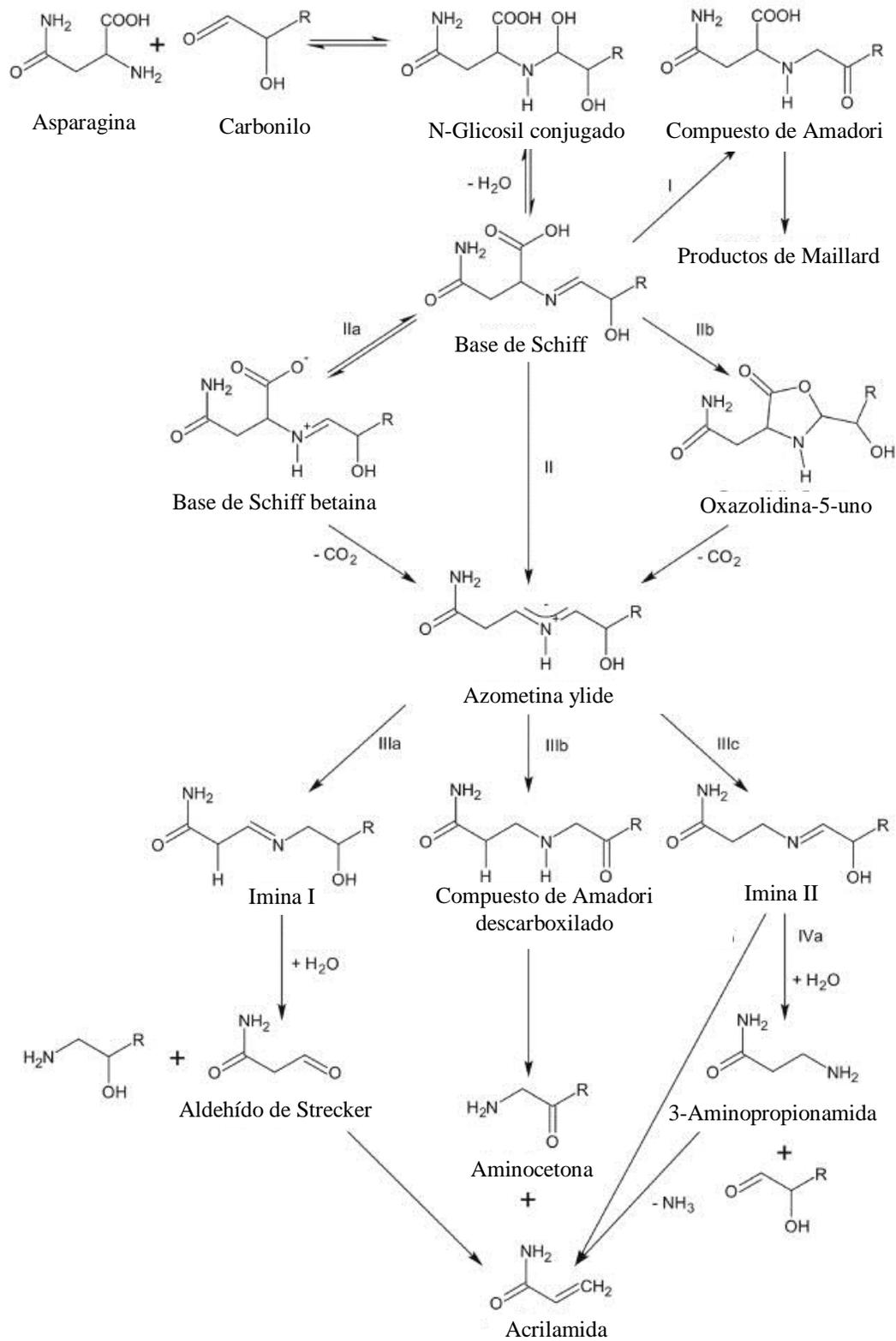


Figura 2. Reacción propuesta de la formación de acrilamida en la reacción de Maillard, (Stadler *et al.*, 2004)

La principal vía de formación de la acrilamida en alimentos está vinculada a la reacción de Maillard y en particular al aminoácido asparagina. El primer paso crítico es la reacción amino-carbonilo de la asparagina y el componente carbonilo, preferentemente el α -hidroxicarbonilo como azúcar reductor, con lo que se produce el correspondiente glico-conjugado que a elevadas temperaturas se deshidrata y genera la base de Schiff como intermediario clave. Estos compuestos son relativamente estables en condiciones de baja humedad. Sin embargo, en un sistema acuoso la base de Schiff puede hidrolizarse a los precursores o recomponerse al compuesto de Amadori, que no es un precursor eficiente en la formación de acrilamida, este mecanismo se muestra en la Figura 2 (Stadler *et al.*, 2004).

De este modo, la acrilamida se genera a partir de los azúcares reductores y el aminoácido asparagina (Mottram *et al.*, 2002, Stadler *et al.*, 2004, Becalski *et al.*, 2003). Recientemente, se demostró que la principal vía de formación de acrilamida en los alimentos involucra la participación de ambas moléculas (Yasuhara *et al.*, 2003).

Lo anterior explica la formación del monómero principalmente en alimentos que contienen grandes cantidades de azúcar y aminoácidos. La fructosa, comparada con la glucosa, genera mayor cantidad de acrilamida en condiciones de baja humedad. Las investigaciones apuntan que, entre los aminoácidos, la asparagina es el principal reactante en sistemas ricos en carbohidratos. En las papas el contenido de este aminoácido representa el 40% de su total lo cual hace a esta matriz especialmente sensible (Serpen y Gökmen, 2009).

No se sabe exactamente a qué temperatura se forma la acrilamida; sin embargo, no se ha encontrado esta sustancia en alimentos preparados a temperaturas inferiores a 120° C, incluyendo los productos hervidos. La comida no debe cocinarse en exceso, pero sí lo suficiente para destruir las bacterias patógenas. Los tratamientos térmicos de esterilización, fritura, tostado, horneado, etc., alcanzan temperaturas de hasta 220° C. Estos procesos llevan intrínsecas una serie de transformaciones en el alimento que conducen a la formación de nuevos compuestos que inciden, de manera general, en la aceptabilidad del producto por el consumidor. Sin embargo, el empleo de altas temperaturas en combinación con otros factores externos al alimento, pueden dar lugar a la formación de algunos

compuestos tóxicos que reduzcan el valor biológico, incidiendo en la seguridad de los mismos (Jiménez *et al.*, 2007).

En un estudio sobre la estabilidad de la acrilamida a diferentes temperaturas encontraron que a 160 °C hay una disminución del 95%. Calentando a 180 °C también baja su concentración de forma gradual con el tiempo de calentamiento. El análisis fue realizado a temperaturas por debajo de 160°C (para las cuales no se presentan resultados significativos), 160°C, 180°C y 200°C, las disminuciones fueron 95%, 90% and 80% respectivamente. Estos resultados se atribuyen a la posible polimerización de la acrilamida. Este compuesto no es muy estable, el almacenamiento durante tres meses de una solución de acrilamida en condiciones de oscuridad a 25°C en solución disminuye su concentración en un 87% (Adams *et al.*, 2010).

Por su parte el pH juega un papel importante en la concentración de acrilamida. En muchas investigaciones se han utilizado soluciones amortiguadoras. La solución a emplear debe elegirse de manera cuidadosa ya que esta puede generar interferencias en el análisis. Así por ejemplo una solución amortiguadora de fosfatos puede acelerar la degradación de azúcares. Por lo tanto si se emplean fosfatos en los análisis de reacciones modelo en la generación de acrilamida, los resultados se verán afectados generando respuestas engañosas pues una menor concentración de este compuesto podrá ser apreciada.

Adams *et al.*, estudiaron el efecto del pH sobre la concentración de acrilamida en una solución amortiguadora de fosfato. El porcentaje de acrilamida disminuye conforme el pH es más alcalino. De este modo su presencia baja de 87% a pH 3 a 49% a pH de 9. En tanto que sin la solución amortiguadora la cantidad del monómero presente es cerca del 90%. Esto puede deberse a que a pH elevado se favorece la polimerización de dicho compuesto a través de una catálisis lenta. Si la concentración de este amortiguador se aumenta, la disminución en el porcentaje de acrilamida es mayor (Adams *et al.*, 2010). Esto explica porqué el pH básico en los alimentos es capaz de disminuir la concentración de acrilamida.

Adams y colaboradores realizaron también un estudio de comparación entre diferentes soluciones amortiguadoras entre ellas citrato, bis-tris y tetraborato. Los resultados no fueron mejores que con el amortiguador de fosfato ya que generaron una mayor

disminución en la concentración de acrilamida, Cuadro 4, (Adams *et al.*, 2010). Al respecto Hidalgo y colaboradores en el 2010 analizaron el efecto de los mercaptanos en la concentración de acrilamida a diferente pH y sus resultados fueron similares a los de Adams y colaboradores en el mismo año. Es decir, también mencionan que la cantidad de acrilamida generada se ve disminuida cuando los análisis se realizan a valores de pH más altos (7 y 9) (Hidalgo, *et al.*, 2010).

Cuadro 4. Efecto de las soluciones amortiguadoras citrato, bis-tris, tetraborato y fosfato sobre la estabilidad de la acrilamida (2.8 mM) después del calentamiento, a 180°C durante 2 hr, a diferentes valores de pH.

Tipo solución amortiguadora	pH	Acrilamida remanente (%)	Desviación estándar (n=3)
Fosfato	3	87.05	1.57
Citrato	3	44.19	1.26
Fosfato	7	70.63	2.12
Bis-tris	7	69.18	0.85
Fosfato	9	49.51	3.61
Tetraborato	9	27.96	0.89

Adams *et al.*, 2010

Hidalgo y colaboradores (2010) realizaron un estudio sobre el efecto de los mercaptanos (benzil mercaptano y N-acetilcisteína) para obtener un mejor entendimiento del mecanismo de reacción a través del cual los aminoácido influyen en la formación de acrilamida en los alimentos. Ellos encuentran que la acrilamida en presencia de los mercaptanos disminuye de manera proporcional a la concentración de estos. De modo que solo el 15% del monómero queda como remanente cuando es analizado en presencia de una concentración de 20µM del mercaptano. El estudio se realizó bajo una atmosfera de nitrógeno durante 30 minutos a una temperatura de 180°C.

2.3 ACRILAMIDA EN ALIMENTOS

La Organización de Alimentos y Agricultura así como la Organización Mundial de la Salud, FAO (por sus siglas en inglés)/OMS, advierten que la exposición a la acrilamida puede ser mayor en la población infantil, dos a tres veces más que en adultos, debido a sus hábitos alimenticios (OMS, 2002).

En un análisis realizado en Holanda se estudió el contenido de AA en algunos productos tal como papas fritas tipo chips, galletas, tostadas, pan de centeno, papas fritas congeladas, cereales de desayuno, leche en polvo, cacahuetes tostados, tortitas, pan de jengibre. La cantidad de acrilamida detectada alcanzaba valores de hasta 3.100 mg/kg. Los alimentos con las tasas más altas fueron las papas fritas de aperitivo, las papas fritas muy cocinadas, las botanas y el pan de jengibre (Jiménez *et al.*, 2007).

Por otra parte, un estudio sobre el consumo de diferentes alimentos contaminados con acrilamida en la población polaca revela que el contenido medio de este contaminante va de 11 a 3647 µg/kg de producto, y que una población con edad entre 1 y 96 años tiene una exposición media de 0.43 µg/kg de peso corporal por día. En esta población el consumo de pan genera el 45% de la ingesta de acrilamida, las papas fritas y crujientes 23% y el café tostado 19% (Mojska *et al.*, 2010).

El uso de bicarbonato amónico como agente gasificante y la presencia de altas cantidades de glucosa o fructosa favorecen la formación de acrilamida. Los alimentos dietéticos contienen grandes cantidades de fibra, en éstos se han detectado concentraciones más elevadas de dicho monómero en comparación con los tradicionales (Morales *et al.*, 2008).

En el Cuadro 5 se muestra el contenido de acrilamida detectado en diversos alimentos.

Cuadro 5. Niveles de acrilamida detectados en diferentes alimentos

Tipo de alimento		Concentración (µg/kg)
Café	Polvo	170-351
	Turco	29-75
	Instantáneo	42-338
	Tostado	12-29
	elaborado	3-13
	Sin elaborar	37-539
Lácteos	Leche en polvo	< 30
	Yogur líquido	
Chocolate	Polvo	15-90
	Líquido	ND- 909
Aguas embotelladas, soda, té		50

Moreno *et al.*, 2007

La ingesta de acrilamida por medio de aguas de consumo contaminadas con ésta podría suponer un aporte de 0.25 µg/día máximo. El humo de tabaco es otro medio de contaminación y se considera como la principal vía de exposición. Un cigarro produce entre 1 y 2 µg netos de acrilamida (Morales *et al.*, 2008).

2.3.1 ACRILAMIDA EN PAPAS

La acrilamida se forma especialmente en los alimentos que contienen altas cantidades de azúcares y pocas proteínas. Los principales alimentos contaminados con este compuesto son papas fritas, café, pasteles, galletas dulces, panes y tostadas (International Food Safety Authorities Network, INFOSAN, 2005).

La papa, uno de los alimentos con grandes cantidades de azúcares, es un tubérculo cuyo nombre científico es *Solanun tuberosum*. Previo a su consumo debe siempre pasar por un proceso térmico tal como la fritura, horneado o cocido. Todo esto para lograr generar en dicho alimento las características organolépticas que le hacen agradable a la vista y gusto del consumidor ya que muchas veces es precisamente el tratamiento térmico el que concede a la papa y a los alimentos en general, el color, sabor, olor y textura característicos y deseables (Stadler *et al.*, 2004). La aplicación de altas temperaturas en el proceso de alimentos es capaz de promover el desarrollo de compuestos benéficos a la salud como los antioxidantes (Lingnert y Wailer, 1983). Sin embargo, la generación de compuestos favorecedores no es el único proceso que tiene lugar ante esta práctica ya que la generación de compuestos nocivos también es desarrollada bajo tal condición (Gökmen y Palazoğlu, 2008). Las papas crudas no contienen acrilamida, pero sí una gran cantidad de sus precursores, asparagina libre y azucares reductores (Williams *et al.*, 2005).

Mojska y colaboradores (2010) realizaron un análisis sobre el contenido de acrilamida en muestras de papas fritas (de bares y restaurantes), crujientes y fritas (de productos precocinados o procesados en el laboratorio). De estos grupos de estudio, las papas crujientes presentaron el valor más alto de contenido de acrilamida, 699 µg/kg. Por otra parte las papas fritas preparadas en el laboratorio presentaron un contenido de 641µg/kg. La exposición a acrilamida a través de las papas depende de la población que la consume. Así

las papas fritas y crujientes generan el 14% del monómero en la población de 19 a 96 años mientras que en niños y adolescentes de 7 a 18 años produce 42%.

Los compuestos precursores de acrilamida presentes en las papas son principalmente los azúcares reductores, glucosa y fructosa, y el aminoácido asparagina la cual, puede generar acrilamida por sí sola a causa de su degradación (Serpen y Gökmen, 2009). Las concentraciones de asparagina en papas frescas están alrededor de 2000 y 5000 mg/kg (Gökmen *et al.*, 2007) y las de los azúcares reductores entre 100 y 3000 mg/kg después de la cosecha. Pero, si son almacenadas a bajas temperaturas pueden llegar a 20000 mg/kg (Amrein *et al.*, 2003).

El alto contenido de almidón en las papas las hace susceptibles a la formación de acrilamida durante su proceso y se genera durante la reacción de Maillard (Granvogl *et al.*, 2006, Mottram *et al.*, 2002, Zyzak *et al.*, 2003; Stadler *et al.*, 2004).

2.3.2 ACRILAMIDA EN CAFÉ

El café es una bebida ampliamente consumida en la que se ha detectado la presencia de acrilamida. Ésta se forma durante el proceso de tostado, la concentración de este monómero depende entre otras cosas de la variedad del café y aún no existe una metodología para disminuir sus niveles de azúcares reductores (Biedermann-Brem *et al.*, 2003, Rydberg *et al.*, 2003, Taubert *et al.*, 2004,).

El café es una de las principales fuentes de exposición a la acrilamida debido a que es una bebida altamente consumida, por ejemplo, en Suecia contribuye en un 39% al consumo total de acrilamida (Svensson *et al.*, 2003). En café tostado y molido se han detectado concentraciones de 45 a 539 µg/kg (Şenyuva y Gökmen, 2005); sin embargo, existen reportes que demuestran que en el café la concentración de este monómero disminuye con el paso del tiempo (Hönicke y Gatermann, 2005). A su vez, el café aporta un 64% del consumo de antioxidantes (Svilaas *et al.*, 2004). Otros estudios han demostrado que la concentración de acrilamida en el café puede ser disminuida con un tostado mas intenso

que puede obtenerse al aplicar temperaturas mas elevadas. Sin embargo esto genera cambios en las características organolépticas finales y una disminución en su capacidad para atrapar radicales además de que temperaturas extremas se pueden generar otros compuestos también indeseables (Summa *et al.*, 2007). La exposición a temperaturas extremas provoca una coloración mas oscura en el alimento pero, a la vez disminuye la formación de acrilamida por el fenómeno de polimerización o degradación (Rydberg *et al.*, 2003; Taubert *et al.*, 2004; Gökmen and Şenyuva, 2006). La concentración de acrilamida presente en el café depende principalmente del tipo de tostado que se aplica y de la preparación del café.

En el tostado la formación de acrilamida es directamente proporcional al incremento de la temperatura, sin embargo como se ha mencionado antes a temperaturas extremas (solo en el caso del café) se ha comprobado una disminución (Summa *et al.*, 2007).

Por otra parte la concentración del monómero dependerá también de la cantidad de agua y de como se prepara la bebida. Así en el café expreso su generación es mucho menor. Esto se debe a que el contacto de los granos tostados de café, en los cuales ya se ha generado la acrilamida, es muy rápido con el agua de esta manera hay menos oportunidad en la acrilamida de disolverse y pasar como parte del producto final (Soares *et al.*, 2006).

Algunos cafés son la mezcla de dos especies, arábica y robusta. Estudios han reportado que en la primera, la formación de carcinógeno(s) es menor. Por lo que en estos casos, la presencia del contaminante en estudio dependerá también de los porcentajes mezclados de cada especie. Desde luego la cantidad de la bebida consumida es importante en la concentración de acrilamida ingerida, pues ésta se incrementa de manera proporcional (Alves *et al.*, 2010).

Mojska y colaboradores (2010) realizaron estudios sobre el contenido de acrilamida en café y encontraron que la concentración media del monómero en muestras de café de grano tostado fue de 364 µg/kg y en una infusión empleando 5 g de café molido y 250 mL de agua hirviendo fue de 7 µg/L. En la comunidad polaca, el café aporta el 27% del consumo total de acrilamida en adultos y cantidades similares fueron encontradas en la población de

Noruega (Dybing y Sanner, 2003, Mojska *et al.*, 2010). Por su parte, estudios en la población adulta de Holanda encuentran bajas cantidades, 13% aportado por el consumo total de café. Sin embargo en Suecia el aporte de acrilamida a través de café en adultos es del 39% (Konings *et al.*, 2003).

2.4 MÉTODOS PARA INHIBIR O DISMINUIR LA FORMACIÓN DE ACRILAMIDA EN ALIMENTOS

La formación de acrilamida en los alimentos depende de la presencia y concentración de azúcares reductores y algunos aminoácidos, principalmente la asparagina. Esto implica que si se logra controlar dichos parámetros se reducirá la generación de este monómero (Amrein *et al.*, 2003).

Actualmente las estrategias para reducir los niveles de acrilamida en las papas fritas se resumen en tres conceptos:

1. Control en la concentración de los precursores de acrilamida
2. Bloqueo de la reacción
3. Eliminación al final del proceso

2.4.1 CONTROL EN LA CONCENTRACIÓN DE LOS PRECURSORES DE ACRILAMIDA

La eliminación o reducción de los precursores se basa en el análisis de los compuestos presentes en los alimentos que al reaccionar a temperaturas elevadas producen la acrilamida. Al respecto, se han generado investigaciones a fin de definir las variedades de papa más adecuadas para la fritura, estas son aquellas en las que se encuentran bajos niveles de azúcares reductores y de asparagina libre. También se ha estudiado el periodo óptimo de maduración (Taeymans *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha sugerido el uso de asparaginasa para interrumpir la interacción entre los azúcares y la asparagina. Sin embargo, este aminoácido cumple un papel importante en el desarrollo de las reacciones de Maillard, deseable para el desarrollo de características organolépticas en el producto final, por lo cual usar asparaginasa no sería recomendable (Amrein *et al.*, 2003, Taeymans *et al.*, 2004, Becalski *et al.*, 2004).

La disminución de azúcares reductores en los alimentos puede contribuir a evitar la formación de acrilamida. Su presencia depende de factores estacionales, condiciones de cultivo y almacenamiento; por consiguiente, seleccionar variedades con una concentración baja, no superior a 1g/kg puede ayudar a disminuir los niveles del monómero (Williams, 2005). El blanqueo o remojo de los alimentos antes de su procesamiento puede ser también eficaz para reducir la formación de acrilamida. Con esto se busca una disminución en la concentración de azúcares reductores que debido a su carácter hidrofílico se disolverán en el agua de remojo y de esta manera se eliminará una gran cantidad de ellos. Mientras menos azúcares reductores existan en el alimento la reacción entre estos y la asparagina se verá limitada (Rydberg *et al.*, 2003).

Otra opción es la disminución del pH utilizando ácido cítrico (0.5 - 1%) por un período menor a 20 minutos, pero, esto puede generar características organolépticas desagradables (Ou, *et al.*, 2008).

Por otra parte es recomendable almacenar las papas a temperaturas no menores a 8 °C para evitar el aumento de los niveles de azúcares reductores. El uso de microondas antes de la cocción incrementa la formación del monómero debido a la disminución de humedad (Amrein *et al.*, 2003, Biedermann-Brem *et al.*, 2003). Se recomienda que en la fritura, las papas adquieran un tono amarillo y que la temperatura no exceda de 175° C. En cuanto a las papas horneadas la temperatura en los hornos convencionales no debe superar los 200° C (Jiménez *et al.*, 2007).

Los alimentos elaborados a base de cereales no deben ser horneados en exceso, es decir no deben presentar una coloración marrón muy oscura y en el caso de los productos de panadería se debe evitar el uso de compuestos distintos al bicarbonato amónico para aumentar su volumen siempre que sea posible y aceptable. Otra recomendación sencilla para eliminar la formación de acrilamida es procurar no cocinar los alimentos en exceso. De este modo la cantidad de acrilamida producida disminuiría significativamente (Tareke *et al.*, 2002).

2.4.2 BLOQUEO DE LA REACCIÓN DE FORMACIÓN DE AA

El bloqueo de la reacción es más complejo desde el punto de vista legislativo, ya que se basa en la propuesta de la adición de diversos aditivos. En este aspecto se han realizado algunos estudios con diversos agentes antioxidantes, presentes o no en el aceite de fritura. También se ha probado la incorporación de glicina como agente competidor de la asparagina (Jiménez *et al.*, 2007).

En 2010 Cheng y colaboradores desarrollaron un estudio sobre el efecto que tiene la adición de extractos de frutas a las papas para inhibir la formación de acrilamida. El estudio fue realizado con extractos de manzana, arándano, mangosteen, longan, fruta del dragón blanca y roja. Para ello el análisis se realizó en una reacción modelo conteniendo glucosa y asparagina en concentraciones iguales a 160°C por 30 minutos. Los resultados reflejan un mejor efecto inhibitorio sobre la formación de acrilamida al emplear el extracto de manzana y el mismo efecto fue observado al adicionar dicho extracto a las papas (Cheng *et al.*, 2010).

2.4.3. ELIMINACIÓN AL FINAL DEL PROCESO

Por otra parte la estrategia de eliminación de la acrilamida una vez formada es más complicada ya que representa un costo adicional además de una posible modificación de las propiedades organolépticas del producto final. Por ejemplo, disminuir el pH de las papas con ácido cítrico, sin embargo, este proceso puede acidificar el producto y oxidar el aceite (Ou, *et al.*, 2008).

En carne se han realizado estudios sobre la formación y eliminación de acrilamida, y se ha sugerido que su disminución es el resultado de la unión de acrilamida a proteínas y aminoácidos (Taeymans *et al.*, 2004). La presencia de aminoácidos, distintos a la asparagina, puede también ayudar a la disminución de la formación de acrilamida y/o a su eliminación, esto debido a una reacción competitiva o bien a su unión con dicho monómero (Claeys *et al.*, 2005).

Otros métodos para reducir la generación de la acrilamida requieren de mayor investigación. Desafortunadamente los avances para minimizar la producción de este contaminante sólo pueden ser aplicados a ciertos productos.

Los conocimientos actuales tratan de concretar estudios sobre los modelos cinéticos (formación/ temperatura/tiempo, el papel del agua, eliminación de competidores cinéticos de la reacción con aminoácidos y azúcares) e identificación de las limitantes que se tienen en las condiciones actuales del procesado de los alimentos. De esta manera se podrían implementar las medidas realmente importantes para intentar reducir el contenido de acrilamida tanto en productos comerciales como en los alimentos elaborados en el hogar.

2.5 MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE ACRILAMIDA

2.5.1. MÉTODOS CONVENCIONALES

La mayoría de los métodos para detectar acrilamida en alimentos se basa en un proceso de extracción por medio de metanol o agua. Este paso, logra que el monómero pase de la matriz alimentaria al solvente. Una vez realizada la extracción se procede a la purificación de la muestra mediante unidades de microfiltración (NANOSEP), seguido de una centrifugación y finalmente se analiza por cromatografía (Taeymans *et al.*, 2004, Wenzl *et al.*, 2003). No existe un método analítico de referencia y eso da una idea de la complejidad del análisis (Morales *et al.*, 2008).

El método más empleado para la detección de acrilamida es la cromatografía de gases/espectrometría de masas. En éste se incluye un proceso para incrementar la volatilidad del analito. Para ello se emplea la bromación de la acrilamida o la silylación de la amida, este proceso resulta ser muy tedioso y arriesgado debido al uso de bromo. Otra alternativa es el uso de cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas. El límite de detección suele ser de 5 a 10 µg/kg para cromatografía de gases/espectrometría de masas y de 20 a 50 µg/kg para cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Wenzl *et al.*, 2003). A pesar de los avances en la detección de acrilamida en alimentos, las técnicas son muy costosas en cuanto a instrumentación y se necesita mucho tiempo para los pre-tratamientos de las muestras. Es por esto que resulta

necesario el desarrollo de nuevos métodos fáciles, rápidos, económicos y confiables para la detección y cuantificación de acrilamida (Moreno, 2007). La acrilamida también ha sido analizada mediante técnicas electroquímicas las cuales son rápidas y altamente sensibles.

2.5.2 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Las técnicas electroquímicas se clasifican en potencioestáticas y potenciométricas. Las técnicas potenciométricas como su nombre lo indica miden el potencial y son estáticas, es decir, a corriente cero. Su análisis se basa en la medición del potencial establecido a través de una membrana. Las técnicas potencioestáticas, llamadas también “técnicas de potencial controlado” estudian el proceso de transferencia de carga en la interface solución-electrodo y se basan en sistemas dinámicos es decir, con corrientes diferentes a cero. El potencial es el símil de la longitud de onda en las mediciones ópticas. Su aplicación concede a la especie electroactiva la energía necesaria para aceptar o ceder electrones según sea el caso. Con esto la muestra se reduce u oxida, respectivamente. En el Cuadro 6 se muestran algunas de las técnicas electroquímicas que pertenecen a esta clasificación y algunas de sus características (Brett C. y Brett A., 1994).

Cuadro 6. Características de algunas técnicas de potencial controlado

Técnica ^a	Electrodo de trabajo ^b	Límite de detección (M)	Velocidad (tiempo por ciclo) (min)	Forma de la respuesta
Polarografía DC	DME	10^{-5}	3	Onda
Polarografía NP	DME	5×10^{-7}	3	Onda
Polarografía DP	DME	10^{-8}	3	Pico
Voltamperometría DP	Sólido (ej. Grafito, oro, pt)	5×10^{-7}	3	Pico
Polarografía SW	DME	10^{-8}	0.1	Pico
Polarografía AC	DME	5×10^{-7}	1	Pico
Cronoamperometría	Estacionario ej. CV	10^{-5}	0.1	
Voltamperometría cíclica	Estacionario ej. CV	10^{-5}	0.1-2	Pico

^a DC = Corriente Directa; NP = Normal de Pulso; DP = Diferencial de Pulso; SW = Onda Cuadrada; AC = Corriente Alterna. ^b DME = Electrodo de Gota de Mercurio; HMDE = Electrodo de Gota de Mercurio Colgante; MFE = Electrodo de Película de Mercurio

2.5.2.1 VOLTAMPEROMETRIA CÍCLICA

La voltamperometría cíclica es una técnica electroquímica que se basa en la aplicación de un barrido de potencial donde después de un tiempo de reacción se llega a un potencial máximo y entonces la dirección del barrido es invertida hasta llegar a un potencial mínimo. Este proceso se realiza de manera cíclica y el gráfico resultante es un voltamperograma que relaciona la corriente contra el potencial. La corriente dependerá de la cinética y transporte por difusión de la especie electroactiva (Figura 3) (Wang J., 2000).

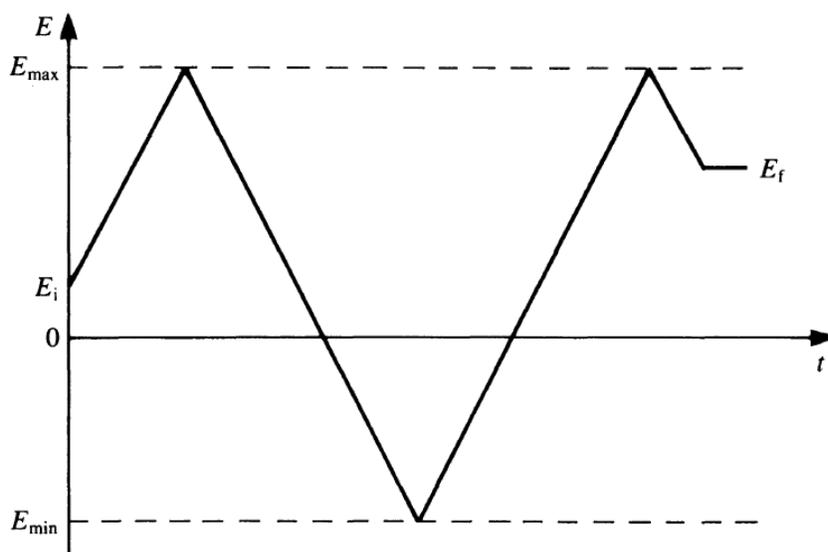


Figura 3. Tipo de perturbación en voltamperometría cíclica.

La voltamperometría cíclica es una técnica muy usada para obtener información cualitativa de las reacciones electroquímicas, de la termodinámica de los procesos redox, cinética de reacciones de transferencia electrónica heterogénea y de reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción. Con esta técnica es posible conocer de manera rápida los potenciales redox de compuestos electroactivos. Es por esto que la voltamperometría cíclica es con frecuencia uno de los primeros experimentos por realizar en electroquímica. El potencial aplicado genera una corriente la cual es medida a través de un potencióstato (Brett C. y Brett A., 1994).

2.5.2.2. VOLTAMPEROMETRIA DIFERENCIAL DE PULSO

Las técnicas de pulso se basan en una secuencia de aplicación de un paso de potencial de corriente al electrodo de trabajo, los cuales tienen una duración de alrededor de 50 milisegundos (ms). El potencial aplicado en esta técnica consiste de pequeños pulsos cuya amplitud es constante pero la base del potencial es incrementado de manera uniforme entre cada pulso. La corriente es muestreada dos veces en cada periodo, una antes y otra al final del mismo, el grafico desplegado es el resultado de la diferencia entre estas dos corrientes. Su forma de potencial (potencial-tiempo) se muestra en la Figura 4 (Brett C. y Brett A., 1994, Wang, 2000). La voltamperometría diferencial de pulso es una técnica muy útil para análisis de especies orgánicas e inorgánicas presentes en cantidades mínimas (trazas). Permite mediciones a concentraciones tan bajas como 10^{-8} M (cerca de $1\mu\text{g L}^{-1}$), (Wang, 2000).

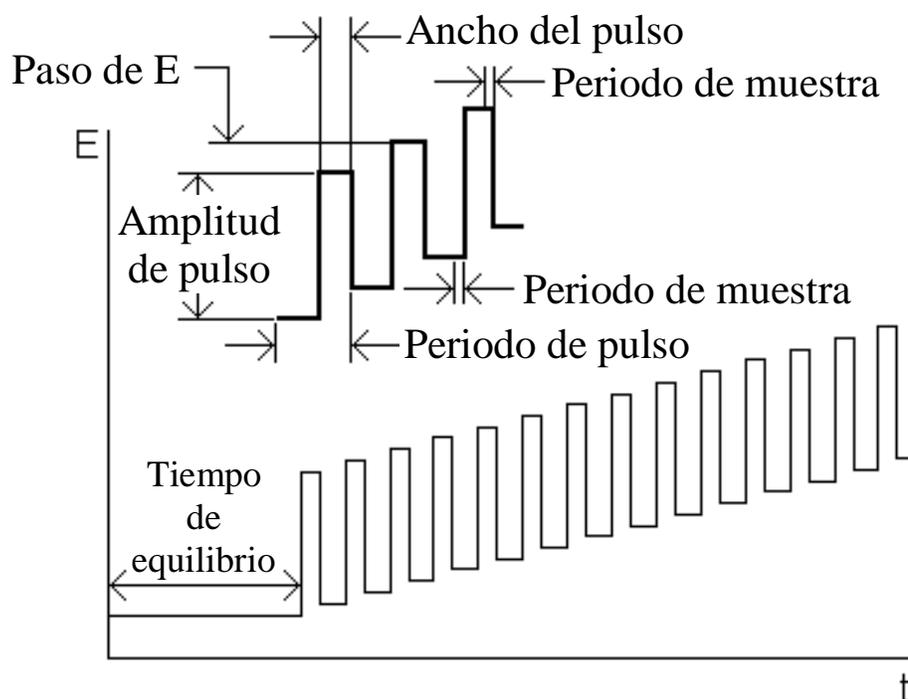


Figura 4. Señal de excitación para la técnica voltamperometría diferencial de pulso

2.5.2.3 VOLTAMPEROMETRIA DE ONDA CUADRADA (OC)

La voltamperometría de onda cuadrada consiste en un potencial en forma de onda cuadrada (cuya amplitud es constante) superpuesta a una de tipo escalera y aplicado al electrodo de

trabajo. La corriente es muestreada dos veces durante cada ciclo completo, al final de cada medio-ciclo, también es muestreada en el medio-ciclo del sentido inverso lo cual provoca una reacción inversa en el producto. Es decir se aplica un impulso catódico y otro anódico (Figura 5). Durante la aplicación del potencial en sentido catódico, una cantidad del analito es reducida en la superficie del electrodo, mientras que durante el barrido anódico, el compuesto reducido es oxidado. Esta técnica es muy rápida y puede ser realizada en segundos. Por otra parte, tiene muy bajo límite de detección, alrededor de 1×10^{-8} M (Wang, 2000).

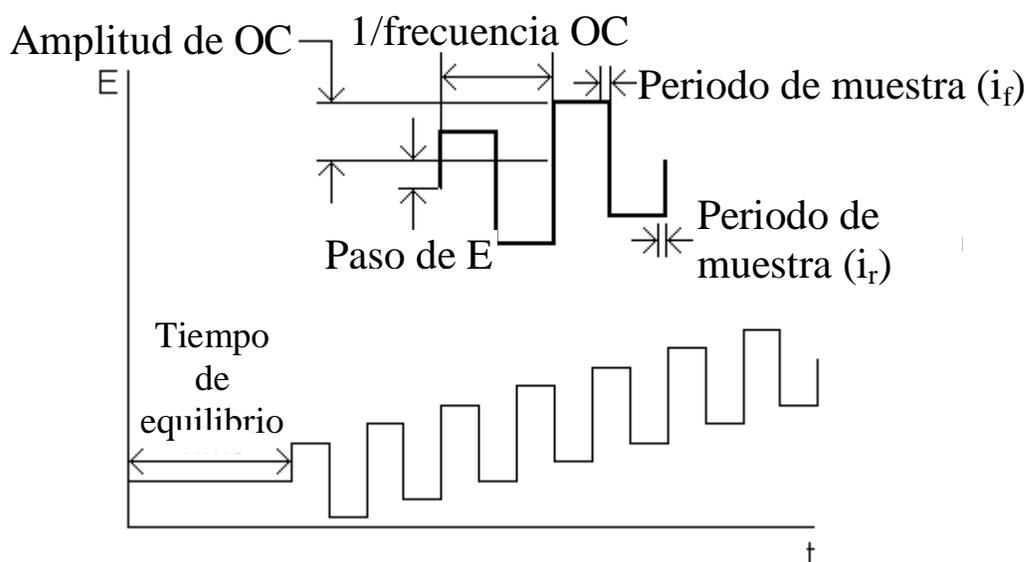


Figura 5. Señal de excitación para la técnica voltamperométrica de onda cuadrada (OC)

Con las técnicas electroquímicas no se necesitan otros reactivos. Sólo se requiere de los estándares, la muestra, un electrolito soporte y un sistema de celda de tres electrodos. Así, debido a su gran sensibilidad, es posible detectar compuestos presentes en cantidades trazas (Blasco *et al.*, 2004).

Estas técnicas se complementan con el uso de electrodos adecuados para el análisis de cada analito. De este modo, si se desea realizar un análisis en muestras orgánicas, un electrodo de trabajo apropiado es el de carbón vítreo. A menudo los electrodos son modificados ya

sea para hacerlos mas sensibles o bien para una mayor especificidad ante la detección de una muestra en especial.

2.5.2.4. EMPLEO DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EN ALIMENTOS

En el ámbito de los alimentos, la necesidad de análisis económicos, rápidos y fáciles ha concedido especial interés a las técnicas electroquímicas. Diferentes aplicaciones han sido desarrolladas con estas técnicas.

En el 2005, De Luca y colaboradores, desarrollaron un sensor para detectar compuestos como glucosa, etanol, lactato y glutamato, emplearon un electrodo de carbono modificado con azul de Prusia el cual cubrieron con una capa de enzima inmovilizada covalentemente (Glucosa oxidasa, alcohol oxidasa, L-lactato oxidasa o bien L-glutamato oxidasa; según el analito de estudio). El sustrato reacciona con el oxígeno generando un producto y peróxido de hidrogeno, esta reacción es catalizada por la enzima oxidasa, inmovilizada en la superficie del electrodo previamente modificado. El H_2O_2 formado, es reducido y detectado electroquímicamente a través del mediador redox, azul de Prusia, contra un electrodo de referencia $Ag|AgCl$. El análisis resultó ser rápido, con un tiempo de 1 a 2 minutos y empleado en el estudio de muestras de alimentos complejas tal como vino y yogurt (De Luca *et al.*, 2005).

Las técnicas electroquímicas han sido utilizadas también para detectar capacidad antioxidante en alimentos. En el 2001, Korotkova y colaboradores realizaron un estudio para determinar la capacidad antioxidante de algunos compuestos como el ácido ascórbico y cítrico, glucosa, extracto de té verde, vinagre de manzana y los fármacos ahemodesum, poliglucinum y solución Ringer. En este estudio se utilizó la técnica de voltamperometría diferencial de pulso, los resultados muestran una mayor capacidad antioxidante tanto en el ácido ascórbico como en la glucosa comparados con el ácido cítrico, los fármacos y productos alimenticios de estudio. Por su parte el vinagre de manzana y la solución de poliglucinum no presentan capacidad antioxidante. Por otra parte, en el Cuadro 7 se muestran los coeficientes de actividad antioxidante (K) y el porcentaje de error experimental ($\sigma/\%$) para los antioxidantes de estudio. Los valores de K con signo menos

mostrados en el Cuadro 7, denotan un incremento de la corriente de reducción del oxígeno al adicionar esas sustancias al electrolito soporte. En lo que respecta al té verde, los autores mencionan que éste muestra una buena capacidad antioxidante debido a su contenido de flavonoides (Korotkova *et al.*, 2002). González y colaboradores en el 2011 realizaron estudios de voltamperometría diferencial de pulsos en el extracto polar y no polar de orégano Mexicano. Los electrodos empleados fueron los serigrafiados de carbono modificados con nanotubos de carbono de pared única y el de carbón vítreo. Los resultados muestran elevada capacidad antioxidante así como mayor sensibilidad en esta técnica comparada con las convencionales (González *et al.*, 2011)

Cuadro 7. Coeficientes de actividad antioxidante para las sustancias investigadas, algunos productos alimenticios y fármacos (Korotkova *et al.*, 2001).

Substancia	K	$\sigma/\%$	Substancia	K	$\sigma/\%$
Ácido ascórbico	0.50	4.7	Solución ringer	0.001	3.6
Glucosa	0.32	4.5	Poliglucinum	-0.09	5.6
Ácido cítrico	0.18	3.9	Extracto de té verde	0.45	4.5
Haemodesum	0.08	5.8	Vinagre de manzana	-0.03	5.6

Por otra parte también se han realizado análisis electroquímicos en alimentos para la diferenciación de flavonoides y ácidos fenólicos predominantes en jugos de manzana y pera, para ello han utilizado la técnica voltamperometría diferencial de pulso usando un electrodo de carbón vítreo. Esta técnica permitió la rápida detección de dichos compuestos por oxidación electroquímica. En la Figura 6, se presentan los voltamperogramas de algunos estándares fenólicos, y en la Figura 7, los voltamperogramas traslapados de los jugos de manzana (Figura 7 A) y de pera (Figura 7 B), ambos a pH 2.0 y 7.5 (Blasco *et al.*, 2004).

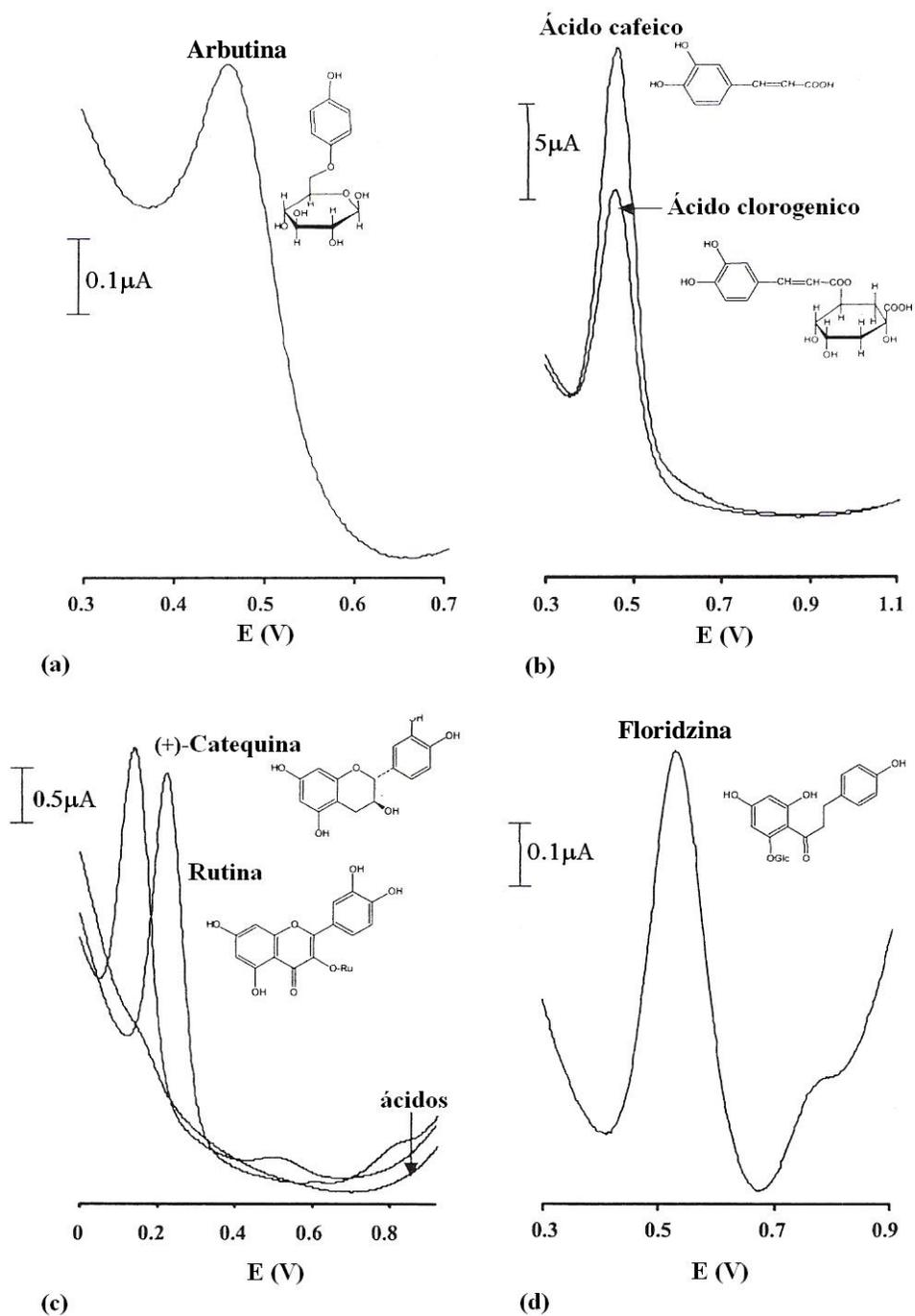


Figura 6. Voltamperogramas de estándares fenólicos: (a) Señal característica de fenolico: arbutina (pH 7.5); (b) Ácidos cinámicos predominantes: ácido cafeico y clorogénico (pH 2.0); (c) Flavonoides predominantes: Flavan 3-ols ((+)-catequina) y flavanoles (rutina) (pH 7.5); (d) fenolico fingerprint: Floridzina (pH 7.5) (Blasco *et al.*, 2004).

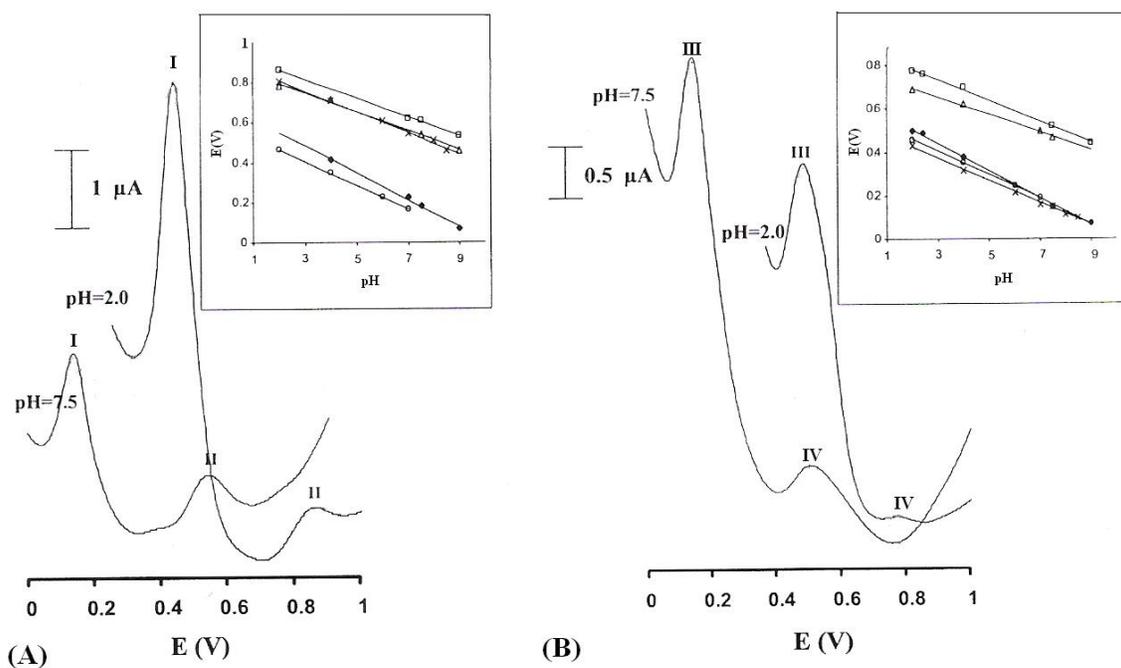


Figura 7. Voltamperogramas traslapados de (A) jugo de manzana y (B) jugo de pera a pHs leídos. El pico I, fue asignado a (+)-catequina a pH 7.5 y por (+)-catequina + cinámico a pH 2.0. El pico II fue asignado a (+)-catequina + floridzina a ambos pHs. El pico III fue asignado a (+)-catequina a pH 7.5 y por (+)-catequina + cinámico a pH 2.0. Pico IV, asignado a (+)-catequina + arbutina a ambos pHs (Blasco *et al.*, 2004).

2.5.2.5 DETECCIÓN DE ACRILAMIDA MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

En el 2007 Stobiecka y colaboradores desarrollaron un sensor voltamperométrico a base de un electrodo de pasta de carbono modificado con hemoglobina, la cual interactúa con la acrilamida mediante la formación de aductos como resultado de su reacción con el grupo α -NH₂ terminal de la valina presente en la hemoglobina. Esta reacción concede especificidad al electrodo en la detección del monómero. El límite de detección de la técnica es de 1.2×10^{-10} M. El material necesario para la modificación es hemoglobina humana (Hb), bromuro de sodio (NaBr), bromuro de dimetildioctadecil-amonio (DDAB, por sus siglas en inglés). Previo a la modificación se preparó una mezcla de Hb-DDAB para lo cual inicialmente se sonicó la suspensión DDAB (0.01M en agua deionizada) 40 min para producir una dispersión vesicular homogénea de liposomas. La mezcla Hb-DDAB-liposomas fue preparada sonicando por 30 minutos 500 μL de la dispersión acuosa de liposomas DDAB y

500 μL de Hb 0.1mM en presencia de 0.1M de solución amortiguadora de acetatos (pH 4.8). La modificación se realizó sobre un electrodo de pasta de carbono con área de 7.1 mm^2 después de ser pulido con papel. Diez μL de la dispersión acuosa del liposoma Hb-DDAB fue colocado sobre la superficie y cubierta con una pequeña tapa de vidrio, se dejó reposar toda la noche para crear una película superficial. Antes de las mediciones electroquímicas el electrodo se almacenó a 4°C en una solución amortiguadora de acetatos (0.2M, pH 4.8) o de fosfatos (0.01M, pH 7.4) con 0.05M de NaBr. Emplearon un sistema de celda de tres electrodos y las técnicas de Voltamperometría Cíclica (VC) y Voltamperometría de Onda Cuadrada (VOC). Una vez realizada la modificación, el electrodo fue acondicionado en la solución amortiguadora de acetatos 0.2M pH 4.8 y NaBr a 50mM durante 24 hr. Antes de las mediciones electroquímicas, el electrolito soporte con los electrodos se purgó con argón durante 15 min. Posteriormente se aplicó voltamperometría cíclica hasta obtener una respuesta estable (6 ciclos). El electrodo modificado fue analizado mediante voltamperometría cíclica mostrando un comportamiento cuasi-reversible de $\text{Hb-Fe}^{2+}|\text{Hb-Fe}^{3+}$ tal como se observa en la Figura 8A. En esta figura también se puede notar un dependencia lineal de la corriente de pico catódico con la velocidad de barrido lo cual indica que la reacción no esta controlada por difusión sino más bien por un proceso superficial tal como se esperaría para un sistema inmovilizado (Stobiecka *et al.*, 2007). Después del acondicionamiento en el electrolito soporte se aplico VC hasta obtener una respuesta estable, después el electrolito se purgó con argón durante 30min y nuevamente se aplicó el potencial ciclado hasta estabilizar la respuesta y se agregó una pequeña cantidad de la solución stock de la AA (esta solución se preparó con una solución amortiguadora de acetatos 0.2M, pH 4.8 y 50 mM de NaBr se mezcló por 10 min y se burbujeó con argón 5 min) nuevamente se aplicó un potencial ciclado hasta obtener estabilidad en la respuesta (3 ciclos). Posteriormente se realizó VOC y este procedimiento se repitió en diferentes concentraciones de AA, la repuesta se muestra en la Figura 8B donde se aprecia una disminución en la corriente de pico conforme se incrementa la concentración de AA. Los análisis fueron realizados contra un electrodo de referencia de Ag|AgCl (Stobiecka, *et al.*, 2007).

Esta técnica muestra varias desventajas como lo es la preparación tardada de los liposomas así como de la mezcla de estos con Hb, y el empleo de compuestos de manejo delicado como la Hb y el NaBr. Además la modificación y acondicionamiento del electrodo involucra el empleo de alrededor de un día y medio así como la aplicación de un potencial ciclado entre cada paso (antes de purgar el electrolito, después de purgarlo, y después de agregar cada concentración diferente de AA).

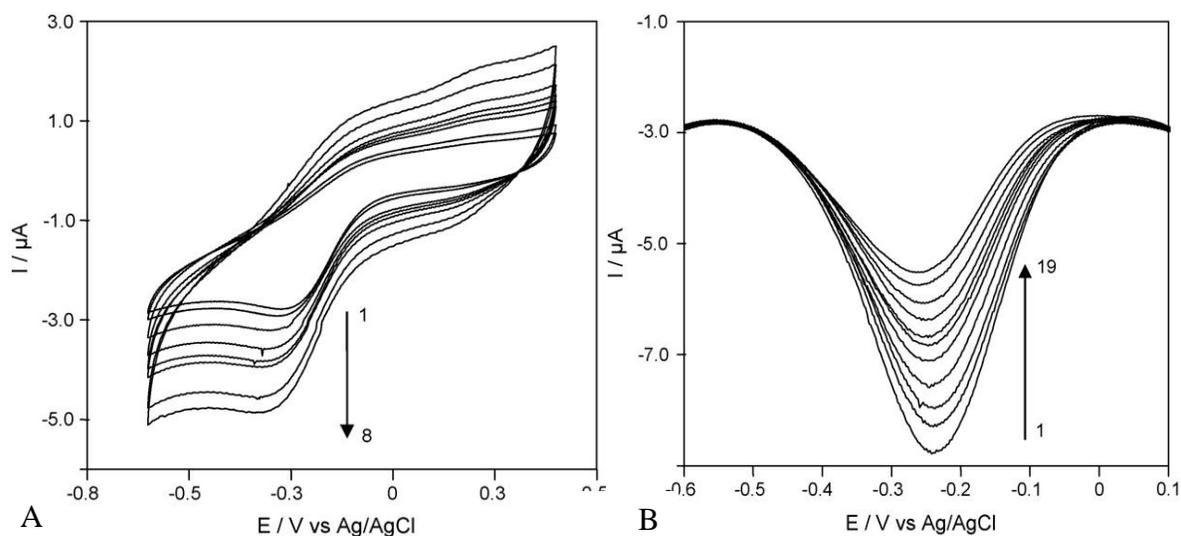


Figura 8. A) Voltamperograma cíclico empleando un electrodo de pasta de carbón modificado con hemoglobina y liposomas DDAB. La solución amortiguadora fue de acetatos 0.2 M, pH 4.8 a diferentes velocidades de barrido (1) 0.2Vs^{-1} , (2) 0.25Vs^{-1} , (3) 0.4Vs^{-1} , (4) 0.45Vs^{-1} , (5) 0.5Vs^{-1} , (6) 0.6Vs^{-1} , (7) 0.8Vs^{-1} , (8) 1.0Vs^{-1} . B) Respuesta electroquímica de acrilamida a diferentes concentraciones en presencia de un extracto acuoso de papas fritas: (1) 0M, (2) 1.3×10^{-11} M, (3) 6.3×10^{-11} M, (4) 6.3×10^{-10} M, (5) 6.9×10^{-10} M, (6) 2.0×10^{-9} M, (7) 6.0×10^{-9} M, (8) 1.3×10^{-9} M, (9) 6.2×10^{-8} M, (10) 4.7×10^{-7} M, (11) 1.1×10^{-6} M, (12) 5.8×10^{-6} M, (13) 1.2×10^{-5} M, (14) 4.8×10^{-5} M, (15) 1.2×10^{-4} M, (16) 5.3×10^{-4} M, (17) 1.1×10^{-3} M, and (18) 5.6×10^{-3} M. NaBr 0.05 M como electrolito soporte en una solución amortiguadora de acetato 0.2M pH 4.8 (Stobiecka *et al.*, 2007)

En el 2009 Zargar y colaboradores desarrollaron un análisis de acrilamida en papas fritas para lo cual emplearon VOC, utilizaron un sistema de celda de tres electrodos con un electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo y adicionaron iones de cobalto como electrocatalizador. De esta manera detectaron acrilamida a una señal de reducción de -1.32 V contra un electrodo de referencia de Ag|AgCl con un límite de detección de 3.52 ng

mL^{-1} . La principal desventaja de esta técnica es el empleo de un electrodo de gota de mercurio el cual está en desuso debido a su toxicidad.

En el 2008, Krajewska y colaboradores, desarrollaron un biosensor basado en la modificación de un electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared sencilla y hemoglobina para la detección y cuantificación de AA en papas fritas. Para la modificación del electrodo, inicialmente purificaron las nanotubos de carbono de pared simple por sonicación durante 30 min en una mezcla de ácido sulfúrico y nítrico concentrados (3:1 $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, 10 mL) calentando a reflujo por una hr. Los nanotubos resultantes se filtraron y lavaron con agua doblemente destilada y se dispersaron en agua ultrapura (1mL). La modificación se realizó diluyendo la solución de los nanotubos 5 veces y se colocaron $5\mu\text{L}$ de esta dilución en la superficie del electrodo de carbón vítreo y se dejó secar a 4°C . Después se colocó sobre la superficie 10 mg/mL de una solución de hemoglobina en solución amortiguadora de acetatos 0.2M conteniendo 0.05 M de NaCl pH=5.0 ($5\mu\text{L}$) y finalmente se dejó secar a 4°C . Una vez modificados, los electrodos fueron almacenados en un ambiente a 4°C hasta su uso. Los electrodos de Ag|AgCl y platino fueron usados como electrodo de referencia y auxiliar, respectivamente.

En este caso, al igual que Zargar y colaboradores (2010), se observa en la VC con el electrodo modificado, una dependencia lineal de las corrientes de pico con la velocidad de barrido, indicando que la reacción redox no es un proceso controlado por difusión sino más bien controlado por la superficie del electrodo. El análisis de acrilamida fue desarrollado mediante VC y VOC en una solución conteniendo 0.2 M de amortiguador de acetatos y 0.05 M de NaCl. Encontraron una mejor respuesta mediante VOC. La técnica tiene un límite de detección de 10^{-9} M.

Si bien esta técnica requiere menor tiempo en comparación con la técnica propuesta por Zargar y colaboradores (2010) en cuanto a la modificación y análisis de AA, tiene como desventaja el empleo de hemoglobina, que es un compuesto fácilmente degradable y que además requiere de su almacenamiento a temperaturas bajas para mantenerlo sin cambio incluso estando inmovilizada sobre la superficie del electrodo hasta el momento de su uso.

Una práctica importante realizada en AA con las técnicas electroquímicas es su polimerización, llamada iniciación electroquímica de la polimerización o electropolimerización. Los estudios realizados al respecto están enfocados en dos aspectos: en las bases del mecanismo de reacción en la superficie del electrodo donde se encuentran los centros activos y el mecanismo de crecimiento de la cadena polimérica (Shapoval y Gorodyskii, 1973).

La polimerización de AA es realizada para la generación de geles de poliacríamida, empleados con frecuencia para el desarrollo de electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos de cadena corta. Para la obtención química del gel, es necesario el empleo del monómero, catalizadores de la polimerización y una solución amortiguadora (Pele, 2007).

La polimerización química de la AA se da a través de la formación de radicales libres en presencia del monómero, para lo cual es necesaria la adición de catalizadores también denominados iniciadores del proceso. El persulfato amónico, es uno de dichos iniciadores, este es disuelto en agua en presencia de una base débil con lo cual se disocia generando un radical libre. Otro catalizador es la riboflavina o riboflavina-5-fosfato, este iniciador genera radicales libres en presencia de luz ultravioleta de longitud de onda larga y trazas de oxígeno (fotopolimerización) (Pele, 2007).

Además de los iniciadores, se agrega una amina para favorecer la generación de los radicales, con frecuencia, la N,N,N',N' tetrametilendiamina (TEMED). En la Figura 9 se aprecia el mecanismo de polimerización química (Pele, 2007).

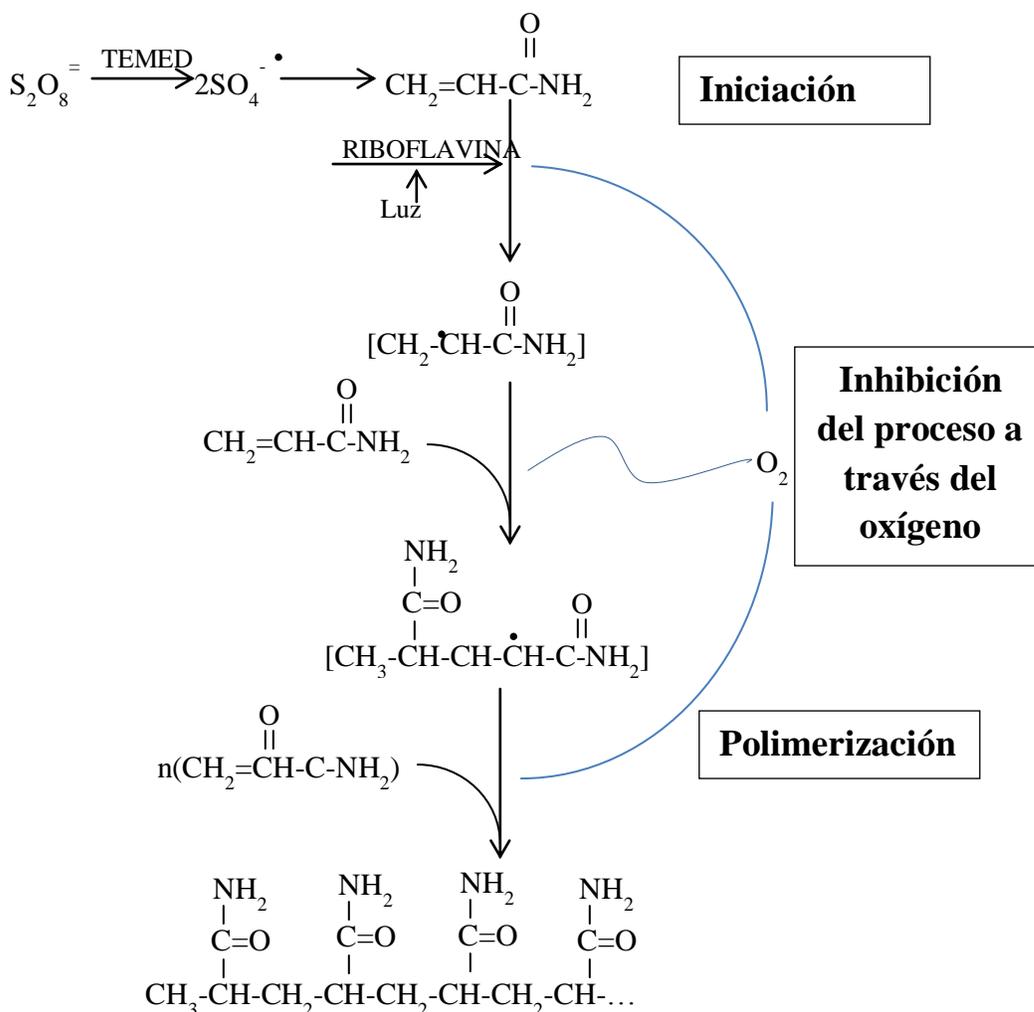


Figura 9. Mecanismo de la polimerización química de AA (Pele, 2007).

La polimerización química de la AA es la más empleada, sin embargo un aspecto que no se puede controlar en este método es la orientación molecular durante el crecimiento de la cadena. Durante la oxidación o reducción electroquímica también es posible la generación de radicales orgánicos por lo que la polimerización puede generarse también por este medio a lo que se le llama iniciación electroquímica de la polimerización o bien electropolimerización y puede tener importantes ventajas en comparación con la polimerización química, una de ellas es precisamente la orientación molecular durante el crecimiento de la cadena (estereoregulación) logrando la obtención de polímeros cristalinos durante la electrólisis (Shapoval *et al.*, 1967, Tomilov *et al.*, 1968).

El crecimiento de la cadena polimérica se lleva a cabo por un mecanismo que involucra radicales libres ó iones dependiendo de las condiciones y es independiente del proceso de iniciación. Los métodos de iniciación electroquímica de la polimerización se clasifican de acuerdo al tipo de proceso que sucede en el electrodo para generar los centros iniciadores y de acuerdo al mecanismo e crecimiento de la cadena polimérica. Dependiendo del tipo de proceso en la superficie del electrodo, la iniciación puede ser anódica o catódica y según la reacción electroquímica empleada, la iniciación se puede dar por reducción u oxidación directa del monómero o por oxidación o reducción del iniciador electroquímico, es decir, compuestos cuya oxidación anódica o reducción catódica forma radicales o iones-radical capaces de iniciar la polimerización. Estos procesos generalmente involucran la transferencia de un electrón (Shapoval *et al.*, 1968).

En la Figura 10, se muestran los tipos de procesos electroquímicos que se han usado para la iniciación de la polimerización. En este proyecto nos enfocaremos únicamente a la oxidación anódica, en ésta, la oxidación electroquímica directa de compuestos orgánicos, especialmente de aniones carboxilatos, genera la formación de radicales alquil o alcanoxil de acuerdo a la reacción de Kolbe. (Svadkovskaya, 1960). Si la oxidación anódica de estos compuestos es realizada en presencia de monómeros y bajo condiciones apropiadas, los radicales formados pueden iniciar su polimerización radical. Durante este mecanismo de polimerización, los ácidos alifáticos y sus sales son oxidados en el ánodo, los productos son los iniciadores electroquímicos. Si los radicales que se forman a través de la oxidación de los iniciadores poseen alta afinidad electrónica, estos pueden oxidar al monómero con lo que se inicia una polimerización catiónica (Shapoval *et al.*, 1973).

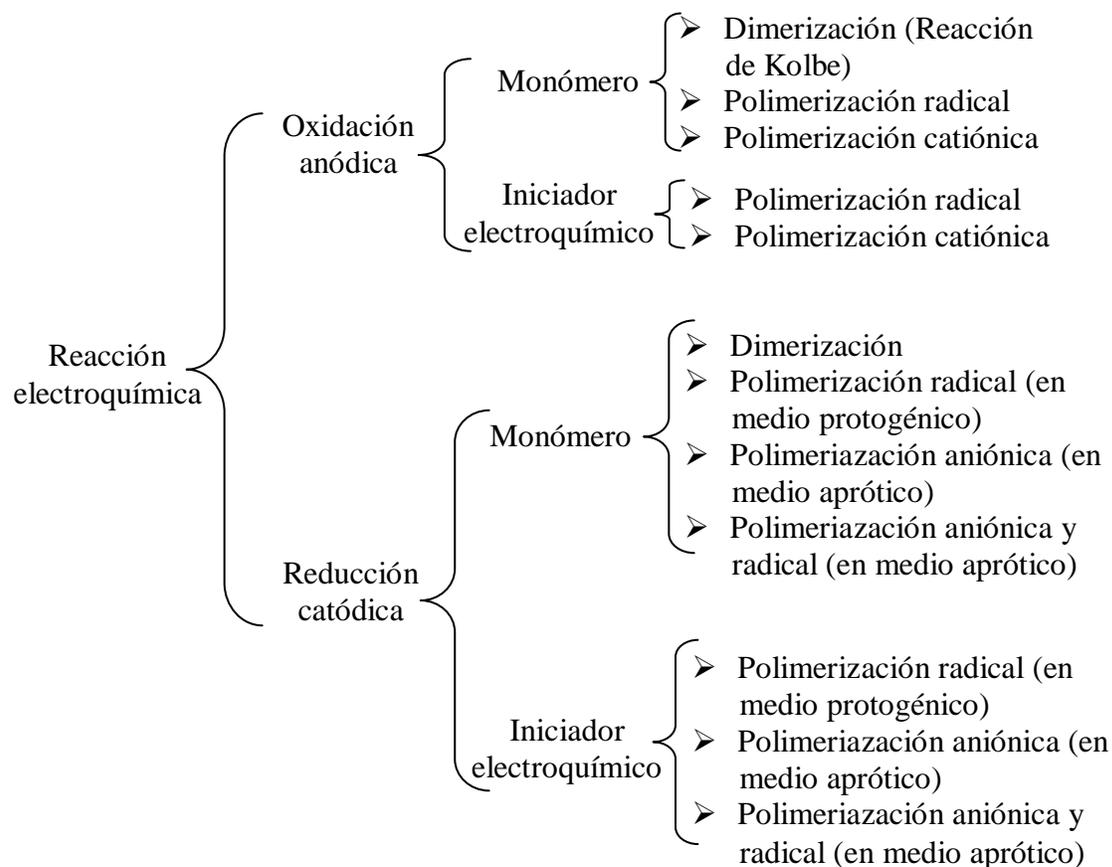


Figura 10. Procesos electroquímicos en la electropolimerización (Shapoval *et al.*, 1973)

De acuerdo a lo anterior, la electropolimerización de AA puede ser desarrollada mediante el empleo de electrodos que presenten grupos carboxilos en su superficie ya sea de manera natural como es el caso del electrodo de carbón vítreo o bien debido a su modificación con moléculas que contengan especies carboxiladas tal como los dendrímeros.

2.6 DENDRÍMEROS

En los años 30, experimentos realizados por Staudinger dan lugar a la generación de polímeros lineales, polietileno y poliestireno. Las propiedades de estas macromoléculas dependen de su estructura química. Estas son modificadas cuando sus cadenas son unidas a través de unidades moleculares, con lo cual se generan los polímeros entrecruzados o reticulares que presentan una estructura tridimensional rígida tal como la de poliuretano o resinas epoxi. Las longitudes y tamaños de estas cadenas poliméricas son muy variables y

por tanto resulta imposible conocer a detalle su disposición interna y por consiguiente sus posibles propiedades. Esto no ocurre con los dendrímeros, macromoléculas surgidas en la década de los 80, ya que su estructura puede ser controlada, es decir, su tamaño forma y topología puede ser diseñada durante su síntesis (Figura 11). De este modo los dendrímeros presentan estructuras homogéneas regulares con lo cual, a diferencia de los polímeros lineales, es posible hacer una relación entre su estructura y propiedad (Tomalia y Durst, 1993).

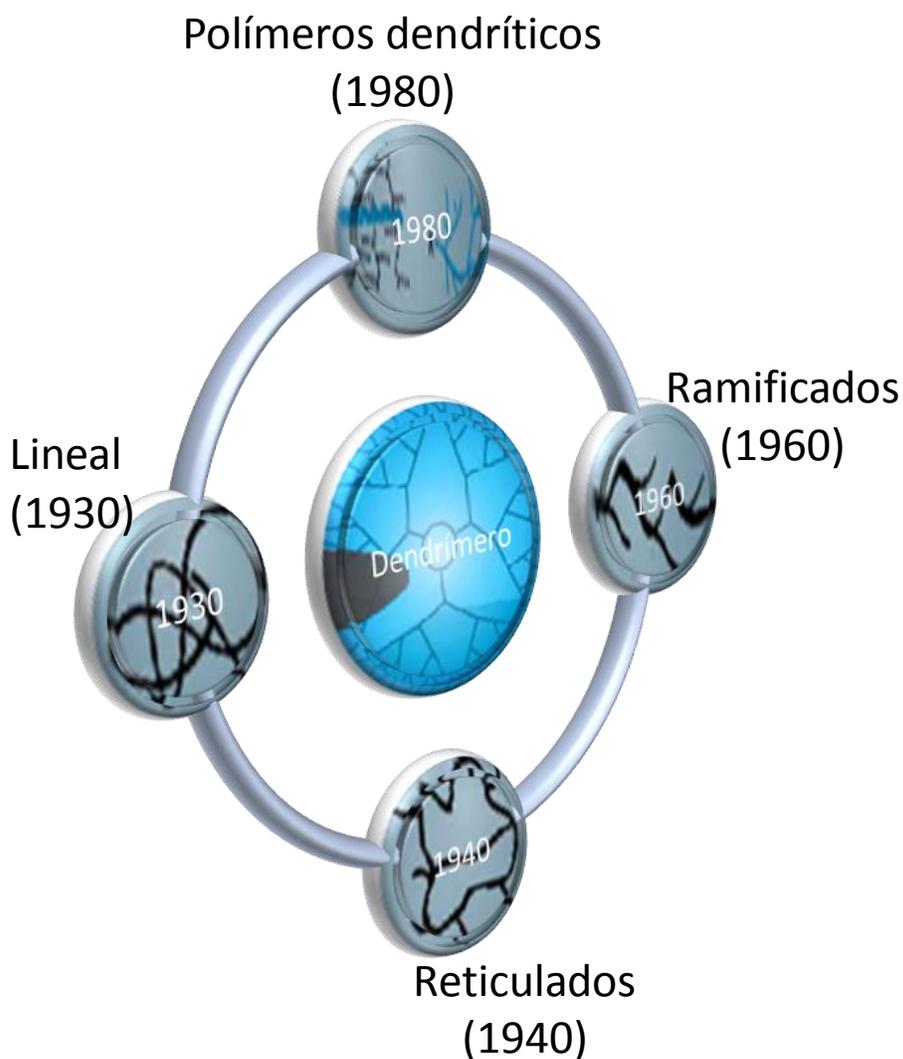


Figura 11. Historia de las modificaciones en los polímeros.

Los dendrímeros se asemejan a las copas de los árboles con sus ramificaciones, de ahí su denominación “dendrímtero”. Esta palabra proviene del vocablo griego *dendron*, que

significa árbol y *meros*, parte principal. Estas moléculas fueron nombradas así por Donald A. Tomalia en 1985 (Kaifer, 1991).

Las moléculas dendriméricas emanan de un centro molecular reactivo y se ramifican hacia el exterior. Estas macromoléculas se clasifican por generaciones. El núcleo inicial de crecimiento corresponde a la generación 0 (G0). La generación denota el número de grupos funcionales, periféricos, presentes en la molécula. Así, entre mayor es la generación, el número de grupos funcionales se incrementa.

En los dendrímeros de generación baja, a diferencia de los de generación alta, la superficie está poco poblada por grupos periféricos, esto da lugar a que existan espacios suficientes entre éstos como para que moléculas relativamente pequeñas puedan ir al interior, esto sería más difícil si se trata de un dendrímero de mayor tamaño ya que habría una mayor densidad de grupos funcionales y por tanto menos espacio entre ellos (Tokuhisa y Crooks, 1997).

Los dendrímeros cuentan con tres rasgos característicos:

- a) Centro
- b) Ramificaciones repetitivas
- c) Grupos funcionales terminales

En la Figura 12 se muestra un dendrímero y se especifican sus componentes y en la Figura 13 se muestran los grupos funcionales que puede contener (Tokuhisa *et al.*, 1997). Cuando los dendrímeros crecen en tamaño adoptan una estructura globular o esférica. Esto se debe a que crecen colocándose en sus grupos funcionales superficiales.

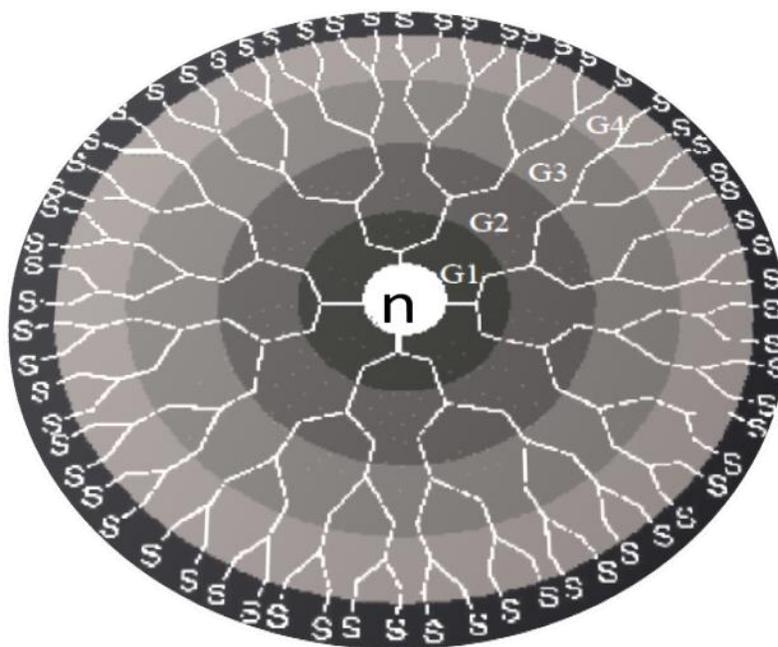


Figura 12. Componentes en los dendrímeros (n = Núcleo, S = Grupo funcional, G = Generación) (Kaifer *et al.*, 1991)

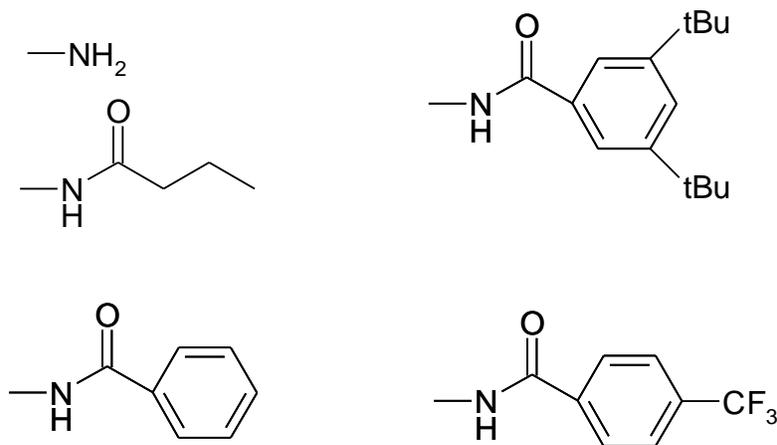


Figura 13. Grupos funcionales que pueden estar presentes en los dendrímeros (Tokuhisa *et al.*, 1997)

2.6.1 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS

La importancia de sintetizar dendrímeros está en la necesidad de crear polímeros con nuevas propiedades así como con una estructura molecular bien definida y altamente controlable. Lo cual resulta difícil de conseguir con la modificación estructural de polímeros mediante cadenas entrelazadas, propias de las macromoléculas poliméricas

convencionales. En el caso de los dendrímeros, que son creados mediante un crecimiento multiplicativo desde una parte central, adoptan una forma esférica concediéndoles una naturaleza monodispersa que les hace importantes para aplicaciones en nanomedicina y nanotecnología.

La síntesis de los dendrímeros se realiza multiplicando en cada paso el número de ramas hasta alcanzar la congestión superficial. Existen dos tipos de síntesis, la convergente y la divergente.

a) Síntesis divergente: Este proceso de crecimiento, creado por Tomalia, involucra la reacción de una unidad monomérica con un centro polifuncional (metil acrilato y amonio) seguida de una amidación de los esteres resultantes con etilendiamina para producir la siguiente generación de grupos reactivos aminos. Es decir, se produce por una adición secuencial de monómeros que comienza del centro y se extiende en forma radial incorporándose una unidad en cada punto de ramificación. Las generaciones mayores son formadas mediante la repetición de dichos pasos este método fue desarrollado por Vögle, Tomalia y Newkome (Figura 14).

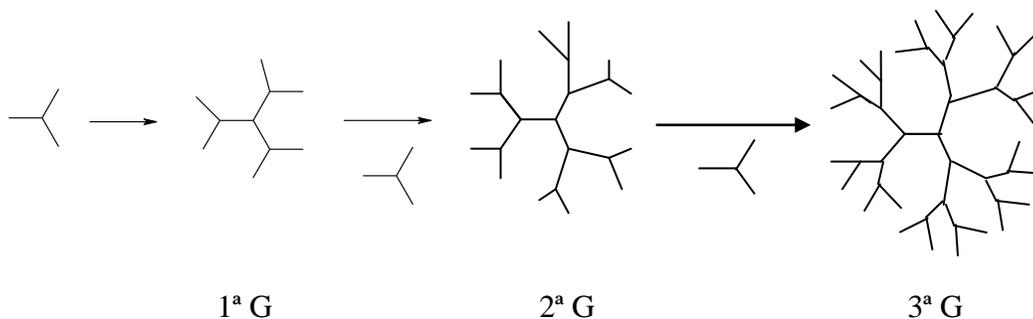


Figura 14. Síntesis divergente de los dendrímeros (Kaifer *et al.*, 1991)

b) Síntesis convergente: Este método de generación de dendrímeros fue creado por Tully y Fréchet en el 2001. En este caso, a diferencia de la síntesis divergente, la construcción del dendrímero comienza de su segmento exterior. Para ello los grupos periféricos se unen a sus respectivas ramificaciones (Dendrón). Posteriormente estos a su vez se unen entre sí para lograr de este modo la generación del dendrímero (Figura 15) (Tully y Fréchet, 2001).

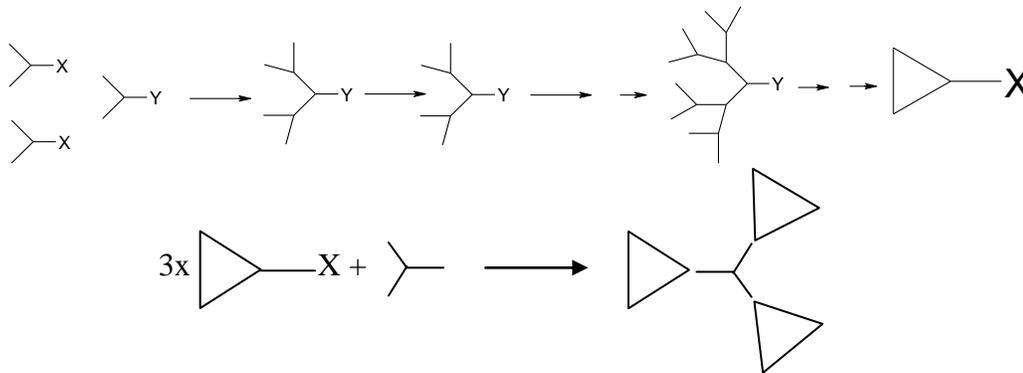


Figura 15. Síntesis convergente de los dendrímeros (Tully y Fréchet, 2001)

Estas técnicas para la generación de los dendrímeros han resultado eficientes para producir macromoléculas del tamaño de proteínas, enzimas o hemoglobina, es decir, con pesos moleculares de alrededor de un millón de Dalton y tamaños de entre 10 y 500 Å.

Una ventaja de los dendrímeros en comparación con los polímeros convencionales es que las moléculas dendriméricas tienen el mismo peso molecular y dimensiones (Kaifer, 1991). Las reacciones en los dendrímeros pueden darse por exorecepción, cuando las moléculas interactúan fuertemente con los grupos funcionales periféricos, y por endorecepción, cuando moléculas pequeñas penetran en los intersticios entre los grupos de la superficie y son solvatados en los canales del centro de los dendrímeros.

2.6.2 DENDRÍMEROS PAMAM

Entre los dendrímeros comercializados están los de poliamidoamina (PAMAM) sintetizados por Tomalia por el método divergente (Pérez y Crooks, 2001).

En el Cuadro 8 se muestran las propiedades presentes en dendrímeros del tipo PAMAM con grupos superficiales amino.

Cuadro 8. Propiedades de los dendrímeros con terminación aminada PAMAM (Klajnert y Bryszewska, 2001)

Generación	Peso molecular	Diámetro (Å)	Grupos superficiales
0	517	15	4
1	1430	22	8
2	3256	29	16
3	6909	36	32
4	14215	45	64
5	28826	54	128
6	58048	64	256
7	116493	81	512
8	233383	97	1024
9	467162	114	2048
10	934720	135	4096

El interés por el empleo de los dendrímeros se ha incrementado en los últimos años debido a que su uso es ampliamente variado. Una de sus aplicaciones es en la catálisis a nanoescala, desarrollo de sensores químicos y micelas unimoleculares, imitación de la función de las enzimas, encapsulación de moléculas, reconocimiento molecular, agentes de diagnóstico y como vehículos para el transporte de fármacos. Un factor atractivo en estos polímeros es el hecho de que pueden ser generados con el grupo funcional que se desee de forma multivalente con lo que se incrementa su acción.

La función de los dendrímeros dependerá de los grupos funcionales que contenga, estos les permitirán ser neutros o con carga, catiónicos o aniónicos, concediéndoles diferentes características y funciones.

Se ha mencionado que los dendrímeros de gran tamaño son similares a las proteínas con la diferencia de que la estructura poli-ramificada en el interior de los dendrímeros, se forma principalmente de enlaces covalentes generando una estructura menos flexible. Estos, son capaces de adoptar formas estructurales compactas o bien extendidas (desnaturalizada) lo cual depende de las condiciones externas en que se encuentren, por ejemplo, polaridad, fuerza iónica y pH (Avnir, 1991). Por otra parte, algunas características de los dendrímeros como la longitud y amplitud de sus ramificaciones definen sus propiedades. Sus grupos

terminales en la superficie pueden actuar como reactivos o pasivos y servir como nanoplataformas polivalentes donde nuevas generaciones de dendrímeros pueden ser colocados covalentemente. Otra función de los grupos superficiales en los dendrímeros es como redes, capaces de controlar la entrada y salida de moléculas huésped en el interior del dendrímero (Tomalia, 2005).

Los dendrímeros son moléculas con alto grado de especialización, por lo que pueden aplicarse en diferentes ramas de la medicina tal como tratamiento, prevención y diagnóstico. Algunas de dichas aplicaciones se mencionan en los párrafos siguientes.

Los polímeros hiper-ramificados son capaces de participar en la transfección (introducción de material genético a células) y transvasación (transporte de material). De este modo pueden por ejemplo transportar el ARN al interior de las células (Wimmer *et al.*, 2002).

Una de las funciones muy importantes de los dendrímeros es como contenedores a nanoescala. Su centro e interior le conceden la capacidad para poseer nanoambientes bien definidos y en el caso de dendrímeros de alta generación dicho ambiente se encuentra protegido por su superficie. Las partes que caracterizan a los dendrímeros (centro, interior y superficie) pueden ser modificadas para un fin en especial. De esta manera se consigue emplearlos en diferentes aplicaciones tal como sensores dendrimericos, acarreadores de medicamentos o incluso como medicamento. Su interior puede ser empleado para interacción anfitrión – huésped y encapsulado de moléculas huésped.

Los dendrímeros PAMAM han revelado topologías que asemejan las micelas clásicas regulares. Sobre esta base, Watkins y colaboradores en 1997, desarrollaron un átomo de carbono ¹² hidrofóbico en el centro de una serie de dendrímeros PAMAM de generación 2, 3 y 4 para simular el carácter hidrofóbico e hidrofílico de una micela regular (Watkins *et al.*, 1997). La forma y densidad de los dendrímeros depende de su fuerza iónica, polaridad y pH. De este modo, los PAMAM con aminas primarias como grupos superficiales presentan una conformación extendida a valores de pH bajos. Esto sucede debido a la repulsión electrostática entre aminas terciarias protonadas en el interior y en las aminas primarias en la superficie forzando al dendrímero a que sus ramificaciones permanezcan

separadas. Por otra parte a valores de pH superiores de 9, se produce un plegamiento debido a puentes de hidrógeno entre las aminas terciarias protonadas en el interior y las aminas primarias en la superficie generando un interior más denso (Figura 16).

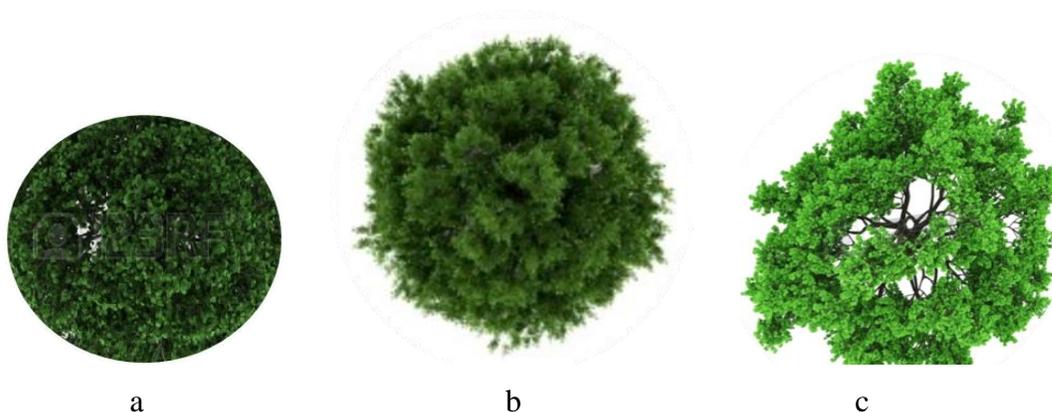


Figura16. Configuración final de un dendrímero PAMAM G6 (a) a pH alto (ninguna amina protonada), (b) pH neutro (aminas primarias protonadas) y (c) pH bajo (todas las aminas protonadas) (Lee *et al.*, 2002)

Otra función de los dendrímeros es como agentes para la transfección de genes. Los dendrímeros PAMAM han sido empleados para ello y se ha reportado que estos mejoran la transferencia de ADN por endocitosis y en núcleo celular.

Por otra parte, los dendrímeros PAMAM han sido modificados con folato en su superficie para ser utilizados como transportadores de isótopos de boro en terapias de captura de neutrones en cáncer (Shukla *et al.*, 2003). Los dendrímeros PAMAM conjugados con cisplatino actúan como un transportador macromolecular de platino, un fármaco antitumoral. Este complejo dendrímero-platino da lugar a una liberación controlada del platino, llevando a una mayor acumulación del mismo en tumores sólidos, con menor toxicidad que el cis-platino libre (Malik *et al.*, 1999). De igual manera se han generado complejos de PAMAM cargados con plata, los cuales la liberan lentamente. Se ha demostrado en estas macromoléculas la actividad antibacteriana contra varias bacterias Gram-positivas (Balogh *et al.*, 2001). De este modo la modificación de los dendrímeros (funcionalización) permite direccionarlos a células en específico. Otra opción es funcionalizarlos con ácido fólico, el cual es captado por las células por la vía del receptor de folato, que está sobre-expresado en las células tumorales. De esta manera los

dendrimeros tendrán preferencia por entrar en las células tumorales. Es decir resultan ser moléculas base conveniente para el transporte de fármacos citotóxicos. Sus uniones se basan en uniones no covalentes entre el fármaco y el dendrímero (Quintana *et al.*, 2002).

La glicodendrimerización es otra aplicación interesante de los dendrímeros. Se refiere a los fármacos basados en carbohidratos. Estos últimos son moléculas con un papel importante para el reconocimiento biológico (Boyd y Shapleigh, 1954). Los glicodendrimeros son preparados a través de la unión de aminas terminales de dendrímeros PAMAM generación (G) 3 o dendrímeros de lisina a manosa-isotiocianato o lactosa (Roy, 1996). Uno de los usos que se ha dado a los glicodendrimeros es como antígeno para vacunas. De este modo, los glicodendrimeros con el antígeno T- asociado beta Gal 1-3 alfa-GalNAc disacárido se han usado para unión a la lectina específica de galactosa (Roy, 2001). Éstos pueden ser empleados para detectar tumores que expresen receptores de antígenos T, y para acarrear fármacos hacia los mismos. De este modo, los glicodendrimeros pueden mimetizar los glicoconjugados naturales e interactuar eficientemente con los receptores carbohidrato naturales.

Por otra parte, se han realizado estudios sobre la aplicación de los dendrímeros como agentes antivirales. En este caso, el dendrímero compite con la superficie celular por la unión al virus, con lo cual las probabilidades de infección de la célula por parte de éste se ven disminuidas, Figura 17. De este modo, se ha demostrado que los dendrímeros de polilisina modificados con residuos de naftil y con grupos sulfonato en su superficie, inhiben la infección por Herpes simplex en sistemas *in vitro* (Bourne *et al.*, 2000), con esto se inhibe tanto la entrada como pasos posteriores de la replicación viral (Gong *et al.*, 2002). De igual manera, se han desarrollado estudios donde los dendrímeros PAMAM son modificados covalentemente con residuos naftil-sulfonato. Los autores mencionan que éstos son capaces de inhibir la replicación del VIH tanto a nivel de la entrada celular como en pasos posteriores, interfiriendo con la retrotranscriptasa y la integrasa (Witvrouw *et al.*, 2000).

Landers y colaboradores en el 2002, realizaron estudios sobre PAMAM funcionalizados con ácido siálico y encontraron que éstos inhiben eficientemente la infección por Influenza

AH3N2, desde luego, esta función se encuentra limitada a dicho subtipo (Landers *et al.*, 2002).

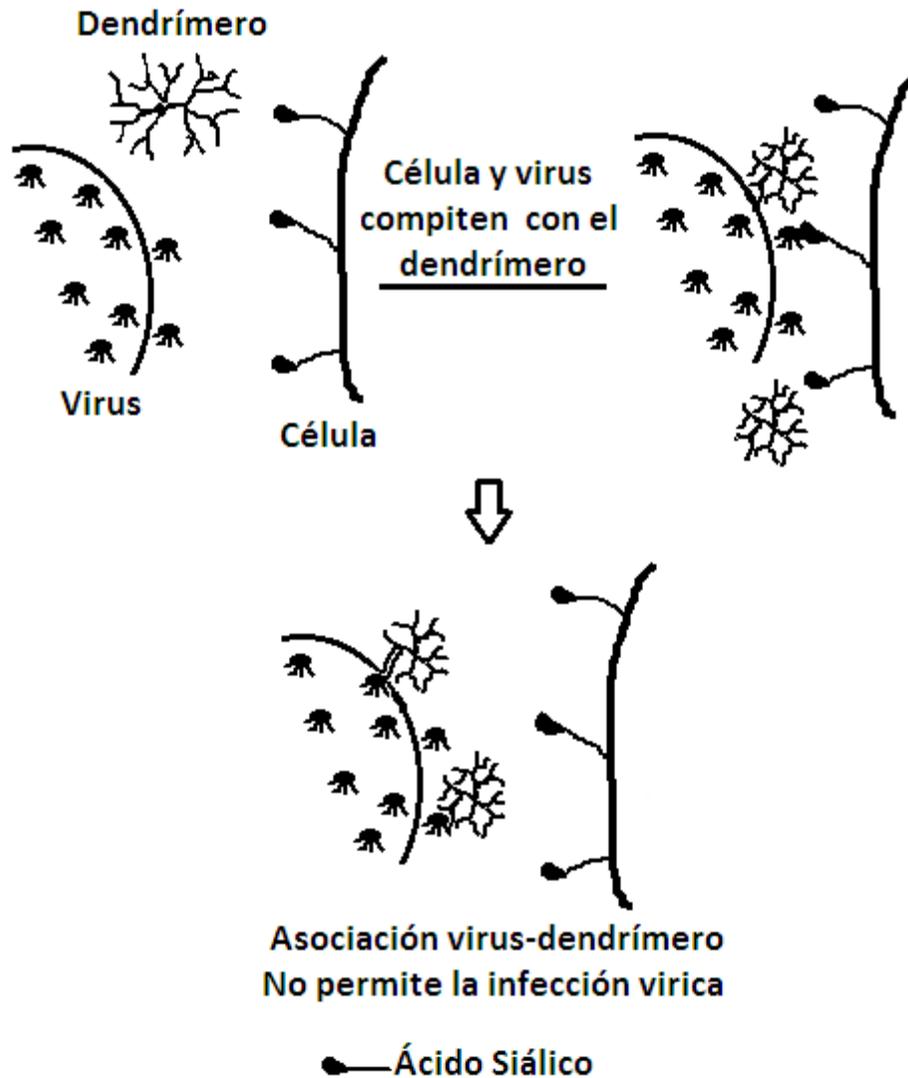


Figura 17. Mecanismo de acción de los dendrímeros como antivirales (Bourne *et al.*, 2000)

Algunos dendrímeros han sido estudiados para evaluar su función como antivirales para la prevención de infección por VIH. El dendrímtero SPL7013 Vivagel, Starpharma Pty, Ltd se está desarrollando como fórmula de aplicación tópica vaginal para impedir la infección del virus durante el acto sexual. Este dendrímtero es actualmente el primero y el único

tratamiento basado en dendrímeros que está autorizado para proceder con los ensayos clínicos por la FDA (Rupp *et al.*, 2007).

Algunos dendrímeros se encuentran en fases preclínicas, y uno en fase clínica. En el Cuadro 9 se mencionan algunas patentes mundiales de desarrollo de fármacos basados en dendrímeros por distintas instituciones, empresas farmacéuticas y empresas de biotecnología.

Cuadro 9. Patentes de dendrímeros y aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de los mismos.

Patente	Licenciario	Título	Aplicación
WO2008133954	Genzime corporation	Dendrímeros amido-amina	
WO2008121153	University of Utah	Métodos de producción y usos de los dendrímeros	Excipientes farmacéuticos
WO2008089256	Capella, Inc	Terapéutica con dendrímeros	Lesiones inflamatorias en cáncer
JP2008050283	Saitama University	Ácidos siálicos tipo tioglicósido unidos a dendrímeros	Influenza
WO2008017122	Starpharma Pty.Ltd. Baker Medical Reserch institute	Agentes de contraste de dendrímeros polilisina	
WO2008017125	Starpharma Pty.Ltd.	Agente terapéutico de dendrímero de polilisina	
WO2008011967			
DE102006035041	Patente Merck GmbH	1,4-Bis(2-tienilvinil)benzol derivados y su uso	
WO2008011047	Genzime Corp.	Dendrímeros aminados	Hiperfosfatemia
WO2008008483	University of Michigan	Métodos de producción y usos de los dendrímeros	Diagnóstico de cáncer
WO2007149500	Dendritic nanotechnologies, Inc.	Formulaciones conteniendo dendrímeros híbridos	

En el cuadro 10 se puede apreciar la diversidad de aplicaciones de los dendrímeros. Se presentan algunos ejemplos de dendrímeros que se encuentran en fase preclínica o clínica más avanzada.

Cuadro 10. Fases clínicas y preclínicas de los dendrímeros en los que se busca una aplicación terapéutica, diagnóstica o preventiva.

Fase	Código	Producto	Aplicación	Mecanismo de acción
Clínica I	SPL 7013	Dendrímero	Prevención HIV y herpes genital	Antiviral tópico vaginal
Preclínica	DAB-Am64-(1B4M-Gd)64	Complejo dendrímero-gadolinio	Diagnostico por RMN de cáncer hepatobiliar	
Preclínica		Dendrímeros	Fármacos oncolíticos	
Preclínica		Dendrímeros	Fármacos oncolíticos	
Preclínica	pGEG.Fas L		Terapia génica	Terapia cáncer de próstata
Diagnóstico biológico	C3d	Dendrímeros	Diabetes tipo 1	Agentes neurotróficos
Preclínica	FGL-4 FGL-D	Dendrímeros	Tratamientos ictus y desordenes cognitivos	Activadores FGFR1
Preclínica	BD-C225 C225-G5-B1100	Dendrímeros radiosensibilizantes	Fármacos oncolíticos	
Preclínica	Gd-D1	Complejos dendrímero-Gadolinio	Agentes para RMN	
Diagnóstico biológico		Dendrímeros	Tratamiento trastornos renales e hiperparatoidismo	

Es importante hacer notar que los dendrímeros tienen una enorme aplicación también en otros campos tales como la cosmética, electrónica, fotónica, industrias químicas, entre otros. En lo que respecta a la industria química, una de las funciones de los dendrímeros es como agente quelante para iones metálicos y se aplica para catálisis o bien para remediación de desechos. La alta densidad de ligandos nitrógeno en los dendrímeros PAMAM y la posibilidad de colocar sobre su superficie diferentes grupos funcionales tales como carboxilos, hidroxilos, etc, les concede dicha propiedad (Diallo *et al.*, 2004).

Los dendrímeros PAMAM han sido utilizados para remover cobre de suelo arenoso contaminado. Éstos son de diversas generaciones y grupos funcionales. De esta manera, mas del 90% de cobre presente en una muestra de tierra fue removido empleando dendrímeros PAMAM de la generación 4.5 con superficie carboxilada a pH 6.0 (Xu y Zhao, 2005). Por otra parte, también se han realizado estudios sobre el uso de dendrímeros unidos a Cu(II) para ultrafiltración. Los autores mencionan que el dendrímero solo tenía una pequeña tendencia a ensuciar la membrana de celulosa (Diallo *et al.*, 2005).

Otra aplicación que se ha dado a los dendrímeros es en el ámbito de la electroquímica. Se han desarrollado sensores para detectar compuestos orgánicos tales como los iodados. Para ello, emplearon un electrodo de oro el cual fue modificado inicialmente con tioles y después con el dendrímero, electrostáticamente. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad comparada a cuando no se realizó dicha modificación (Ledesma-García *et al.*, 2003). Los dendrímeros son capaces de interactuar de manera específica con moléculas de interés generando bajos límites de detección.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica, permite la detección y cuantificación de acrilamida en alimentos mediante su electropolimerización sobre electrodos conteniendo grupos carboxílicos en su superficie, de manera rápida, segura en cuanto a toxicidad y confiable.

4. JUSTIFICACIÓN

La generación de acrilamida en alimentos es muy frecuente y su presencia es causa de enfermedades posteriores. Es por esto que es importante desarrollar una técnica que logre detectar cantidades trazas de este compuesto de manera fácil, económica, segura y rápida. De acuerdo a todo lo anterior la electropolimerización, que involucra la adsorción de monómeros sobre la superficie del electrodo, puede ser un método eficaz en la detección y cuantificación de AA empleando electrodos con grupos carboxilos en su superficie que al ser oxidados generarán radicales libres capaces de iniciar la polimerización electroquímica del monómero. Por lo que se propone en el presente proyecto el desarrollo de esta técnica mediante voltamperometría cíclica para el análisis de AA en muestras de papas fritas, aplicando el uso de tres electrodos de trabajo diferentes a fin de conocer el de mejor respuesta (carbón vítreo, electrodos impresos de carbono modificados con nanotubos de carbono pared única funcionalizados con grupos carboxilos y carbón vítreo modificado con dendrímeros PAMAM de terminación carboxilada). La papa es uno de los alimentos que al ser procesados a temperaturas arriba de 120°C generan mayor cantidad de acrilamida, motivo por el cual se propone para el análisis en muestra real.

5. OBJETIVO GENERAL

Análisis, detección y cuantificación rápida, confiable y segura de acrilamida en alimentos mediante voltamperometría cíclica.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análisis de Acrilamida (AA) mediante la celda convencional, empleando carbón vítreo como electrodo de trabajo, anodizado y sin anodizar.
- Estudio de la respuesta electroquímica del monómero mediante el sistema convencional empleando electrodos de carbón modificado con dendrímeros de terminación carboxilada (G3.5 y G4.5)
- Observación del comportamiento electroquímico del monómero sobre electrodos impresos (NTbCPS)
- Detección y cuantificación de acrilamida en papas fritas mediante la técnica electroquímica empleando el electrodo de mejor respuesta en el análisis del estándar y HPLC.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 REACTIVOS

Los solventes y reactivos fueron de grado analítico y se adquirieron de J. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, U.S.A). La AA fue obtenida de Sigma Aldrich (St. Louis MO, U.S.A.). El agua empleada fue purificada usando un sistema Milli-Q, 18.2 $M\Omega\text{cm}^{-1}$.

7.2 MÉTODOS

7.2.1 MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

Los análisis electroquímicos se desarrollaron con un potenciostato Bas Epsilon mediante la técnica de voltamperometría cíclica. Se usó una celda convencional de tres electrodos con carbón vítreo y carbón vítreo modificado con dendrímeros PAMAM G3.5 y G4.5 como

electrodos de trabajo, en ambos casos contra un electrodo de Ag|AgCl. El electrodo de carbón vítreo se limpió mediante inmersión en mezcla crómica y enjuague con HNO₃ al 10%, posteriormente se realizó un pulido con alúmina 0.05 μM y se enjuagó con agua deionizada. Este procedimiento se realizó antes y después de cada análisis. Posterior al tratamiento de limpieza se desarrolló un anodizado mediante cronoamperometría, con el fin de incrementar los grupos carboxilatos en la superficie. Un sistema de tres electrodos conteniendo H₂SO₄ 0.5 M fue empleado incluyendo Ag|AgCl como referencia y un alambre de platino como contador. Se aplicó un potencial de 2000 mV durante 60 minutos. Al término del anodizado, se realizó una voltamperometría cíclica (VC) en H₂SO₄ 0.5 M en ausencia de AA y posteriormente en presencia de concentraciones conocidas del monómero (50 μM a 5 mM) en ambos casos se aplicó una ventana de potencial que va desde el potencial a circuito abierto (pca) hasta 2000 mV y una velocidad de barrido de 20 mV/s.

La modificación con dendrímeros sobre el electrodo de carbón vítreo se realizó de la siguiente manera: el electrodo se limpió y anodizó tal como se menciona antes y posteriormente se realizó una cronoamperometría en una celda de tres electrodos conteniendo una solución de hidroximetil aminometano (HOCH₂)₃CNH₂ (TRIS) y KClO₄, el electrodo de Cv anodizado, un alambre de platino y un electrodo de Ag|AgCl, como referencia. La cronoamperometría se realizó aplicando un potencial de 2 V durante una hora, todo esto con el fin de tener un electrodo funcionalizado con grupos aminos para que estos pudieran unirse a los dendrímeros con terminación carboxilada. De este modo, una vez terminado este proceso, el electrodo se modificó con el dendrímero mediante inmersión en una solución dendrimerica en metanol a una concentración de 80 μN (1.25μM), conteniendo etilencarbodiimida (EDC), que permitió la unión covalente a los grupos aminos del electrodo. El tiempo de inmersión fue de 12 horas.

Por otra parte, se emplearon electrodos serigrafiados modificados con una capa de nanotubos de carbono funcionalizados con grupo carboxilos (NTbCPS), (COOH-SWCNT-SPEs, Type: 110-SWCNT, DropSens, Oviedo, España) contra un electrodo de plata. Este electrodo se compró de la compañía DropSens y antes de ser usado por primera vez, se activó electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica a 1V 100 ciclos en presencia de una gota de 50 μL de H₂SO₄ 0.5 M. Después de la activación se realizó

voltamperometría cíclica en un barrido de potencial de 0 a 2000 mV a 20 mV/s tanto en el blanco (0.5 M H₂SO₄) como en presencia de diferentes concentraciones de AA (50, 150, 200, 300 μM y 2, 4 y 8 mM).

El apasivamiento del electrodo por la adición de AA a NTbCPS se siguió mediante experimentos de CV en una solución 0.5 M H₂SO₄ conteniendo cantidades equimolares de soluciones 1mM de K₃Fe(CN)₆ y K₄Fe(CN)₆ a 25°C.

Para la detección y cuantificación del monómero en el extracto de papas fritas, se tomaron 500 μL del extracto y se adicionó 2 mL de H₂SO₄, una gota de 50 μL de esta dilución fue colocada sobre el electrodo serigrafiado y analizada mediante VC bajo las condiciones antes mencionadas.

7.2.2 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Los espectros Raman fueron obtenidos con un DXR Microscopio Raman (Thermo Scientific) equipado con un láser de 14 mW, bajo una longitud de onda de excitación de 780 ± 0.2 nm. Los espectros fueron registrados a temperatura ambiente empleando un 70% de la potencia del láser (~10mW) y un corte de apertura de 50 μm. El análisis se realizó sobre los electrodos impresos NTbCPS con y sin AA adsorbida.

7.2.3 EXTRACCIÓN DE AA DE MUESTRAS DE PAPAS FRITAS

Las papas de variedad *Ciana*, cosechadas en su estado de madurez en Aculco estado de México, fueron lavadas, peladas y cortadas en rodajas delgadas. Posteriormente se sometieron a un proceso de fritura a temperatura de 170 °C durante 5 min a fin de asegurar la presencia de acrilamida. La extracción del monómero se realizó de acuerdo al método establecido por Zargar y col. en el 2009, con algunas variantes. Brevemente, 18 g de muestra fueron desgrasados con 40 mL de hexano, agitando por 5 min y removiendo el solvente por decantación. El proceso se repitió cuatro veces y el sólido remanente se secó a vacío. La extracción de AA se realizó mediante la adición de una mezcla de agua y acetona (40 mL cada solvente) al sólido seco y se mantuvo en ultrasonido a 40 °C por 20 min. El material fue filtrado, el residuo sólido desechado y el solvente removido por rotaevaporación. El

extracto se disolvió en 3 mL de agua y la solución fue filtrada con un acrodisco para ser analizada HPLC.

7.2.4 ANÁLISIS DE AA POR HPLC

El análisis mediante HPLC-DAD fue realizado en un equipo de la marca Waters, con un arreglo de detección de fotodiodos usando una columna C-18 (300 mm x19 mm i.d.). Se empleó un Loop de inyección de 50 μ L. La fase móvil empleada fue agua/acetonitrilo 96:4 (v/v). El método fue desarrollado en modo isocrático: Una proporción 96:4 (v/v) por 10 min; 50:50 (v/v) desde el minuto 15 hasta el minuto 20 y finalmente 96:4 (v/v). El tiempo total del análisis fue de 40 min a 0.8 mL/min. Para la cuantificación de AA por este método, se realizó una curva de calibración del monómero, para lo cual se analizó a diferentes concentraciones (50, 100, 150 y 200 μ M).

7.3 RESULTADO Y DISCUSIÓN

7.3.1. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE AA SOBRE EL ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO

La voltamperometría cíclica realizada en el H_2SO_4 empleando un electrodo de carbón vítreo anodizado y sin anodizar, muestra como respuesta una señal de oxidación a 1500 mV (Figura 18). La respuesta se debe a que los grupos carboxilos presentes en la superficie del electrodo, son oxidados durante la polarización anódica bajo este sistema. El carbón vítreo sin anodizar contiene grupos carboxilos no funcionalizados, por esta razón y con la intención de incrementarlos, se realizó un anodizado como se describió anteriormente. Posterior a este tratamiento se obtuvo una voltamperometría cíclica en H_2SO_4 0.5M para analizar el resultado. Los grupos carboxilos se incrementaron después del tratamiento electroquímico, esto se puede observar en la Figura 18 donde se muestran los voltamperogramas cíclicos sobrepuestos del electrodo anodizado y sin anodizar. La corriente detectada en la señal de oxidación de los carboxilos (1500 mV) es directamente proporcional a su concentración, esta corriente resultó mayor cuando el análisis se realizó con el electrodo anodizado, lo cual indica que la cantidad de carboxilatos presentes en la

superficie es mayor cuando se realiza el tratamiento electroquímico previamente, esto permite una mayor área superficial y con ello una mejora en la sensibilidad.

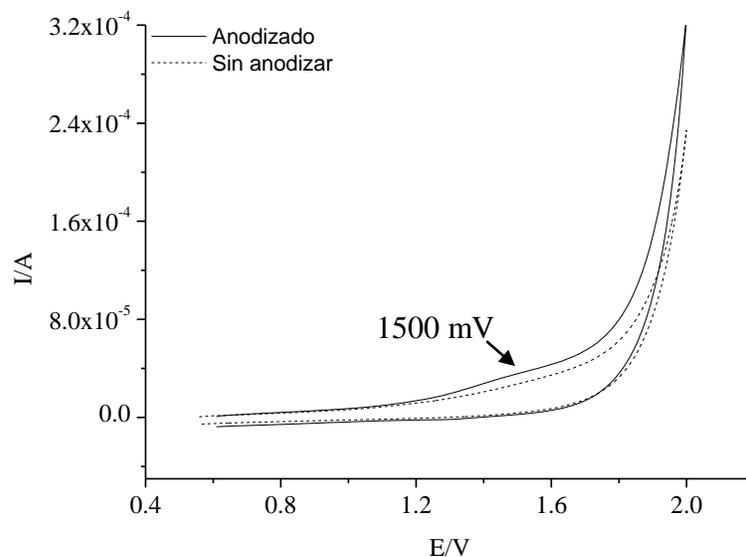


Figura 18. Voltamperograma cíclico de H_2SO_4 0.5M. Electrodo de trabajo: carbón vítreo, electrodo de referencia $\text{Ag}|\text{AgCl}$. El gráfico en línea sólida corresponde al análisis con el electrodo anodizado, el gráfico en línea punteada se realizó con el electrodo sin anodizar. $E_1 = \text{Pca}$ (580 mV), $E_2 = 2000$ mV, velocidad = 20 mV/s.

La oxidación de los grupos carboxilatos genera radicales libres, los cuales son capaces de reaccionar químicamente con la AA y adsorberla en la superficie del electrodo. La Figura 19 muestra los voltamperogramas sobrepuestos de la respuesta del ácido sulfúrico 0.5 M (Blanco) y de la adición de diferentes concentraciones de AA (0, 25 μM , 1, 2, 3 y 4 mM). Como puede observarse, conforme se incrementa la concentración de AA, la corriente de la señal de oxidación presente a 1500 mV en el blanco, se observa disminuida, posiblemente debido a un bloqueo del área superficial por parte de la AA adsorbida que inactiva los grupos carboxilatos. La concentración de AA podría ser investigada desarrollando una curva de calibración que refleje la corriente disminuida según la cantidad del estándar de AA escaneado, sin embargo la caída de corriente observada en este sistema es demasiado rápida y sin diferencias claras entre cada concentración. La superficie del electrodo es fuertemente pasivada desde la menor concentración de AA adicionada a la solución de análisis (25 μM).

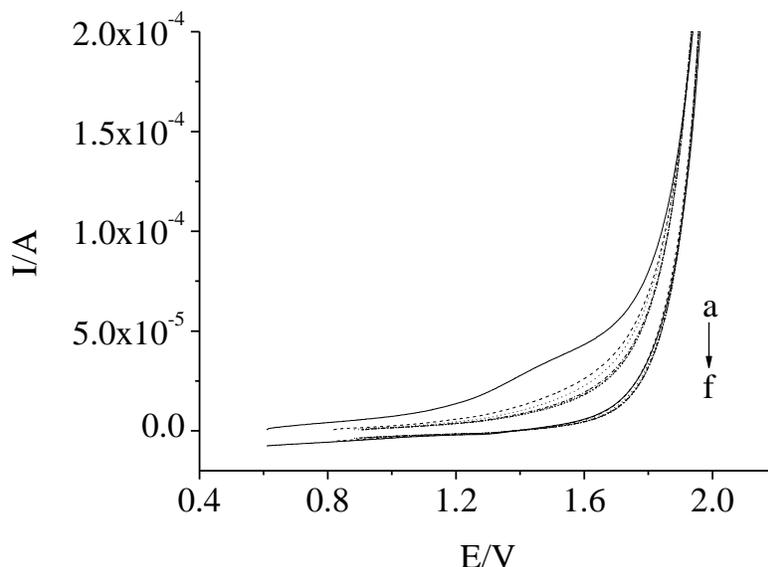


Figura 19. Voltamperograma cíclico de H_2SO_4 0.5 M (Bco) y del H_2SO_4 en presencia de diferentes concentraciones de AA sobre un electrodo de carbón vítreo anodizado y contra un electrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}$. a) 0, b) 25 μM , c) 1 mM, d) 2 mM, e) 3 mM y f) 4 mM. $E_1=\text{Pca}$, $E_2=2000$ mV, velocidad=20 mV/s.

7.3.2 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE AA SOBRE EL ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO MODIFICADO CON DENDRÍMEROS

Debido a la ineficiencia de los resultados obtenidos cuando se empleó el electrodo de carbón vítreo sin anodizar y anodizado, fue necesario el estudio de un mejor sistema de análisis. Dado que la oxidación de grupos carboxilos es el paso determinante para que se realice la adsorción de AA en la superficie del electrodo (Shapoval y Gorodyskii, 1973), la existencia de estos grupos funcionales en la superficie del electrodo es indispensable, por consecuencia, podría pensarse que si están presentes en elevadas concentraciones, el bloqueo de los centros activos en presencia del monómero podría ser menos desfavorable. La modificación del CV con dendrímeros Poliamidoamina (PAMAM) de terminación carboxilada, es capaz de proveer un área superficial con mayor concentración de carboxilatos. De acuerdo a lo anterior, se realizó una modificación de la superficie del electrodo de carbono con dendrímeros de generación 3.5 y 4.5 con terminación carboxilada, posteriormente se empleó la voltamperometría cíclica para conocer su comportamiento electroquímico en el blanco (H_2SO_4) y en diferentes concentraciones de AA (25 μM a 4 mM).

La Figura 20 muestra una comparación entre la respuesta electroquímica del blanco (H_2SO_4 0.5 M) analizado con el electrodo modificado con G3.5 y con el electrodo sin anodizar y anodizado. Los resultados muestran un claro incremento en la corriente de oxidación a 1500 mV cuando el electrodo es modificado. Este hecho es un indicio de una buena adsorción del polímero y por consecuencia de un incremento de los grupos carboxilos periféricos.

La Figura 21 muestra la respuesta electroquímica de diferentes concentraciones de acrilamida empleando un electrodo modificado con G3.5. Los resultados muestran que la modificación con dendrímeros carboxilados mejora la adsorción gradual de AA sobre el electrodo, de otra manera la disminución de la corriente observada es casi total en la primera adición del monómero. Por otra parte, también podemos observar que a partir de la adición de AA a 200 μM , la respuesta electroquímica no cambia. Fue necesario investigar una modificación cuya respuesta a la adsorción de AA fuera aún más lenta.

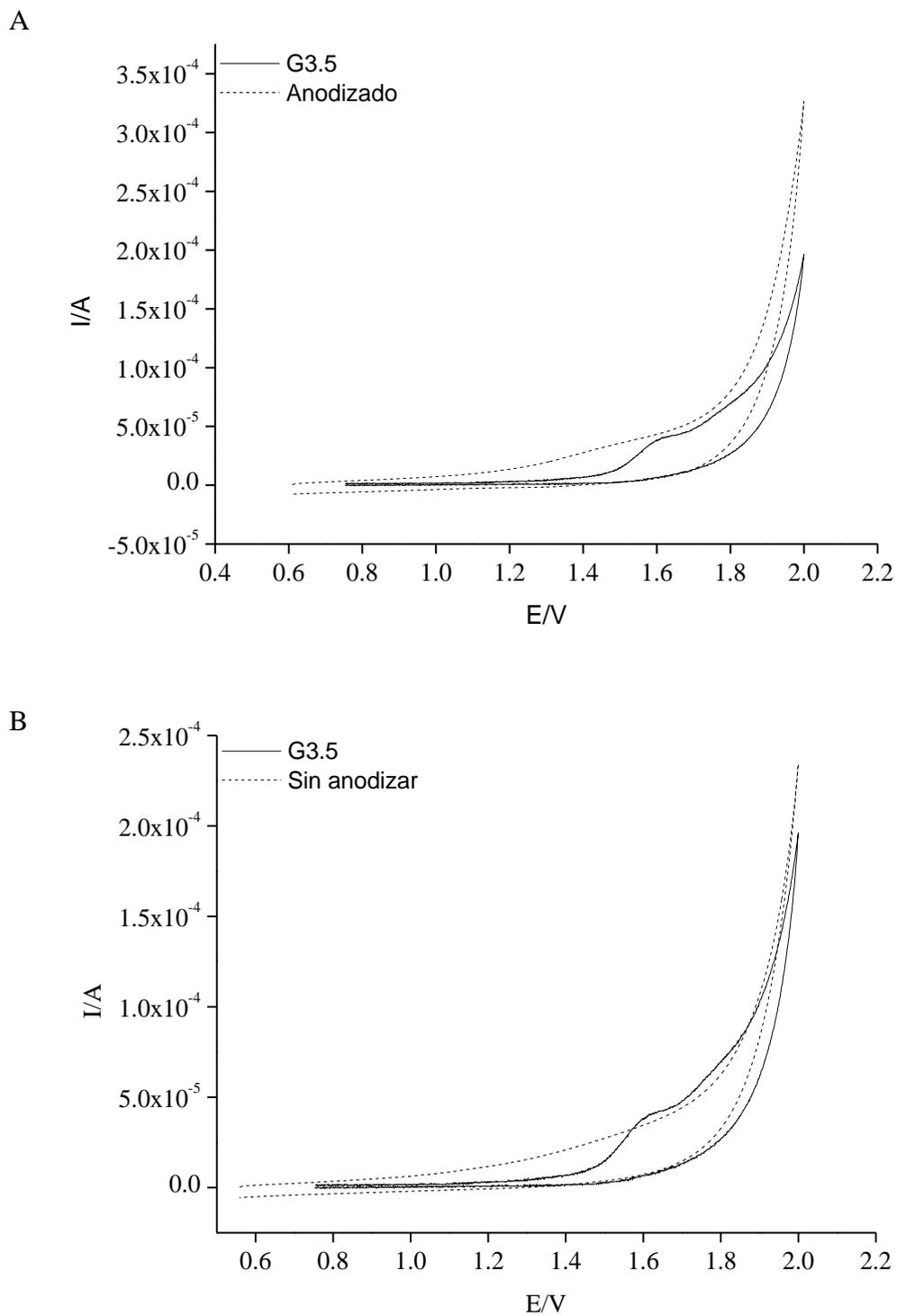


Figura 20. Voltamperograma cíclico de H_2SO_4 0.5 M analizado con el electrodo (CV) modificado con G3.5 y con CV únicamente anodizado (A) y sin anodizar (B). Los análisis fueron realizados contra un electrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}$, con una ventana de potencial iniciando desde el pca hasta 2000 mV a 20 mV/s.

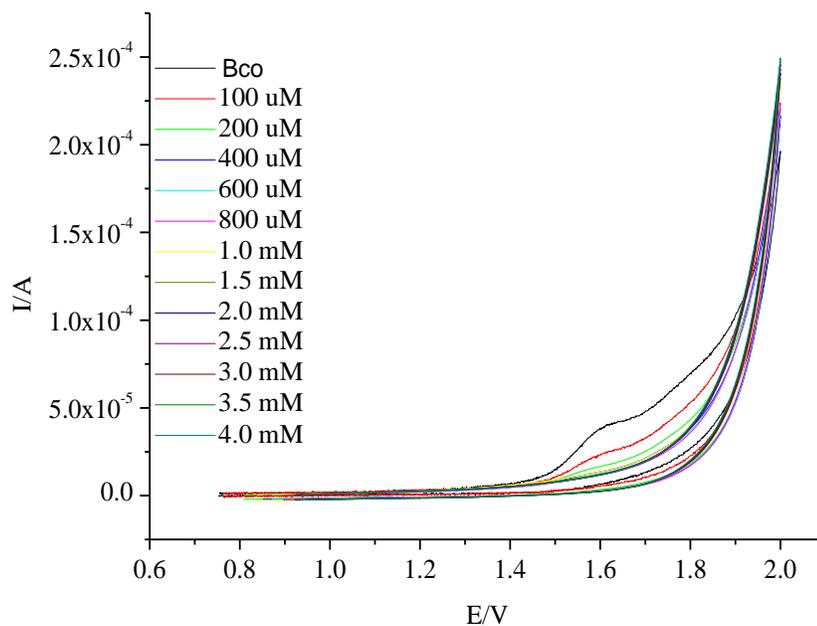


Figura 21. Voltamperograma cíclico de H_2SO_4 0.5 M puro y con AA a diferentes concentraciones (100 μM -4 mM) empleando un electrodo de carbón vítreo modificado con dendrímero de generación 3.5 contra un electrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}$, Ventana de potencial: pca-2000 mV a 20 mV/s.

En la búsqueda de un mejor sistema para el análisis de AA, se realizó una modificación del electrodo de carbón vítreo con dendrímeros de generación 4.5, que implica un análisis con mayor número de grupos carboxilos en la periferia. Este proceso se desarrolló de la misma manera que en la modificación con G3.5. A pesar de mostrarse un incremento en la corriente de oxidación de los carboxilatos comparado a cuando se realizó el análisis con CV/G3.5, Los resultados no muestran una mejor respuesta (Figura 22).

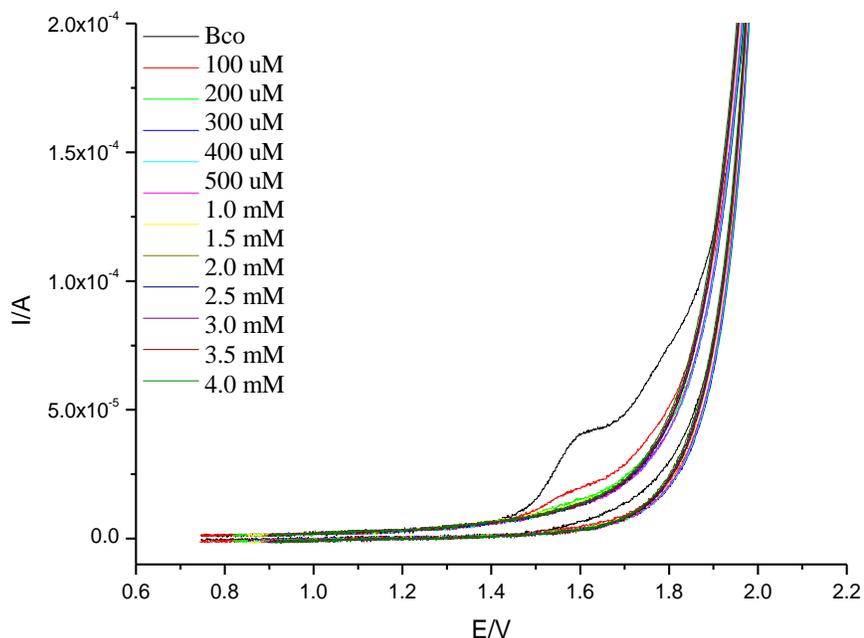


Figura 22. Voltamperograma cíclico de H_2SO_4 0.5 M puro y con AA a diferentes concentraciones (100 μM – 4 mM) empleando un electrodo de carbón vítreo modificado con dendrímero de generación 4.5 contra un electrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}$. Ventana de potencial: pca-2000 mV a 20 mV/s.

Se realizó un análisis donde se comparan los resultados de concentración contra relación de corriente a fin de apreciar las pendientes resultantes con los diferentes tratamientos en el electrodo de carbón vítreo. En la Figura 23 se muestra la respuesta. Como puede observarse, una mayor pendiente se obtiene con el electrodo de carbón vítreo modificado con el dendrímero de generación 3.5 lo cual indica que el sistema más eficiente para el estudio de AA es el que emplea dicho electrodo.

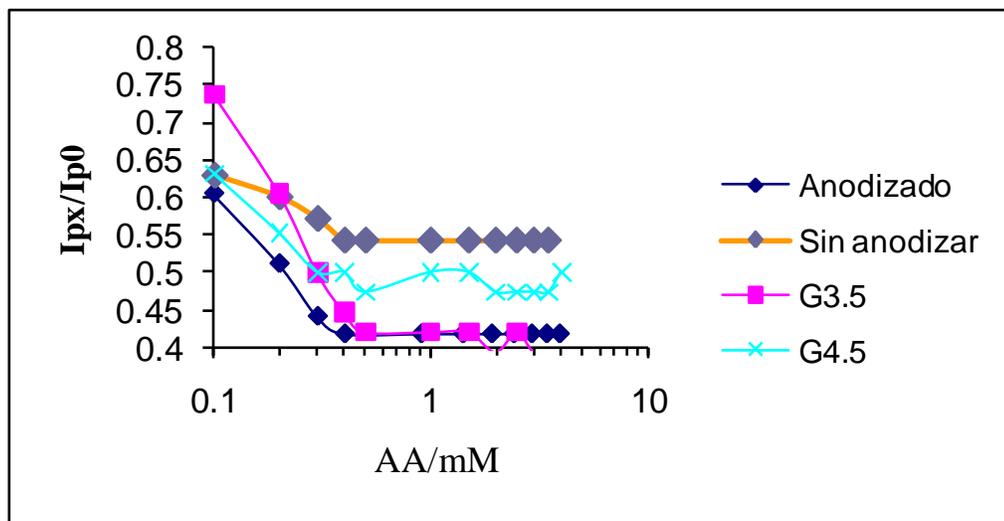


Figura 23. Comparación de las pendientes obtenidas con los diferentes tratamientos y modificaciones sobre el electrodo de carbón vítreo.

Estos resultados parecían prometedores, sin embargo el análisis con el electrodo de carbón vítreo anodizado o modificado con dendrímeros, resultó ser un sistema que carece de reproducibilidad por lo que se ha descartado como una propuesta eficiente para determinar y cuantificar AA. Probablemente esto se debe a que tanto el tratamiento de anodizado como el proceso de limpieza exhaustivo debido a una fuerte adsorción del monómero, eran lo suficientemente agresivos como para generar áreas superficiales muy diferentes en cada ocasión. Por otra parte se observó una importante degradación de los electrodos conforme se les aplicaban estos tratamientos.

7.3.3 ANÁLISIS DE AA SOBRE ELECTRODOS IMPRESOS NTbCPS

En el análisis del blanco (H_2SO_4), la perturbación del sistema a potenciales altos sobre los electrodos serigrafiados, produjo la oxidación de los grupos carboxilos de la misma manera que cuando se usó CV como electrodo de trabajo. A diferencia de los voltamperogramas obtenidos con la celda convencional, los resultantes con los serigrafiados (Figura 24), no presentan señal de oxidación, sin embargo muestran dos señales catódicas a 924 y 390 mV que corresponden a la reducción de los productos de oxidación de los grupos carboxilos.

Por otra parte, la oxidación de los carboxilatos, produce la electrogeneración de radicales $-COO^\bullet$ (Walker y Hathway, 1977) los cuales, en presencia de la AA reaccionan

química con el monómero y la adsorben en la superficie del electrodo. En el barrido en sentido catódico, la AA es reducida y su polimerización es generada. Es por esto que en la respuesta del análisis de la AA a diferentes concentraciones (50 a 200 μM) se observa que mientras los picos de reducción a 924 y 390 mV permanecen sin cambio significativo, una nueva señal de reducción a 1200 mV se incrementa en corriente de manera proporcional a su concentración (Figura 25). Según la ley de Faraday, el incremento de la corriente se debe a un incremento en la cantidad de materia transformada. De esta manera, por medio de esta técnica analítica fue posible detectar y cuantificar el monómero. La Figura 26 muestra los voltamperogramas sobrepuestos del proceso de electropolimerización de AA a diferentes concentraciones, en el intervalo de 300 μM - 8 mM, en este caso la variación de corriente con respecto a la concentración de AA es opuesta a la mostrada cuando el rango de va de 50 a 200 μM . Esto puede deberse a que quizá a concentraciones más altas el monómero produce una película sobre la superficie del electrodo y por consiguiente hay un incremento de la resistencia en la interface y por consecuencia la corriente es disminuida. Estos resultados nos llevan a deducir que la AA polimeriza en la superficie del electrodo y que su cuantificación por este método es posible.

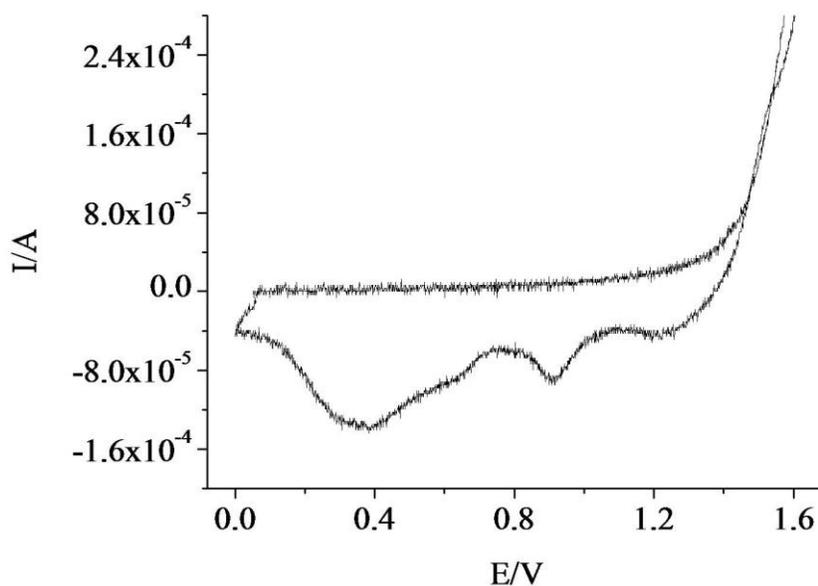


Figura 24. Voltamperograma cíclico del ácido sulfúrico 0.5M, Blanco, sobre un electrodo impreso de carbono modificado con nanotubos de carbono de pared sencilla.

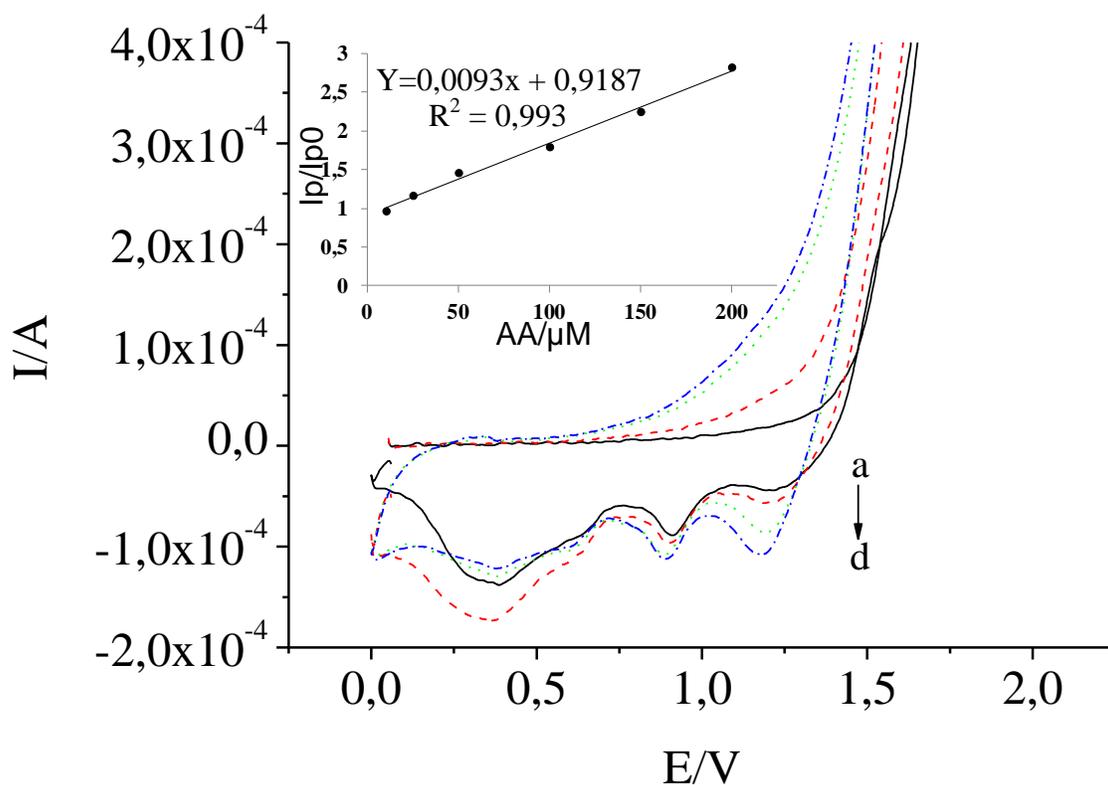


Figura 25. Voltamperograma cíclico sobre electrodos impresos (NTbCPS) en presencia de diferentes concentraciones de AA. Electrolito: H_2SO_4 0.5M, concentración del analito: a) 0 μM , b) 50 μM , c) 150 μM , d) 200 μM

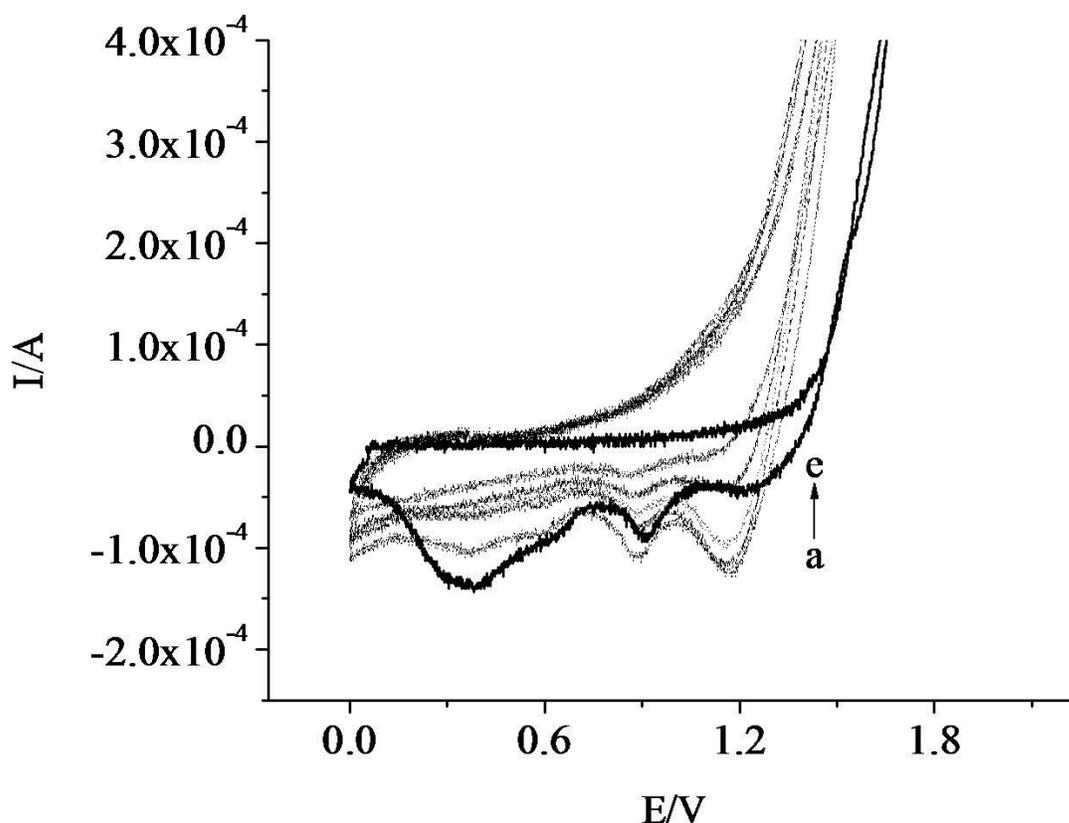


Figura 26. Voltamperograma cíclico en presencia de diferentes concentraciones de AA sobre los NTbCPS. Electrolito: H_2SO_4 0.5M, concentración del monómero: a) 300 μM , b) 2 mM, c) 4 mM, d) 6 mM, e) 8mM, línea sólida gruesa: blanco.

Existen dos posibilidades acerca del mecanismo por el cual la AA se adsorbe sobre los electrodos serigrafiados. Una es a través del ataque del radical sobre el carbono $\alpha\beta$ -insaturado de la molécula, de esta manera los grupos aminos estarían expuestos en la superficie con una densidad de carga positiva δ^+ . La otra opción es a través de una reacción entre el radical y el nitrógeno que se encuentra presente en el grupo amino de la AA (Reacción de adición de Michael) en este caso los grupo expuestos serían carbonilos con densidad de carga neutra. A fin de definir este mecanismo, se realizó voltamperometría cíclica, de una mezcla equimolar (1 mM) de ferrocianuro de potasio con ferricianuro de potasio cuyo comportamiento es ampliamente conocido. Esta molécula tiene una densidad de carga negativa, por lo que si el electrodo modificado con AA presentara grupos aminos expuestos, la corriente de pico de la especie electroactiva en la solución debe ser favorecida debido al hecho de que la atracción entre cargas opuestas debe mejorar la transferencia

electrónica, mientras que si los grupos expuestos son carbonilos y por consiguiente con densidad de carga neutra, ninguna diferencia debe esperarse en el comportamiento electroquímico del par ferro-ferri. Los resultados se muestran en la figura 27, donde puede observarse que las corrientes de pico son incrementadas cuando se emplea el electrodo modificado con AA. Esto indica que el mecanismo de reacción corresponde al ataque del radical sobre el carbono α -insaturado de la molécula, produciendo superficies funcionalizadas con grupos $-\text{NH}_3^+$. La adsorción del monómero se comprobó también mediante los estudios RAMAN realizados sobre los serigrafiados después de haber sido tratados con $200 \mu\text{M}$ de AA, estos resultados se exponen más adelante.

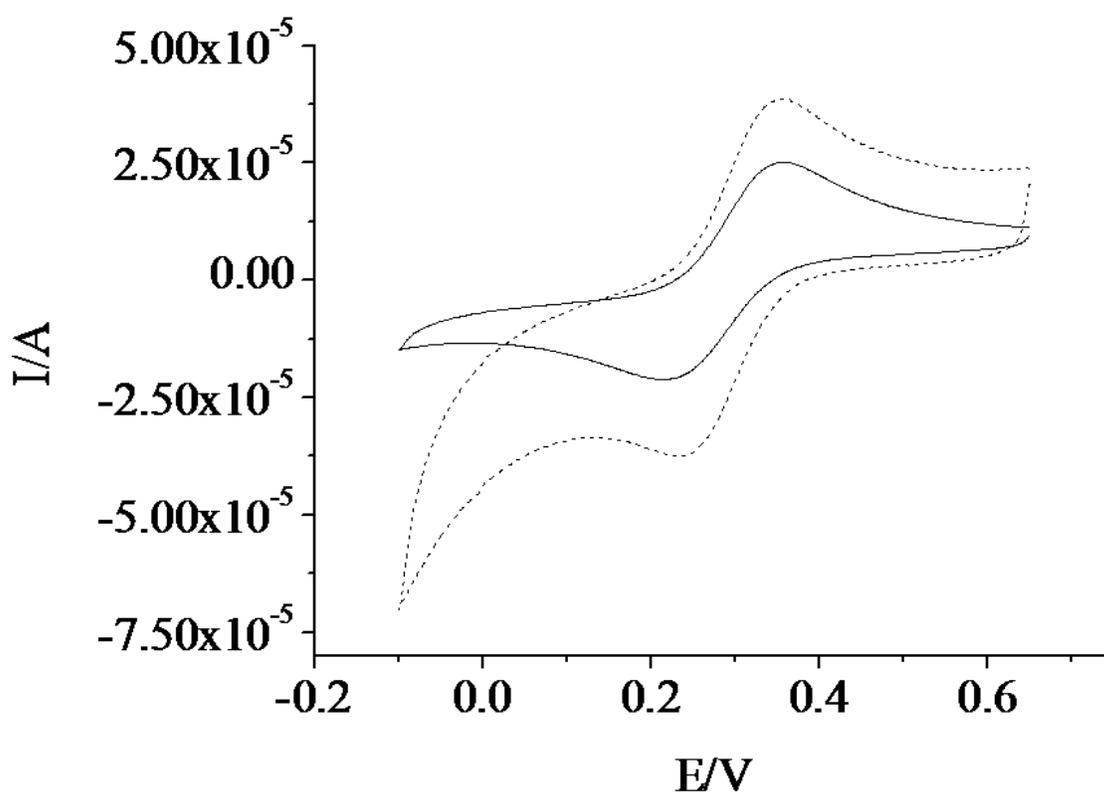


Figura 27. Voltamperograma cíclico de la molécula $(\text{FeCN})_6^{-3}/(\text{FeCN})_6^{-4}$ sobre un electrodo de NTbCPS (línea sólida) y uno de NTbCPS con acrilamida adsorbida a $200 \mu\text{M}$ (línea punteada)

7.3.4 ESTUDIO DE INTERFERENCIAS EN EL ANÁLISIS ELECTROQUÍMICO DE AA EMPLEANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS (NTBCPS)

El análisis de interferencias, es un aspecto importante en el estudio de técnicas de detección. En este proyecto se analizaron algunos compuestos que pueden estar presentes en el extracto de papas fritas, tal como asparagina, glucosa, iones de K, y ácido acrílico (Ac). Las Figuras 28 y 29 muestran los voltamperogramas de la mezcla equimolar (50 μM) de AA con Asparagina y glucosa, respectivamente. En ambos casos, el comportamiento electroquímico no muestra algún cambio significativo sobre la respuesta de la AA. La misma tendencia fue observada cuando el análisis se realizó con K^+ .

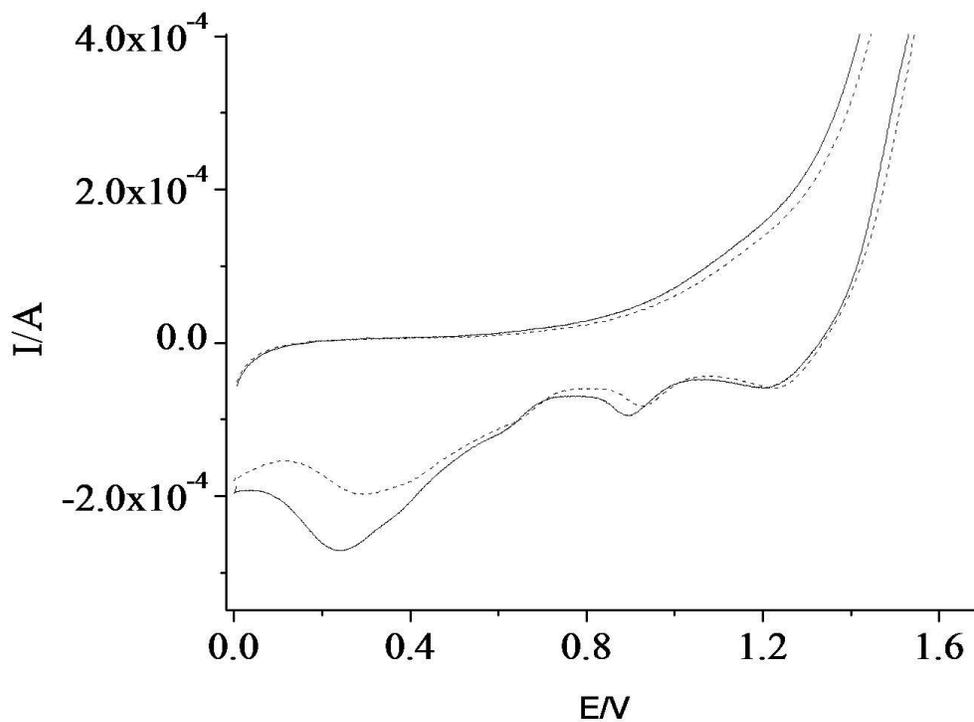


Figura 28. Voltamperograma cíclico de AA (línea sólida) y de la mezcla equimolar de asparagina y AA (línea punteada).

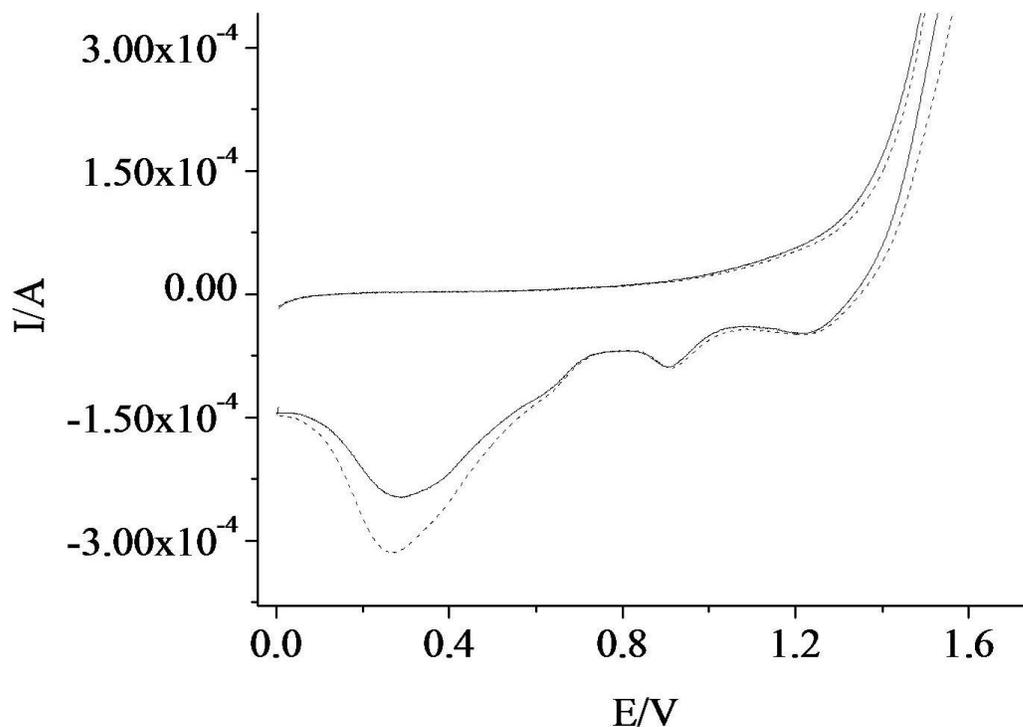


Figura 29. Voltamperograma cíclico de AA (línea sólida) y de la mezcla equimolar de glucosa y AA (línea punteada).

La Figura 30, muestra la respuesta electroquímica de AA y Ac, ambos a $50 \mu\text{M}$ y una mezcla equimolar AA-Ac ($50 \mu\text{M}$). El comportamiento electroquímico del Ac es el mismo que el de la AA, sin embargo, cuando su mezcla es analizada, el voltamperograma es igual al banco, es decir, la señal de reducción perteneciente al monómero desaparece, lo cual puede observarse en la Figura 31. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos mediante espectroscopía Raman (Figura 32) Las bandas D y G, características para los NTbCPS, no son doblemente incrementadas en el análisis de la mezcla equimolar como se podría esperar debido a su similitud en estructura teniendo como única diferencia el grupo amino de la AA y el hidroxilo del Ac. El estudio por separado de estos compuestos produce intensidades menores en las bandas obtenidas con el Ac adsorbido que con la AA, a pesar de ser estudiados a la misma concentración. Ambos compuestos, en medio ácido, se polimerizan sin la necesidad de la aplicación de algún potencial de oxidación o reducción. Cuando en el mismo medio se encuentra presente una mezcla AA-Ac, el Ac polimeriza más rápido y forma co-polimeros con la AA. Esta es quizá la razón por la cual una mezcla de ellos no permite la electro-polimerización de AA ya que antes del proceso electroquímico

se realiza la co-polimerización química en el seno de la solución, lo cual ocasiona que la AA no sea totalmente adsorbida y por consiguiente su reducción electroquímica no se lleve a cabo.

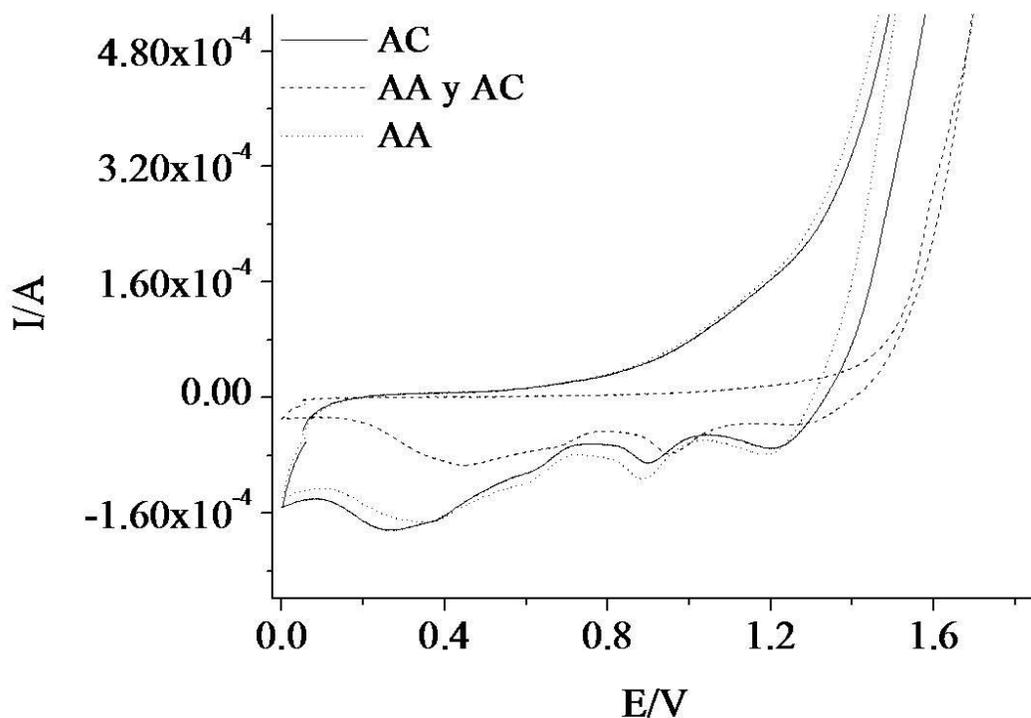


Figura 30. Voltamperograma cíclico de AA (línea punteada), AC (línea sólida) ambos a $50 \mu\text{M}$ y mezcla equimolar ($50 \mu\text{M}$) de AA y acrílico (línea en guiones).

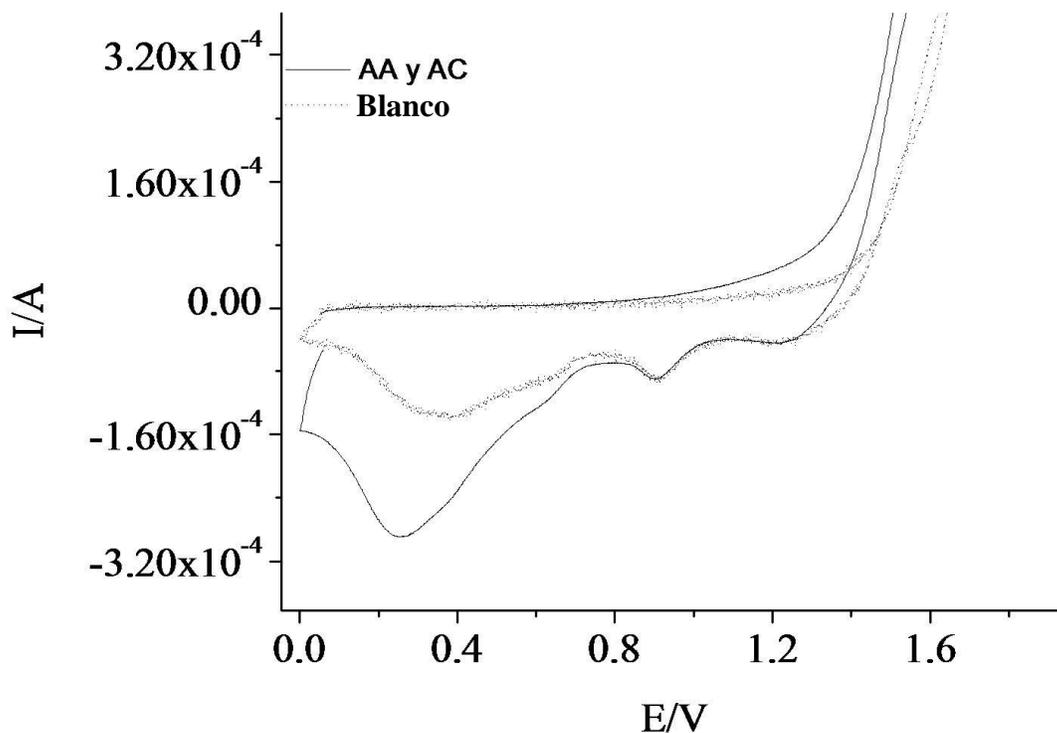


Figura 31. Voltamperograma cíclico del blanco y de la mezcla equimolar de AA y AC

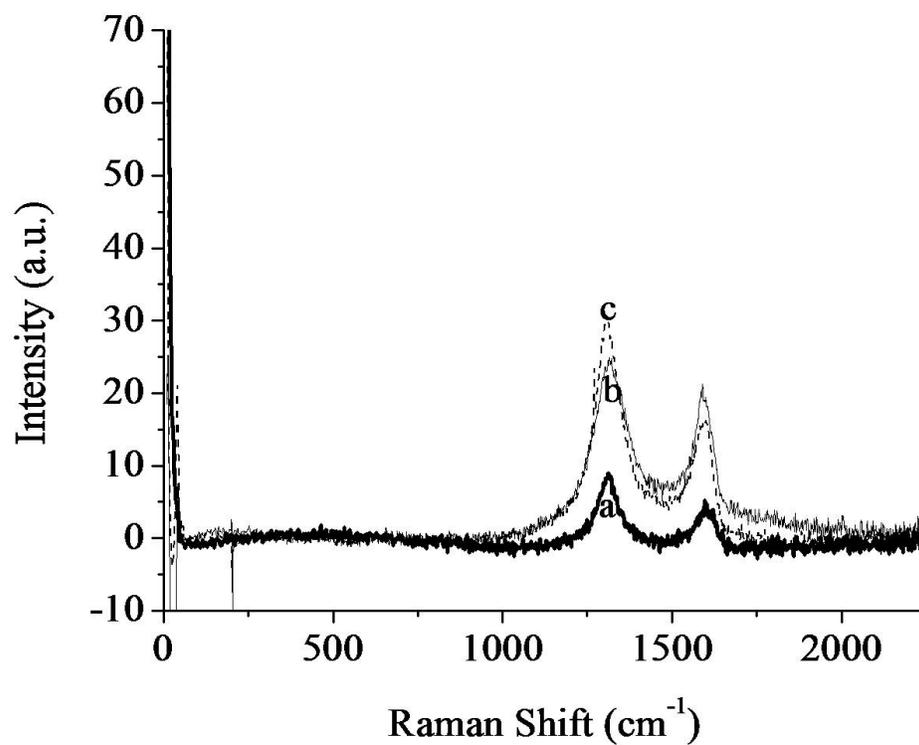


Figura 32. Espectroscopía Raman para electrodos serigrafiados NTbCPS: a) Sin AA adsorbida, b) AA 50 μM , c) mezcla equimolar de AA y Ac (50 μM).

La Figura 33, muestra el comportamiento electroquímico de la mezcla de AA a 50 μM y diferentes concentraciones de AC (10, 50 y 200 μM) donde podemos ver que el resultado es independiente de la concentración del AC. Probablemente esto se debe a la polimerización en el seno de la solución. De este modo, el AC no es considerado una interferencia para el análisis de AA en papas fritas a través de este método electroquímico.

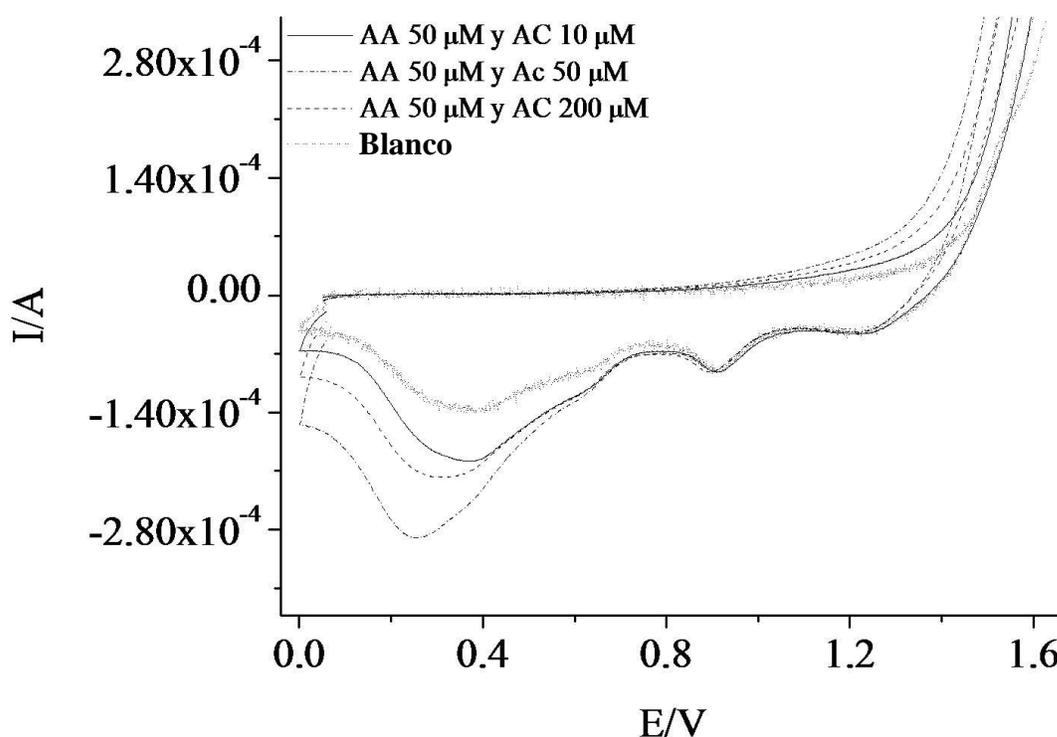


Figura 33. Voltamperograma cíclico de la mezcla de AA a 50 μM y AC a diferentes concentraciones (10, 50 y 200 μM)

7.3.5 ESTUDIO DE LOS SERIGRAFIADOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN

Los espectros resultantes en el análisis de los NTbCPS (Figura 34), muestran dos bandas, D y G, a 1310 cm^{-1} y 1580 cm^{-1} respectivamente. La intensidad de la banda D, es mayor que en la banda G, esto muestra la presencia de carbono amorfo así como una satisfactoria funcionalización del electrodo (Murko *et al.*, 2005). Por otra parte, los espectros obtenidos del análisis de los electrodos serigrafados con AA adsorbida (50-200 μM) revelan un incremento en la intensidad de ambas bandas proporcional a la concentración y un desplazamiento en la frecuencia de la banda G, es decir que la respuesta está en función de la superficie cubierta por la AA, mientras que un pretratamiento del electrodo con 300 μM

del monómero produce su disminución (Figura 34). Estos resultados sugieren que a mayor concentración de AA ligada a los NTbCPS del electrodo, el número de enlaces C=C también se ven incrementados. A partir de una concentración de 300 μM del monómero adsorbido, el electrodo es saturado por la polimerización de AA en su superficie que produce estructuras con alto número de uniones C-C que son inactivos para la polarización Raman con el láser empleado. El análisis de la adsorción de AA mediante esta técnica, refuerza los obtenidos a través del método electroquímico, que adicional a estos resultados, revela que los análisis a concentraciones mayores que 300 μM lejos de mostrar un incremento en la corriente produce más bien una disminución de la misma incluso menor que la obtenida a 100 μM .

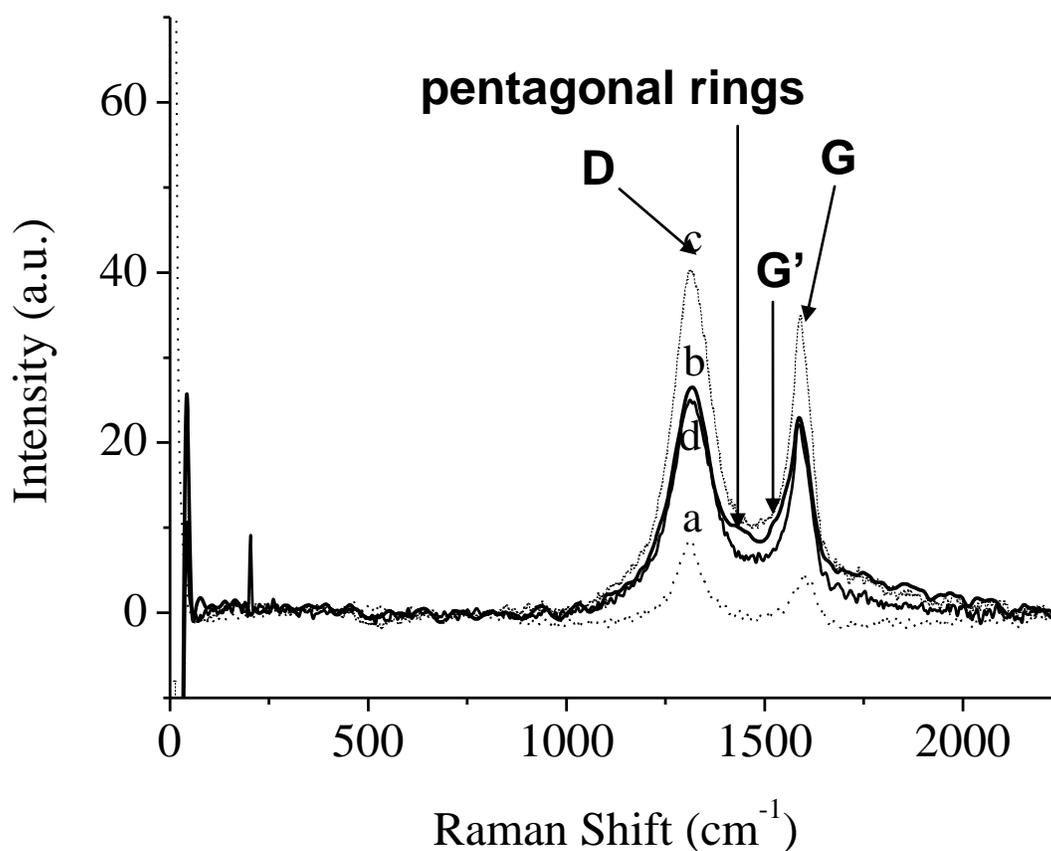


Figura 34. Espectroscopía Raman de los electrodos de NTbCPS con diferentes concentraciones de AA adsorbida: a) sin AA, b) 100 μM , c) 200 μM , d) 300 μM

7.3.6 ANÁLISIS, DETECCIÓN Y CUANTIFICACION DE AA EN PAPAS FRITAS MEDIANTE HPLC-DAD.

La AA fue detectada a 210 nm en un tiempo de elución de 4.7 minutos. Bajo estas condiciones la AA así como los componentes del extracto fueron separados. Una vez extraída la AA, se procedió a realizar el análisis bajo las mismas condiciones de estudio del estándar. Cuando se detectó el pico correspondiente al monómero, se realizó una coelución de la muestra real con el estándar a fin de verificar su correspondencia. El cromatograma resultante se muestra en la Figura 35. La concentración de AA en papas fritas calculada mediante HPLC fue de 23.90 ± 0.1 mg/Kg por gramo de extracto seco.

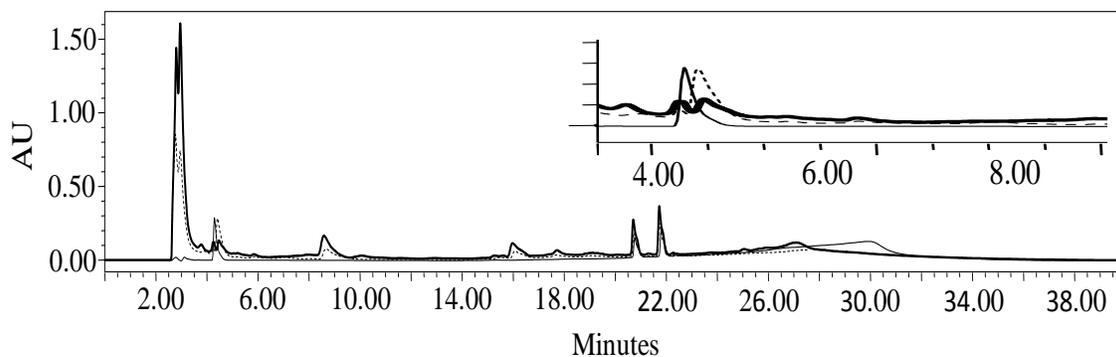


Figura 35. Cromatograma correspondiente al extracto de papas fritas (línea gruesa), estándar de AA (línea delgada) y coelución del extracto y el estándar (línea punteada). Inset: Acercamiento de los picos correspondiente a la AA

7.3.7 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AA EN PAPAS FRITAS MEDIANTE LA TÉCNICA ELECTROQUÍMICA

El sistema electroquímico con mejor respuesta en el análisis del estándar de AA fue el de los electrodos impresos, con los que se obtuvo una curva de calibración lineal en el rango de 50 a 300 μM , con límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) de 0.03 μM y 0.04 μM , respectivamente. Por esta razón, los resultados mostrados del análisis en muestra real, son los obtenidos bajo este método.

La Figura 36 muestra los voltamperogramas sobrepuestos de la muestra real y el estándar a 50 μM . Como se observa en el gráfico del extracto, las señales de reducción correspondientes al blanco (alrededor de 390 y 924 mV presentes aun cuando se examina el estándar) disminuye en el caso de la de 300 mV y desaparece la de 900 mV, mostrándose únicamente un pico de reducción alrededor de 1200 mV el cual al agregar diferentes concentraciones del estándar se ve disminuido. La concentración de AA en las papas fritas de acuerdo a esta técnica fue de 29.70 ± 0.15 mg/Kg de AA por gramo de extracto seco.

Como puede observarse, la concentración de AA detectada por HPLC es similar a la revelada por la técnica electroquímica, aunque esta cuantifica un nivel del monómero ligeramente más alto, tiene grandes ventajas comparada con las técnicas convencionales tal como el uso de volúmenes de muestras pequeños, es una técnica rápida, fácil, confiable y amigable con el medio ambiente.

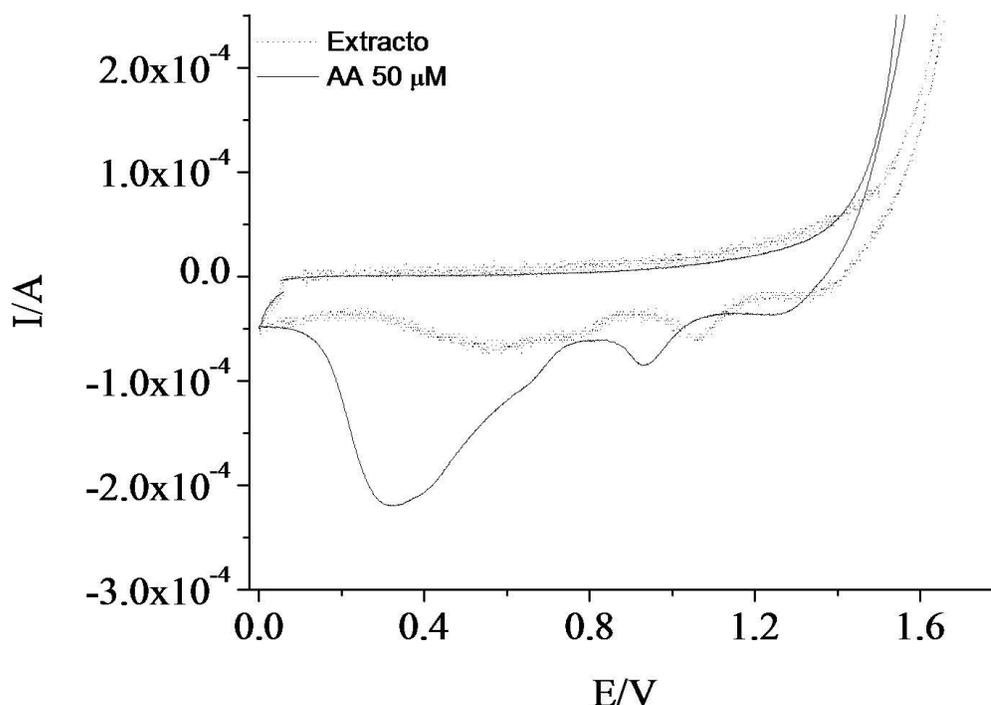


Figura 36. Voltamperograma cíclico del extracto de papas fritas (línea punteada) y del estándar de AA a $50\mu\text{M}$ (línea sólida)

8 CONCLUSIONES

En este trabajo, se reporta un nuevo método para la detección y cuantificación de AA en alimentos de manera fácil, rápida y segura a través de su electropolimerización sobre electrodos de NTbCPS. El límite de detección de esta técnica (LOD) es de $0.03\ \mu\text{M}$ y el límite de cuantificación (LOQ) es de $0.04\ \mu\text{M}$. La cuantificación de AA en papas fritas por el método electroquímico ($29.70 \pm 0.15\ \text{mg/Kg}$) es similar a la obtenida por HPLC-DAD ($23.90 \pm 0.1\ \text{mg/Kg}$) lo cual implica que el método propuesto es confiable. Los estudios de interferencias realizados revelan que ninguno de los compuestos analizados representa un problema en la cuantificación electroquímica de AA en la muestra real. Por estas razones, se puede concluir que el presente procedimiento electroquímico representa un método confiable, rápido, fácil, seguro y barato para la detección y cuantificación de AA en papas fritas. Por otra parte, El análisis de AA realizado en el electrodo de carbón vítreo, anodizado, sin anodizar y modificado con dendrímeros, resultó ineficiente debido a un excesivo pre-tratamiento que produjo una importante degradación de los electrodos.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adams A., Hamdani S., Lancker F. V., Méjri S., Kimpe N. D., 2010, Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles, *Food Research International*, 43:1517-1522
- Alves R. C., Soares C., Casal S., Fernandes J.O., Oliveira M. B. P.P., 2010, Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length, *food chemistry*, 119:929-934
- Amrein T.M., Bachmann S., Noti A., Biedermann M., Barbosa M.F., Biedermann-Brem S., Grob K., Keiser A., Realini P., Escher F., Amado R., 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.
- Atay N. Z., Çalgan D., Özakat E., Varnali T., 2005, Acrylamide and glycidamide adducts of guanine, *Journal of Molecular Str* 728:249-251
- Avnir, 1991, Surface Fractality of Dendrimers, *Angew Chem.*, 30: 1379-1380.
- Balogh L., Tomalia D.A., Hagnauer G.L., McManus A.T., 2001, Dendrimer-Silver Complexes and Nanocomposites as Antimicrobial Agents., *Nano Lett.* 1:18-21.
- Becalski A., Lau B.P., Lewis D., *et al.*, 2004, Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3801-3806.
- Becalski A., Lau B.P., Lewis D., Seaman S.W., 2003, Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 802-808.
- Biedermann-Brem S, Noti A., Grob K., Imhof D., Bazzocco D., Pfefferle A., 2003, How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking?., *Eur Food Res Technol*, 217: 369-373.
- Blasco A. J., González M. C., Escarpa A., 2004, Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolics acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants, *Analytica Chimica Acta* 511:71–81.
- Bourne N., Stanberry L.R., Kern E.R., Holan G., Matthews B., Bernstein D.I., 2000, Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2471-4.
- Boyd W.C., Shapleigh E., 1954, Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins, *J. Immunol* 73: 226-31.

- Brett christopher m. A., brett ana maria oliveira, 1994, electrochemistry Principles, methods, and applications, oxford university press, new York
- Burghard Marko, 2005, Electronic and vibrational properties of chemically modified single-wall carbon nanotubes, *Surface Science Reports*, 58:1-109
- Bustos E., García M.G., Chapman T.W., Juaristi E., and Godínez L.A., 2006, Electrodes Modified with Nanocomposites of PAMAM Dendrimers and Inorganic Electrocatalysts: Sensing Molecules with Biological Importance, *ECS Transactions*, 3:45-57
- Cheng K., Shi J., Ou S., Wang M., Jiang Y., 2010, Effects of Fruit Extracts on the Formation of Acrylamide in Model Reactions and Fried Potato Crisps, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58:309–312
- Cheng Ka-Wing, Shi Jian-Jun, Ou Shi-Yi, Wang Mingfu, Jiang Yue, 2010, Effects of Fruit Extracts on the Formation of Acrylamide in Model Reactions and Fried Potato Crisps, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58:309–312.
- Claeys W. L., De Vleeschouwer K., & Hendrickx M. E., 2005, Effect of amino acids on acrylamide formation and elimination kinetics, *Biotechnology Progress*, 21:1525–1530.
- Costa LG, Deng H, Gregotti C., 1992, Comparative studies on the neuro - and reproductive toxicity of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Neurotoxicology*, 13: 219-224.
- De Luca S., Florescu M., Ghica M.E., Lupu A., Palleschi G., Brett C.M.A., Compagnone D., 2005, Carbon film electrodes for oxidase-based enzyme sensors in food analysis, *Talanta*, 68:171-178
- Dearfield KI, Albernathy CO, Ottley MS, Branter JH, Hayes PF., 1988, Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res.*, 195: 45-77.
- Diallo M., Maiti P., Cagin T., 2004, Multiscale modeling of Cu(II) binding to PAMAM dendrimers with terminal NH₂ groups in aqueous solutions, *The american chemical society*, 227:U814
- Diallo, M.S., Christie S., Swaminathan P., Johnson j. H., Goddard W. A., 2005, Dendrimer enhanced ultrafiltration. 1. Recovery of Cu(II) from aqueous solutions using PAMAM dendrimers with ethylene diamine core and terminal NH₂ groups, *Environmental Science & Technology*, 39:1366-1377.
- Dybing E., Sanner T., 2003, Forum Risk assessment of acrylamide in foods, *Toxicological Sciences* 75:7–15.

- Friedman M., 2003, Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide., *journal of agricultural food chemistry*, 51:4504-4526.
- Gökmen V., Akbudak B., Serpen A., Acar J., Turan Z.M., Eriş A., 2007, Effects of controlled atmosphere storage and low-dose irradiation on potato tuber components affecting acrylamide and color formations upon frying. *European Food Research and Technology*, 224:681–687.
- Gökmen V., Palazoğlu T.K., 2008, Acrylamide formation in foods during thermal processing with a focus on frying, *Food and Bioprocess Technology* 1:35–42.
- Gökmen V., Şenyuva H.Z., 2006, Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. *Food Chemistry* 99:238–243.
- Gong Y., 2002, Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication, *Antiviral Res.* 55: 319-29.
- González F., Lopez G., Mendoza S., Alberto E., 2011, Electrochemical Screening of Biomarkers in Chemotype Mexican Oregano Oils on Single-Walled Carbon Nanotubes Screen-Printed Electrodes, *electroanalysis*, 9:2212-2216.
- Granvogl M., Schieberle P., 2006, Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54:5933–5938.
- Hidalgo F. J., Delgado R. M., Zamora R., 2010, Role of mercaptans on acrylamide elimination, *Food Chemistry*, 122:596-601
- Hönicke K., Gatermann R., 2005, Studies on the stability of acrylamide in food during storage. *Journal of AOAC International*, 88:268–273.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Industrial Chemicals. Acrylamide. Lyon, France: IARC; 1994;60: 389-433
- INFOSAN Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos No 2, 2005, Acrilamida.
- Jiménez Salvio Morales, Navas Francisco J., Arribas-Lorenzo Gema y Martí López Eva, 2007, Formación de acrilamida durante el procesado y cocinado de alimentos, *Instituto del Frio Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)*.
- Kaifer A. E., Gómez-Kaifer M., Supramolecular Electrochemistry, Wiley-VCH, Federal Republic of Germany, 1991.

- Klajnert B., Bryszewska M., 2001, Dendrimers: properties and applications, *Acta Biochimica Polonica*, 48:199-208.
- Konings E.J.M., Baars A.J., van Klaveren J.D., Spanjer M.C., Rensen P.M., Hiemstra M., van Kooij J.A., Peters P.W.J., 2003, Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risk, *Food Chemistry Toxicology*, 41:1569–1579.
- Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Shevchuk A.V., 2002, Study of antioxidant properties by voltammetry, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 518:56–60.
- Landers J.J. 2002, Prevention of influenza pneumonitis by sialic Acid-conjugated dendritic polymers, *J. Infect. Dis.* 186:1222-30.
- Lee I., Athey B. D., Wetzal A. W., Meixner W., Baker J. R., 2002, Structural Molecular Dynamics Studies on Polyamidoamine Dendrimers for a Therapeutic Application: Effects of pH and Generation, *Macromolecules* 35:4510-4520.
- Lingnert H., Wailer G.R., 1983, Stability of antioxidants formed from histidine and glucose by the Maillard reaction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31:27–30.
- Lopachin RM, 2004, the changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 25:617-630.
- LoPachin RM, Lehning EJ., 1994, Acrylamide- Induced distal axon degeneration: a proposed mechanism of action, *Neurotoxicology*, 15: 247-259.
- Malik N., Evagorou E.G., Duncan R., 1999, Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy, *Anticancer Drugs*. 10: 767-76.
- Mojska H., Gielecińska I., Szponar L., Ołtarzewski M., 2010, Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population, *Food and Chemical Toxicology*, 48:2090-2096.
- Morales F., Capuano E., Fogliano V., 2008, Mitigation Strategies to Reduce Acrylamide Formation in Fried Potato Products *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126: 89–100.
- Moreno Navarro I. M., Rubio Armendáriz C., Gutiérrez Fernández A. J., Cameán Fernández A. M. Hardisson de la Torre A., 2007, La acrilamida, contaminante químico de procesado: Revisión *Revista de toxicología*, 24:001 1-9
- Mottram DS, Wedzicha BI, Dodson AT., 2002, Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419: 448-449.
- Norma Oficial Mexicana NMX-AA-137-SCFI-2007

- Norma Oficial Mexicana *NOM-010-STPS-1999*.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 1985, Acrylamide. Environmental Health Criteria 49. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 1996, Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2002, Health implications of acrylamide in food.
- Otles S., Otles S., 2004, Acrylamide in food-formation of acrylamide and its damages to health, *Electronic J Polish Agric Univ* 7 (2).
- Ou S., Lin Q., Zhang Y., Huang C., Sun X., Fu L., 2008, Reduction of acrylamide formation by selected agents in fried potato crisps on industrial scale *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9:116–121.
- Pelé Florent, Gil F. X., 2007, Obtención y caracterización de geles para su utilización como andamios en ingeniería de tejidos, Universidad Politecnica de Cataluña, Tesis.
- Pérez G. P., Crooks R. M., 2001, Selectively Permeable Dendrimers as Molecular Gates, *The electrochemical Society interface*, 10:34-38.
- Quintana A., 2002, Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor, *Pharm. Res.* 19: 1310-6.
- Roy R., 1996, Syntheses and some applications of chemically defined multivalent Glycoconjugates, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 692-702.
- Roy R., 2001, Synthesis of N,N '-bis(acrylamido)acetic acid-based T-antigen glycodendrimers and their mouse monoclonal IgG antibody binding Properties, *J. Am. Chem. Soc.* 123: 1809-1816.
- Rupp R., Rosenthal S.L., Stanberry L.R., 2007, VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer—microbicide for the prevention of HIV and HSV infection, *Int. J. Nanomedicine.* 2:561-6.
- Rydberg P., Eriksson S., Tareke E., Karlsson P., Ehrenberg L., Torqvist M., 2003, Investigation of factor that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7012-7018.
- Şenyuva H. Z., Gökmen V., 2005, Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. *Food Additives and Contaminants*, 22:214–220.

- Serpen A., Gökmen V., 2009, Evaluation of the Maillard reaction in potato crisps by acrylamide, antioxidant capacity and color, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22:589–595.
- Shapoval G. S., Gorodyskii, 1973, Electrochemical initiation of polymerisation, *Russian Chemical Reviews* 42: 370-383.
- Shapoval G. S., Markova N. P., Skobets E. M., 1968, Synthesis and Physical Chemistry of Polyurethanes, *Naukova Dumka Kiev*, pp. 76.
- Shapoval G. S., Skovets E. M., Markova N. P., 1967, Possibility of electrochemical production of stereoregular polymers, *Doklady Akademii Nauk SSSR*.
- Shukla G.W., Chatterjee M., Yang W., Sekido M., Diop L.A., Muller R., Sudimack J. J., Lee R. J., Barth R.F., Tjarks W., 2003, Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy, *Bioconjugate Chem.* 14: 158-167.
- Soares C., Cunha S., Fernandes J., 2006, Determination of acrylamide in coffee and coffee products by GC-MS using an improved SPE clean-up, *Food Additives and Contaminants*, 23:1276–1282.
- Stadler R. H., Robert F., Riediker S., Varga N., Davidek T., Devaud S., Goldmann T., Hau J., Blank I., 2004, In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52:5550-5558.
- Stadler R. H., Verzejnassi L., Varga N., Grigorov M., Studer A., Riediker S., Schilter B., 2003, formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems, *Chemical research toxicology*, 16:1242-1250 .
- Stobiecka A., Radecka H., Radecki J., 2007, Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 22:2165–2170.
- Summa C. A., De la Calle B., Brohee M., Stadler R. H., Anklam E., 2007, Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide, *LWT-Food Science and Technology* , 40:1849–1854.
- Svadkovskaya G. E., Voitkevich S. A., 1960, Electrolytic condensation of carboxylic acids, *Russian chemical Reviews*, 29:161-180.
- Svensson A., Abramsson L., Becker W., Glynn A., Hellenäs K. E., Lind Y., 2003, Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food and Chemical Toxicology*, 41:1581–1586.
- Svilaas A., Sakhi A. K., Andersen L. F., Svilaas T., Ström E. C., Jacobs D. R., 2004, Intakes of antioxidants in coffee, wine and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *Journal of Nutrition*, 134:562–567.

- Swedish National Food Administration. Acrylamide is formed during the preparation of foods. Available at: http://www.slv.se/templatesSLV/SLV_Page%20__6182.asp. Accessed October 22, 2004.
- Taeymans D., Wood J., Ashby P., Blank I., Studer A., Stadler T.H., Gonde P., Van Eijck P., 2004, A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation and control. *Food Science and nutrition*, 44:323-347.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Tornqvist M., 2002, Analysis of acrylamide a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4998-5006.
- Taubert D., Harlfinger S., Henkes L., Berkeles R., Scheming E., 2004, Influence of processing parameters on acrylamide formation during frying of potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2735-2739.
- Tokuhisa H., Crooks R. M., Interactions between organized, surface-confined monolayers and vapor-phase probe molecules .12. Two new methods for surface-immobilization and functionalization of chemically sensitive dendrimer surfaces *Langmuir*, 1997, 13:5608-5612.
- Tokuhisa H., Crooks R. M., Ricco A. J., Osbourn G. C., 1997, Chemical sensors based on surface-confined dendrimers, *Proceedings of the Symposium on Chemical and Biological Sensors and Analytical Electrochemical Methods*, pp. 134-140
- Tomalia D. A., Durst H. D., 1993, Genealogically directed synthesis-starburst cascade dendrimers and hyperbranched structures, *Topics in current chemistry*, 165:193-313
- Tomalia, 2005, The dendritic state, *materials today* 8:34-46.
- Tomilov A. P., Mairanovskii S. G., Fiochin M. Ya., Smirnov V. A., 1968, Electrochemistry of Organic Compounds), Handbook *Khimiya, Leningrad*, pp. 515.
- Tully D. C., Fréchet J. M. J., 2001, Dendrimers at surfaces and interfaces: chemistry and applications, *Chemical Communications* 14:1229-1239.
- Valenzuela Rodrigo B., Ronco M. Ana María, 2007, Acrylamide in food, *Revista Chilena de Nutrición*, 34:1
- Vattem D. A., Shetty K., 2003, Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4:331-338.

- Walker G. H., Hathway D. E., 1977, Electrochemical analysis of the carboxy-¹⁴C-labelled aliphatic carboxylic acid metabolites resulting from tracer studies, *Biochemistry Journal*, 167:505-507.
- Wang J., 2000, Analytical electrochemistry, Jhon Wiley and Sons, New York. p. 66.
- Watkins D. M., Sayed-Sweet Y., Klimash J. W., Turro N. J., Tomalia D. A., 1997, Dendrimers with Hydrophobic Cores and the Formation of Supramolecular Dendrimer-Surfactant Assemblies, *Langmuir* 13:3136-3141.
- Wenzl T., De La Calle M.B., Anklam E., 2003, Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: A Review. *Food Additives and Contaminants*, 20: 885-902.
- Williams J.S.E., 2005, Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps, *Food Chemistry*, 90:875–881.
- Wimmer N., Marano R.J., Kearns P.S., Rakoczy E.P., Toth I., 2002, Syntheses of polycationic dendrimers on lipophilic peptide core for complexation and transport of oligonucleotides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2635-7.
- Witvrouw M., Weigold H., Pannecouque C., Schols D., De Clercq E., Holan G., 2000, Potent anti-HIV (type 1 and type 2) activity of polyoxometalates: structure-activity relationship and mechanism of action, *J. Med. Chem.* 43: 778-83.
- Xu Y.H., Zhao D.Y., 2005, Removal of copper from contaminated soil by use of poly(amidoamine) dendrimers, *Environmental Science & Technology*, 39: 2369-2375.
- Yasuhara A, Tanaka Y, Hengel M, Shibamoto T., 2003, Gas Chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51: 3999-4003.
- Yaylayan V. A., Wnrowski A., Perez L. C., 2003, Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51:1735-1757.
- Zargar B., Sahraie N., Khoshnam F., 2010, Catalytic Square-Wave Voltammetric Determination of Acrylamide in Potato Chips, *Analytical Letters*, 42:1407-1417.
- Zyzak D. V., Sanders R. A., Stojanovic M., Talimadge D. H., Eberhart B. L., Ewald D. K., Gruber D. C., Morsch T. R., Strothers M. A., Rizzi G. P., Villagran M. D., 2003, Acrylamide formation mechanism in heated foods, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51:4782-4787.