



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

LICENCIATURA QUÍMICA

TESIS

Desarrollo de una metodología electroanalítica para la
determinación de Aflatoxina B1 basada en un sensor
no enzimático enriquecido con nanopartículas de CuO

**Para obtener el título de
LICENCIADA EN QUÍMICA**

P R E S E N T A

Karen Olguin Contreras

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. Daniel Hernández Ramírez

Mineral de la Reforma, Hgo., México, 2024



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 11 de abril de 2024

Número de control: ICBI-D/452/2024
Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Química **Karen Olgún Contreras**, quien presenta el trabajo de titulación "**Desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de Aflatoxina B1 basada en un sensor no enzimático enriquecido con nanopartículas de CuO**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Secretaria: Dra. Araceli Castañeda Ovando

Vocal: Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero

Suplente: Dr. Daniel Hernández Ramírez

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI



OAASYCC



Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 2231 Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y contó con apoyo de beca otorgada por el Proyecto de Ciencia-Básica 2017-2018 de CONAHCyT con clave A1-S-8057 titulado: “Estudio y desarrollo de metodologías electroquímicas verdes como alternativas amables con el medio ambiente para la cuantificación y control de aflatoxina B1 en alimentos”

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en el XXXV Congreso Nacional de Química Analítica y XXV Simposio Estudiantil celebrado en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla del 18-22 de septiembre de 2023, con el trabajo titulado: “Desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de aflatoxina B1 basada en un electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de CuO”.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, por la beca otorgada para realizar la presente tesis.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por brindarme sus instalaciones y permitirme realizar mis actividades para la elaboración de este proyecto.

A mi asesor Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su disponibilidad en todo momento, paciencia, apoyo y confianza, por la orientación y aporte para la redacción y corrección del presente trabajo, muchas gracias.

Al Dr. Daniel Hernández Ramírez, por su tiempo, confianza, sus conocimientos y asesoría durante la optativa experimental y el desarrollo del presente proyecto. Al laboratorio 2 de Química Analítica a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo, consejos y la confianza que me han prestado.

A mis padres, Adolfo Francisco Olguin Pérez y Blanca Estela Contreras Monrroy, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por sus consejos, amor y apoyo incondicional.

A mi hermana, Karyme Olguin Contreras por estar siempre presente y ser un apoyo emocional en mi vida.

A loskani Estrada Pérez por tu amor, consejos y opiniones para la escritura de este proyecto y ser un apoyo incondicional a lo largo del tiempo que hemos compartido. Muchas gracias.

A mi familia y amigos de la universidad Fani, Pao, Dani, Sergio y en especial a ti Josué, gracias por las asesorías, consejos y el tiempo que compartimos a lo largo de la carrera.

Índice general

Resumen	17
Introducción	18
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	20
1.1 Micotoxinas	21
1.2 Aflatoxinas	21
1.2.1 Generalidades	21
1.2.2 Propiedades físicas y químicas	22
1.2.3 Toxicidad e importancia	24
1.2.4 Límites máximos permisibles de aflatoxinas	25
1.2.5 Estabilidad y persistencia	26
1.3 Mecanismo de oxidación de AFB1 en medios ácidos y alcalinos	27
1.4 Técnicas analíticas oficiales para cuantificar Aflatoxina B1	27
1.5 Técnicas electroquímicas para cuantificar Aflatoxina B1	30
1.5.1 Fundamento	30
1.5.2 Voltamperometría	30
1.5.3 Voltamperometría cíclica	32
1.5.4 Cinética de reacción sobre la superficie del electrodo	33
1.5.5 Celda electroquímica	36
1.6 Sensores electroquímicos	37
1.6.1 Biosensores utilizados en la determinación de AFB1	38
1.6.2 Sensores no enzimáticos utilizados para la determinación de AFB1	40
1.7 Electroodos de pasta de carbono	41
1.7.1 Electroodos de pasta de carbono modificados	42
1.7.2 Nanopartículas de óxido de cobre como modificante	42
1.8 Justificación	45
1.9 Objetivo general	46

1.10 Objetivos específicos	46
CAPÍTULO 2. MARCO METODOLÓGICO.....	47
2.1 Reactivos.....	48
2.2 Sistema electroquímico	48
2.3 Preparación de estándares de AFB1 y 5,7-dimetoxicumarina (DMC) en medio acuoso.....	49
2.4 Preparación del electrodo de pasta de carbono modificado con óxido de cobre	49
2.5 Caracterización electroquímica de la AFB1 usando el electrodo de pasta de carbono modificado	50
2.6 Efecto del pH del electrolito soporte.....	50
2.7 Efecto de la composición del electrodo	51
2.8 Efecto de la velocidad de barrido	51
2.9 Estudio de los procesos de difusión y adsorción sobre la superficie del electrodo de trabajo	51
2.10 Estudio de repetibilidad	52
2.11 Estudio de reproducibilidad	52
2.12 Determinación de los parámetros analíticos del método propuesto	52
2.12.1 Determinación de la sensibilidad analítica.....	53
2.12.2 Determinación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) 53	
2.13 Análisis en muestras reales.....	54
2.13.1 Maíz.....	54
2.13.2 Cacahuate	55
2.13.3 Leche.....	55
2.14 Cuantificación de AFB1 en muestras reales.....	56
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57

3.1 Caracterización electroquímica de la AFB1 usando el sensor Nps-CuO/EPC..	58
3.2 Optimización del porcentaje de Nps-CuO en electrodos de pasta de carbono (EPC)	62
3.3 Optimización de la velocidad de barrido para el sistema electroquímico	62
3.4 Estudio de los procesos electroquímicos sobre la superficie del electrodo de trabajo	63
3.5 Repetibilidad y reproducibilidad.....	65
3.6 Caracterización analítica de la metodología propuesta.....	65
3.7 Análisis en muestras reales.....	66
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	68
4.1 Conclusiones.....	69
4.2 Perspectivas.....	70
5. Referencias	71

Índice de figuras

Figura 1.1 Estructura química de las principales aflatoxinas encontradas en alimentos contaminados.....	23
Figura 1.2 Esquema de reacción para la oxidación de AFB1.Las especies descritas son la lactona, el derivado del ácido cumárico y la cetona.....	27
Figura 1.3 Señales de excitación de voltaje contra tiempo utilizadas en voltamperometría.	31
Figura 1.4 Ejemplo de un voltamperograma.....	31
Figura 1.5 Señal de excitación en Voltamperometría Cíclica.	32
Figura 1.6 Representación de un voltamperograma cíclico.	33
Figura 1.7 Esquema típico de una celda electroquímica formada por un electrodo de pasta de carbono (WE), un electrodo de Ag/AgCl (RE) y una barra de grafito (AE).	37
Figura 1.8 Representación de elementos de un sensor electroquímico.....	38
Figura 1.9 Esquema del funcionamiento de un inmunosensor inmovilizando AFB1-ASB sobre la superficie del electrodo para la determinación de AFB1.	39
Figura 1.10 Partes de un electrodo de pasta de carbono.....	42
Figura 2.1 Estructura química de la 5,7-dimetoxicumarina (DMC) y la aflatoxina B1 (AFB1).....	49
Figura 2.2 Proceso de elaboración de electrodos de pasta de carbono, a) Sin modificar, b) Modificados.....	50
Figura 2.3 Pretratamiento de la muestra de maíz.	54
Figura 2.4 Pretratamiento de la muestra de cacahuate.....	55
Figura 2.5 Pretratamiento de la muestra de leche.....	55

Figura 3.1 VC para un electrodo de pasta de carbono modificado con CuO (Nps-CuO/EPC) y un electrodo de pasta de carbono (EPC) en KCl 0.1 M a pH 12 (ajustado con NaOH), con una velocidad de barrido de 0.1 V s⁻¹ en sentido anódico. **58**

Figura 3.2 VC del sensor *CuO – NPs/EPC* obtenido en KCl 0.1 M a pH 12 sin y con 100 ng L⁻¹ de DMC, usando una velocidad de barrido de 0.1 V s⁻¹ en sentido anódico. **59**

Figura 3.3 a) Estructura de AFB1 b) Complejo propuesto para la interacción entre el *Cu²⁺* y AFB1..... **60**

Figura 3.4 a) Estructura de DMC b) Complejo propuesto para la interacción entre el *Cu²⁺*y DMC. **60**

Figura 3.5 VC obtenidos en KCl 0.1 M a pH 6, 7, 9, 11, 12, 13 (ajustado con NaOH) sin y con 100 ng L⁻¹ de DMC, usando el sensor *CuO – NPs/EPC*, a una velocidad de barrido de 0.1 V s⁻¹ en sentido anódico. **61**

Figura 3.6. Efecto de la variación de la velocidad de barrido sobre la diferencia de intensidad de corriente de pico anódico usando el *CuO – NPs/EPC* en una solución de KCl 0.1 M con 100 ng L⁻¹ de DMC a pH 12. **63**

Figura 3.7 Relación entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$) vs la diferencia de la intensidad de corriente anódica (Δi). **64**

Figura 3.8 Relación entre el log de la velocidad de barrido vs el log de la diferencia de la intensidad de corriente anódica. **64**

Figura 3.9 Adsorción de AFB1 sobre la superficie del electrodo de pasta de carbono modificado con óxido de cobre..... **65**

Figura 3.10 Curva de calibración obtenida usando el sensor *CuO-Nps/EPC* con la metodología optimizada. **66**

Índice de tablas

Tabla 1.1 Propiedades físicas y químicas de las principales aflatoxinas.....	24
Tabla 1.2 Ejemplos de técnicas analíticas convencionales reportadas en la literatura para la determinación de AFB1.	29
Tabla 1.3 Estudios realizados utilizando biosensores como métodos de detección de aflatoxina B1	39
Tabla 3.1 Valores de (Δi) para los diferentes porcentajes de modificante en el EPC.	62
Tabla 3.2 Parámetros analíticos correspondientes a la curva de calibrado en la determinación de AFB1 mediante voltamperometría cíclica.	66
Tabla 3.3 Concentraciones promedio (n=3) de AFB1 y porcentajes de recuperación obtenidos por adición patrón en las muestras de maíz, cacahuate y leche.....	67

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Ecuación de Randles-Sevcik	34
Ecuación 2 Ecuación de la adsorción.....	35
Ecuación 3 Ecuación resumida en cinética de reacción.....	35
Ecuación 4 Mecanismos de oxidación del CuO en la superficie del EPC modificado	44
Ecuación 5 Determinación de la desviación estándar relativa (%DER)	52
Ecuación 6 Ecuación de regresión lineal	53
Ecuación 7 Determinación del límite de detección (LD)	53
Ecuación 8 Determinación del límite de cuantificación (LQ)	53
Ecuación 9 Porcentaje de recuperación	56
Ecuación 10 Ecuación lineal de la relación ΔI_p vs V	63

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

%DER	Porcentaje de desviación estándar relativa
Ω	Ohm
$S_{x/y}$	Desviación estándar de la curva
°C	Grados Celsius
μA	Microamperios
μg	Microgramo
A	Amperes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB1	Aflatoxina B1
AFB1-ASB	Aflatoxina B1-albúmina sérica bovina
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AFM2	Aflatoxina M2
AOAC	Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales
ARN	Ácido ribonucleico
ASB	Albúmina sérica bovina
A_w	Actividad del agua
CG	Cromatografía de gases

CL	Cromatografía Líquida
DMC	5,7-dimetoxicumarina
DER	Desviación estándar relativa
E	Potencial
EA	Electrodo auxiliar
E_{eq}	Potencial de equilibrio
ELISA	Método de inmuno-absorción ligado a enzimas (del inglés Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
ECV	Electrodo de carbón vítreo
EPC	Electrodo de pasta de carbono
ER	Electrodo de referencia
ET	Electrodo de trabajo
g	Gramo
HNO₃	Ácido nítrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés High Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	Cromatografía de capa fina de Alta Resolución (del inglés High-Performance Thin-Layer Chromatography)
I_{pa}	Intensidad máxima de pico anódico
I_{pc}	Intensidad máxima de pico catódico
ITO	Óxido de indio y estaño (del inglés Indium Tin Oxide)

kg	Kilogramo
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
M	Molaridad (mol L ⁻¹)
m	Pendiente
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	Milivolts
n	Número de muestras
NaOH	Hidróxido de sodio
ne-	Número de electrones
nm	Nanómetro
Nps	Nanopartículas
Nps-Au	Nanopartículas de oro
OGR	Óxido de grafeno reducido
PC	Pasta de carbono
PCG	Puntos cuánticos de grafeno
PEDOT	Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
pH	Potencial de hidrogeno
PTH	Politionina

rpm	Revolución por minuto
s	Desviación estándar
TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés Thin Layer Chromatography)
V	Volts
v	Velocidad de barrido
VC	Voltamperometría cíclica
VDP	Voltamperometría diferencial de pulso
VOC	Voltamperometría de onda cuadrada
\bar{x}	Promedio

RESUMEN

En este trabajo se reporta la determinación y cuantificación de AFB1 por voltamperometría cíclica con el uso de un electrodo de pasta de carbono modificado con óxido de cobre en muestras de maíz, cacahuate y leche. El primer capítulo atiende a los antecedentes generales para el desarrollo de esta investigación, describiendo las características principales y la importancia de la determinación de Aflatoxina B1 en alimentos sobre la salud de animales y seres humanos. Se incluyen las principales técnicas convencionales para la cuantificación de AFB1 en alimentos y las ventajas que ofrecen las técnicas electroquímicas. Se aborda el uso de biosensores y sensores no enzimáticos en las metodologías electroanalíticas y como las últimas sugieren ser una alternativa más sensible y de fácil uso; por último, se plantea el uso de electrodos de pasta de carbono modificados con materiales inertes y de bajo costo, como sensores no enzimáticos para la metodología electroquímica a utilizar. El segundo capítulo describe la metodología empleada para el desarrollo experimental de la presente tesis, integrado por la elaboración de los electrodos de pasta de carbono modificados, la optimización de la composición del electrodo de trabajo, del medio de análisis y la velocidad de barrido. Por último, se discute la forma en que se realizará la caracterización analítica y la evaluación del funcionamiento de la metodología propuesta. En el tercer capítulo se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de AFB1 en muestras reales de leche, maíz y cacahuate utilizando la metodología voltamperométrica propuesta basada en el sensor modificado con CuO, la cual mostró buena sensibilidad, excelente repetibilidad, reproducibilidad y funcionalidad en el análisis de estas muestras, convirtiéndola en una alternativa novedosa para su empleo en pruebas de campo y laboratorio.

Introducción

Las aflatoxinas (AF) son sustancias tóxicas que pueden contaminar los cultivos de alimentos. Estas toxinas son producidas por dos especies de hongos relacionados llamados *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. En la naturaleza hay varios tipos de AFs, pero las más peligrosas para los humanos y los animales son las B1, B2, G1 y G2, ya que, se han caracterizado por ser: mutagénicas, teratogénicas, carcinogénicas e inmunodepresoras, con una dosis letal media (DL50) de 360 ppb.¹

La AFB1 es la más común en los alimentos contaminados naturalmente, y está identificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como una de las aflatoxinas más tóxicas y cancerígenas para el ser humano². Lo anterior hace de gran importancia una detección y determinación rápida, sensible y precisa de AFB1 en alimentos.

Se han reportado en la literatura múltiples métodos analíticos para la determinación de AFB1 en alimentos como; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ³, cromatografía en capa fina (TLC) ⁴, y ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA) ⁵. Aunque estos métodos han demostrado ser precisos y exactos para la determinación de la micotoxina, llegan a ser costosos además de que consumen mucho tiempo de análisis. En este sentido, una alternativa la ofrecen los métodos basados en detección electroquímica, ya que han demostrado ser tan eficientes como los métodos aceptados oficialmente, pero con análisis menos costosos y más rápidos. Estos métodos electroanalíticos están basados en el uso de voltamperometrías donde se emplean sensores electroquímicos contruidos a partir de electrodos convencionales pero modificados con materiales inertes, que otorgan al método nuevas características que mejoran sus propiedades analíticas⁶. Particularmente, los electrodos de pasta de carbono modificados están siendo usados con más frecuencia como sensores para la determinación de biomoléculas debido a su fácil preparación, sencillez en la modificación y renovación superficial ⁷.

Uno de los materiales que se han usado recientemente como modificantes de electrodos son las nanopartículas (Nps) de óxidos metálicos, que se pueden incorporar fácilmente en un electrodo de pasta de carbono (EPC) y aprovechar así el efecto sinérgico de las propiedades del grafito (propiedades eléctricas y mecánicas) y las nanoestructuras de los óxidos metálicos (propiedades electrocatalíticas)⁸.

En la presente tesis se reporta el desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación y cuantificación de AFB1 por voltamperometría cíclica empleando electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de óxido de cobre.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por cepas toxicogénicas de especies de algunos géneros de mohos. Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho^{9,10}.

Las micotoxinas son de tamaño relativamente pequeño, con un peso molecular inferior a 7,000 Da, y suelen ser específicas de las especies de hongos dentro de un mismo género. Estas sustancias pueden encontrarse en productos vegetales y animales, tanto cuando hay presencia del hongo toxigénico como después de que este ha sido eliminado¹¹. Se han identificado hasta ahora más de 200 micotoxinas, sin embargo, las que se pueden encontrar de una manera más frecuente como contaminantes naturales en los alimentos para animales y para humanos son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumonisinas, toxinas tricotecenas (toxina T-2), citrinina, patulina, ácido penicílico, sterigmatocistina toxinas de alternaria, toxinas tremorgénicas, rubratoxinas A y B, etc. Todas ellas presentan en mayor o menor grado un riesgo para la salud de animales y seres humanos⁹.

1.2 Aflatoxinas

1.2.1 Generalidades

Las aflatoxinas (AF) son micotoxinas producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Hasta el momento se han reportado 18 tipos de aflatoxinas de las cuales las más tóxicas y frecuentes en alimentos contaminados son las aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), M1 (AFM1), M2 (AFM2), G1 (AFG1) y G2 (AFG2)

(siendo la aflatoxina M1 y M2, derivados metabólicos de las aflatoxinas tipo B que proceden del metabolismo animal, pudiéndose encontrar en leche y orina) ^{9,12}.

Las AF entran al organismo con la dieta, a través de la piel o son inhaladas; este tipo de micotoxinas se pueden encontrar como contaminantes naturales en los cereales (esencialmente en el maíz, trigo, sorgo y arroz), subproductos de cereales, pasta de oleaginosas (algodón, cacahuate, canola, coco, girasol y otros), leches y derivados¹².

Se han detectado en diferentes cultivos en el campo, cosecha, transporte y almacenamiento en el hogar. El desarrollo de este tipo de micotoxinas se favorece principalmente en zonas tropicales y subtropicales (zonas húmedas), teniendo una temperatura óptima para la producción de aflatoxinas en alimentos de 27° C y un contenido de humedad en el grano de 16.5 a 18%, sin embargo, la susceptibilidad de los alimentos al ataque de aflatoxinas varía con la ubicación geográfica, la agricultura y las prácticas agronómicas¹³. El control de los factores físicos como la temperatura y la humedad, es, por lo tanto, un aspecto crítico en la contaminación de los alimentos con estas toxinas.

Este tipo de micotoxinas tiene asociado efectos sobre la salud del ser humano y animales como: cáncer de hígado, hepatitis crónica, ictericia, hepatomegalia y cirrosis, causadas por la ingestión frecuente de pequeñas cantidades de aflatoxinas presentes en los alimentos¹⁴.

1.2.2 Propiedades físicas y químicas

Las aflatoxinas son compuestos incoloros, cristalinos, insípidos e inodoros, solubles en solventes moderadamente polares como cloroformo, metanol y dimetilsulfóxido. Químicamente, son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales¹⁵. Las aflatoxinas son estructuras que contienen un anillo dihidrodifurano o tetrahidrofurano unido a una cumarina que puede tener un anillo de cinco o seis átomos de carbono (figura 1.1).

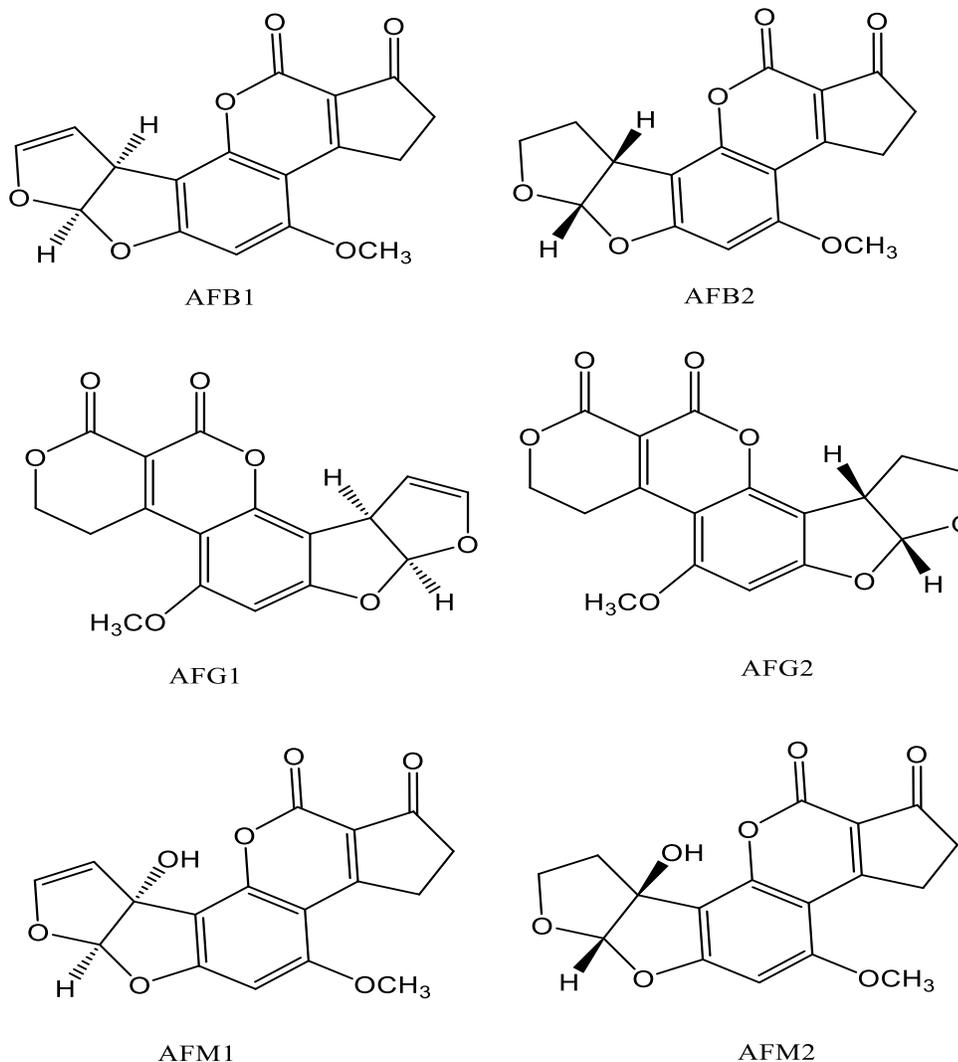


Figura 1.1 Estructura química de las principales aflatoxinas encontradas en alimentos contaminados.

Las cuatro aflatoxinas principales corresponden a aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (tabla 1.1). La letra B indica que tienen fluorescencia azul (blue) frente a la luz ultravioleta, mientras que la letra G (green) indica fluorescencia verde amarillenta. Por otro lado, la aflatoxina M1 (AFM1) produce una fluorescencia azul, mientras que la M2 produce fluorescencia violeta^{16,17}.

Las aflatoxinas tienen estructuras muy similares; las AFB1 y AFB2 difieren entre ellas por la presencia de un doble enlace más en la primera, las aflatoxinas G1 y G2 difieren entre sí en el mismo detalle estructural. Las aflatoxinas B difieren de las G

porque el anillo furano de las primeras se convierte en un anillo de lactona en las segundas. La AFM1 y AFM2 corresponden a los metabolitos hidroxilados de las aflatoxinas de tipo B.

Tabla 1.1 Propiedades físicas y químicas de las principales aflatoxinas.

Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Punto de fusión (°C)	Absorción (ε)		Longitud de onda de emisión de fluorescencia (nm)
				265 nm	360-362 nm	
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	12,400	21,800	425
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	12,100	24,000	425
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	9,600	17,700	450
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	8,200	17,100	450
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14,150	21,250	425
M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12,100	22,900	-----

1.2.3 Toxicidad e importancia

Las aflatoxinas se ligan o adhieren a ADN y ARN, y a proteínas formando aductos AFB₁-ADN, que afectan a todos los seres vivos, desde virus, vegetales y al hombre¹⁸. El ADN afectado puede almacenar las moléculas de AFB₁ por años, afectando a la síntesis de proteínas y ácidos grasos. Las AF son compuestos peligrosos y muy tóxicos, son los más potentes cancerígenos biológicos para animales y el hombre¹⁹.

Elevados niveles (dosis altas) de aflatoxinas en la dieta diaria pueden provocar efectos agudos o crónicos (por el consumo frecuente de dosis bajas) sobre la salud del hombre y en una gran variedad de especies animales, afectando a distintos

órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario²⁰.

Los principales efectos tóxicos sobre la salud humana y animal de efecto crónico incluyen carcinogenicidad, inmunosupresión y disrupciones endocrinas; la principal vía de exposición es la oral a través del consumo de alimentos contaminados, aunque también se presentan casos de micotoxicosis por inhalación¹⁴.

Respecto a los principales efectos agudos sobre la salud humana, estos corresponden a hepatitis aguda y se manifiesta por vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración grasa y necrosis del hígado, reportándose esta presentación clínica en exposiciones a alimentos contaminados con concentraciones entre 10 y 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 0.25 y 15.6 mg kg^{-1} ⁹. Dietas bajas en lípidos y/o proteínas hacen más vulnerable el hígado, por el contrario, el mismo órgano, con dietas con gran cantidad de ácidos grasos insaturados, es menos afectado por estas toxinas²¹.

La aflatoxina B1 es uno de los más potentes hepato-carcinógenos conocidos, y por ello, la exposición crónica a largo plazo a muy pequeñas cantidades de esta toxina a través de la dieta tiene importantes consecuencias para la salud ²².

1.2.4 Límites máximos permisibles de aflatoxinas

Entre las aflatoxinas, la AFB1 es la más estudiada, debido a que sus efectos tóxicos son cuantitativamente más importantes que los ocasionados por las demás. Por esta razón, se ha creído conveniente limitar el contenido total en aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en los productos alimenticios y el contenido en aflatoxina B1 en particular²².

Debido a las complicaciones de salud que se han observado a lo largo del tiempo en humanos y animales por la ingesta de aflatoxinas, diferentes países han implementado regulaciones estrictas para establecer los límites máximos permisibles de aflatoxina B1 y aflatoxinas totales en alimentos.

En Venezuela, la Norma Covenin 1935-87 correspondiente a maíz, siendo este un cereal y uno de los principales alimentos cultivados en el mundo, establece la cuantificación de la toxina con un límite máximo permitido de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 para consumo humano²³.

En Estados Unidos, hay un límite general para las aflatoxinas de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ en todos los alimentos²⁴. En Brasil, se establecieron niveles máximos de aflatoxinas para los cereales y sus productos (5 ng kg^{-1} , con la excepción del maíz), los alimentos elaborados a base de cereales y los preparados para lactantes ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$) y para el maíz y sus productos ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$)²⁵.

Igualmente, la legislación de la Unión Europea, establece niveles máximos permitidos de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para aflatoxina B1, de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2,) y de $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ para aflatoxina M1 en leche.²⁶

Respecto a México, de acuerdo con la NOM-247-SSA1-2008 se establece un límite máximo de aflatoxinas totales en los cereales destinados para el consumo humano y animal (entre los que se incluyen: arroz, avena, cebada, centeno, maíz, sorgo, triticale y trigo) de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de alimento.²⁷

1.2.5 Estabilidad y persistencia

Las aflatoxinas son bastante estables en muchos alimentos y resistentes a la degradación, dichas micotoxinas resisten temperaturas promedio de 280 a 320 °C, esto según el tiempo de calentamiento, la humedad del alimento y el pH. Así, las AF no se degradan con la ultrapasteurización, cocción, freído, hervido, fermentación, nixtamalización, sin embargo, se pueden reducir considerablemente la concentración de aflatoxinas si en el procesado de materias primas se utilizan protocolos de limpieza en los cuales se incluya retirar granos partidos y otros restos, la clasificación y la molienda²⁸.

1.2 Mecanismo de oxidación de AFB1 en medios ácidos y alcalinos

Estructuralmente, la molécula de AFB1 consta de dos grupos funcionales principales: anillos de furano y una cumarina altamente sustituida, que puede adoptar dos formas distintas, que dependen del pH. La oxidación y/o transformación se da en el aromático (fenol-quinona), que es la parte más reactiva de la molécula. En condiciones más alcalinas, pH superior a 11.6, la lactona adopta la forma de cumarina, sin llegar a oxidarse a cetona. En valores de pH inferiores a 6.8, la forma más estable es la de ácido de apertura del anillo, la cual se oxida hasta cetona con la transferencia de un electrón y un protón. Entre 6.8 y 11.6, las dos formas coexisten, y no es posible distinguirlas. A partir de esto, se puede sugerir que a pH=5.0 es la mejor condición para oxidar a AFB1, ya que la forma predominante es el derivado de ácido cumárico, que puede oxidarse con la pérdida de un electrón para formar la cetona; según el esquema de reacción propuesto, demostrado en la figura 1.2 ²⁹

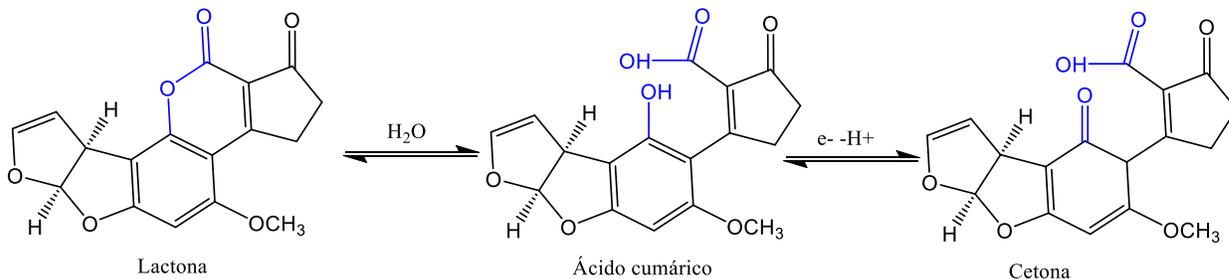


Figura 1.2 Esquema de reacción para la oxidación de AFB1. Las especies descritas son la lactona, el derivado del ácido cumárico y la cetona.

1.4 Técnicas analíticas oficiales para cuantificar Aflatoxina B1

La presencia de aflatoxinas en alimentos ha sido estudiada desde la década de los 90's; debido al riesgo que involucra la presencia de estas micotoxinas sobre la salud del ser humano y animales. La química analítica le ha dedicado gran parte de sus esfuerzos para el desarrollo de metodologías que permitan la cuantificación y detección de aflatoxinas totales y aflatoxina B1 en los alimentos ³⁰.

El método analítico más utilizado para la cuantificación y determinación de aflatoxina B1 y aflatoxinas totales es por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mediante la metodología establecida por la AOAC (2000) ^{31,32}. Esta es una técnica que consiste en fraccionar la muestra entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria donde ocurre una separación de los diferentes componentes de esta ³¹.

El método consiste en la extracción de una muestra en metanol: agua (7:3) que es previamente filtrada y diluida con agua, haciéndola pasar por una columna de inmunoafinidad conteniendo anticuerpos monoclonales específico para aflatoxina totales (B1, B2, G1 y G2). Las aflatoxinas son aisladas, purificadas y concentradas en columnas y removidas de anticuerpos con metanol. El total de aflatoxina es cuantificada por medidas de fluorescencia después de una reacción con bromuro de potasio (KBr). Se ha reportado una variación de esta metodología por HPLC acoplada a un detector fluorescencia y un detector electroquímico ^{32,33}. A pesar de ser una técnica que ofrece alta selectividad además de precisión y exactitud en los resultados, presenta desventajas desde los puntos de vista económico y ambiental, dados los altos costos de los solventes grado HPLC, tiempo de análisis y los problemas inherentes a la disposición de residuos químicos ³⁴.

Otra metodología reportada es la determinación de aflatoxina B1 por el método de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), su principio básico es el uso de anticuerpos o antígenos conjugados con una enzima que, al reaccionar con el sustrato específico, producen una reacción de color que se puede cuantificar con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm, que muestra especificidades del 100%, valor similar en pruebas de inmuno-cromatografía. El inmunoensayo entrega resultados cuantitativos y está validado por la AOAC ^{35,36}. A pesar de sus ventajas, la técnica no tiene buenos resultados al procesarse muestras compuestas, arrojando resultados inexactos; y al tratarse de inmunoensayos el costo del análisis es elevado ³⁷.

Otros métodos analíticos reportados para la cuantificación de AFB1 se resumen en la tabla 1.2, donde se destacan las ventajas y desventajas de cada uno

Tabla 1.2 Ejemplos de técnicas analíticas convencionales reportadas en la literatura para la determinación de AFB1.

Método	Ventajas	Desventajas	Tipo de muestra	Parámetros analíticos	Referencias
TLC	Puede detectar varios tipos de micotoxinas en una sola muestra. Excelente sensibilidad. Método oficial para las aflatoxinas.	Requiere de un técnico calificado. Pretratamiento de las muestras y equipos costosos. Carece de precisión. Separación destructiva de muestras.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mañí ✓ Maíz ✓ Leche ✓ Almendras ✓ Avellanas ✓ Pistachos ✓ Nueces ✓ Trigo ✓ Legumbres 	LD: 0.1-0.2 ng g ⁻¹ LQ: 0.2-0.3 ng g ⁻¹ % de recuperación: 79 - 85%	38, 39, 40
HPTLC	Ofrece una buena separación cromatográfica. Eficiente y mayor sensibilidad. Menor tiempo. Análisis múltiple. Mediciones cuantitativas selectivas y precisas.	Procedimiento costoso. Requiere de un operador especializado. Separación destructiva de las muestras.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Maíz ✓ Arroz ✓ Cereales ✓ Trigo ✓ Mañí 	LD: 0.05-0.12 µg kg ⁻¹ LQ: 0.02-0.21 µg kg ⁻¹ % de recuperación: 92 - 95%	41, 42, 43
LC	Separación rápida de los analitos. Precisión y exactitud. Alto rango dinámico y versatilidad. Buen porcentaje de recuperación.	Alto costo. Requiere de procedimientos de derivatización pre o post columna. Los eluyentes de fase inversa pueden apagar la fluorescencia de la micotoxina. Requiere operador especializado.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Maíz ✓ Cereal ✓ Nueces ✓ Cacao ✓ Arroz ✓ Leguminosas 	LD: 1.2-50 µg kg ⁻¹ LQ: 2.5-100 µg kg ⁻¹ % de recuperación: 79-105%	44, 45
GC	Separación rápida de los analitos. Buen porcentaje de recuperación. Separación de componentes baja.	Para aflatoxinas requiere proceso de derivatización. Técnica costosa. Requiere un paso previo de limpieza.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Maíz ✓ Nueces ✓ Arroz ✓ Cacahuete ✓ Trigo 	LD: 0.5 µg kg ⁻¹ LQ: 10 µg kg ⁻¹ % de recuperación: 65-81%	46, 47

1.5 Técnicas electroquímicas para cuantificar Aflatoxina B1

1.5.1 Fundamento

Las técnicas electroquímicas están basadas en las propiedades eléctricas del analito en disolución cuando forma parte de una celda electroquímica^{48,49}.

Estos métodos analíticos cuantitativos se centran principalmente en el estudio de la transformación de la energía eléctrica a química y viceversa; se investigan los procesos fisicoquímicos que tienen una relación entre la reacción química de oxidación o reducción y la electricidad, los cuales ocurren en la interfase entre un conductor químico y un conductor iónico^{48,49}.

En las reacciones electroquímicas se produce una transferencia de electrones entre una especie que se oxida (pierde electrones) y una especie que se reduce (gana electrones); de esta forma se llama reductor a la especie que cede los electrones y oxidante a la que los acepta. En los procesos electroquímicos, se controla una variable eléctrica y se monitorean los cambios en las demás, que indirectamente describen los fenómenos químicos que ocurren en la superficie del electrodo^{50,51}.

Las técnicas electroquímicas aplicadas a la química analítica se caracterizan por una alta sensibilidad, gran selectividad, elevada precisión y exactitud, rango lineal amplio, bajos límites de detección y cuentan con una instrumentación de bajo costo y portátil. Los análisis electroquímicos se emplean con frecuencia con diferentes fines en la industria y el medio ambiente, así como en el estudio de medicamentos, alimentos y muestras biológicas⁵³.

1.5.2 Voltamperometría

Entre las técnicas electroanalíticas más utilizadas se encuentra la voltamperometría, la cual se basa en la medición de una corriente eléctrica en función a un potencial aplicado sobre un electrodo de trabajo sumergido en una solución electrolítica que contiene una especie electroactiva. El flujo de corriente eléctrica se debe a reacciones de oxidación-reducción (redox) que se producen en la interfase entre el electrodo de trabajo y la disolución de electrolito⁵⁰.

En la voltamperometría, se imprime una señal de excitación de potencial variable a un electrodo de trabajo de una celda electroquímica. Esta señal de excitación produce una respuesta de corriente característica para cada tipo de voltamperometría (figura 1.3) ⁵⁰. Este proceso se puede repetir numerosas veces a medida que la corriente se registra en función del tiempo, lo que corresponde a las llamadas voltamperometrías cíclicas.

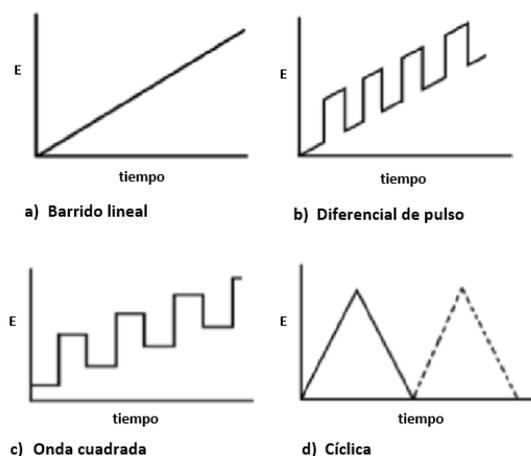


Figura 1.3 Señales de excitación de voltaje contra tiempo utilizadas en voltamperometría.

La intensidad de corriente registrada durante el análisis electroquímico de acuerdo con las señales de excitación es representada en un diagrama de corriente-voltaje denominado voltamperograma, en donde se designa al potencial de voltaje en el eje (x) y a la intensidad de corriente en el eje (y) (figura 1.4).

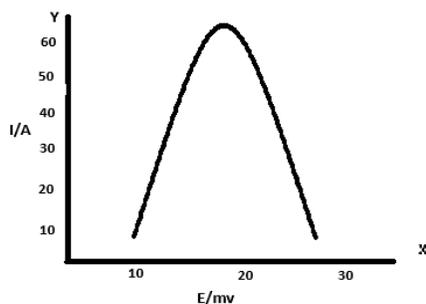


Figura 1.4 Ejemplo de un voltamperograma.

En el análisis de aflatoxinas se han utilizado técnicas voltamperométricas como la voltamperometría cíclica (VC) ⁵³, la voltamperometría diferencial de pulso (VDP) ⁵⁴ y la voltamperometría de onda cuadrada (VOC) ⁵⁵, en donde dependiendo del tipo

de celda y analito, se selecciona la técnica voltamperométrica que más se adecúe a las necesidades del sistema electroquímico.

1.5.3 Voltamperometría cíclica

La VC es una técnica electroanalítica que se basa en la aplicación de una señal de excitación al electrodo de trabajo en forma de onda triangular partiendo del potencial de equilibrio (E_{eq}). Después de aplicar una rampa de potencial lineal, se invierte la rampa para volver a llevar el potencial a su valor inicial de E_{eq} (figura 1.5). El ciclo se puede repetir n número de veces⁴⁸.

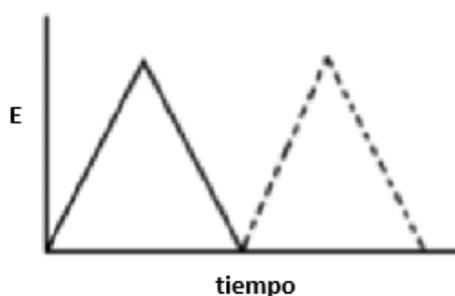


Figura 1.5 Señal de excitación en Voltamperometría Cíclica.

Todos los datos obtenidos se reúnen en los llamados voltamogramas que son gráficos que muestran la variación de la corriente versus el voltaje aplicado⁴⁸.

En una semirreacción de oxidación (pico anódico) en una celda electroquímica, los electrones fluyen desde las especies en solución al electrodo. Frecuentemente, este pico de oxidación aparece al escanear de potenciales negativos a positivos. En una semirreacción de reducción (pico catódico), los electrones fluyen desde el electrodo a la especie en solución, dando como resultado una corriente catódica. Este tipo de corriente se observa con mayor frecuencia al escanear de potenciales positivos a negativos^{48,49}.

La figura 1.6 muestra un voltamperograma cíclico típico con picos de corriente en sentido anódico y catódico, ambos con contribuciones de corrientes faradaicas y no faradaicas. Las corrientes faradaicas están vinculadas a las reacciones electroquímicas que ocurren sobre la superficie del electrodo, mientras que las no faradaicas son más generales y pueden surgir de diversas fuentes^{48,56}.

Algunas variables importantes en un voltamperograma cíclico son el potencial de pico catódico (E_{pc}), el potencial de pico anódico (E_{pa}), la intensidad de corriente de pico catódica (I_{pc}) y la intensidad de corriente de pico anódica (I_{pa})^{48,56}.

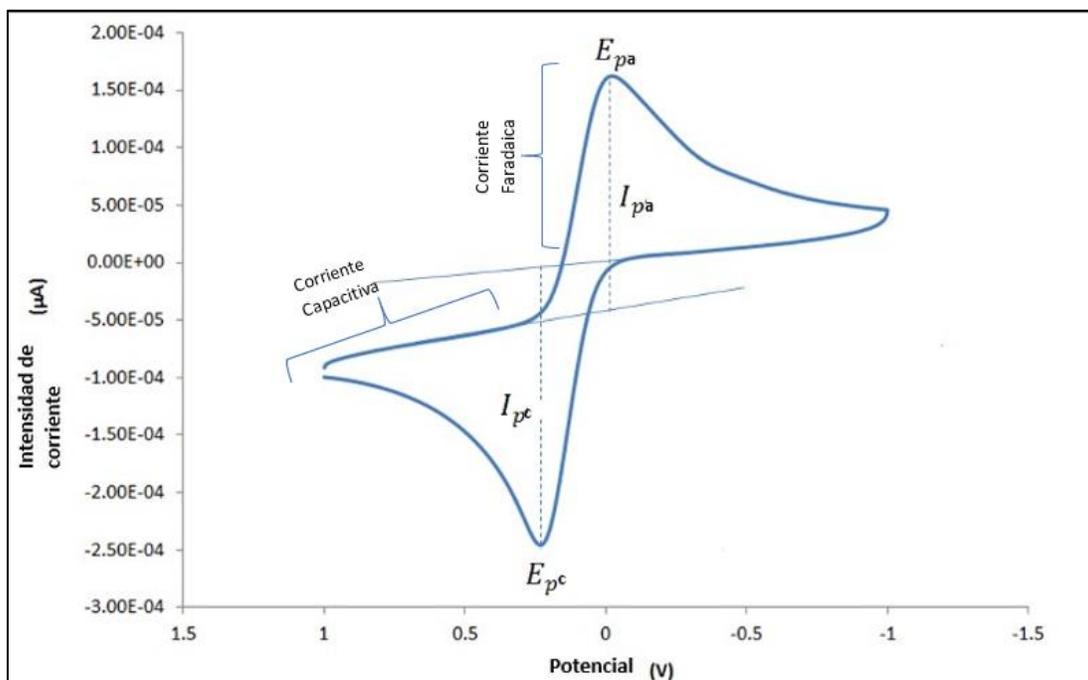


Figura 1.6 Representación de un voltamperograma cíclico.

1.5.4 Cinética de reacción sobre la superficie del electrodo

La voltamperometría cíclica es una caracterización analítica muy importante en el campo de la electroquímica. Cualquier proceso que incluya transferencia de electrones puede ser investigado con esta técnica electroquímica⁵⁶.

Mediante la voltamperometría cíclica se puede tener información acerca de la cinética de reacción sobre la superficie del electrodo de trabajo. Lo anterior se logra, realizando un gráfico linealizado de la respuesta voltamperométrica del analito a diferentes velocidades de barrido y haciendo uso de la ecuación de Randles-Sevcik y/o la ecuación de adsorción, según sea el caso⁵⁷.

1.5.4.1 El fenómeno de difusión y la Ecuación de Randles-Sevcik

En un sistema electroquímico, comúnmente el mecanismo de transporte que rige el movimiento de iones y moléculas hacia la superficie del electrodo de trabajo es el fenómeno de difusión. La difusión se define como el desplazamiento de las moléculas de una sustancia de una zona de mayor concentración a otra de menor concentración.

Con la ecuación de Randles-Sevcik es posible evaluar el coeficiente de difusión de las especies electroactivas. Esto permite a los investigadores disponer de datos cuantitativos de cómo afectan los distintos factores a este parámetro crucial y ayuda a optimizar el sistema electroquímico ⁵⁸.

El fenómeno de difusión se rige de acuerdo con la ecuación 1:

$$i_p = 0.4463 nFAC \sqrt{\frac{nFvD}{RT}} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde i_p es la corriente de pico, n es el número de electrones de la reacción, F es la constante de Faraday, A es la superficie del electrodo de trabajo, C es la concentración de la especie, v es la velocidad de barrido, D es el coeficiente de difusión, R es la constante de los gases y T es la temperatura en K.

Para un sistema electroquímico controlado por difusión, el gráfico de la intensidad de corriente frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido muestra una tendencia lineal.

1.5.4.2 Adsorción en procesos electroquímicos

La adsorción de iones y moléculas (adsorbato) sobre la superficie de electrodos (sustrato) es un fenómeno de gran importancia en electroquímica. En muchos casos, la adsorción del reactante o del electrolito es la primera etapa en una

reacción electroquímica. La adsorción de especies puede acelerar el mecanismo de reacción o inhibir la transferencia de electrones ⁵⁹.

En términos generales, la adsorción en sistemas electroquímicos depende de factores como la temperatura y concentración del adsorbato, pero además depende fuertemente de la polarización impuesta al electrodo, ya que las especies presentes en solución pueden adsorberse y/o desorberse sobre el electrodo en una región específica de potencial ⁵⁸.

Un proceso de adsorción sobre la superficie del electrodo se rige de acuerdo con la ecuación 2:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma A v}{4RT} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde i_p es la corriente de pico, n es el número de electrones de la reacción, F es la constante de Faraday, A es la superficie del electrodo de trabajo, Γ es la concentración de superficie, v es la velocidad de barrido, R es la constante de los gases y T es la temperatura en K.

En teoría, ambas ecuaciones (1 y 2) se pueden escribir como (Ecuación 3):

$$i_p = a v^b \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde: la corriente medida (i_p) a un potencial fijo es directamente proporcional a la velocidad de barrido (v) elevada a b (donde b puede ser 1 o 0.5) y a es una constante de proporcionalidad que involucra los demás términos descritos en la ecuación 1 o 2, ya sea el caso.

Si se aplica logaritmo base 10 en ambos lados de la ecuación 3, tomando a "b" como el valor de la pendiente, se obtiene una relación lineal entre el \log_{10} de la velocidad de barrido y el \log_{10} de la intensidad de corriente de pico.

En una reacción limitada exclusivamente por la difusión de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo, la ecuación lineal logarítmica tendría una pendiente

de 0.5; cuando la reacción está limitada por la adsorción la pendiente tendría un valor de 1.

1.5.5 Celda electroquímica

En voltamperometría se emplea una celda electroquímica (figura 1.7) constituida por tres electrodos que se sumergen en una disolución que contiene al analito y también un exceso de un electrolito no reactivo conocido como electrolito soporte, que sirve para dar conductividad eléctrica al sistema y desde donde se lleva a cabo el transporte de materia hacia la superficie del electrodo de trabajo para que se lleve a cabo la reacción de transferencia de electrones. Los electrodos que se usan para construir la celda electroquímica son:

- a) **Electrodo de referencia (ER):** tiene como función dar una medida de potencial constante, fiable y conocida que sirva de referencia para medir la diferencia de potencial entre este y el electrodo de trabajo^{16,38}.

El electrodo de referencia de Ag/AgCl saturado con KCl es el más utilizado en voltamperometría.

- b) **Electrodo auxiliar (EA):** también llamado contraelectrodo, tiene la función de permitir el paso de la corriente generada en el electrodo de trabajo, posibilitando cerrar el circuito eléctrico y así evitar oscilaciones en el electrodo de trabajo producidas por los efectos de los fenómenos redox inducidos en su interfase. El electrodo auxiliar debe ser inerte en las condiciones de trabajo requeridas (potenciales, pH y solutos de la celda)^{16,38}. Entre los más utilizados se encuentran el platino y la barra de grafito.
- c) **Electrodo de trabajo (ET):** es aquel cuyo potencial frente a un electrodo de referencia es variado con el tiempo (en voltamperometría). El electrodo de trabajo es el electrodo en el que se oxida o reduce el analito de interés. La mayoría de los electrodos de trabajo consisten en metales inertes, como oro, plata, platino o carbón inerte como carbón vítreo o electrodos de pasta de carbono, este último siendo uno de los más utilizados debido a sus ventajas

de corriente de fondo muy baja, naturaleza compuesta, incluida la facilidad de modificación y renovación ³⁸.

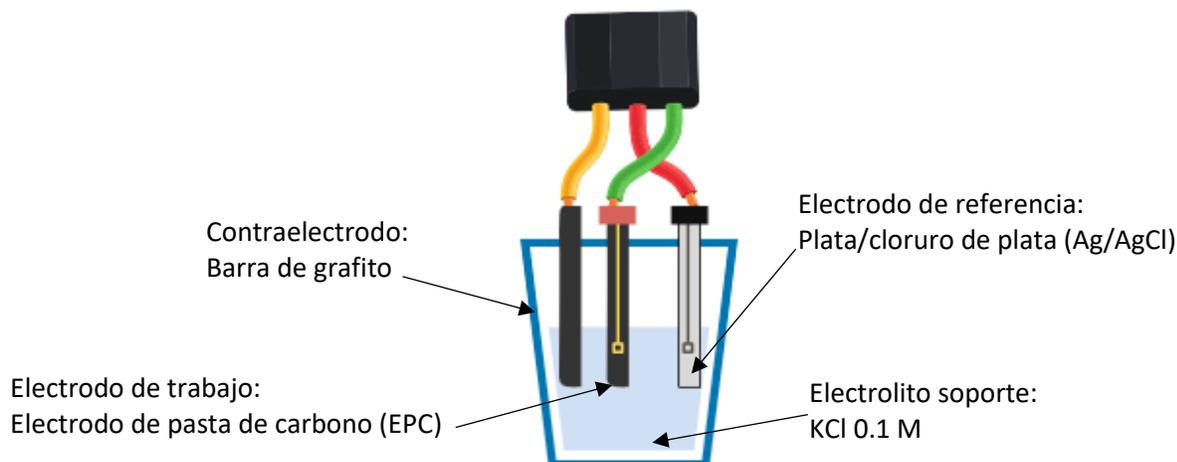


Figura 1.7 Esquema típico de una celda electroquímica formada por un electrodo de pasta de carbono (WE), un electrodo de Ag/AgCl (RE) y una barra de grafito (AE).

1.6 Sensores electroquímicos

Un sensor electroquímico es un dispositivo químico que responde a cambios específicos en el potencial o en la corriente eléctrica como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa con él ^{56,60}.

El sensor electroquímico está formado por un receptor y un transductor (figura 1.8), capaz de transformar información sobre las sustancias químicas en señales eléctricas medibles y analíticamente útiles. El receptor interacciona con el analito produciendo o desencadenando en el mismo una serie de cambios químicos que inducen en el transductor la generación de señales eléctricas. Estas señales son transmitidas hasta un instrumento de medida y generalmente procesadas informáticamente, pudiendo inferir de ellas mediante diferentes técnicas la información requerida de la sustancia analizada ⁶¹.

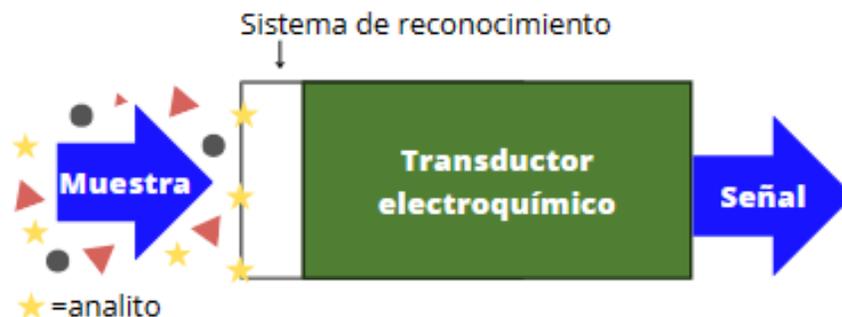


Figura 1.8 Representación de elementos de un sensor electroquímico.

Los sensores electroquímicos utilizados para la determinación de Aflatoxina B1 en alimentos, dependiendo del elemento de reconocimiento, caen dentro de la clasificación de biosensores y sensores no enzimáticos.

1.6.1 Biosensores utilizados en la determinación de AFB1

Un biosensor es un dispositivo que se basa en el reconocimiento del analito por un elemento de detección biológico (bioreceptor) y un transductor fisicoquímico que convierte la señal biológica en una señal electrónica ⁶².

Uno de los biosensores mayormente utilizados para la determinación de AFB1 está basado en la inmovilización de anticuerpos sobre la superficie del electrodo por medio de interacciones electrostáticas, lo que permite una determinación directa o indirecta de Aflatoxina B1 ^{63,64}. Los biosensores de afinidad, con anticuerpos como elementos de bioreconocimiento, reciben el nombre de inmunosensores, ejemplo de estos biosensores es el que reportó Owino en 2008 con el desarrollo de un inmunosensor electroquímico inmovilizando AFB1-albúmina sérica bovina (AFB1-ASB) en un electrodo de carbón vitreo modificado con politionina (PTH) y nanopartículas de oro (Nps-Au). La detección se basó en la competencia entre AFB1 libre y el conjugado AFB1-ASB inmovilizado por los sitios de unión del anticuerpo anti-AFB1 libre (figura 1.9). La respuesta mediante voltamperometría diferencial de pulso cayó después de un aumento en el nivel de AFB1 en el rango de trabajo lineal de 0.6 a 2.4 ng mL⁻¹, alcanzándose un límite de detección de 0.07 ng mL⁻¹ ⁶⁵.

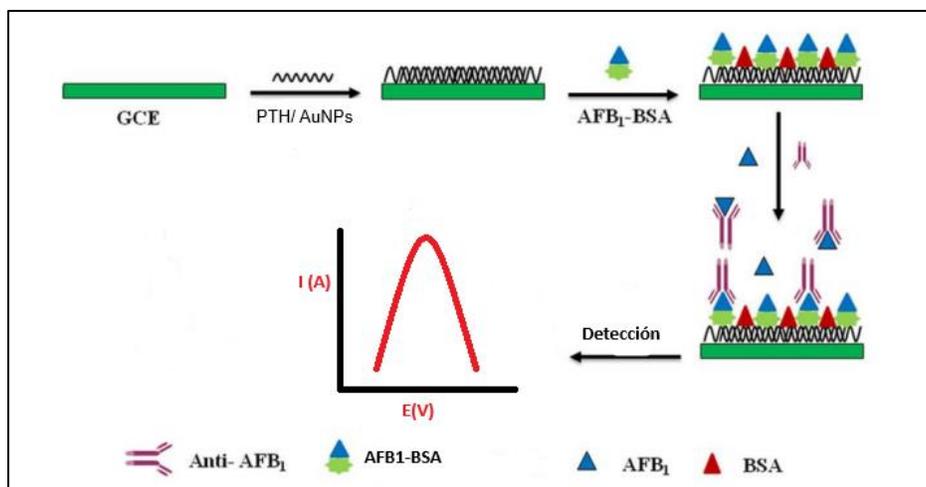


Figura 1.9 Esquema del funcionamiento de un inmunosensor inmovilizando AFB1-ASB sobre la superficie del electrodo para la determinación de AFB1.

La utilización de biosensores para la detección de aflatoxina B1 constituye un método popular, por las ventajas que estos ofrecen como: alta sensibilidad, alta selectividad, equipo portátil y su posibilidad de automatización⁶⁶. En la tabla 1.3 se resumen otros trabajos reportados en bibliografías para la determinación de AFB1 con el uso de biosensores.

Tabla 1.3 Estudios realizados utilizando biosensores como métodos de detección de aflatoxina B1.

Electrodo	Técnica	Rango de detección	Sensibilidad	LD (ng L ⁻¹)	Referencia
ECV/AuNps/PTH/AFB1-ASB	VDP	600-2400 ng L ⁻¹	1.23 $\mu\text{A ng}^{-1} \text{mL}^{-1}$	70	65
Anti-AFB1/OGR/ITO	VC	12.5-150 ng L ⁻¹	68 $\mu\text{A ng}^{-1} \text{mL}^{-1} \text{cm}^{-2}$	12	66
Anti-AFB1/chitosan-AuNps	VC	20-300 ng L ⁻¹	72.34 $\mu\text{A ng}^{-1} \text{mL}^{-1} \text{cm}^{-2}$	12	67
ASB/Anti-AFB1/Mn ₂ O ₃ /ITO	VDP	1-1000 ng L ⁻¹	2.044 $\mu\text{A ng}^{-1} \text{mL}^{-1} \text{cm}^{-2}$	55	62
ASB/anti-AFB1/AuNps/PEDOT/ITO	VDP	100-250 ng L ⁻¹	3.72 $\mu\text{A ng}^{-1} \text{mL}^{-1}$	4.5	68

OGR: óxido de grafeno reducido; ITO: óxido de indio y estaño; AuNps: nanopartículas de oro; ASB: Albúmina sérica bovina; PEDOT: Poli(3,4-etilenodioxitiofeno); ECV: Electrodo de carbón vítreo VC: Voltamperometría Cíclica; VDP: Voltamperometría diferencial de pulso.

A pesar de que el uso de biosensores muestra buenos parámetros analíticos y competitivos, la inmovilización de anticuerpos sobre la superficie del electrodo suele ser un procedimiento tedioso, además de presentar baja estabilidad a temperaturas mayores de 30°C, afectando gravemente la sensibilidad y tiempo de vida media del dispositivo⁶⁵.

1.6.2 Sensores no enzimáticos utilizados para la determinación de AFB1

En los últimos años, la química analítica ha centrado esfuerzos para el desarrollo de nuevas metodologías electroquímicas que puedan remplazar a los biosensores y superar las limitaciones que estos presentan. El uso de materiales inertes como nanopartículas metálicas y óxidos metálicos para el desarrollo de sensores electroquímicos no enzimáticos ha demostrado ser una alternativa viable para el uso de biosensores enzimáticos⁷⁰. La principal ventaja de este tipo de sensores es su capacidad de ser reusado por largos periodos de tiempo sin perder su sensibilidad⁵².

En el año 2019, Gevaerd y colaboradores reportaron el desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de AFB1 por voltamperometría con el uso de un electrodo serigrafado modificado con nanopartículas de oro (Nps-Au) y puntos cuánticos de grafeno (PCG). La detección se basó en la oxidación de la AFB1 sobre la superficie del electrodo, mostrando un incremento en la intensidad de corriente anódica del voltamperograma al aumentar la concentración de AFB1 en un rango de trabajo de 1 a 50 nM con un límite de detección de 1.5 nM²⁹.

Para el año 2022 investigadores de la UAEH y UAM reportaron el desarrollo de una metodología voltamperométrica para la determinación de AFB1 usando un electrodo de carbón vítreo modificado con una película de bismuto. Los límites de detección y de cuantificación que se obtuvieron después de la de la optimización de la VPD mediante un diseño Box-Behnken fueron 11.19 y 37.31 ng L⁻¹ respectivamente. Estos parámetros indican que es posible cuantificar la aflatoxina B1 en un intervalo de concentraciones a nivel traza, tal como se encuentra en alimentos⁵⁴.

Se puede observar que los sensores no enzimáticos mostraron alta estabilidad, selectividad, reproducibilidad y simplicidad para la determinación de AFB1, al momento de modificar el electrodo de trabajo con nanopartículas metálicas, ya que estas sirven como electrocatalizadores para la oxidación de la AFB1 sobre la superficie del electrodo, mejorando significativamente los parámetros analíticos.

1.7 Electrodo de pasta de carbono

La utilización de los sensores electroquímicos en muchas áreas de análisis ha requerido una mejora en las carencias que los electrodos convencionales presentaban: mala reproducibilidad, tareas de limpieza o recuperación tediosas ⁶¹.

La miniaturización de los electrodos y las posibilidades de fabricación de electrodos con carácter desechable surgidas en los últimos años, se presentan como una atractiva alternativa a la utilización de electrodos convencionales. Entre este tipo de dispositivos destacan los electrodos de pasta de carbono.

El carbono siempre se consideró como un sustrato ideal de electrodo, ya que tiene un rango de potencial amplio en ambas regiones anódicas y catódicas, además de baja corriente residual, fácil uso, bajo costo, tiempo de respuesta rápido y puede fabricarse en diferentes dimensiones^{60,71}. Los electrodos de pasta de carbono (EPC) han sido ampliamente utilizados por sus múltiples ventajas como: una superficie de trabajo renovable, fácil modificación, bajo costo y fácil preparación⁷¹.

Las partes elementales de un EPC (figura 1.10) constan de una punta o superficie de contacto, un tubo de polipropileno que actúa como material de soporte para una pasta homogénea constituida de polvo de grafito y un aglutinante (aceite de parafina).

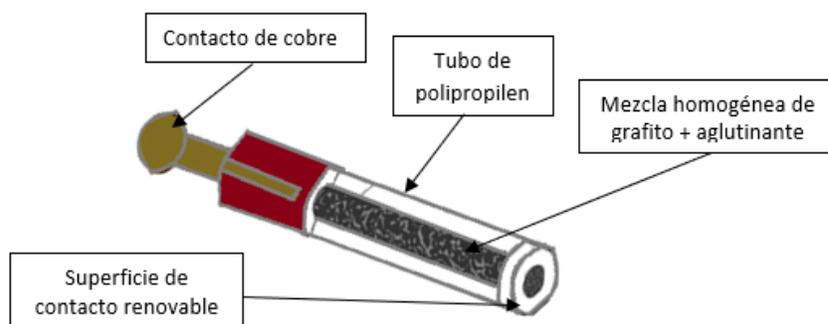


Figura 1.10 Partes de un electrodo de pasta de carbono.

1.7.1 Electrodo de pasta de carbono modificados

La modificación de electrodos de carbón con cierto tipo de materiales puede mejorar su respuesta electroquímica y a su vez la respuesta analítica, así como la selectividad hacia el analito; esto ha hecho que una de las áreas más importantes en la investigación electroquímica sea el desarrollo de electrodos modificados. Las modificaciones pueden ser superficiales e incluyen la aplicación irreversible de sustancias adsorbentes, el enlace covalente entre el modificador y la superficie del electrodo y el recubrimiento con películas de polímeros o de otras sustancias. La modificación de los electrodos de pasta de carbono se realiza de manera muy sencilla sólo agregando en la mezcla composite el modificador deseado⁷².

1.7.2 Nanopartículas de óxido de cobre como modificador

El uso de nuevos sistemas analíticos inspirados en la nanotecnología es una estrategia que ofrece varias ventajas a los sensores electroquímicos, particularmente en la determinación de AFB1.

La incorporación de nanopartículas de óxidos metálicos para la modificación de electrodos de trabajo representa un área de oportunidad para la creación de sensores electroquímicos con mayor sensibilidad y límites de detección más bajos, ya que estos materiales incrementan el área electroactiva del electrodo de trabajo y mejoran la transferencia de electrones en el proceso de oxidación o reducción^{73,74}.

Las nanopartículas de óxido de cobre (Nps-CuO) han atraído un gran interés durante los últimos años debido a las ventajas que presentan, ya que el cobre es un

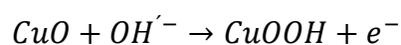
elemento más rentable, abundante y presenta una alta conductividad iónica. En la electroquímica, comúnmente se utilizan como electrocatalizadores para las reacciones de oxidación o reducción que se lleven a cabo en la superficie del electrodo de trabajo ^{75,76}.

En el año 2013 Huang y colaboradores, sintetizaron y probaron tres diferentes nanoestructuras de CuO (nanopartículas, nanoplaquetas y nanobarras), los electrodos exhibieron excelente catálisis para la oxidación de la glucosa. El estudio electroquímico mostró alto efecto catalítico en las nanopartículas en comparación con las nanobarras y las nanoplaquetas. Esto, se atribuye a la habilidad de las nanopartículas para transferir electrones y la alta área superficial que presentan. El análisis electroquímico además demostró que el electrodo modificado con nanopartículas de CuO posee buena detección de la glucosa con un rango lineal de hasta 6 mM y una sensibilidad de $1.43 \text{ mA cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$ en 0.2 M de NaOH ⁷⁷.

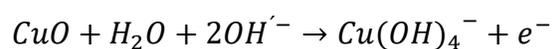
En el año 2020, Jamil y colaboradores, reportaron la determinación electroquímica de ácido úrico mediante voltamperometría cíclica con el uso de nanoestructuras de CuO. Las nanoestructuras de óxido de cobre mostraron un comportamiento electrocatalítico sorprendente en la detección de ácido úrico, mostrando una buena respuesta lineal entre valores de 0.001–351 mM, con un límite de detección de 6mM; además de ser un método simple y prácticamente factible, libre de pretratamiento de muestras, configuración experimental complicada y tiempo de análisis prolongado⁷⁸.

En el año 2019 Chunyan y colaboradores reportaron la determinación electroquímica de aflatoxina B1 (AFB1) utilizando una estructura metal-orgánica a base de cobre (Cu-MOF) y Nanopartículas de Oro (AuNps) por Voltamperometría de Pulso Diferencial. El uso de Cu-MOF mejoró significativamente la señal electroquímica en la determinación de AFB1 en un rango lineal de 1×10^{-6} -1 ng mL⁻¹ con un límite de detección de 6.7×10^{-7} ng mL⁻¹. Además, con la metodología propuesta se determinó AFB1 en cerveza con valores de recuperación que oscilaron entre 96% y 103% ⁵³.

Por otra parte, diversos investigadores han dado a conocer que a pHs alcalinos el CuO puede ser oxidado. En el año 2010 Jiang y colaboradores reportaron la oxidación del CuO a CuOOH, con el intercambio de un electrón, en condiciones atmosféricas, mostrando un pico anódico entre +0.7 y +0.8 V en un electrolito soporte de KCl 100 mM y $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 0.01 M; lo que da paso a una nueva área de investigación en la electroquímica⁷⁹. Las reacciones de oxidación del CuO reportadas son las siguientes (ecuación 4a y 4b):



Ecuación 4a



Ecuación 4b

1.8 Justificación

La AFB1 es una micotoxina altamente cancerígena producida por varias especies de hongos del género *Aspergillus*, que se encuentra frecuentemente en alimentos contaminados, principalmente cereales y frutos secos, por lo tanto, su detección rápida, sensible y precisa en alimentos es de gran importancia.

La determinación de AFB1 se realiza mediante técnicas analíticas convencionales como lo son HPLC, TLC y ELISA; a pesar de la alta especificidad, exactitud y precisión de estos métodos, resultan costosos, tardados, algunos no son amigables con el medio ambiente y requieren personal especializado para la operación de los equipos necesarios para realizar la técnica.

Es por esto que en este proyecto se plantea la determinación de AFB1 en alimentos por voltamperometría cíclica, usando sensores electroquímicos no enzimáticos basados en electrodos de pasta de carbono modificada con nanopartículas de CuO, debido a que en varios reportes en la literatura, estos materiales han demostrado ser útiles para la cuantificación muchas moléculas de interés biomédico y ambiental, por lo que se espera que la metodología propuesta sea tan eficiente como las metodologías convencionales para determinar AFB1, pero además de una manera rápida, menos costosa, sencilla y de fácil uso.

1.9 Objetivo general

Desarrollar una metodología por voltamperometría cíclica mediante el uso de electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de óxido de cobre para la determinación de Aflatoxina B1 en muestras de alimentos.

1.10 Objetivos específicos

- Realizar la optimización del porcentaje de nanopartículas de óxido de cobre dentro de la pasta de carbono, el pH del electrolito soporte y la velocidad de barrido del sistema electroquímico empleando voltamperometría cíclica, para la mejora de los parámetros analíticos.
- Realizar un estudio de repetibilidad y reproducibilidad para evaluar la precisión y confiabilidad de la metodología propuesta.
- Evaluar el efecto de la concentración de Aflatoxina B1 en la señal de respuesta anódica del sensor Nps-CuO/EPC usando la metodología propuesta para la determinación de los parámetros analíticos.
- Evaluar la metodología propuesta para la determinación y cuantificación de AFB1 en muestras de maíz, cacahuate y leche.

CAPÍTULO 2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Reactivos

En este trabajo se emplearon reactivos químicos comerciales de grado analítico. La Aflatoxina B1 y 5,7-Dimetoxicumarina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

La construcción de los electrodos de pasta de carbono se realizó mezclando grafito en polvo, parafina y nanopartículas de óxido cobre (Nps-CuO) como modificante. El electrolito soporte fue preparado y ajustado con fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), fosfato de potasio (K_3PO_4), hidróxido de sodio (NaOH) y cloruro de potasio (KCl), reactivos de Sigma-Aldrich.

Para el pretratamiento de las muestras de leche, maíz y cacahuate se emplearon, ácido nítrico (HNO_3 , 70% pureza), metanol (CH_3OH , 99.9% pureza) y acetonitrilo (CH_3CN , 99.9% pureza) respectivamente, reactivos de J.T. Baker. El desarrollo experimental se llevó a cabo a temperatura ambiente haciendo uso de agua desionizada con una resistividad de $18.2M\Omega\text{ cm}^{-1}$.

2.2 Sistema electroquímico

En los experimentos electroquímicos se usó un sistema de tres electrodos: Ag/AgCl saturado como electrodo de referencia, una barra de grafito de alta pureza de 6 mm de diámetro como contraelectrodo y un electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de óxido de cobre en la mezcla composite como electrodo de trabajo.

El electrolito soporte empleado consistió en una solución de cloruro de potasio 0.1 M en un buffer de fosfatos 0.1 M. Para la optimización del medio de trabajo se ajustó el valor de pH en el intervalo de 6 a 13, empleando una solución de NaOH saturada.

En las mediciones voltamperométricas se usa un potenciómetro/galvanostato marca Methrom, modelo Dropsens. Para medir los valores de pH de las diferentes soluciones se utilizó un potenciómetro marca CORNING, modelo Meter 450.

2.3 Preparación de estándares de AFB1 y 5,7-dimetoxicumarina (DMC) en medio acuoso

Debido a los efectos carcinogénicos e inmunosupresores que presenta la AFB1, se optó por utilizar DMC como plantilla “dummy” para el estudio y optimización del sistema electroquímico. Las plantillas ficticias o dummy, son análogos estructurales de la molécula de interés, cuyo uso radica en reemplazar a la molécula objetivo en la parte de optimización y/o detección del sistema, con el fin de reducir costos y evitar las complicaciones toxicológicas que supone el uso directo del analito.

Dado que AFB1 es un derivado de dihidrofurano cumarinas, DMC tiene una estructura central similar a la de AFB1 (figura 2.1). El grupo metoxi en la posición 11 de DMC imita la estructura furano de AFB1^{81,82}.

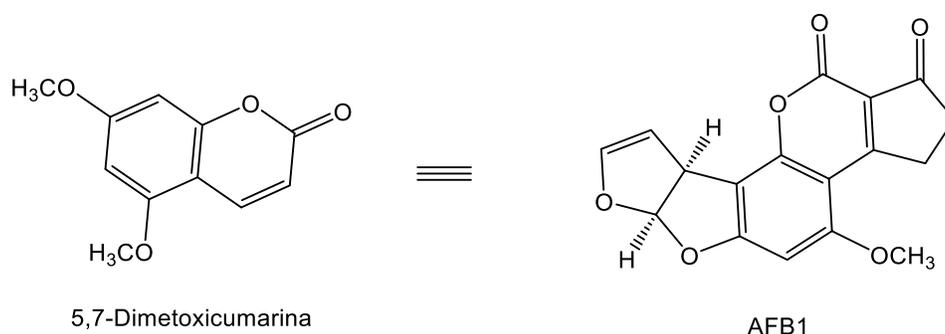


Figura 2.1 Estructura química de la 5,7-dimetoxicumarina (DMC) y la aflatoxina B1 (AFB1).

Se trabajó con un estándar de 200 mg L⁻¹ preparada con etanol (C₂H₆O) absoluto al 99.5%. Se realizaron diluciones del estándar de AFB1 utilizando el electrolito soporte hasta llegar a las concentraciones deseadas. El estándar de DMC, fue preparado de la misma forma.

2.4 Preparación del electrodo de pasta de carbono modificado con óxido de cobre

La pasta de carbono modificada se preparó mezclando cuidadosamente el polvo de grafito, con las nanopartículas de óxido de cobre y aceite mineral empleado como aglutinante. La mezcla fue homogeneizada durante 15 minutos de manera manual; posteriormente la pasta de carbono modificada fue empaquetada en un tubo de

plástico (jeringa para insulina). Por último, se insertó un contacto de cobre en uno de los extremos para ser conectado con el potenciostato (figura 2.2).

El electrodo de pasta de carbono sin modificar se preparó de manera similar sin incluir a las nanopartículas de óxido de cobre.

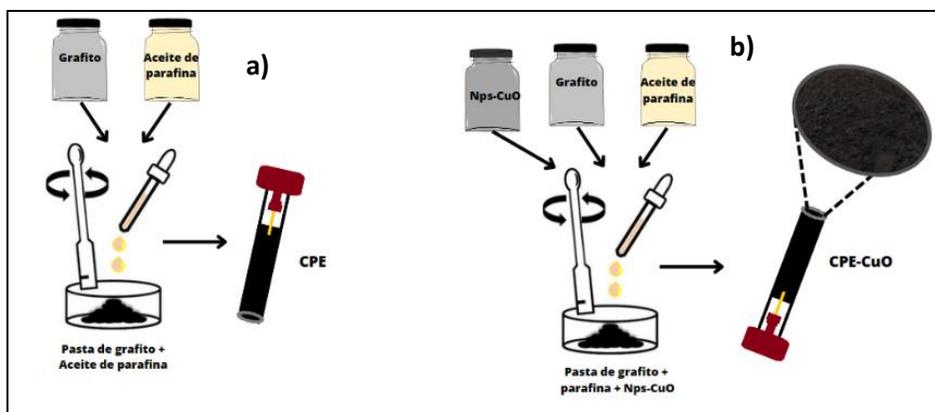


Figura 2.2 Proceso de elaboración de electrodos de pasta de carbono, a) Sin modificar, b) Modificados.figur

2.5 Caracterización electroquímica de la AFB1 usando el electrodo de pasta de carbono modificado

Se evaluó por voltamperometría cíclica la respuesta anódica sobre la superficie del electrodo de trabajo en presencia y ausencia de DMC en el electrolito soporte (KCl 0.1 M) considerando en su caso una concentración de 100 ng L⁻¹ de la molécula.

2.6 Efecto del pH del electrolito soporte

Se evaluó por voltamperometría cíclica, el efecto del pH del electrolito soporte sobre la señal de respuesta anódica del CuO en una solución KCl 0.1 M (blanco) y una solución con DMC 100 ng L⁻¹. El valor de pH de la solución electrolítica (KCl 0.1 M) fue ajustado en un intervalo de 6-13 con una solución de NaOH saturada. Se seleccionó el valor de pH que incremento la diferencia de intensidades de corriente en el proceso de oxidación entre un blanco y una muestra con el analito presente.

2.7 Efecto de la composición del electrodo

Se evaluó por voltamperometría cíclica, el efecto de la cantidad de óxido de cobre en la pasta de carbono sobre la señal de respuesta anódica en la superficie del electrodo de trabajo. Se evaluó el comportamiento electroquímico en la oxidación del CuO con porcentajes de 5%, 10%, 15%, 20% y 25% de CuO , en una solución electrolítica de KCl 0.1 M a pH 12; seleccionando la proporción de modificante que incremente la diferencia de intensidad de corriente anódica entre un blanco y una solución con 100 ng L^{-1} de DMC.

2.8 Efecto de la velocidad de barrido

Por medio de voltamperometría cíclica se estudió el efecto de la velocidad de barrido sobre la diferencia de intensidad de corriente anódica en el proceso de oxidación del CuO en ausencia y presencia de 100 ng L^{-1} de DMC. Para ello, el valor de la velocidad de barrido fue estudiado en un intervalo de $0.1\text{-}1.1\text{ V s}^{-1}$ en KCl 0.1 M a pH 12, seleccionando el valor que muestre la mayor diferencia de intensidad de corriente anódica.

2.9 Estudio de los procesos de difusión y adsorción sobre la superficie del electrodo de trabajo

La cinética de reacción sobre la superficie del electrodo fue evaluada de acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik y la ecuación de la adsorción (ecuaciones 1 y 2). Utilizando los datos del estudio anterior, se realizaron dos gráficos logarítmicos de la diferencia de intensidad de corriente versus la v y $v^{1/2}$ y en función de la linealidad de cada una de ellas se puede conocer información del tipo de proceso electroquímico, ya sea controlado por difusión ($b=0.5$) o adsorción ($b=1$).

2.10 Estudio de repetibilidad

El %DER para el estudio de repetibilidad y reproducibilidad se calculó con la ecuación 5, donde el %DER es función de la desviación estándar del conjunto de datos (s) sobre el promedio de estos (\bar{x}) por cien.

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad \text{Ecuación 5.}$$

El estudio de repetibilidad en el sensor se realizó preparando un electrodo de pasta de carbono modificado con 15% de nanopartículas de óxido de cobre con la metodología propuesta y realizando 5 mediciones sucesivas de la intensidad de corriente de pico anódico y una solución con 100 ng L⁻¹ de DMC. Se calculó la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER), cuyo valor debe ser menor al 10%, para demostrar una buena precisión en el sensor.

2.11 Estudio de reproducibilidad

El estudio de reproducibilidad se realizó preparando de manera independiente 5 electrodos de pasta de carbono modificados con 15% de nanopartículas óxido de cobre y realizando 5 mediciones consecutivas de la intensidad de corriente anódica para cada uno de ellos con la metodología propuesta y una solución con DMC 100 ng L⁻¹. Se calculó la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER), cuyo valor debe ser menor al 10%, para demostrar confiabilidad y una buena precisión entre los sensores (n=5).

2.12 Determinación de los parámetros analíticos del método propuesto

La metodología propuesta se empleó en el estudio del efecto de la variación de concentración de Aflatoxina B1. Se graficaron concentraciones crecientes de estándares de Aflatoxina B1 vs la intensidad de corriente anódica, para la construcción de una curva de calibración, en un intervalo de concentraciones de 20-140 ng L⁻¹.

2.12.1 Determinación de la sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del método se determinó aplicando el análisis de mínimos cuadrados a la curva de calibración, obteniendo la ecuación de la recta descrita como (ecuación 6):

$$\Delta i (\mu A) = [m (\mu A \text{ ng}^{-1} L) * [AFB1](\text{ng L}^{-1})] + b \quad \text{Ecuación 6.}$$

Donde se considera que la pendiente de la recta (m) es igual a la sensibilidad del método analítico.

2.12.2 Determinación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

La determinación del LD y LQ se realizaron mediante el estudio estadístico de la curva de calibración construida usando la metodología recomendada por la IUPAC.

El LD, definido como la concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por el método analítico, se determinó con la ecuación 7.

$$LD = \frac{(3 * S_{X/Y})}{S} \quad \text{Ecuación 7.}$$

Donde $S_{X/Y}$ es el error típico de la curva y S es la sensibilidad del método electroquímico (pendiente).

El LQ, definido como la concentración mínima de sustancia que puede ser cuantificada por el método analítico, se determinó con la ecuación 8.

$$LQ = \frac{(10 * S_{X/Y})}{S} \quad \text{Ecuación 8.}$$

2.13 Análisis en muestras reales

Se emplearon muestras de maíz, cacahuate y leche que fueron adquiridos en el mercado local de Pachuca Hidalgo, para la cuantificación de Aflatoxina B1 con la metodología propuesta.

Previo al análisis voltamperométrico, las muestras fueron sometidas a un procedimiento de extracción y limpieza con la finalidad de disminuir los posibles interferentes. Los pretratamientos de las muestras son descritos a continuación.

2.13.1 Maíz

El pretratamiento para las muestras de maíz se basa en una modificación de la NOM-247-SSA1-2008. Para la extracción se pesaron 25 g de muestra (maíz molido) y se licuó con 50 mL de solución de metanol: agua (80:20, v/v) por 15 minutos a alta velocidad. El extracto fue centrifugado durante 10 minutos a 4000 rpm. La solución resultante fue filtrada y guardada para su posterior análisis (figura 2.3) ^{27,83}.

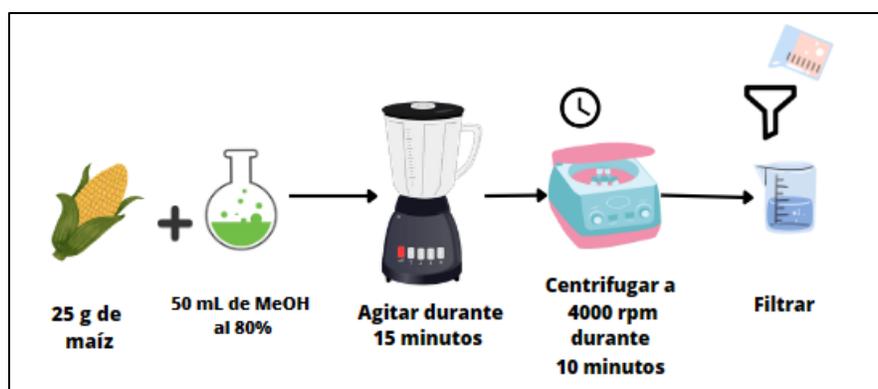


Figura 2.3 Pretratamiento de la muestra de maíz.

2.13.2 Cacahuete

El pretratamiento en las muestras de cacahuete se basó en una modificación del método descrito por Mengke Lv y colaboradores. Se pesaron 25 g de cacahuete en una licuadora, posteriormente se agregaron 50 mL de solución de acetonitrilo-agua (9:1) y se agitaron durante 1 hora. La solución de extracción fue centrifugada durante 10 minutos a 4000 rpm, posteriormente se filtró a través de un papel de filtro para eliminar el material sólido y el extracto se recogió para su análisis (figura 2.4)

84,85



Figura 2.4 Pretratamiento de la muestra de cacahuete.

2.13.3 Leche

Las muestras de leche fueron analizadas según el procedimiento descrito en la NOM-243-SSA1-2010⁸⁷ con algunas modificaciones. En un vaso precipitado de 50 mL, se adicionaron 5 mL de leche entera y 8 mL de HNO_3 6M. La solución fue llevada a calentamiento con agitación constante durante cuatro horas y media, posteriormente se dejó en reposo y fue guardada para su análisis. (figura 2.5)⁸⁸.

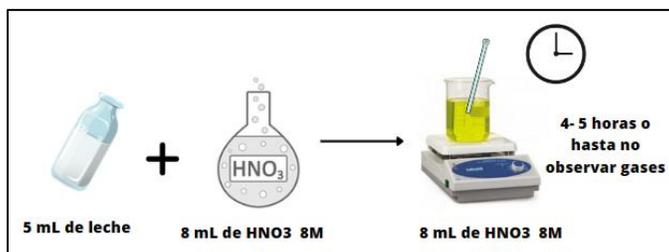


Figura 2.5 Pretratamiento de la muestra de leche.

2.14 Cuantificación de AFB1 en muestras reales

Concluido el pretratamiento, 100 µL de cada muestra fueron diluidos en 10 mL de una solución de KCl 0.1 M con un buffer de fosfatos a la misma concentración y dopadas con AFB1 30 ng L⁻¹, para ser analizadas por voltamperometría cíclica bajo la metodología propuesta.

La cuantificación de AFB1 en las muestras de leche, maíz y cacahuete se realizó mediante calibración por adición patrón, haciendo 3 repeticiones por cada muestra y obteniendo los porcentajes de recuperación de acuerdo con la ecuación 9.

$$\%R = \frac{\textit{Cantidad real}}{\textit{Cantidad teorica}} * 100 \qquad \textit{Ecuación 9.}$$

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización electroquímica de la AFB1 usando el sensor Nps-CuO/EPC

Mediante voltamperometría cíclica se aplicó un barrido en sentido anódico en una ventana de potencial de 0.2 V a 1.4 V y una velocidad de barrido de 100 V s^{-1} para evaluar el comportamiento electroquímico del electrodo de pasta de carbono modificado y sin modificar en una solución de KCl 0.1 M a pH 12.

En la figura 3.1 se observan los VCs correspondientes al sensor *NPs – CuO/EPC*, donde se aprecia un pico anódico entre un potencial de 0.8 - 1.2 V, asociado a la oxidación del CuO a *CuOOH* o $\text{Cu}(\text{OH})_4^{-79}$ (ecuación 4) sobre la superficie del electrodo de trabajo. En el voltamperograma obtenido por el EPC sin modificar se observa un pico anódico disminuido, asociado a la oxidación de grupos funcionales pertenecientes al carbono presente en el grafito por las condiciones alcalinas del medio.

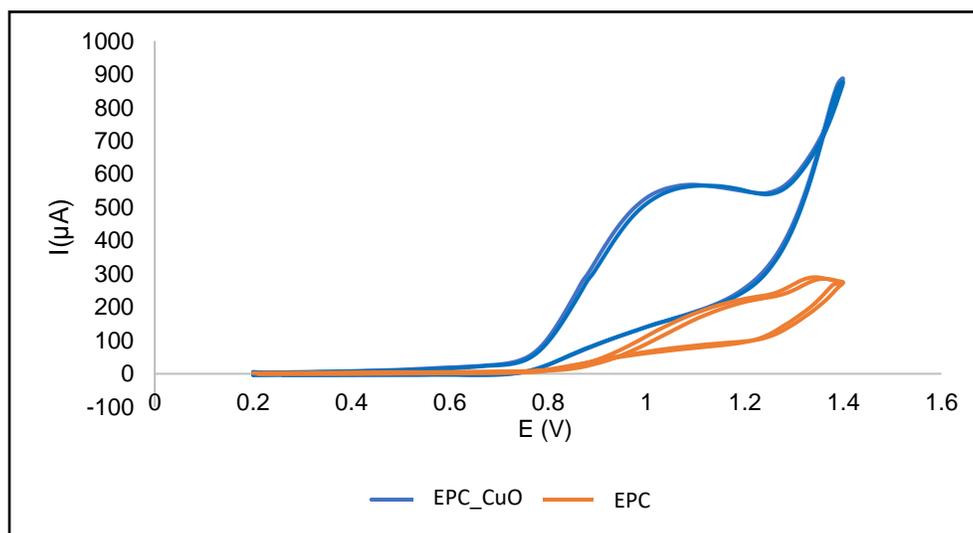


Figura 3.1 VC para un electrodo de pasta de carbono modificado con CuO (*Nps-CuO/EPC*) y un electrodo de pasta de carbono (*EPC*) en KCl 0.1 M a pH 12 (ajustado con NaOH), con una velocidad de barrido de 0.1 V s^{-1} en sentido anódico.

En la figura 3.2 se muestran los VCs obtenidos usando el sensor *NPs – CuO/CPE* en KCl 0.1 M a pH 12 sin y con 100 ng L^{-1} de DMC. En ellos, se observa una disminución de la intensidad de corriente en presencia de DMC respecto al blanco. Esto indica que el DMC interfiere en la transferencia de electrones sobre la

superficie del electrodo necesaria para la oxidación de CuO, disminuyendo la intensidad de corriente anódica esperada. Esto hace que se establezca como respuesta analítica hacia DMC (o AFB1) la diferencia entre las corrientes de pico anódico registradas en una solución blanco y en la solución conteniendo el analito.

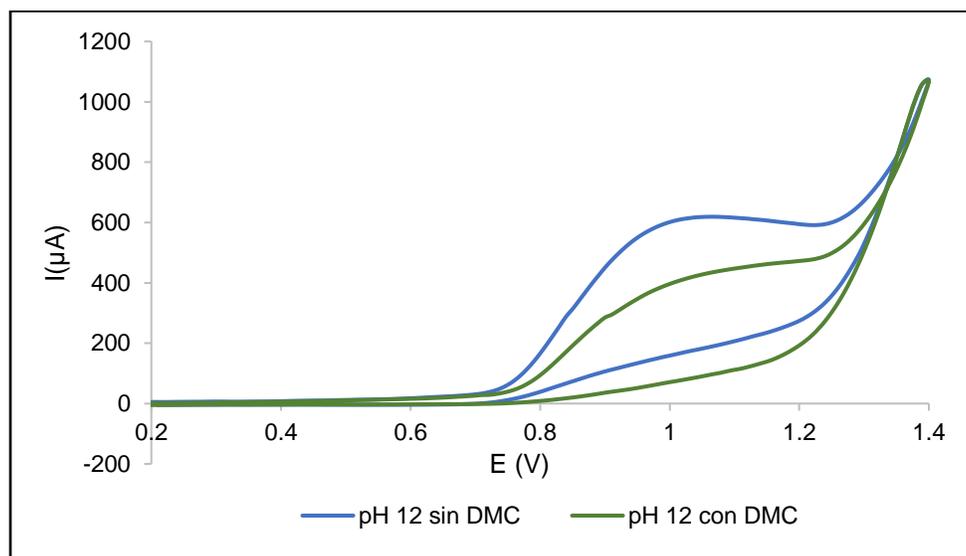


Figura 3.2 VC del sensor *CuO*–*NPs*/*EPC* obtenido en *KCl* 0.1 M a pH 12 sin y con 100 ng L⁻¹ de DMC, usando una velocidad de barrido de 0.1 V s⁻¹ en sentido anódico.

Los estudios anteriores indican que las nanopartículas de *CuO* permiten la determinación indirecta de DMC (o AFB1).

El mecanismo propuesto para la respuesta del *Nps-CuO/EPC* hacia el DMC se describe a continuación. El óxido de cobre presente en la pasta de carbono, se oxida de *CuO* a *CuOOH* favorecido por el medio básico y potencial aplicado (1 V). En el momento de agregar DMC (o AFB1) al sistema, es posible que se dé una interacción *Cu*²⁺-AFB1 (debido a los sitios activos que presenta el *CuO*⁸⁹), misma que impide la oxidación total del *CuO* presente en la superficie del electrodo de trabajo, ocasionando una pasivación en la señal anódica para la oxidación a *CuOOH*, la cual es proporcional a la cantidad de DMC (o AFB1) presente en la muestra^{90,91}.

La figura 3.3 muestra la estructura propuesta para la formación de un complejo *Cu*²⁺-AFB1, de acuerdo con una relación ion-dipolo, donde el catión *Cu*²⁺ establece una interacción con los oxígenos 7 y 20 de AFB1.⁹¹

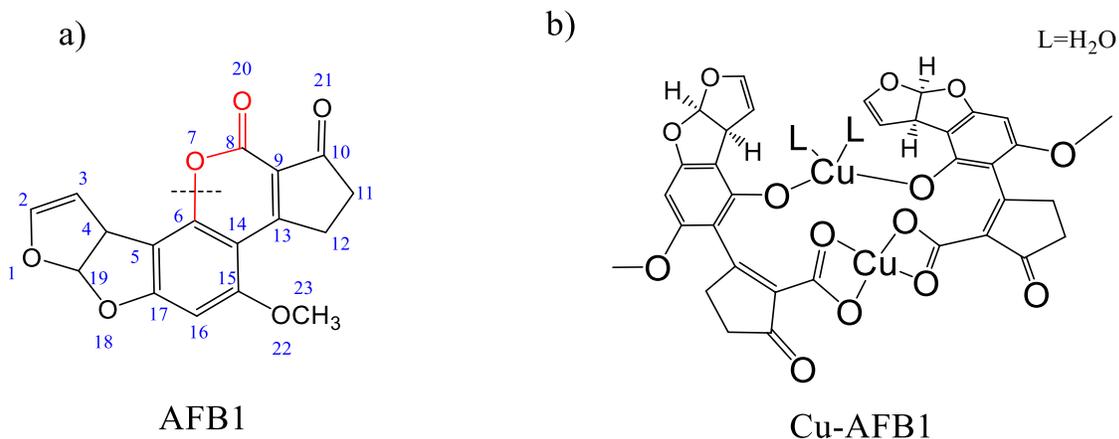


Figura 3.3 a) Estructura de AFB1 b) Complejo propuesto para la interacción entre el Cu^{2+} y AFB1.

En el caso de la molécula DMC (plantilla dummy de AFB1) se espera un comportamiento similar, con la formación de un complejo Cu^{2+} -DMC (figura 3.4), donde el catión Cu^{2+} interacciona con los oxígenos en las posiciones 1 y 11 del DMC ⁹¹.

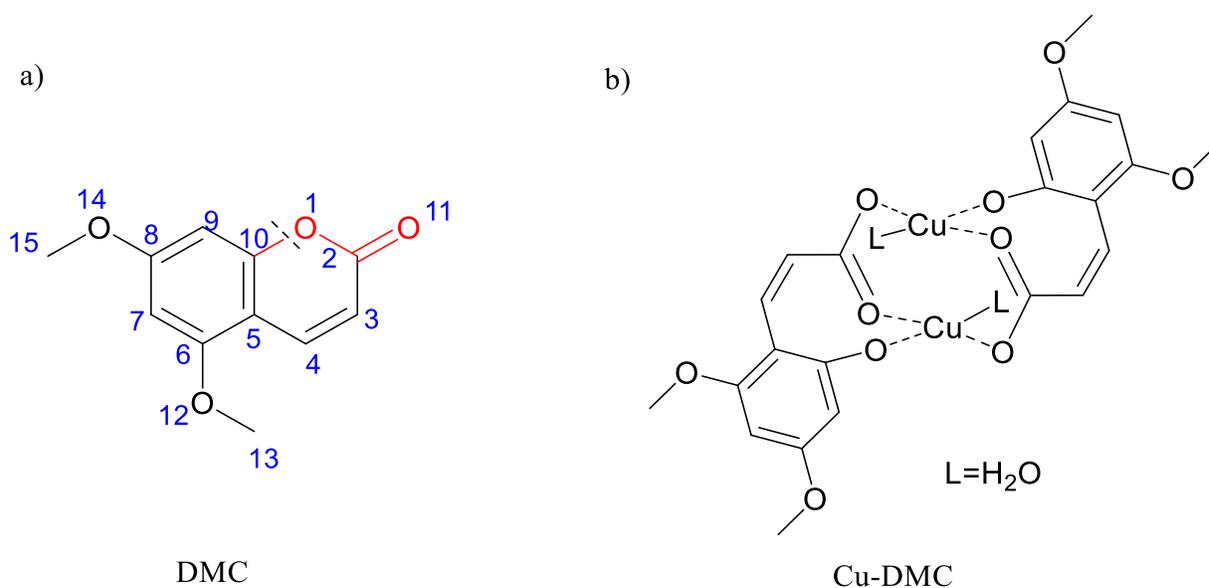


Figura 3.4 a) Estructura de DMC b) Complejo propuesto para la interacción entre el Cu^{2+} y DMC.

La optimización del pH de trabajo se realizó mediante VC, variando el pH del electrolito soporte de 6 a 13. Para cada muestra se midió la intensidad de pico de corriente anódica usando una solución con 100 ng L^{-1} de DMC (a la par de su

respectivo blanco), esto con el fin de encontrar el valor de pH con la mayor diferencia de intensidad de corriente anódica entre estos valores.

La figura 3.5, muestra la relación proporcional entre la intensidad de corriente anódica y el aumento en el valor de pH para las muestras y respectivos blancos. En valores de pH 6-9 no se observaron picos anódicos, lo que indica que a estos valores no se favorece la oxidación del CuO .

Se seleccionó el pH 12 como valor optimizado para los estudios posteriores, ya que este mostró la mayor diferencia de intensidad de corriente anódica de una muestra con DMC respecto a su blanco, con un valor de 125.213 μA .

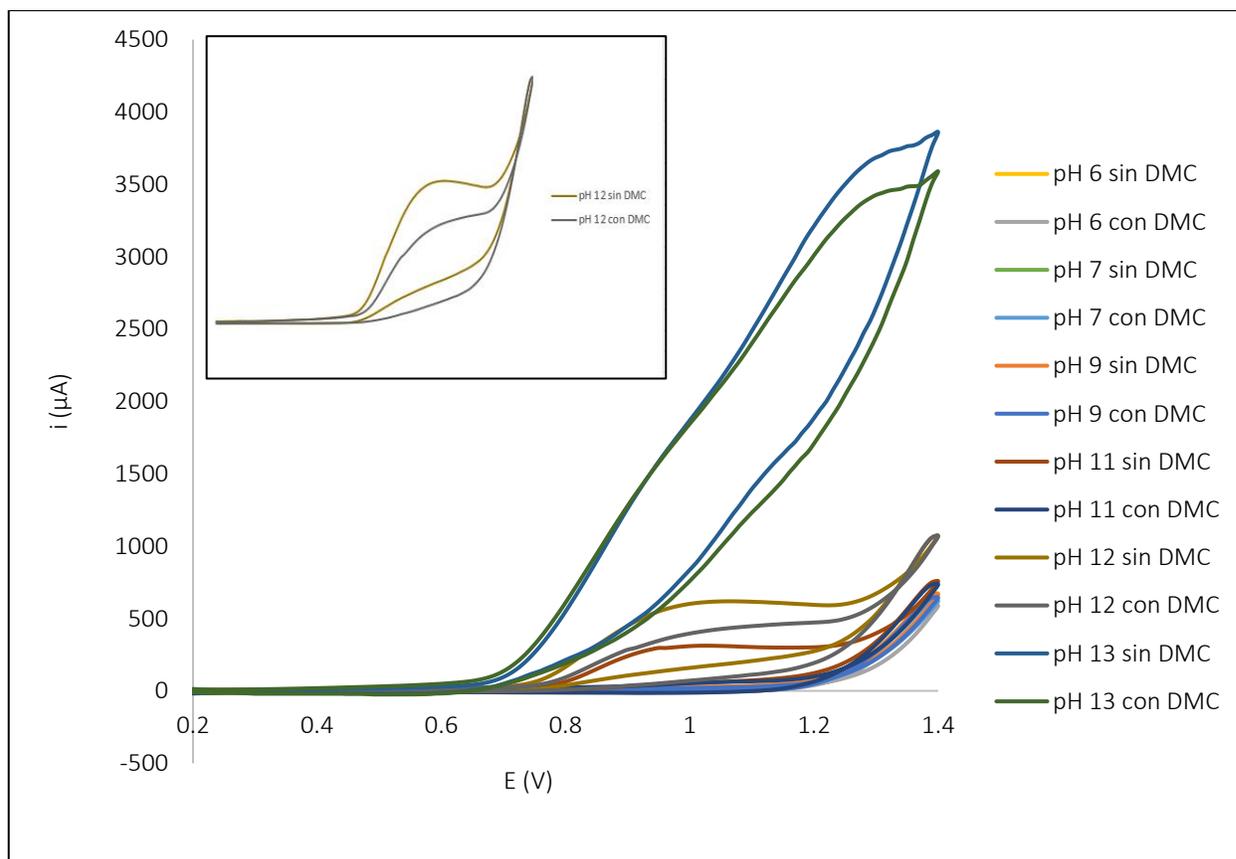


Figura 3.5 VC obtenidos en KCl 0.1 M a pH 6, 7, 9, 11, 12, 13 (ajustado con $NaOH$) sin y con 100 $ng L^{-1}$ de DMC, usando el sensor $CuO-NPs/EPC$, a una velocidad de barrido de $0.1 V s^{-1}$ en sentido anódico.

3.2 Optimización del porcentaje de Nps-CuO en electrodos de pasta de carbono (EPC)

Se evaluó por VC el efecto de la cantidad de las nanopartículas de CuO en la pasta de carbono, empleando una solución de DMC 100 ng L^{-1} en KCl 0.1 M . Se probaron los siguientes porcentajes de CuO : 0%, 5%, 10%, 15%, 20% y 25% (tabla 3.1). Al comparar los VCs obtenidos con los diferentes porcentajes de CuO , se observa que un 15% presentó la mayor diferencia de intensidad de corriente anódica respecto al blanco, en comparación con las otras proporciones. La proporción de 15% fue seleccionada como la óptima.

A porcentajes superiores del 15% la diferencia de intensidades de corriente anódica disminuye, debido a la naturaleza semiconductora del CuO ⁹², disminuyendo la conductividad del electrodo.

Tabla 3.1 Valores de (Δi) para los diferentes porcentajes de modificante en el EPC.

% CuO en el EPC	Δi (μA).	% DER (n=3)
5	81.82	2.14
10	126.86	2.53
15	182.28	2.32
20	165.19	2.12
25	147.49	4.96

3.3 Optimización de la velocidad de barrido para el sistema electroquímico

La influencia de la velocidad de barrido sobre la respuesta hacia DMC del electrodo modificado, se realizó por VC. El efecto de la velocidad de barrido se estudió considerando valores entre 0.02 y 0.1 V s^{-1} en una solución a concentración fija de DMC de 100 ng L^{-1} . El gráfico resultante (figura.3.6), muestra la relación entre Δi_p vs v . Se observó que la diferencia de intensidad de corriente anódica aumentaba

linealmente a la velocidad de barrido en el rango de 0.020 V s^{-1} a 0.1 V s^{-1} . La ecuación lineal está dada por la ecuación 10:

$$\Delta I_p (\mu A) = 1770.5 \frac{V}{s} + 40.355 \quad R^2 = 0.9934 \quad \text{Ecuación 10.}$$

Por tal motivo, se seleccionó 0.1 V s^{-1} como valor optimizado para los estudios posteriores, ya que este, nos brinda una mayor diferencia de intensidad de corriente respecto al blanco.

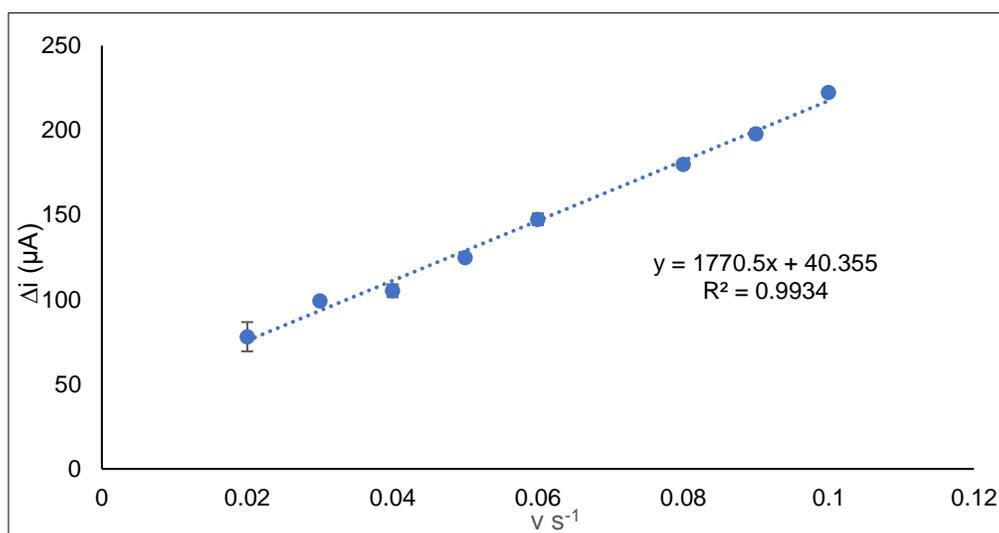


Figura 3.6. Efecto de la variación de la velocidad de barrido sobre la diferencia de intensidad de corriente de pico anódico usando el $\text{CuO} - \text{NPs}/\text{EPC}$ en una solución de KCl 0.1 M con 100 ng L^{-1} de DMC a pH 12.

3.4 Estudio de los procesos electroquímicos sobre la superficie del electrodo de trabajo

Mediante VC se estudió la cinética electrónica de la reacción sobre la superficie del electrodo de trabajo. Con base a la ecuación de Randles-Sevcik se graficó Δi vs $v^{1/2}$ (figura 3.7), obteniendo una tendencia lineal, con una $R^2 = 0.9773$. Esto indica que el mecanismo de transporte que rige el movimiento de DMC hacia la superficie del electrodo de trabajo es la difusión.

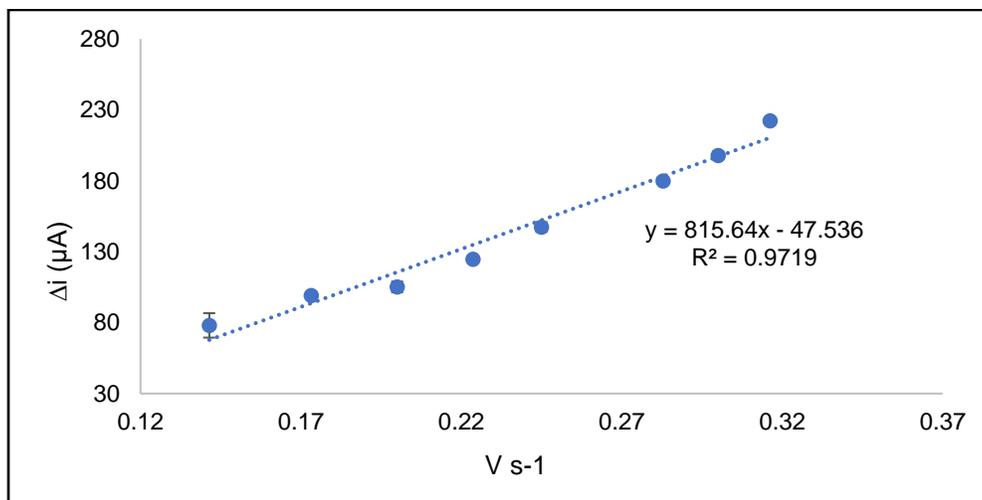


Figura 3.7 Relación entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$) vs la diferencia de la intensidad de corriente anódica (Δi).

En la figura 3.8, se presenta el gráfico linealizado $\log \Delta i$ vs $\log v$, obteniendo un coeficiente de correlación $R^2=0.9804$ y una pendiente de 0.657 ($b>0.5$) por lo cual, de acuerdo con la ecuación de la adsorción, la cinética de reacción sobre la superficie del electrodo también se rige por la adsorción.

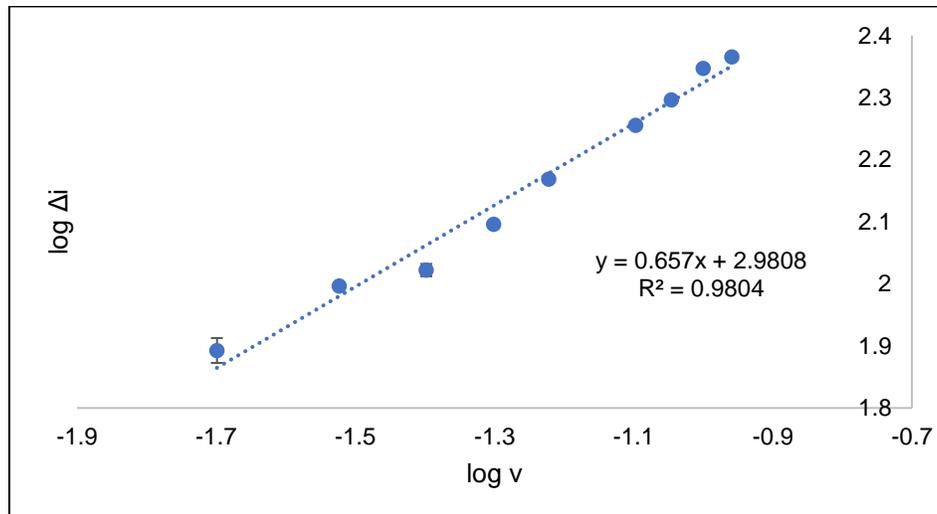


Figura 3.8 Relación entre el log de la velocidad de barrido vs el log de la diferencia de la intensidad de corriente anódica.

Los estudios anteriores demuestran que la molécula de DMC presente en el electrolito soporte, es capaz de difundir (figura 3.9) y adsorberse sobre la superficie del electrodo modificado por sí misma. La adsorción de DMC sobre la superficie del

electrodo favorece la formación del complejo $Cu^{2+} - DMC$, por lo que, se espera el mismo mecanismo de transporte para la molécula de AFB1 ⁹³.

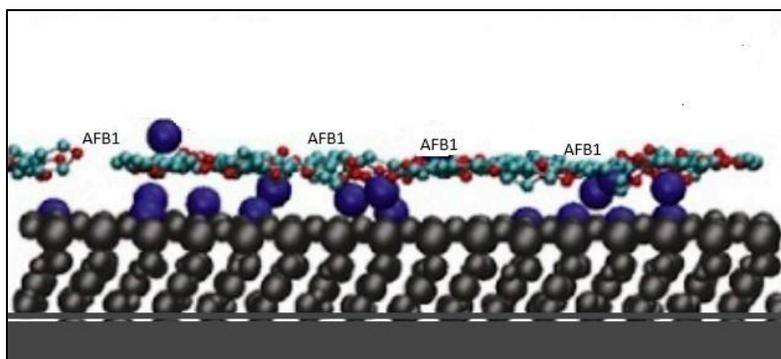


Figura 3.9 Adsorción de AFB1 sobre la superficie del electrodo de pasta de carbono modificado con óxido de cobre.

3.5 Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad se determinó realizando 5 mediciones sucesivas usando un mismo sensor en una solución de DMC a 100 ng L^{-1} y en las condiciones optimizadas. La desviación estándar relativa en la prueba de repetibilidad fue 1.877% ($<10\% \text{DER}$).

La reproducibilidad se evaluó usando 5 electrodos preparados de manera independiente, en condiciones optimizadas y solución de DMC 100 ng L^{-1} . El promedio de DER para el estudio de reproducibilidad fue de 2.837% ($<10\% \text{DER}$).

Los valores de DER para ambas pruebas fueron satisfactorios, lo que indica buena precisión en las mediciones.

3.6 Caracterización analítica de la metodología propuesta

La curva de calibración se realizó empleando 7 estándares de AFB1 en concentraciones desde 20 a 140 ng L^{-1} , utilizando tres replicas para la medición de cada estándar (véase figura 3.10). La ecuación de regresión lineal y los parámetros analíticos encontrados con la metodología propuesta se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Parámetros analíticos correspondientes a la curva de calibrado en la determinación de AFB1 mediante voltamperometría cíclica.

Intervalo lineal	1.0067 [AFB1] + 17.275
Sensibilidad	1.0067 $\mu\text{A ng}^{-1} \text{L}$
R²	0.996
LD	8.023 ng L^{-1}
LQ	26.74 ng L^{-1}

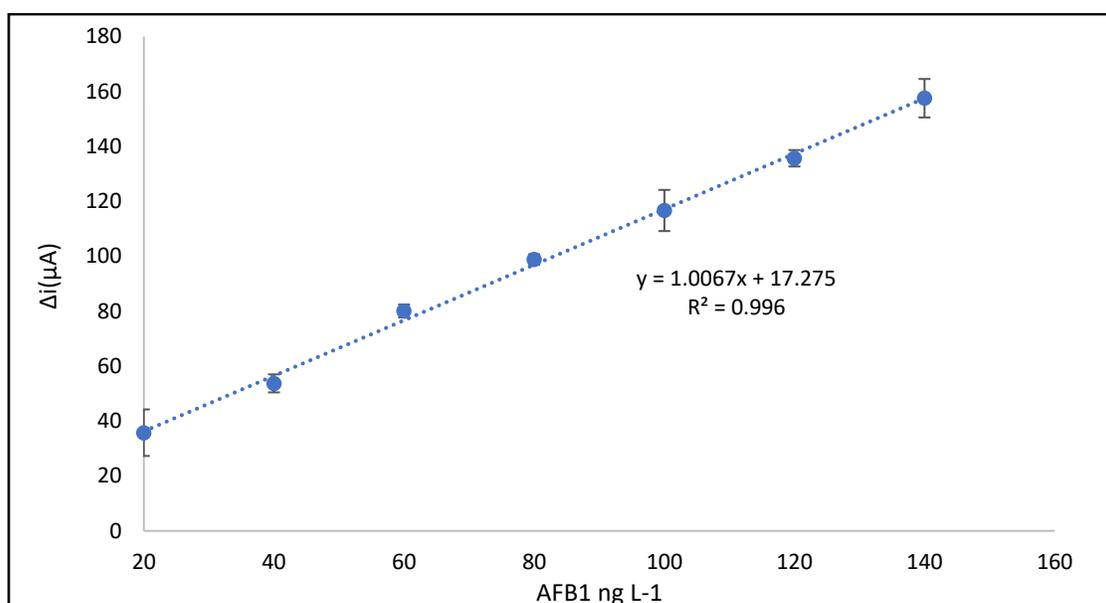


Figura 3.10 Curva de calibración obtenida usando el sensor CuO-Nps/EPC con la metodología optimizada.

3.7 Análisis en muestras reales

La funcionalidad del sensor fue evaluada en muestras de maíz, cacahuate y leche, dopadas con estándares de Aflatoxina B1 a una concentración de 30 ng L^{-1} . La cuantificación de las muestras se realizó mediante curvas de adición patrón, con la finalidad de evitar el efecto matriz, obteniendo porcentajes de recuperación cercanos al 100%, los cuales se encuentran dentro de los límites permitidos por la AOAC ($100 \pm 15\%$)⁹⁴. Los resultados de las muestras se describen a continuación.

La cuantificación para cada muestra de maíz, cacahuate y leche se realizó por triplicado con curvas de adición patrón, obteniendo porcentajes de recuperación de 100-103% (tabla 3.3.) y valores de desviación estándar menores a 3 ng L⁻¹, lo que indica buena precisión de los datos. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que las muestras analizadas antes del dopaje, no se encuentran contaminadas por AFB1.

Tabla 3.3 Concentraciones promedio (n=3) de AFB1 y porcentajes de recuperación obtenidos por adición patrón en las muestras de maíz, cacahuate y leche.

Muestra	\bar{x} de [AFB1] (ng L ⁻¹)	% de recuperación
Maíz	30.259 ± 0.888	100.86%.
Cacahuate	30.32 ± 0.90	101.07%.
Leche	30.69 ± 2.199	102.3%.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 Conclusiones

Se evaluó por voltamperometría cíclica el comportamiento electroquímico del sensor CuO-Nps/EPC en condiciones alcalinas. Observándose un pico anódico entre un potencial de 0.8 V-1.2V propio de la oxidación del CuO a CuOOH.

Se estudio el comportamiento electroquímico de DMC, sobre la respuesta anódica en la oxidación de CuO. Observándose una disminución en la intensidad de corriente anódica en presencia de DMC. Lo cual sugiere que DMC (o AFB1) interviene en la oxidación del CuO. Haciendo posible una determinación indirecta de DMC (o AFB1), en base a la diferencia de intensidad de corriente anódica de una solución blanco y una solución con aflatoxina B1.

La optimización de parámetros como el pH, % CuO y velocidad de barrido por voltamperometría cíclica, permitió maximizar la diferencia de intensidad de corriente anódica entre una solución blanco y una solución con DMC. Mejorando los parámetros analíticos para la determinación indirecta de DMC (o AFB1) mediante la oxidación del CuO presente en el electrodo de trabajo.

El método electroquímico utilizado presenta linealidad, alta sensibilidad, bajos límites de detección y cuantificación, así como precisión y confiabilidad (repetibilidad y reproducibilidad), lo que sugiere ser una alternativa viable para la cuantificación de AFB1.

La metodología propuesta por voltamperometría cíclica, con el uso de un electrodo de pasta de carbono modificado con óxido de cobre permitió la detección y cuantificación de AFB1 en muestras de maíz y cacahuate con porcentajes de recuperación cercanos al 100%.

4.2 Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis se tienen como perspectivas los siguientes puntos:

- Estudiar la respuesta electroquímica de la oxidación de CuO en otros tipos de voltamperometrías como voltamperometría diferencial de pulsos o voltamperometría de onda cuadrada, con la finalidad de mejorar los parámetros analíticos.
- Hacer un estudio de interferentes con las distintas aflatoxinas: AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 Y AFM2, para mejorar la selectividad de la metodología propuesta.
- Investigar y poner en práctica nuevos pretratamientos para las muestras de maíz, cacahuate y leche, los cuales, permitan disminuir el efecto matriz en la determinación de AFB1.
- Comparar los resultados obtenidos de esta metodología con otras oficiales para la cuantificación y determinación de AFB1 y poder validarla.

5. Referencias

1. Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *TIP*, 16(2), 109–120. doi:10.1016/s1405-888x(13)72082-5
2. Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. doi:10.1128/cmr.16.3.497-516.2003
3. Hammami, Walid; Fiori, Stefano; Al Thani, Roda; Ali Kali, Najet; Balmas, Virgilio; Migheli, Quirico; Jaoua, Samir (2014). Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. *Food Control*, 37(), 177–181. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.027
4. Var, I., Kabak, B., Gök, F. (2007). Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC. *Food Control*, 18(1), 59–62. doi:10.1016/j.foodcont.2005.08
5. Liu, B.-H., Hsu, Y.-T., Lu, C.-C., Yu, F.-Y. (2013). Detecting aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Food Control*, 30(1), 184–189. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.07.00
6. Feng, Z., Gao, N., Liu, J., Li, H. (2020). Boron-doped Diamond Electrochemical Aptasensors for Trace Aflatoxin B1 Detection. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2020.04.062
7. Rahimi, F., Roshanfekar, H., Peyman, H. (2020). Ultra-sensitive electrochemical aptasensor for label-free detection of Aflatoxin B1 in wheat flour sample using factorial design experiments. *Food Chemistry*, 128436. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.12843

8. Arroquia M. (2016). Sensor electroquímico basado en nanoesferas de dopamina auto-ensambladas [Tesis de licenciatura]. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID.
9. Gimeno, A., Martins, M. (2003). Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. *Special Nutrients*. (3),1-20
10. Soriano, J., Molto, J., Manes, V., López, A., García, J., Pérez, J., Gregori, C. (2007). Micotoxinas en alimentos. *Diez de Santos*. 1-393.
11. Abarca, L., Bragulat, R., Castellá, G., Accensi, F., Cabañes, J. (2000). Hongos productores de micotoxinas Emergentes. *Rev Iberoam Micol*. 17, 63-68.
12. Gimeno, A. (2004). Aflatoxina M1 en leche. Riesgo para la salud pública prevención y control. *Associação portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA), Alimentação Animal*. 49, 32-44.
13. Filazi, A., & Tansel, U. (2013). Occurrence of Aflatoxins in Food. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. doi:10.5772/51031
14. Duarte, S.; Villamil, L. (2006). Micotoxinas en la Salud Pública; *Rev. salud pública*. 8(1),129-135.
15. Deshpande, S.S. (2002). *Handbook of Food Toxicology* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203908969>.
16. Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España (AFHSE). (2015). Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 6-20.

17. Scheidegger, K.A., Payne, G.A. Unlocking the Secrets behind Secondary Metabolism: A Review of *Aspergillus flavus* from Pathogenicity to Functional Genomics, *Journal of Toxicology*, 22, 2-3, 2003, 423-459.
18. Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. (1979). *Postgraduate Medical Journal*, 55(639), 65–65. doi:10.1136/pgmj.55.639.65.
19. Olsen, J., Dragsted, L., Autrup, H. (1988). Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. *British Journal of Cancer*, 58(3), 392–396. doi:10.1038/bjc.1988.226.
20. Arroyo, N., Manzanares, J.; Pérez, H.; Gracia, L.; Campaña, A. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. Universidad de Granada. 7,1-17.
21. Villalobos, C., Peña, J., Guzmán de Peña, D. (2001). Producción de Aflatoxinas en Maíz in vitro. *Rev. Mex. Fitopat.* 19(2),218- 222.
22. Filazi, A., & Tansel, U. (2013). Occurrence of Aflatoxins in Food. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. doi:10.5772/51031.
23. Normalización CT10 Productos Alimenticios, S. T. de N. S. C. y. L. del C. T. (2017). Norma Venezolana COVENIN 1935:1987.
24. USFDA, (2000). Food and Drug Administration-Guidance for Industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed.
25. ANVISA. (2011). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brazilian Sanitary Surveillance Agency: Resolução (Brazil) 11-3.

26. Durán, C.; Castillo, P. (2006). Las micotoxinas: metabolitos secundarios de los hongos filamentosos. *Educación Química*. 1-128. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2006.2.66050>.
27. Secretaria de salud. (2008). NOM-247-SSA1-2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. México, D.F. Diario Oficial de la Federación.
28. OPS-OMS. (1983). Micotoxinas. Criterios de la salud ambiental. Micotoxinas, Organización Mundial de la Salud, Publicación Científica 11,453.
29. Gevaerd, A., Banks, C. E., Bergamini, M. F., Marcolino-Junior, L. H. (2019). Nanomodified Screen-Printed Electrode for direct determination of Aflatoxin B1 in malted barley samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 127547. doi:10.1016/j.snb.2019.127547.
30. Pereira Schuler, A. R., Gómez B., Óscar M. (2018). Aflatoxinas. Una revisión. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 4, 65–85. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.336534>.
31. Pimentel, M. (2007). Conceptos básicos de cromatografía líquida de alta resolución. [Tesis de licenciatura]. Universidad Veracruzana.62.
32. Association Official Analytical Chemistry (AOAC). 2000. Método 49.2.18. Official Method 991.31 Aflatoxins in Corn, Raw peanuts, and Peanut Butter. 22-24.

33. Aisel A., Pérez S. (2016). Validación del método analítico para la cuantificación de aflatoxinas totales en maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). [Tesis de licenciatura]. Universidad Central de Venezuela Facultad de Agronomía. Maracay.1-69.
34. Couto, A. S. (2021). Fundamentos de la cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico (HPAEC-PAD): Determinación estructural de glicoproteína; Universidad Nacional del Litoral, 207-224.
35. Velarde, K., Escobar, P., Cárdenas, R., Díaz, B., (2022). Detección de micotoxinas (aflatoxinas) en alimentos primarios y procesados para humanos y animales de granja, en Riobamba-Ecuador. 10, 2-7. <https://doi.org/10.29166/siembra.v10i1.4126>.
36. Navvabi, N., Khadem, M.H., Navvabi, A., Chalipa, H.R., Zitricky, F. (2022). Evaluación comparativa de las pruebas de diagnóstico ELISA e inmunocromatografía para detección de HBsAg en infección por VHB confirmada por PCR. 82 (2), 176-180. Doi: 10.1016/j.rgmx.2020.12.003.
37. Lei, J., Han, X., Tang, X., Wang, H., Zhang, Q. (2020). Development of Anti-Idiotypic Nanobody-Phage Based Immuno-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Aflatoxins in Peanuts. *Toxins*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/toxins12090565>.
38. Thathana, M. G., Murage, H., Luther, A., Abia, K. (2017). Morphological Characterization and Determination of Aflatoxin-Production Potentials of *Aspergillus flavus* Isolated from Maize and Soil in Kenya. <https://doi.org/10.3390/agriculture7100080>.

39. Mahfuz, M., Gazi, A., Hossain, M., Islam, R., Fahim, S. M., Ahmed, T. (2018a). General and advanced methods for the detection and measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites : a review. *Toxin Reviews*, 0(0), 1–15. <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1514638>.
40. Abbas, M., Abbas, M. (2021). Chromatographic Techniques for Estimation of Aflatoxins in Food Commodities. *Aflatoxins - Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.98508>.
41. Jaiswar, R., Sarathchandra, G., Shanmugam, S. A., Felix, N. (2022). Assessment of total aflatoxin (AFB1 , AFB2 , AFG1 and AFG2) in fish feed and feedstuffs by using high performance thin layer chromatography.
42. Pradhan, S., Ananthanarayan, L. (2020). Standardization and validation of a high-performance thin-layer chromatography method for the quantification of aflatoxin B1 and its application in surveillance of contamination level in marketed food commodities from the Mumbai region. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 33(6), 617–630.
43. Pradhan, S., & Ananthanarayan, L. (2020). Standardization and validation of a high-performance thin-layer chromatography method for the quantification of aflatoxin B1 and its application in surveillance of contamination level in marketed food commodities from the Mumbai region. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 33(6), 617–630. <https://doi.org/10.1007/S00764-020-00073-6/METRICS>.
44. Rebaza, C. (2021). Detección de aflatoxina B1 en Granos de kiwicha mediante nanosensores aptaméricos y remediación fotoquímica con rayos ultravioleta. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Trujillo.

45. Samaniego, M. R., Espín, H. S., Villavicencio, J., Ortiz, B., & Zambrano, J. L. (2018). Evaluación De La Contaminación Por Aflatoxinas B 1 , B 2 , G 1 Y G 2 En Maíz Amarillo Duro. *Revista Espamciencia*, 9(1), 13–21.
46. Gonzalez, S., & Gutiérrez, C. (2019). Biorreactores empleados para la biorremediación de aflatoxinas. 10(3), 235–239.
47. Acosta, E. (2022). Posible riesgo carcinogénico en lactantes por presencia de aflatoxina m1 en leche materna asociado al consumo de alimentos de sus madres. [Tesis de maestría]. Universidad de Nuevo León. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/24203>.
48. Skoog, D. A., Donald; West, F; Holler, Stanley; Crouch, West, D. M., Crouch, S. R. & Holler, F. J. (2014). *Fundamentos de Química Analítica*. Cengage Learning Editores S.A. de C.V.
49. Skoog, D. A., Holler, J. & Crouch, S. (2018). *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning.
50. Ugaz, A., Díaz, I. (1988). Principios de las técnicas electroquímicas en estudios de procesos de corrosión. *Revista de Química*. 11, (1), 1-10.
51. Mahmudiono, T., Bokov, D.O., Jasim, S.A., Abdelbasset, W.K., Y Khashirbaeva, D.M. (2022). State of the art of convenient and low-cost electrochemical sensor for food contamination detection: Technical and analytical overview. *Microchemical Journal*, 107460. doi.org/10.1016/j.microc.2022.107460.
52. Hernández Hernández, A. A. (2017). Desarrollo y optimización de metodologías para la extracción y preconcentración de AFB1 para su

detección electroanalítica. [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 1-116.

53. Wang, Chunyan; Zhang, Hui; Jiang, Xiaoqing; Zhou, Bo (2019). Electrochemical Determination of Aflatoxin B1 (AFB1) Using a Copper-Based Metal-Organic Framework (Cu-MOF) and Gold Nanoparticles (AuNps) with Exonuclease III (Exo III) Assisted Recycling by Differential Pulse Voltammetry (DPV). *Analytical Letters*, 1–15. doi:10.1080/00032719.2019.1610418
54. González Aguilar, L. Á., Álvarez Romero, G. A., Castañeda Ovando, A., Chávez Flores, B., Hernández León, S., Franco Guzmán, M. (2022). Desarrollo de una metodología voltamperométrica para la determinación de Aflatoxina B1 usando un electrodo de carbón vítreo modificado con una película de bismuto y nanopartículas de oro. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química* 2022, 1-6.
55. Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 95(2), 197-206. doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361.
56. Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., & Li, G. (2008). Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, 8(4), 2043-2081. doi.org/10.3390/s8042043.
57. Kissinger, P. y Heineman, W. (1983). *Cyclic Voltammetry*. *Journal of Chemical Education*, Vol. 60, (pp. 702-706).
58. Allen J., Bard y R. Foulken, L. (2000). *Electrochemical methods Fundamentals and applications*. 2a. U.S.A.: Wiley.
59. Lipkowski, J., y Ross, P. N. (1992). Adsorption of molecules at metal electrodes. <https://ci.nii.ac.jp/ncid/BA19528850>.

60. Mehrvar , M .,& Abdi , M .(2004). Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical sciences* ,20(8).1113-1126. doi . org /10.2116/analsci.20.1113.
61. Bujes, J. (2013). Estudio de sensores electroquímicos flexibles. [Tesis de maestría]. Universidad de Burgos.2-3.
62. Liu, D., Li, W., Zhu, C., Li, Y., Shen, X., Li, L., Yan, X., You, T. (2020). Recent progress on electrochemical biosensing of aflatoxins: A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 133. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115966>.
63. Kumar Singh, A., Kumar Dhiman, T., Lakshmi, G., Solanki, P. R. (2020). Dimanganese trioxide (Mn_2O_3) based label-free electrochemical biosensor for detection of Aflatoxin-B1. *Bioelectrochemistry*, 107684. doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107.
64. Yagati, A. K., Chavan, S. G., Baek, C., Lee, M.-H., & Min, J. (2018). Label-Free Impedance Sensing of Aflatoxin B1 with Polyaniline Nanofibers/Au Nanoparticle Electrode Array. *Sensors*, 18(5), 1320. doi:10.3390/s18051320.
65. Owino, J., Arotiba, O., Hendricks, N., Songa, E., Jahed, N., Waryo, T., ... Iwuoha, E. (2008). Electrochemical Immunosensor Based on Polythionine/Gold Nanoparticles for the Determination of Aflatoxin B1. *Sensors*, 8(12), 8262–8274. doi:10.3390/s8128262.
66. Charbgoon, F., Ramezani, M., Darroudi, M. (2017). Bio-sensing applications of cerium oxide nanoparticles: Advantages and disadvantages. *Biosensors and Bioelectronics*, 96, 33–43. doi:10.1016/j.bios.2017.04.037.
67. Srivastava, S., Kumar, V., Ali, M. A., Solanki, P. R., Srivastava, A., Sumana, G., Malhotra, B. D. (2013). Electrophoretically deposited reduced graphene

- oxide platform for food toxin detection. *Nanoscale*, 5(7), 3043. doi:10.1039/c3nr32242d
68. Ma, H., Sun, J., Zhang, Y., Xia, S. (2016). Disposable amperometric immunosensor for simple and sensitive determination of aflatoxin B 1 in wheat. *Biochemical Engineering Journal*, 115, 38–46. doi: 10.1016/j.bej.2016.08.003.
69. Sharma, A., Kumar, A., Khan, R. (2017). Electrochemical immunosensor based on poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified with gold nanoparticle to detect aflatoxin B 1. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 802–809. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.146.
70. Xue, Z., Zhang, Y., Yu, W., Zhang, J., Wang, J., Wan, F., Kou, X. (2019). Recent advances in aflatoxin B1 detection based on nanotechnology and nanomaterials-A review. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2019.04.032
71. Tölg, G. (1986). *Stripping Analysis. Principles, Instrumentation, and Applications*. Von J. Wang. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1985. VIII, 160 S., geb DM 120.00 – ISBN 3-527-26192-3. *Angewandte Chemie*, 98(8), 764–764. doi:10.1002/ange.19860980840.
72. Schultz, F. A., & Kuwana, T. (1965). *Journal of Electroanalytical Chemistry* (1959), 10(2), 95-103.
73. Chadim, P., Svancara, I., Pihlar, B., & Vytras, K. (2000). Gold-plated carbon paste electrodes for anodic stripping determination of arsenic. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 65, 1035-1046.

74. Hoover NN, Auten BJ, Chandler BD. Tuning Supported Catalyst Reactivity with Dendrimer-Templated Pt-Cu Nanoparticles. *J Phys Chem B.* (2006); 110(17): 8606-8612.
75. Pavón, M.M. (1992). Comportamiento electroquímico del cobre en disoluciones acuosas de iones perclorato, cloruro y fosfato, y en presencia de inhibidores de su corrosión.[Tesis de doctorado].Universidad de la Laguana.1-202.
76. Gevaerd, A., Banks, C. E., Bergamini, M. F., Marcolino-Junior, L. H. (2019). Nanomodified Screen-Printed Electrode for direct determination of Aflatoxin B1 in malted barley samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 127547. doi:10.1016/j.snb.2019.127547.
77. Huang, Fuying; Zhong, Yanmei; Chen, Jie; Li, Shunxing; Li, Yancai; Wang, Fei; Feng, Shuqing (2013). Nonenzymatic glucose sensor based on three different CuO nanomaterials. *Analytical Methods*, 5(12), 3050–. doi:10.1039/C3AY40342D.
78. Jamil A. Buledi; Sidra Ameen; Saba A. Memon; Almas Fatima; Amber R. Solangi; Arfana Mallah; Fatemeh Karimi; Salima Malakmohammadi; Shilpi Agarwal; Vinod Kumar Gupta; (2021). An improved non-enzymatic electrochemical sensor amplified with CuO nanostructures for sensitive determination of uric acid . *Open Chemistry*, (), –. doi:10.1515/chem-2021-0029.
79. Jiang Yang; Liao-Chuan Jiang; Wei-De Zhang; Sundaram Gunasekaran (2010). A highly sensitive non-enzymatic glucose sensor based on a simple two-step electrodeposition of cupric oxide (CuO) nanoparticles onto multi-walled carbon nanotube arrays. , 82(1), 0–33. doi:10.1016/j.talanta.2010.03.047.

80. Yunfei, Z., Tingting, L., Yi, S., Hongying, L.,(2022).A High-Performance Self-Supporting Electrochemical Biosensor to Detect Aflatoxin B1. *Biosensors*, 12, 897. [https:// doi.org/10.3390/bios12100897](https://doi.org/10.3390/bios12100897).
81. Wyszomirski, Mirosław; Prus, Wojciech (2012). Molecular modelling of a template substitute and monomers used in molecular imprinting for aflatoxin B1 micro-HPLC analysis. *Molecular Simulation*, 38(11), 892–895. doi:10.1080/08927022.2012.667876.
82. Guo, Pengqi; Yang, Wu; Hu, Hao; Wang, Yitao; Li, Peng (2019). Rapid detection of aflatoxin B1 by dummy template molecularly imprinted polymer capped CdTe quantum dots. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, – . doi:10.1007/s00216-019-01708-2.
83. Lee, N. A., Wang, S., Allan, R. D., & Kennedy, I. R. (2004). A Rapid Aflatoxin B1 ELISA: Development and Validation with Reduced Matrix Effects for Peanuts, Corn, Pistachio, and Soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2746–2755. doi:10.1021/jf0354038.
84. Mengke Lva , Fang Lia,b , Yanqing Dua , Xingyuan Guoa , Pengying Zhanga,b , Yunhong Liu. (2023). Ratiometric electrochemical aptasensor for AFB1 detection in peanut and peanut products. *International Journal of Electrochemical Science*, 18, (9-15). <https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.01.006>.
85. Pena. R, Alcaraz. M.C, Arce. L, Rios, A, Valcarcel M; (2002). Screening of Aflatoxins in Feed Samples Using a Flow System Coupled to Capillary Electrophoresis. *J Of Chromatography A*. 967: 303-314.

86. Hernández-Hernández, A. A., Castañeda-Ovando, A., Mendoza-Huizar, L. H., Franco-Guzmán, M., Meneses-Pimentel, K. X., Vidal, C., Páez-Hernández, M. E., & Álvarez-Romero, G. A. (2021). A novel voltammetric approach for the quantification of aflatoxin B1 using a Bismuth-Modified electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, 168(2), 026512.
87. Secretaria de salud. NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. México D.F.
88. Rastogi, S, Dwivedi, P. D, Khanna S.K, Das M; (2004). Detection of Aflatoxin M1 Contamination in Milk and Infant milk Products From Indian Market by ELISA. *Food Control*. 15: 287 – 290.
89. Hernández, I., Contreras J.L., Castro, J., Suárez, R. (2006). Oxidación de Fenol con Catalizadores de CuO/Al₂O₃, CuO/ZnAl₂O₄ y CuO-ZnO-Al_xO_y. 5(17), <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642006000500009>.
90. Xu, Xue (2019). Electrochemical Synthesis of Cu_xO/Cu₂S Nanocomposites as Nonenzymatic Glucose Sensor. *International Journal of Electrochemical Science*, (), 5637–5645. doi:10.20964/2019.06.38.
91. Martínez, J; Hernández-Rodríguez, M; Méndez-Albores, A.; Téllez-Isaías, G.; Mera Jiménez, E.; Nicolás-Vázquez, M.I.; Miranda Ruvalcaba, R.(2023). Computational Studies of Aflatoxin B1 (AFB1): A Review. *Toxins*,15, 135. <https://doi.org/10.3390/toxins15020135>.
92. El-Trass, A., ElShamy, H., El-Mehasseb, I., & El-Kemary, M. (2012). CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258(7), 2997–3001. doi:10.1016/j.apsusc.2011.11.025

93. Aleksandra Daković; Srđan Matijašević; George E. Rottinghaus; David R. Ledoux; Paula Butkeraitis; Živko Sekulić (2008). Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. , 66(1), 20–25. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.05.008.

94. AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18th ed. Association of Official of Analytical Chemist. Washington, DC.