



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA.

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN QUÍMICA.

TESIS

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA
VOLTAMPEROMÉTRICA PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA B1 BASADA EN
ELECTRODOS MODIFICADOS CON POLIDOPAMINA**

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

PRESENTA

Abril Villagrán Manilla

Director

Dra. Gíaan Arturo Álvarez Romero

Comité tutorial

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar
Dra. Dafne Sarahia Guzmán Hernández

Mineral de la Reforma, Hgo., México., julio 2024

Tabla de contenido

ABREVIACIONES	7
AGRADECIMIENTOS.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Las aflatoxinas como compuestos tóxicos en alimentos.....	12
2.2 Métodos reportados para la cuantificación de aflatoxinas.....	13
2.3 Métodos electroquímicos para la determinación de aflatoxina B1.....	15
2.3.1 Electroodos de trabajo convencionales.....	16
2.3.2 Electroodos de trabajo modificados.....	17
2.3.2.1 Biosensores.....	17
2.3.2.2 Sensores no enzimáticos.....	19
2.4 Uso de polidopamina para la determinación de aflatoxinas.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
5. CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	23
5.1 Materiales y reactivos.....	23
5.2 Caracterización electroquímica.....	24
5.3 Perfil electroquímico de la dopamina.....	24
5.4 Modificación del electrodo de carbón vítreo.....	24
5.4.1 Optimización de la electropolimerización de dopamina.....	24
5.4.2 Caracterización de la película electropolimerizada.....	25
5.5 Determinación del área electroactiva.....	25

5.6 Perfil electroquímico de la aflatoxina B1.....	26
5.6.1 Caracterización mediante espectroscopía de impedancia electroquímica.....	26
5.6.2 Comportamiento electroquímico de la aflatoxina B1 en el electrodo modificado.	27
5.7 Optimización del tiempo de contacto y pH para el análisis de aflatoxina B1 para el análisis por voltamperometría de redisolución anódica.	28
5.7.1 Tiempo de contacto.	28
5.7.2 pH.....	28
5.8 Optimización de las variables relacionadas con la voltamperometría de onda cuadrada.	28
5.9 Determinación de las características analíticas cuantitativas de la metodología propuesta.	29
5.10 Análisis de muestras reales.....	30
5.11 Validación de la técnica de cuantificación propuesta.....	30
6. RESULTADOS.	31
6.1 Perfil electroquímico de la dopamina.....	31
6.2 Modificación del electrodo de carbón vítreo.....	33
6.2.1 Optimización de la electropolimerización de DA.....	35
6.2.2 Caracterización de la película electropolimerizada.....	37
6.3 Determinación del área electroactiva.....	41
6.4 Perfil electroquímico de la aflatoxina B1.....	43
6.4.1 Caracterización mediante espectroscopía de impedancia electroquímica.....	45
6.4.2 Comportamiento electroquímico de la aflatoxina B1 en el electrodo modificado	46
6.5 Optimización del tiempo de contacto y pH para el análisis de AFB1.....	48
6.5.1 Tiempo de contacto.	48
6.5.2 pH del medio de análisis.	50

6.6 Optimización de las variables relacionadas con la voltamperometría de onda cuadrada.	52
6.7 Determinación de las características analíticas cuantitativas de la metodología propuesta.	53
6.8 Análisis de muestras reales.....	55
6.9 Validación de la técnica de cuantificación propuesta.	57
7. CONCLUSIONES.	58
8. REFERENCIAS	59
ANEXOS.....	68
A.1 Técnicas electroanalíticas.....	68
A.1.1 Voltamperometría.	68
A.1.1.1 Voltamperometría cíclica.....	69
A.1.1.2 Voltamperometría a base de pulsos.....	71
A.1.1.3 Voltamperometría de redisolución adsortiva.....	72
A.1.2 Cronoamperometría.	73
A.1.3 Impedancia.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas.....	12
Figura 2. Polimerización química de la dopamina.....	21
Figura 3. Perfil electroquímico de la dopamina	31
Figura 4. Mecanismo de polimerización de la dopamina.....	32
Figura 5. Análisis de dopamina con voltamperometría cíclica sucesiva de 3 ciclos.....	33
Figura 6. Técnicas de electropolimerización de polidopamina	34
Figura 7. Efecto de diferentes potenciales para cronoamperometría	36
Figura 8. Efecto del tiempo de imposición para cronoamperometría.....	37

Figura 9. Microscopías ópticas de los electrodos.....	38
Figura 10. Gráficos de superficie 3D de la disposición del polímero	39
Figura 11. Microscopías SEM de los electrodos	39
Figura 12. Espectros obtenidos del análisis EDS de los electrodos	40
Figura 13. Diagramas de Nyquist.....	40
Figura 14. Determinación del área electroactiva	42
Figura 15. Regresión lineal para determinar el área electroactiva.....	42
Figura 16. Perfil electroquímico de la aflatoxina B1 sobre carbón vítreo	44
Figura 17. Mecanismo de oxidación de aflatoxina B1	44
Figura 18. Perfil electroquímico de la aflatoxina B1 sobre el electrodo modificado	45
Figura 19. Diagramas de Nyquist.....	46
Figura 20. Comportamiento electroquímico de la aflatoxina B1	47
Figura 21. Gráfico de Randles-Sevcik.....	47
Figura 22. Tiempo de preconcentración.....	49
Figura 23. pH del medio de análisis	51
Figura 24. Relación entre el pH y su dependencia con el potencial de pico anódico.....	52
Figura 25. Gráficos de superficie de respuesta	53
Figura 26. Curva de calibración	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas analíticas para determinar AFB1 en matrices alimentarias.....	14
Tabla 2. Biosensores para determinar aflatoxina B1 en alimentos.	18
Tabla 3. Sensores no enzimáticos para determinar aflatoxina B1 en alimentos.	19
Tabla 4. Variables empleadas para el diseño Box-Behnken.	29
Tabla 5. Potencial impuesto para la modificación por cronoamperometría.....	35
Tabla 6. Tiempo de imposición para la modificación potencioestática	36
Tabla 7. Tiempo de preconcentración de la aflatoxina B1	49
Tabla 8. Evaluación del pH del electrolito soporte.....	50
Tabla 9. Parámetros analíticos para la determinación de aflatoxina B1	54
Tabla 10. Determinación de aflatoxina B1 mediante calibración directa.....	56
Tabla 11. Determinación de aflatoxina B1 mediante adición patrón.....	56
Tabla 12. Exactitud de la metodología propuesta.	57

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de Randles-Sevcik	26
Ecuación 2. Determinación del área electroactiva.....	26
Ecuación 3. Ecuación logarítmica de Randles-Sevcik.....	27
Ecuación 4. Proceso controlado por adsorción	27
Ecuación 5. Proceso controlado por difusión	27
Ecuación 6. Límite de detección	29
Ecuación 7. Límite de cuantificación	29
Ecuación 8. Ecuación de la recta.....	29
Ecuación 9. Porcentaje de desviación estándar relativa	29
Ecuación 10. Porcentaje de recuperación.....	30
Ecuación 11. Área de un círculo	43
Ecuación 12. Ecuación cuadrática del diseño de experimentos	53

ABREVIACIONES

DA	Dopamina
PDA	Polidopamina
AFB1	Aflatoxina B1
ECV	Electrodo de carbón vítreo
ECV-PDA	Electrodo de carbón vítreo modificado con polidopamina
ECV-PDA-AFB1	Electrodo de carbón vítreo modificado con la toxina adsorbida
SEM	Microscopía electrónica de barrido
EDS	Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva
VC	Voltamperometría cíclica
CA	Cronoamperometría
VOC	Voltamperometría de onda cuadrada
VRA	Voltamperometría de redisolución anódica
%RSD	Porcentaje de desviación estándar relativa

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a mi asesor, el Dr. Giaan, por su apoyo, orientación y comentarios invaluable durante todo el proceso de investigación y redacción de esta tesis. Su experiencia, aliento y paciencia han sido fundamentales para dar forma a este trabajo.

También estoy en deuda con todos los integrantes de mi comité evaluador el Dr. Huizar, el Dr. Galán y la Dra. Dafne por sus valiosos comentarios y sugerencias, que mejoraron enormemente la calidad de esta tesis. Su perspectiva añadió profundidad y claridad a mi investigación y estoy realmente agradecida por sus contribuciones.

Extiendo mi más sincero agradecimiento a mis amigos y familiares por su inquebrantable aliento y comprensión durante este viaje. Su fe en mí me proporcionó la motivación para perseverar a través de desafíos y obstáculos.

Además, me gustaría agradecer al Conahcyt por la beca otorgada para mis estudios de Maestría en Química, de igual forma al Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías y en especial al Área Académica de Química por proporcionar los recursos e instalaciones necesarios que facilitaron la realización de esta tesis.

Por último, agradezco a todos los participantes que generosamente compartieron su tiempo y sus conocimientos, sin los cuales esta investigación no habría sido posible.

Esta tesis es la culminación de los esfuerzos colectivos de muchas personas y estoy profundamente agradecida por su apoyo y aliento a lo largo del camino.

RESUMEN

El presente trabajo expone el desarrollo de una metodología electroanalítica para la cuantificación de aflatoxina B1 (AFB1) usando un electrodo de carbón vítreo (ECV) modificado con polidopamina (PDA). Mediante cronoamperometría (CA) se electropolimerizó PDA sobre el ECV, optimizando de forma univariable el potencial impuesto y tiempo de imposición. Se encontró que 550 mV y 180 s son los valores óptimos para realizar la modificación del electrodo de trabajo y tener la mejor señal analítica hacia AFB1. El análisis morfológico se realizó mediante microscopía óptica, SEM con mapeo elemental empleando EDS, además de un estudio por impedancia electroquímica; cada una de las técnicas evidenció que la modificación del electrodo fue favorable y que hay interacción entre la PDA y la AFB1. También se determinó el área electroactiva para el ECV y ECV-PDA, obteniendo 0.0303 y 0.0455 cm², respectivamente.

Durante el estudio se examinó el comportamiento electroquímico de la AFB1 en el ECV-PDA, se elaboraron los gráficos de Randles-Sevcik, que determinaron un régimen difusional de transporte del analito además de una fuerte contribución de la adsorción, lo que permitió proponer la voltamperometría por redisolución adsortiva (VRA) para el análisis de AFB1. Se optimizaron de forma univariable el tiempo de contacto (carga del electrodo) y pH del electrolito soporte, esto permitió determinar que 1 min de carga y un pH 4 impuesto con un buffer de acetatos logran un aumento en la intensidad de pico anódico correspondiente al proceso de oxidación de la AFB1. La técnica de cuantificación usada fue la voltamperometría de onda cuadrada (VOC) que se optimizó empleando un diseño de experimentos Box-Behnken, de esta forma se estableció que 200 Hz de frecuencia de pulso, 5 mV de paso de potencial y una amplitud de pulso de 200 mV corresponden a los valores que maximizan la señal analítica hacia AFB1. La determinación de los parámetros analíticos se realizó mediante el análisis por mínimos cuadrados de curvas de calibración, determinando así: una sensibilidad de 0.1364 $\mu\text{A} [\text{ng L}^{-1}]^{-1}$, un LOD de 5.56 ng L⁻¹, un LOQ de 18.54 ng L⁻¹, un intervalo lineal de 18.54 a 75 ng L⁻¹ y una reproducibilidad de 6.9% en términos del %RSD (n=10). Se realizó la determinación de AFB1 por adición patrón en almendra (4.35 $\mu\text{g kg}^{-1}$), nuez (2.36 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y pistache (7.52 $\mu\text{g kg}^{-1}$), encontrando valores dentro del límite reportado en normativas (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Finalmente, la validación de la metodología demuestra que es viable, confiable y estadísticamente aceptable para la cuantificación de AFB1 en estas muestras.

1. INTRODUCCIÓN.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos generados por microorganismos de tipo fúngico del género *Aspergillus*; principalmente por la especie *A. flavus* (Urrego y Díaz, 2006). Los microorganismos productores de aflatoxinas muestran afinidad por cultivos agrícolas de cereales y semillas oleaginosas. Sin embargo, podrían propagarse a productos lácteos debido a la ingesta del ganado de productos vegetales contaminados (World Health Organization, 2018).

El estudio de las aflatoxinas resulta de vital importancia debido a que presentan alta capacidad bioacumulativa que deriva en daños a nivel hepático, además de ser consideradas como potentes agentes genotóxicos que interfieren con el proceso de replicación del ADN (ácido desoxirribonucleico) y provocan daños irreversibles a nivel celular (International Agency for Research on Cancer. 2012).

Para llevar a cabo la determinación de aflatoxinas en alimentos existen diversas normativas a nivel nacional e internacional, las cuales, en su mayoría, reportan a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) debido a que se considera una técnica precisa y exacta (Sanabria et al., 2017). En el caso de México se tiene a la NOM-247-SSA1-2008 que detalla la metodología para el análisis cuantitativo de aflatoxinas mediante una serie de pasos iniciando con una columna de inmunoafinidad que emplea un anticuerpo monoclonal específico para cada tipo de aflatoxina, luego se realiza una serie de lavados con agua para eliminar impurezas y con metanol se separa la aflatoxina del anticuerpo, seguido de una elución con acetonitrilo y posteriormente un proceso de derivatización con ácido trifluoroacético como pretratamiento para el análisis cuantitativo por HPLC en fase reversa, acoplado un fluorómetro como detector. De lo anterior es evidente que una de las principales desventajas del uso de esta metodología oficial es el costo elevado de los equipos e insumos, sobre todo el uso excesivo de solventes orgánicos que provocan residuos no amigables con el medio ambiente.

En este sentido, los métodos electroquímicos resultan una alternativa para el análisis de estas moléculas, debido a que presentan ciertas ventajas frente a la metodología oficial como es reducir considerablemente el volumen de muestra para el análisis, que las técnicas electroquímicas son consideradas rápidas y confiables. Además, se ha demostrado que al modificar la superficie de los electrodos de trabajo con agentes biológicos o químicos se

logran mejorar parámetros analíticos como la sensibilidad, selectividad, reproducibilidad y los límites de detección y cuantificación (Kozub et al., 2010). Algunos de los agentes modificantes que se han utilizado para determinar aflatoxina B1 en alimentos son los anticuerpos, aptámeros, enzimas, nanopartículas, polímeros molecularmente impresos (MIP por sus siglas en inglés Molecularly Imprinted Polymers), estructuras metal-orgánicas (MOF por sus siglas en inglés Metal–Organic Framework), óxido de grafeno, nanotubos de carbono y algunos polímeros.

Por esta razón se planteó la modificación del electrodo de carbón vítreo con polidopamina empleando cronoamperometría como técnica de electropolimerización. La elección del agente modificante se basa en las interacciones que presenta con la aflatoxina B1 que se explican mediante el modelo donador-aceptor de electrones (Li et al., 2018).

En este trabajo se presenta el desarrollo de una metodología voltamperométrica para el análisis cuantitativo de aflatoxina B1, la propuesta se basa en hacer uso de la voltamperometría de onda cuadrada con redisolución adsorptiva empleando electrodos de trabajo modificados con polidopamina para determinar aflatoxina B1 en almendra, nuez y pistache.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Las aflatoxinas como compuestos tóxicos en alimentos.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunos hongos filamentosos. Son de gran interés debido a que resisten el tratamiento térmico que se les da a los alimentos e incluso tienden a multiplicarse en condiciones de almacenamiento no idóneas, resulta de gran importancia identificar su presencia puesto que producen importantes daños al organismo humano debido a su bioacumulación progresiva (Urrego y Díaz, 2006; World Health Organization. 2018).

Las aflatoxinas (AF) son un tipo de micotoxina producidas por hongos del género *Aspergillus*, entre los cuales destacan dos especies principales: *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las aflatoxinas afectan principalmente a cultivos agrícolas de cereales y semillas oleaginosas; e incluso pueden llegar a la industria avícola y productos lácteos por la ingesta del ganado de productos vegetales o piensos contaminados, ya que en el tracto gastrointestinal de los animales la aflatoxina B1 es metabolizada a aflatoxina M1 (National Center for Environmental Health, 2012). Existen diversas variedades de aflatoxinas, pero son seis las principales que se han encontrado en alimentos: B1, B2, G1, G2, M1 y M2 las cuales se representan en la **Figura 1**.

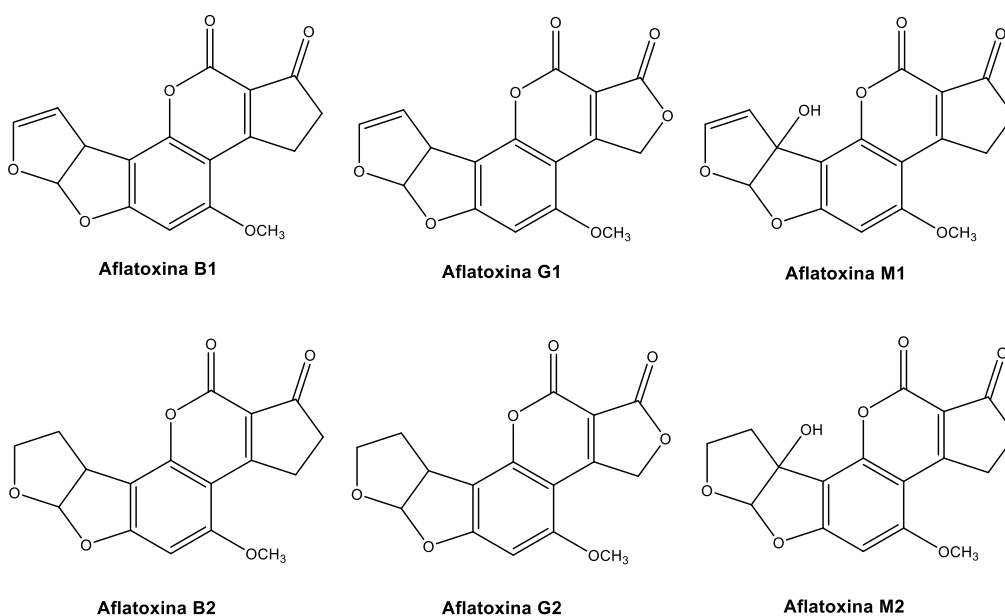


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas (National Center for Environmental Health, 2012).

Las letras que identifican a cada especie están relacionadas con sus propiedades físicas y químicas; por ejemplo, cuando las aflatoxinas se tratan con radiación ultravioleta y emiten una fluorescencia azul, entran en la clasificación de tipo B (*blue*), mientras que las de tipo G (*green*) presentan fluorescencia verde (Bogantes et al., 2004). Aquellas que se denominan del tipo M son resultado de los productos metabólicos de la aflatoxina B1 (AFB1) y aflatoxina B2 (AFB2), que son excretadas en leche de animales que han consumido alimentos contaminados. De todas, la AFB1 encabeza las investigaciones debido a que es la especie que se ha identificado como la más letal y se encuentra con mayor frecuencia en los diferentes cultivos (International Agency for Research on Cancer. 2012).

La exposición en seres humanos se da mayoritariamente por ingesta de los productos contaminados. El problema al consumir AFB1 en alimentos frecuentemente es su alta capacidad de biotransformación y bioacumulación en el organismo humano; además, causa daños hepáticos que suelen derivar en cáncer, incluso hay evidencia de que también poseen capacidad genotóxica puesto que modifican el ADN y causan daños irreversibles a nivel celular (Urrego y Díaz, 2006). Todo esto ha propiciado el desarrollo de técnicas y metodologías confiables, exactas y precisas que permitan la cuantificación de AFB1 en alimentos.

2.2 Métodos reportados para la cuantificación de aflatoxinas.

Como se indicó anteriormente, la contaminación de alimentos destinados al consumo humano y animal por la AFB1 es una problemática que afecta a gran parte de la población, dado que son productos muy estables y al realizar un tratamiento físico, como es someter la materia prima contaminada a elevadas temperaturas, no se garantiza la eliminación de la micotoxina. De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), es una sustancia que se encuentra clasificada como hepatocarcinógeno de clase I (Sheng et al., 2020).

En lo que respecta a las normativas nacionales que reportan los límites permisibles de estos contaminantes, destacan la NOM-188-SSA1-2002 y la NOM-247-SSA1-2008, ambas avaladas por el Diario Oficial de la Federación (DOF), indican un límite total de aflatoxinas

de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (DOF, 2002; DOF, 2008). Sin embargo, a nivel internacional la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) establece en la normativa del CODEX STAN 193-1995 un límite de 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (FAO, 1995), mientras que el Reglamento de la Unión Europea No 165/2010 determina 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (EU, 2010).

En el caso de la NOM-247-SSA1-2008, se encuentra reportado el método estandarizado para la cuantificación de aflatoxinas, iniciando con su extracción de la muestra con metanol al 80%. El extracto se filtra y se diluye con agua para que posteriormente pase a través de una columna de inmunoafinidad, la cual contiene un anticuerpo monoclonal específico para cada tipo de aflatoxina. Después se realizan varios lavados de la columna empleando agua con el fin de eliminar impurezas y para remover las aflatoxinas del anticuerpo se pasa metanol a través de la columna. Una vez obtenidos los extractos de aflatoxinas se filtran y purifican empleando un soporte sólido en donde son retenidas para dar paso a la elución de los extractos purificados con acetonitrilo; el eluido se derivatiza con ácido trifluoroacético y finalmente se procede a la cuantificación empleando HPLC en fase reversa con un detector de fluorometría (DOF, 2008).

A pesar de que se cuenta con el método estandarizado, varios autores han reportado la determinación de aflatoxinas en alimentos implementado diferentes metodologías instrumentales, las cuales se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Técnicas analíticas convencionales para determinar AFB1 en matrices alimentarias.

Técnica	Característica	Aplicación	Reactivos	Referencia
Cromatografía en capa fina (TLC)	Técnica de separación que permite la identificación y cuantificación de AF haciendo uso de sus propiedades fluorescentes.	Uso de 2D TLC para determinar AFB1 en huevo y detección UV a 365 nm.	Etanol: metanol: agua (94:4,5:1,5) Cloroformo: acetona: isopropanol (86:4:10)	(Rahmani et al., 2009; Shephard, 2009; Scussel, 2003)
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	Distribución de los componentes de la muestra entre una fase móvil y una estacionaria.	Detección de AF totales en semillas oleaginosas y granos implementando un detector UV a 365 y 435 nm.	Acetonitrilo: metanol: agua (17:29:54)	(Cho et al., 2008; Shephard, 2009)

Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)	Separación de la muestra en sus componentes químicos, seguido de una ionización de las moléculas que permite clasificar e identificar de acuerdo con la relación masa-carga.	Análisis y cuantificación de AFB1 en almendras.	Formiato de amonio (5mM), ácido fórmico (1%), metanol.	(Krska et al., 2008; Li et al., 2013; Pascale, 2009)
Electroforesis capilar (CE)	Se basa en el comportamiento de un analito en presencia de un campo eléctrico.	Cuantificación de AFB1 en maíz con detección de fluorescencia inducida por láser.	50 mM desoxicolato de sodio, 10 mM fosfato dibásico de sodio y 6 mM borato de sodio.	(Maragos, 2004; Maragos y Greer, 1997)
Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	Técnica inmunoquímica que combina la especificidad de un anticuerpo con la sensibilidad del uso de enzimas.	Determinación de AF totales en pistache, cacahuete y nuez con la medición de absorbancia a 450 nm.	Kit Euroclon (LOD 4 ppb) y metanol al 33%.	(Pascale, 2009; Pittet, 2005; Tahavori et al., 2012)

Sin embargo, como podemos observar en la **Tabla 1**, las técnicas reportadas implican el uso de solventes orgánicos que a la larga resultan en un problema medioambiental por la generación de residuos tóxicos. De igual forma, en la mayoría de los casos se hace uso de la propiedad de fluorescencia que poseen las aflatoxinas como detector. Sin embargo, acoplar la espectroscopia de fluorescencia al análisis por HPLC implica un aumento en el costo de análisis debido a que se emplean dos técnicas instrumentales para realizar las determinaciones.

2.3 Métodos electroquímicos para la determinación de aflatoxina B1.

La aplicación de métodos electroquímicos ha ganado relevancia en los últimos años debido a su alta sensibilidad y bajos límites de detección, que son equiparables a las metodologías reportadas en las normas, lo que podría beneficiar en la determinación de las aflatoxinas. Por esta razón, diversos autores han desarrollado metodologías electroanalíticas para la determinación de aflatoxinas en matrices alimentarias mediante la construcción de sensores electroquímicos. Por lo regular, para llevar a cabo los análisis electroquímicos se requiere de un sistema de tres electrodos, compuesto por un electrodo de referencia, un

electrodo auxiliar (también conocido como contra-electrodo) y el electrodo de trabajo, que da la pauta para establecer una clasificación de los métodos electroquímicos.

2.3.1 Electroodos de trabajo convencionales.

En este trabajo, llamamos electroodos de trabajo convencionales a aquéllos que llevan a cabo la determinación de forma directa, es decir, no se modifica la superficie del electrodo. Por esta razón, se realizó una revisión bibliográfica que reportaran diferentes proyectos de investigación en los que se describe la cuantificación de aflatoxina B1.

Yaacob et al. (2008) describen el desarrollo de una metodología de cuantificación de aflatoxina B1 mediante voltamperometría de redisolución catódica de onda cuadrada empleando un electrodo de gota de mercurio. Los autores reportan un intervalo lineal en la curva de calibración de 1 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ y un límite de detección de 0.389 $\mu\text{g L}^{-1}$. Aplicaron su método en muestras de cacahuete incorporando adición estándar con el fin de reducir el efecto matriz y para validar su metodología contrastaron sus resultados con el análisis por HPLC, obteniendo que no había diferencias significativas entre ambas metodologías. De igual forma Hajian y Ensafi (2009) emplearon a la voltamperometría de redisolución catódica de onda cuadrada y un electrodo de gota de mercurio. Esto les permitió obtener un intervalo lineal desde 0.2 a 0.4 ng ml^{-1} y un límite de detección de 0.15 ng ml^{-1} . Sin embargo, en la actualidad el convenio de Minamata (UNEP, 2013) establece que las técnicas electroquímicas que dependan del mercurio deben evitarse.

Ahora bien, la metodología propuesta por Slepchenko et al. (2018) consiste en la aplicación de voltamperometría diferencial de pulsos con redisolución empleando un electrodo de carbón vítreo para la determinación de AFB1 y aflatoxina M1 (AFM1) en muestras de leche empleando citrato de amonio como electrolito soporte. El intervalo de concentración empleado para la AFB1 fue de 2×10^{-3} a 2×10^{-1} mg L^{-1} mientras que para la AFM1 se empleó 2×10^{-4} a 2×10^{-2} mg L^{-1} . Aunque como se logra visualizar, con el uso de electroodos convencionales, los intervalos de concentración que se determinan se encuentran en un orden de magnitud elevado en comparación con el uso de los métodos no electroquímicos.

2.3.2 Electroodos de trabajo modificados.

La modificación de electrodos de trabajo es una técnica ampliamente utilizada debido a que muestra mejoras en cuanto a la determinación de los parámetros analíticos, tales como sensibilidad, precisión y selectividad del análisis cuantitativo de diversos analitos (Kozub et al., 2010).

El proceso de modificación del electrodo se refiere a propiciar un cambio químico sobre la superficie de los electrodos de trabajo, con el fin de aumentar su área electroactiva y así favorecer una mayor interacción entre la especie química. En lo que respecta a la elección de un agente modificante, se deben tener en consideración algunas características indispensables para seleccionarlos: en primer lugar, debe ser altamente conductor para garantizar que el flujo de electrones pase a través del electrodo y la película electropolimerizada para garantizar un área electroactiva mayor. Se busca también que el material presente actividad electrocatalítica con el fin de amplificar la señal analítica y el analito que se desee determinar debe presentar cierta afinidad por el material. Lo anterior, va a influir directamente en la selectividad y sensibilidad del análisis (Shi, 2023). Por lo que, en las siguientes secciones, 2.3.2.1 y 2.3.2.2, se reportan algunos de los agentes modificantes comúnmente utilizados para el análisis de AFB1 en diferentes matrices alimentarias; además de realizar una distinción entre las especies químicas empleadas para la modificación del electrodo de trabajo.

2.3.2.1 Biosensores.

Los biosensores electroquímicos han surgido como técnicas simples y altamente sensibles los cuales integran a un ente biológico que mejora el parámetro de selectividad; su fundamento consiste en la aplicación de técnicas amperométricas, de impedancia, métodos potenciométricos o conductimétricos, que tienen como finalidad la determinación de aflatoxinas mediante la adición de anticuerpos o aptámeros específicos como ligandos de afinidad (Vidal et al., 2013). Algunas de las metodologías que se encuentran reportadas en donde se reporta el uso de biosensores se encuentran reportadas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Uso de biosensores para determinar aflatoxina B1 en alimentos.

Técnica de cuantificación	Agente modificador	Electrodo de trabajo	Parámetros analíticos (ng L ⁻¹)	Aplicación	Referencia
Voltamperometría diferencial de pulsos	Biosensor basado en un aptámero y óxido de grafeno reducido	Carbón vítreo	Intervalo lineal: 156.13 – 1.25x10 ⁶ LOD: 21.86	Leche de vaca	Beheshti-Marnani et al. (2019)
Voltamperometría diferencial de pulsos	MOF de cobre asistido por exonucleasa III e inmovilización de nanopartículas de oro con un aptámero	Oro	Intervalo lineal: 1x10 ⁻³ a 1x10 ³ LOD: 6.7x10 ⁻⁴	Cerveza	Wang et al. (2019)
Espectroscopía de impedancia electroquímica	Inmunosensor con un anticuerpo monoclonal	Serigrafiado de oro	Intervalo lineal: 4560 – 50860 LOD: 500	Pistaches	Kaminiaris et al. (2020)
Espectroscopía de impedancia electroquímica	Aptasensor modificado con polianilina	Serigrafiado de carbono	Intervalo lineal: 9.37 a 24.98 LOD: 3.12	Pistache, canela y maíz	Ong et al. (2023)
Espectroscopía de impedancia electroquímica	Electrohilado de nanofibras compuestas por zeína/polipirrol con inmovilización de anticuerpos	Serigrafiado de carbono y óxido de grafeno	Intervalo lineal: 250 a 1x10 ⁴ LOD: 92	Maíz	Dos Santos et al. (2023)

En la literatura se encuentran reportados múltiples artículos que determinan aflatoxinas con el uso de biosensores y esto se debe a que se obtienen límites de detección muy por debajo de los electrodos convencionales ya que aumentan la selectividad y sensibilidad de los análisis. Sin embargo, la principal desventaja del uso de biosensores es que podrían arrojar falsos negativos en la determinación debido a la degradación o inestabilidad de los agentes biológicos. Una excelente alternativa para reducir esta problemática es implementar

agentes químicos no biológicos que muestren afinidad por el analito que se desee analizar, desarrollando entonces sensores no enzimáticos los cuales se describen a continuación.

2.3.2.2 Sensores no enzimáticos.

De forma general, los sensores no enzimáticos emplean agentes químicos para la modificación de los electrodos, en este sentido un requisito indispensable para su elección es que presenten afinidad por el analito, esto ayuda a mejorar la sensibilidad de las metodologías propuestas y de cierto modo controlar la selectividad del análisis. A continuación, en la **Tabla 3**, se detallan algunas de las especies químicas que se han empleado para realizar la cuantificación de aflatoxina B1 en diferentes matrices de alimentos.

Tabla 3. Uso de sensores no enzimáticos para determinar aflatoxina B1 en alimentos.

Técnica de cuantificación	Agente modificante	Electrodo de trabajo	Parámetros analíticos (ng L ⁻¹)	Aplicación	Referencia
Voltamperometría diferencial de pulsos	Nanotubos de carbono bimetalicos de paredes múltiples de Au/Pt injertados con poli o-fenilendiamina	Carbón vítreo	Intervalo lineal: 31.23 a 31.23 × 10 ⁵ LOD: 9.37	Aceite	Wang et al. (2014)
Voltamperometría diferencial de pulsos	Nanopartículas de oro y puntos cuánticos de grafeno	Serigrafiado de carbono	LOD: 146.77 LOQ: 468.41	Cebada	Gevaerd et al. (2020)
Voltamperometría diferencial de pulsos	Película de bismuto electropolimerizada aplicando voltamperometría cíclica	Barra de grafito	LOD: 11.2 LOQ: 37.3	Leche	Hernández et al. (2021)
Espectroscopía de impedancia electroquímica	MIP con fenol como monómero y un producto derivado de la goma de <i>Elaeagnus</i>	Carbón vítreo	Intervalo lineal: 1.56 a 31.22 LOD: 0.53	Arroz	Chen et al. (2023)

Lo anterior evidencia un amplio campo de aplicación con respecto al uso de especies químicas no biológicas que muestren afinidad por la aflatoxina B1, como es el caso del trabajo que se desarrolló, en donde se plantea el uso de polidopamina como agente modificante sobre el electrodo de carbón vítreo para la determinación de la micotoxina, esto retomando estudios previos en donde se reportan las interacciones que se llevan a cabo entre ambas especies (Zhao et al., 2021).

2.4 Uso de polidopamina para la determinación de aflatoxinas.

La dopamina (DA) desempeña un papel muy importante como neurotransmisor en el cuerpo de diversas especies animales, incluyendo al ser humano, sin embargo, estudios recientes se han enfocado en la capacidad que muestra para polimerizarse, lo que recientemente ha sido aprovechado en electroanálisis para la modificación de electrodos de trabajo. Esta resulta una alternativa interesante si se considera que la polidopamina presenta características como material de adsorción de AFB1 para su posterior determinación (Si y Yang, 2011).

Hay que mencionar, que la dopamina es una molécula susceptible a la polimerización química (**Figura 2**), proceso mejor conocido como autopolimerización, y esta reacción se ve favorecida a pH alcalino. La polimerización se lleva a cabo mediante la oxidación de la molécula por condiciones aerobias o bien, por medio de la adición de agentes oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxodisulfato amónico ($(NH_4)_2S_2O_8$), peryodato de potasio (KIO_4) (Carrasco-Rodríguez, 2013) o incluso mediante electrooxidación, en donde se garantiza la modificación de la superficie del electrodo, es importante mencionar que el espesor de la película electropolimerizada depende de la concentración del monómero así como del tiempo y condiciones de la polimerización (Quinchanegua y Cortés, 2018).

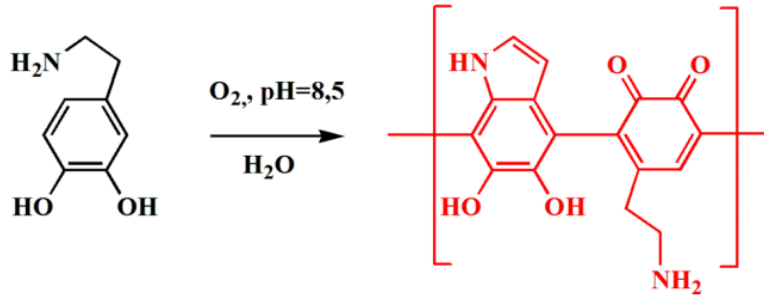


Figura 2. Polimerización química de la dopamina.

La electropolimerización es un proceso que involucra la aplicación de técnicas electroquímicas, como es el caso de la voltamperometría cíclica o bien la cronoamperometría. Es importante contar con una atmósfera de nitrógeno ya que permite controlar el proceso de deposición del polímero sobre la superficie del electrodo de trabajo, reduciendo el riesgo de tener la autopolimerización química de DA lo cual implica la obtención de una película uniforme y reproducible (Allende-Sánchez, 2012).

La polidopamina (PDA) ya formada puede interactuar con moléculas, mostrando afinidad principalmente por grupos amino debido a la presencia de grupos catecol en su estructura, formando enlaces covalentes (Allende-Sánchez, 2012). El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta interacción es mediante la adición de Michael y la reacción de la base de Schiff, por la presencia de la quinona, dentro del polímero (Martínez et al., 2013)

Se ha demostrado que la interacción entre PDA y AFB1 se debe a interacciones electrostáticas, enlaces por puentes de hidrógeno y el modelo donador-aceptor de electrones (Li et al., 2018). Por esta razón, para llevar a cabo un proceso eficiente en la cuantificación de AFB1 empleando PDA, se requiere de un proceso de adsorción significativo que permita retener una mayor cantidad del contaminante en matrices alimenticias.

El presente trabajo propone realizar un análisis cuantitativo de AFB1 a través del desarrollo de una metodología basada en un sensor modificado con PDA a partir de diversas técnicas electroquímicas; para posteriormente usar voltamperometría por redisolución adsortiva y lograr la cuantificación de la micotoxina en semillas oleaginosas.

3. JUSTIFICACIÓN.

Los pistaches junto con las almendras y las nueces, son las semillas que más exporta México, ya que produce anualmente 37 mil toneladas de las nueces de árbol. Los frutos secos, son muy importantes en la ingesta debido a su poder antioxidante (SENASICA, 2019). El almacenamiento de las semillas oleaginosas juega un papel muy importante en lo que respecta a la contaminación por micotoxinas, ya que bajo condiciones de humedad elevadas se tiene el crecimiento y proliferación del hongo *Aspergillus Flavus*, por consiguiente, la producción de aflatoxinas se incrementa. El principal problema que conlleva su presencia en alimentos reside en que no presentan deterioro en las características organolépticas; de igual forma son térmicamente estables (soportan entre 260 y 320 °C sin presentar degradación) por lo tanto persisten tras procesos como el tostado o incluso la cocción (López, 2018). La ingesta de la materia prima contaminada es muy común en humanos, por lo cual es de vital importancia la cuantificación de aflatoxinas que ingresan al organismo.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Desarrollar una metodología voltamperométrica basada en un sensor modificado con polidopamina para la determinación de aflatoxina B1 en nuez, almendra y pistache.

4.2 Objetivos específicos.

- Evaluar el perfil electroquímico de la dopamina mediante voltamperometría cíclica para establecer los parámetros de oxidación y reducción en el electrodo de trabajo.
- Evaluar el perfil electroquímico de la polidopamina mediante voltamperometría cíclica para establecer la ventana de potencial de trabajo y las mejores condiciones para su electrosíntesis potencioestática.

- Evaluar el perfil electroquímico de la aflatoxina B1 mediante voltamperometría cíclica para establecer los parámetros de oxidación y reducción en el electrodo de trabajo modificado.
- Optimizar los parámetros asociados a la técnica seleccionada para la electrosíntesis de la polidopamina mediante una optimización univariable de forma que se obtenga la señal analítica más intensa para la aflatoxina B1.
- Optimizar los parámetros relacionados a la voltamperometría de onda cuadrada mediante el diseño Box-Behnken para maximizar la señal analítica hacia aflatoxina B1.
- Realizar la caracterización analítica de la propuesta metodológica mediante el uso de la estadística para determinar la sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y reproducibilidad.
- Validar el método propuesto mediante el uso de la estadística comparando las mediciones obtenidas con un estándar de aflatoxina B1, así como el porcentaje de recuperación con el fin de demostrar que la metodología propuesta es aceptable y adecuada.
- Realizar mediciones en muestras reales mediante una determinación directa y adición patrón para la determinación de aflatoxina B1 en almendra, nuez y pistache.

5. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

5.1 Materiales y reactivos.

Para la preparación de las diferentes soluciones se partió de reactivos grado analítico marca Sigma-Aldrich y agua desionizada (resistividad 18.2 Ω) obtenida de un sistema Milli-Q MILLIPAK GAMMA GOLD.

La solución de DA para la modificación del electrodo se preparó a una concentración 5 mM y se disolvió en un buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7. La solución fue previamente burbujeada con nitrógeno de ultra alta pureza y se protegió de la luz; la película electropolimerizada era renovada en cada determinación, puliendo el electrodo de trabajo con la ayuda de una

solución de partículas de diamante con tamaño de 1.00 μm marca BASi. En cada modificación, la concentración y tratamiento de DA permaneció constante.

En lo que respecta a las soluciones de AFB1 se prepararon a partir de una ampolla certificada de Sigma-Aldrich a 200 mg L^{-1} en etanol absoluto.

5.2 Caracterización electroquímica.

Todos los experimentos se realizaron en una celda electroquímica convencional de vidrio para tres electrodos con capacidad de 20 ml. El sistema de electrodos está compuesto por un electrodo de trabajo de carbón vítreo (ECV), un electrodo auxiliar que consistió en una barra de grafito de alta pureza y como electrodo de referencia Ag/AgCl saturado. Los análisis electroquímicos se realizaron con un potenciostato Epsilon conectado a una computadora de escritorio.

5.3 Perfil electroquímico de la dopamina.

Para las determinaciones que involucren a la DA se empleó atmósfera de nitrógeno de ultra alta pureza, burbujeando la solución durante 10 minutos con el fin de eliminar el oxígeno en la solución y de esta forma evitar la polimerización química de DA. El comportamiento electroquímico de la DA sobre el ECV se estudió mediante voltamperometría cíclica, iniciando el barrido en sentido anódico, a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s^{-1} y en una ventana de potencial de -800 a 800 mV.

5.4 Modificación del electrodo de carbón vítreo.

5.4.1 Optimización de la electropolimerización de dopamina.

Para estudiar la modificación del ECV se contrastaron los métodos potenciodinámico (aplicando voltamperometría cíclica) y potencioestático (aplicando cronoamperometría) con el fin de establecer la técnica que representa una mayor reproducibilidad con respecto a la

respuesta hacía AFB1. Primero se creció la película, por voltamperometría cíclica y cronoamperometría, una vez electropolimerizada sobre la superficie del ECV se evaluó su respuesta mediante voltamperometría cíclica, considerando 3 réplicas, en una solución de AFB1 a 40 ng L^{-1} en un buffer de boratos 0.1 M a pH 9. El parámetro determinante en cuanto a la elección de la técnica para el crecimiento de la película fue la reproducibilidad de los voltamperogramas. Y una vez seleccionada la mejor metodología de electropolimerización, se procedió a optimizar de forma univariable los parámetros característicos de la técnica.

5.4.2 Caracterización de la película electropolimerizada.

La caracterización morfológica se llevó a cabo empleando un microscopio óptico de mano de marca ProScope HR, análisis por microscopías electrónicas de barrido (SEM) usando un equipo JEOL IT-300 y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) empleando un equipo OXFORD X-Max 20. Para los tres estudios se evaluaron tanto el ECV, así como el modificado (ECV-PDA) con el fin de evidenciar la electropolimerización de PDA sobre la superficie del electrodo. Además de estos análisis se realizaron estudios de impedancia usando un potenciostato Metrohm-Autolab controlado con el software Nova 2.1.4, empleando como electrolito soporte una solución 0.01 M de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en cloruro de potasio (KCl) 0.1 M ; en donde se analizaron el ECV y ECV-PDA.

5.5 Determinación del área electroactiva.

Se creció la película de PDA a las condiciones previamente optimizadas, una vez modificado el electrodo se usó una solución de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 0.01 M en cloruro de potasio (KCl) 0.1 M y mediante voltamperometría cíclica se varió la velocidad de barrido de potencial desde 10 a 100 mV s^{-1} . Una vez obtenidos los voltamperogramas se obtuvo la ecuación de la recta, relacionando la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial en Volts por segundo (V s^{-1}) vs la intensidad de pico catódico en Amperes (A). Y con base a la ecuación de Randles-Sevcik (Gosser, 1993), **Ecuación 1**, se despejó el área electroactiva, **Ecuación 2**, sustituyendo el valor obtenido de la pendiente del análisis de regresión lineal.

$$i_p = 2.65 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde: i_p = corriente (A); n = número de electrones intercambiados en la reacción; A = área electroactiva (cm^2); C = concentración de la especie electroactiva (mol cm^{-3}); D = coeficiente de difusión de la especie electroactiva ($6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$); v = velocidad de barrido de potencial (V s^{-1}).

$$A = \frac{m}{2.65 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} C D^{\frac{1}{2}}} \quad \text{Ecuación 2}$$

5.6 Perfil electroquímico de la aflatoxina B1.

Con el fin de identificar los procesos de óxido-reducción de la AFB1 se preparó una solución a 40 ng L^{-1} empleando como electrolito soporte un buffer de boratos 0.1 M a pH 9. Posteriormente empleando un análisis por voltamperometría cíclica en sentido anódico, a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s^{-1} y en una ventana de potencial de -1200 a 1200 mV se identificó la onda anódica que se asocia a la oxidación de la AFB1.

5.6.1 Caracterización mediante espectroscopía de impedancia electroquímica.

Con el fin de identificar el efecto de la AFB1 sobre el ECV-PDA se realizaron estudios de impedancia electroquímica empleando un potenciostato Metrohm-Autolab controlado con el software Nova 2.1.4, empleando como electrolito soporte una solución 0.01 M de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en cloruro de potasio (KCl) 0.1 M ; en esta ocasión se contrastaron tres casos con respecto al electrodo de trabajo: ECV, ECV-PDA y electrodo de carbón vítreo modificado con la toxina adsorbida (ECV-PDA-AFB1).

5.6.2 Comportamiento electroquímico de la aflatoxina B1 en el electrodo modificado.

El comportamiento electroquímico de la AFB1 sobre el electrodo de trabajo modificado se estudió mediante voltamperometría cíclica a diferentes velocidades de barrido de potencial dentro del intervalo de 20 a 100 mV s⁻¹, usando una solución de AFB1 a 60 ng L⁻¹ en un buffer de boratos 0.1 M a pH 9 como electrolito soporte. Una vez obtenidos los voltamperogramas se obtuvo la ecuación de la recta, relacionando la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial (mV s⁻¹) en función de la intensidad de pico anódico (μA), cuyo fundamento se encuentra en la linealización de la **Ecuación 1**, empleando términos logarítmicos y obteniendo la **Ecuación 3** (Bard & Faulkner, 2001); esperando obtener un intervalo lineal que se relaciona con el régimen del comportamiento entre la AFB1 y el ECV-PDA.

Para estudiar el proceso que controla el sistema electroquímico se analizó un gráfico en términos logarítmicos que relaciona el logaritmo de la velocidad de barrido de potencial (mV s⁻¹) vs el logaritmo de la intensidad de pico anódico (μA). Para el análisis de esta prueba se realizó una regresión lineal y se contrastó el valor de la pendiente con dos ecuaciones que representan una aproximación con respecto al control del sistema, la **Ecuación 4** se relaciona con un control por adsorción, mientras que la **Ecuación 5** indica un control difusional.

$$\log i_p = \log (2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}}) + \log (v)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\log i_p = \log (v) + \log (cte) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\log i_p = 0.5 \log (v) + \log (cte) \quad \text{Ecuación 5}$$

5.7 Optimización del tiempo de contacto y pH para el análisis de aflatoxina B1 para el análisis por voltamperometría de redisolución anódica.

5.7.1 Tiempo de contacto.

Se procedió a optimizar el tiempo de contacto del electrodo modificado en la solución que contiene a la AFB1, para esto se ajustó una velocidad de agitación de 500 rpm y se probaron tiempos de preconcentración en un intervalo de 30 s hasta 10 min. El tiempo óptimo se determinó con base a la máxima intensidad de corriente anódica relacionada a la oxidación de AFB1.

5.7.2 pH.

La optimización del electrolito soporte donde se lleva a cabo la determinación de AFB1 se realizó de forma univariable variando el pH del electrolito de 1 a 11, mediante un buffer Britton-Robinson 0.1 M. La elección del pH óptimo se realizó considerando el máximo valor para la señal de corriente anódica correspondiente a la AFB1.

5.8 Optimización de las variables relacionadas con la voltamperometría de onda cuadrada.

Mediante un diseño de experimentos Box-Behnken se optimizaron los parámetros característicos de la voltamperometría de onda cuadrada que se usará para la cuantificación de AFB1. Se consideró un diseño a tres niveles y con tres factores, los cuales fueron el paso del potencial, amplitud del pulso y frecuencia del pulso. En la **Tabla 4** se muestra la codificación de cada una de las variables, así como los niveles en los que fueron estudiadas. Mediante el análisis estadístico adecuado se pudieron obtener los valores óptimos para los parámetros de forma que se maximizara la señal analítica hacia la AFB1.

Tabla 4. Nivel de las variables independientes empleadas para el diseño Box-Behnken.

Variable	Símbolo	Codificación de variables		
		-1	0	+1
Frecuencia de pulso (Hz)	A	1	100	200
Paso de potencial (mV)	B	5	20	35
Amplitud de pulso (mV)	C	10	105	200

5.9 Determinación de las características analíticas cuantitativas de la metodología propuesta.

Para determinar los parámetros analíticos relacionados a la determinación de AFB1 con la metodología propuesta, se construye una curva de calibración considerando mediciones de estándares de AFB1 en concentraciones desde 0 a 75 ng L⁻¹, realizando un triplicado de cada medición. Mediante el análisis por regresión lineal de la corriente máxima de pico anódico vs la concentración de AFB1 medida, se determinaron estadísticamente el límite de detección (**Ecuación 6**) y cuantificación (**Ecuación 7**), intervalo lineal (**Ecuación 8**), sensibilidad del método propuesto (tomando como referencia el valor de la pendiente obtenida del análisis por regresión lineal) y reproducibilidad (**Ecuación 9**), los cálculos matemáticos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC.

$$LOD = \frac{3 S_x}{m} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$LOQ = \frac{10 S_x}{m} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$y = b + mx \quad \text{Ecuación 8}$$

$$\%RSD = \frac{S_x}{\bar{x}} * 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

5.10 Análisis de muestras reales.

Partiendo de las especificaciones reportadas en normativas se describen el proceso de extracción de aflatoxinas en semillas oleaginosas. Para ello se trituraron 25 g de la muestra en un procesador de alimentos a máxima velocidad durante 3 minutos, después se agregaron 1 g de NaCl y 50 ml de metanol al 80% para homogenizar los tres componentes y posteriormente la solución sobresaturada obtenida se filtró con papel Whatman No. 1, obteniendo así, el extracto de almendra, nuez y pistache.

El análisis cuantitativo se realizó de forma directa empleando la metodología propuesta. Primero se diluyó el extracto filtrado considerando que las muestras contenían el límite máximo permisible en las normativas oficiales mexicanas ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) y a partir de esta suposición se preparó una concentración teórica (50 ng L^{-1}) dentro del intervalo de la curva de calibración. Sin embargo, con el fin de determinar el efecto matriz se realizó también la cuantificación mediante adición patrón analizando estándares en concentraciones desde 5 a 25 ng L^{-1} de AFB1 para cada matriz alimentaria.

5.11 Validación de la técnica de cuantificación propuesta.

La validación del método se llevó a cabo mediante la obtención del porcentaje de recuperación. Primero se doparon los extractos de las muestras de almendra, nuez y pistache, con una concentración conocida del estándar de AFB1. Para proseguir con su cuantificación y finalmente sustituir los valores en la **Ecuación 10**.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{Y_i - X_i}{X_0} * 100 \quad \text{Ecuación 10}$$

En donde: Y_i = concentración de la muestra más el patrón añadido; X_i = concentración inicial de la muestra;

X_0 = concentración del patrón añadido.

6. RESULTADOS.

6.1 Perfil electroquímico de la dopamina.

El uso de la atmósfera de nitrógeno durante los experimentos permitió descartar las señales catódicas asociadas a la presencia de oxígeno en la solución de igual forma la solución se protegió de la luz con el fin de impedir que la dopamina sufriera oxidación química. El perfil electroquímico de la dopamina se estudió en una solución 5 mM en un buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7 mediante voltamperometría cíclica. En la **Figura 3**, se muestra el voltamperograma obtenido que se inició en sentido anódico; en él se observó un primer pico anódico (I) con un potencial de máximo pico anódico alrededor de 400 mV, de acuerdo con el mecanismo de reacción propuesto por Szewczyk et al. (2022), ilustrado en la **Figura 4**, se asocia a la oxidación de dopamina (DA) a dopaminoquinona (DAQ) en un proceso electroquímico-químico. Esto se deduce ya que durante el barrido del segundo segmento del voltamperograma (sentido catódico) el pico asociado a la reducción de DAQ a DA, pico catódico (II), no tiene la misma intensidad de corriente que el pico (I) (Almeida et al., 2019; Bacil et al., 2020). En este punto se empiezan a formar los primeros oligómeros de acuerdo al intermediario A mostrado en la **Figura 4**. Continuando con el barrido catódico, finalmente se encuentra el pico catódico (III) a un potencial de mínima corriente catódica de -410 mV. De acuerdo con el mecanismo de reacción; al formarse la DAQ sufre una ciclación intramolecular de DAQ mediante una adición de Michael, proceso químico que precede a los productos leucodopaminocromo (LDAC) y dopaminocromo (DAC), siendo la reducción de este último el responsable del pico (III) (Szewczyk et al., 2022).

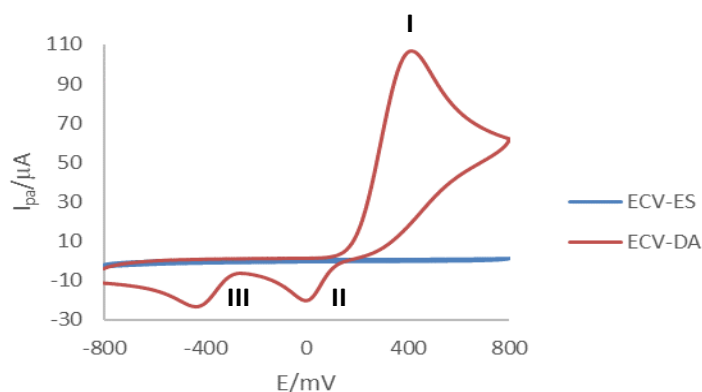


Figura 3. Voltamperograma cíclico que muestra el perfil electroquímico de la dopamina obtenido en una solución 5 mM usando como electrolito soporte un buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7 y una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} , iniciando el análisis en sentido anódico.

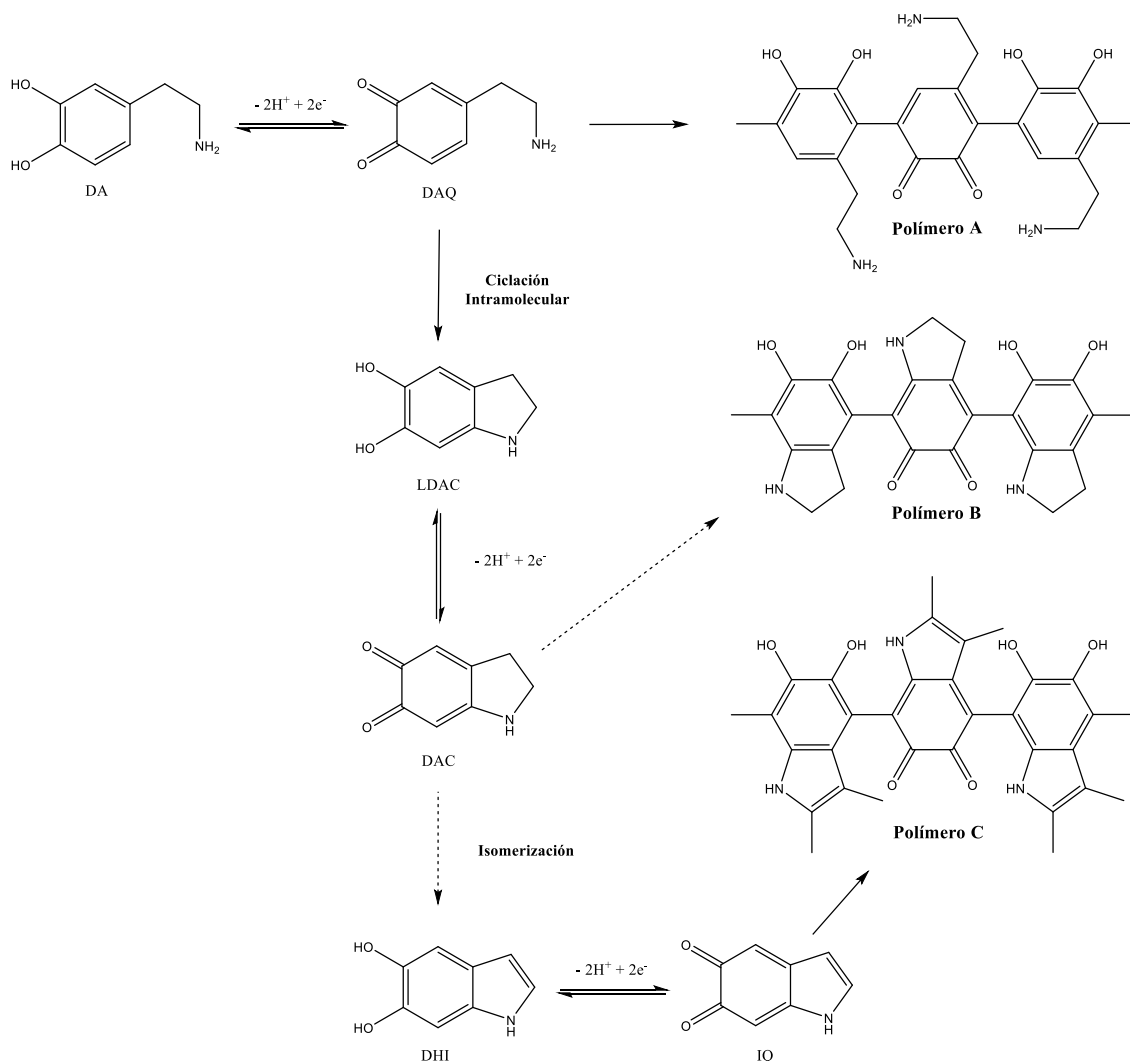


Figura 4. Esquema del mecanismo de polimerización de la dopamina (Almeida et al., 2019).

En la **Figura 5**, se presenta el voltamperograma cíclico sucesivo en donde aparece un pico anódico (IV), y de acuerdo con lo discutido en la **Figura 4** se atribuye a un proceso de oxidación de dihidroxindol (DHI) formado por la isomerización del DAC que posteriormente se oxida a indolquinona (IQ). Este último proceso contribuye a la formación del polímero a través del intermediario C mostrado en el esquema de la **Figura 4**. En la **Figura 5**, se visualiza una disminución gradual en la intensidad del pico anódico I conforme se realizan los ciclos consecutivos, este comportamiento es un indicativo de la posible modificación superficial del ECV.

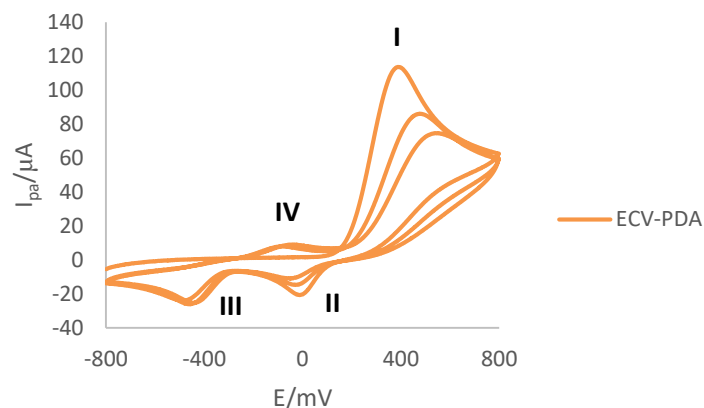


Figura 5. Voltamperograma cíclico sucesivo de 3 ciclos obtenido en una solución de dopamina 5 mM usando como electrolito soporte un buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7, velocidad de barrido de 100 mV s⁻¹.

6.2 Modificación del electrodo de carbón vítreo.

Para llevar a cabo la modificación del ECV se empleó una solución de DA 5 mM en un buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7, la solución se protegió de la luz y fue burbujeada con nitrógeno de ultra alta pureza durante 10 minutos. La modificación del electrodo se estudió mediante dos métodos: el potenciodinámico por voltamperometría cíclica (empleando 3 ciclos sucesivos en una ventana de potencial de -800 a 800 mV y una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s⁻¹) y el potencioestático por cronoamperometría (estableciendo un potencial de 174 mV y un tiempo de imposición de 30 s) ver **Figura 6 A y B**. Una vez que se creció la película de PDA, por voltamperometría cíclica y cronoamperometría, se evaluó la respuesta de la AFB1 mediante voltamperometría cíclica, ver **Figura 6 C y D**, la concentración de AFB1 para realizar este experimento se tomó con base en la revisión bibliográfica (Gevaerd et al., 2020) estableciendo 40 ng L⁻¹ y usando un buffer de boratos 0.1 M a pH 9 como electrolito soporte, cada determinación se llevó a cabo por triplicado y directamente sobre la solución de AFB1.

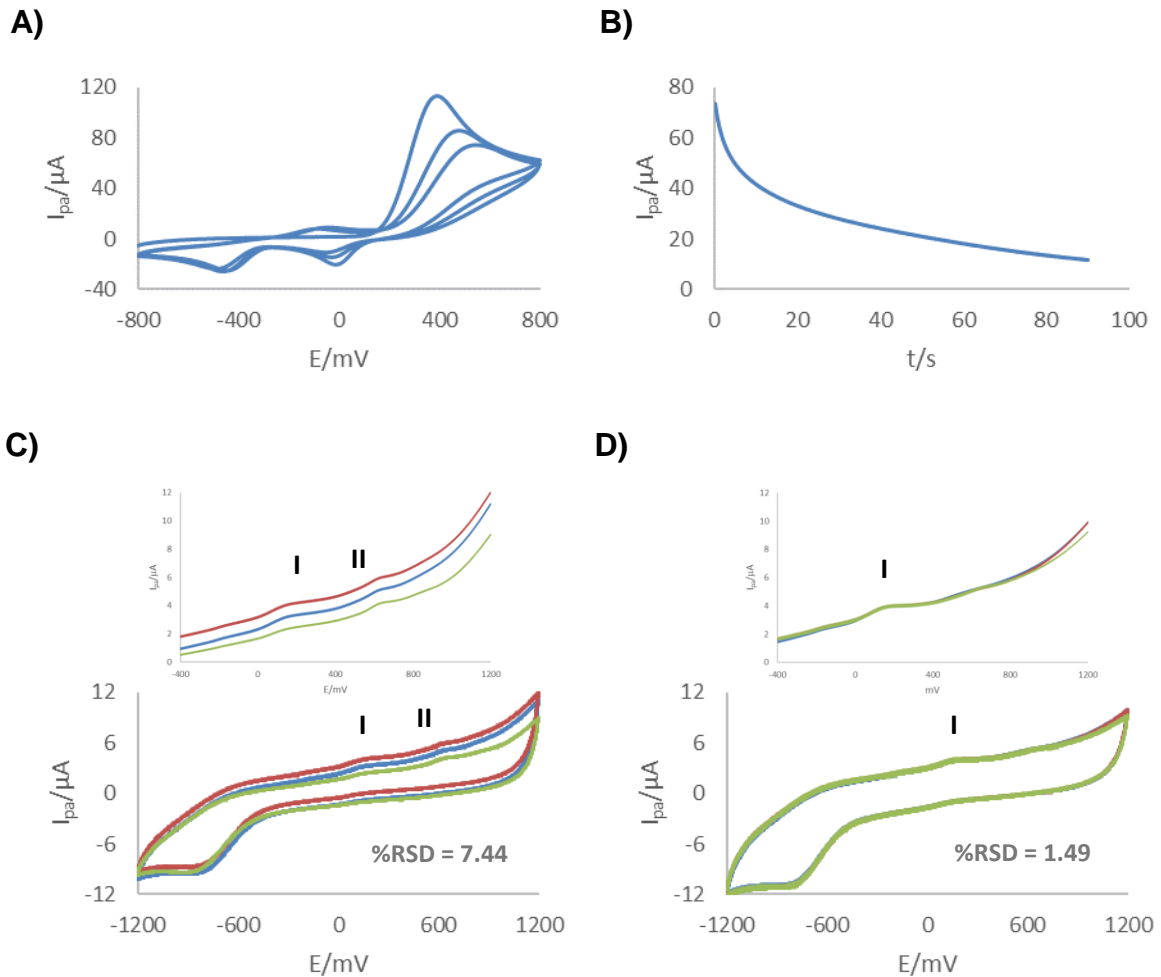


Figura 6. Electropolimerización de PDA mediante: A) Método potenciodinámico y B) Transitorio potencioestático. Ambos en el sistema dopamina 5 mM en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7. Reproducibilidad de la electropolimerización por: C) Voltamperometría cíclica y D) Cronoamperometría; las respuestas se visualizan mediante voltamperogramas cíclicos, iniciando el barrido en sentido anódico, a 100 mV s^{-1} y en AFB1 40 ng L^{-1} usando como electrolito soporte un buffer de boratos 0.1 M a pH 9.

Cuando se analiza el voltamperograma obtenido mediante la modificación potenciodinámica (**Figura 6 C**) se visualizan dos ondas anódicas, alrededor de los 150 y 630 mV, caso contrario al analizar el voltamperograma obtenido por el método potencioestático (**Figura 6 D**), en donde el pico anódico II, que aparece a los 650 mV, disminuye su intensidad a tal punto de ser considerado como un hombro. Bajo este análisis, se fijó como señal analítica el pico anódico I, debido a que mantiene su definición y aparece

al mismo potencial (150 mV) al analizar las dos técnicas de electropolimerización. La diferencia más importante entre ambas técnicas fue en la reproducibilidad de los análisis. Mediante la técnica potenciostática se obtuvo un %RSD de 1.49% mientras que con la técnica potenciodinámica se obtuvo un 7.44%, por esta razón se elige la primera para el crecimiento de la película de PDA.

6.2.1 Optimización de la electropolimerización de DA.

La optimización de los parámetros relacionados a la técnica potenciostática se realizó de forma univariable con el fin de maximizar la respuesta anódica hacia la AFB1. Se inició con la optimización del potencial de crecimiento para la formación de la PDA. Los potenciales elegidos para el estudio se retomaron del voltamperograma indicado en la **Figura 3**, seleccionando valores de potencial por debajo y por encima del potencial de máxima corriente anódica del pico (I). Una vez sintetizada la PDA, se realizó voltamperometría cíclica, en una solución de AFB1 40 ng L⁻¹ empleando un buffer de boratos 0.1 M a pH 9 como electrolito soporte, los resultados se muestran en la **Figura 7**, y se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Potencial impuesto vs la intensidad de corriente de pico anódico relacionada a la oxidación de AFB1 a 40 ng L⁻¹ durante la etapa de modificación del electrodo mediante cronoamperometría (%RSD) n= 3.

E/mV	I _{pa} /μA
200	0.4517 (2.44)
300	0.3937 (1.59)
350	0.3601 (3.46)
400	0.4883 (1.15)
450	0.6622 (5.32)
550	0.6673 (3.87)
650	0.6097 (5.91)

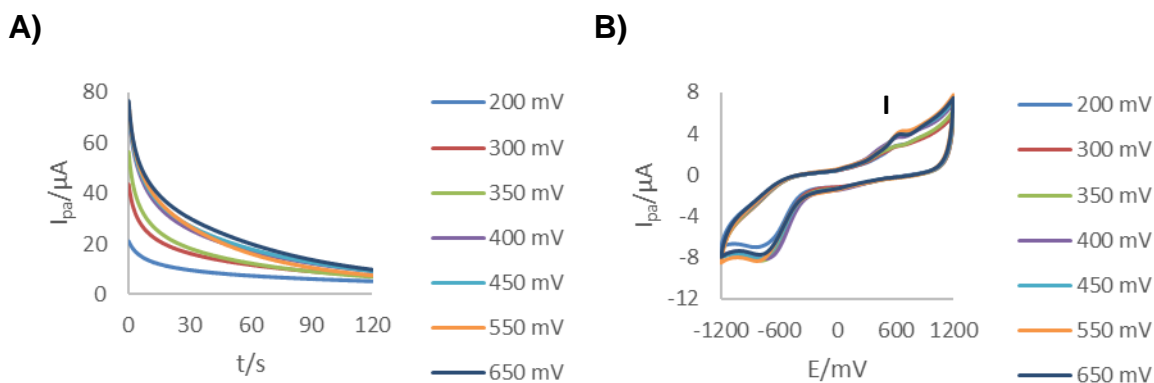


Figura 7. A) Familia de transitorios potenciostáticos obtenidos imponiendo diferentes potenciales para modificación con PDA. B) Voltamperogramas cíclicos que muestran la respuesta de los diferentes electrodos modificados en una solución de AFB1 40 ng L⁻¹ en un buffer de boratos 0.1 M a pH 9 a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s⁻¹.

De acuerdo con la **Tabla 5**, se observa un comportamiento directamente proporcional entre el potencial (E/mV) y la altura del pico anódico (I_{pa}/μA). A partir de 550 mV la intensidad anódica decrece. Esto se relaciona con el recubrimiento y grosor de la película por lo que el decremento en la intensidad de corriente anódica se podría asociar a que espesor de la película interfiere con la transferencia de electrones. Por esta razón se fija el potencial para el crecimiento de la película de PDA en 550 mV y se procedió a optimizar el tiempo de imposición de potencial para la cronoamperometría.

Tabla 6. Tiempo de imposición de potencial vs la intensidad de corriente anódica relacionada a la oxidación de AFB1 para la modificación potenciostática del electrodo (%RSD) n= 3.

t/s	I _{pa} /μA
30	0.2208 (2.84)
60	0.2889 (3.38)
120	0.3696 (6.21)
180	0.4334 (2.65)
300	0.3113 (3.82)
420	0.2686 (4.63)

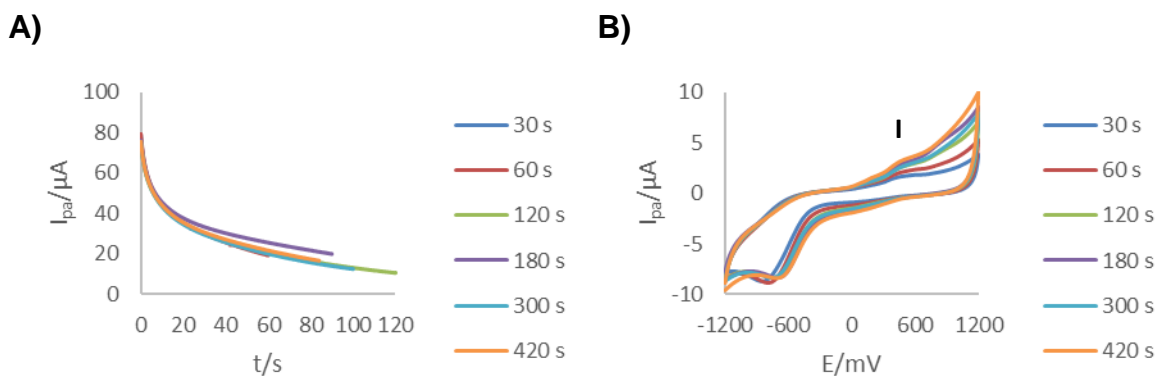


Figura 8. A) Familia de transitorios potenciostáticos imponiendo un potencial de 550 mV obtenidos a diferentes tiempos de imposición para la modificación con PDA. B) Voltamperogramas cíclicos de una solución de AFB1 40 ng L⁻¹ en un buffer de boratos 0.1 M a pH 9 a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s⁻¹.

Para la optimización univariable se empleó un intervalo de tiempo de 30 hasta 420 s, los correspondientes transitorios potenciostáticos se muestran en la **Figura 8** y contrastando con las intensidades reportadas en **Tabla 6**, se encuentra un pico anódico mejor definido y que posee una mayor intensidad de corriente al usar 180 s. Tiene sentido que, a tiempos mayores, 300 y 420 s, la altura de pico anódico decrezca este comportamiento se le atribuye a las propiedades físicas de la PDA, que la clasifican como un material semiconductor. Por esta razón, al electropolimerizar la película por un tiempo prolongado el grosor aumenta y por ende la conductividad del material se ve disminuida afectando directamente la transferencia de electrones entre la AFB1 y el ECV-PDA.

6.2.2 Caracterización de la película electropolimerizada.

La caracterización morfológica del ECV y ECV-PDA se estudió con un microscopio óptico de mano, la **Figura 9 A** muestra la superficie del ECV en donde se observa una superficie pulida, lisa y vítrea. Por otro lado, la electropolimerización de PDA se estudió creciendo la película con el método potenciostático previamente optimizado, **Figura 9 B**, la modificación resulta evidente ya que se observa un cambio en la morfología del ECV, apreciando diversos relieves que se distribuyen en forma de anillo, principalmente sobre la parte externa del componente vítrea del ECV, la coloración de la película corresponde a una

gama azulada-grisácea y presenta una textura completamente rugosa. Incluso en la vista lateral se evidencian las prominencias que se asocian con una electropolimerización exitosa de PDA sobre el ECV.

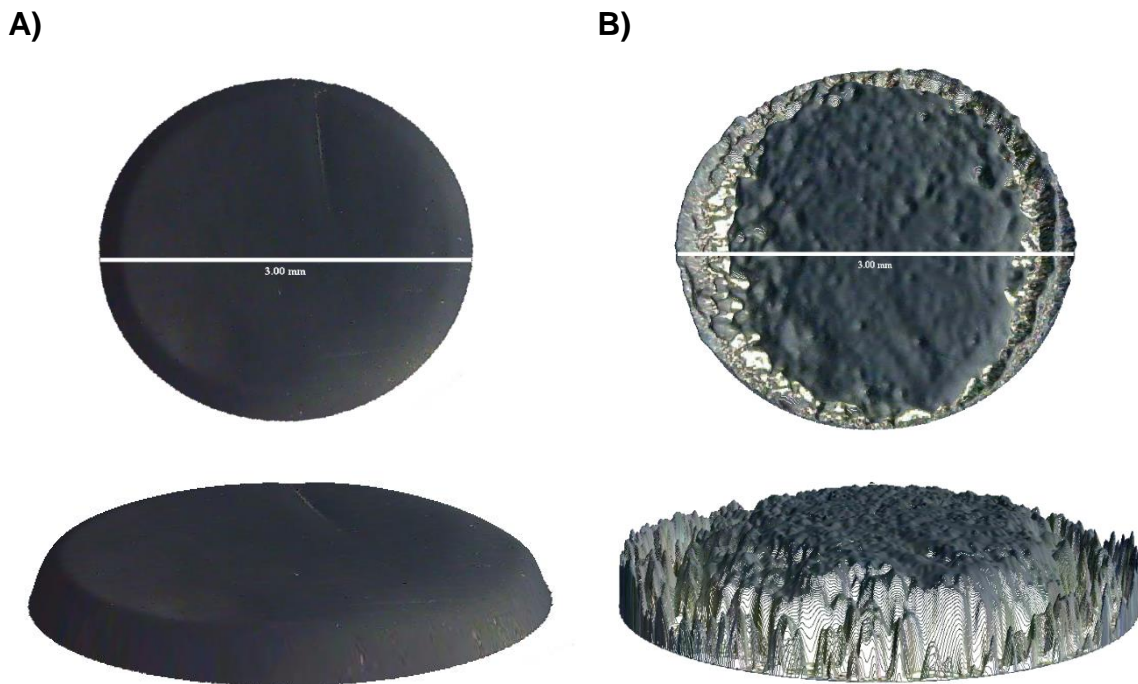


Figura 9. Microscopías ópticas y gráfico de superficie 3D de A) ECV y B) ECV-PDA obtenidas con 250x.

Una vez analizada la superficie del electrodo, se procedió a identificar la disposición de PDA a lo largo de la superficie del ECV, por esta razón se tomaron microscopías en diferentes zonas del ECV-PDA, que se encuentran representadas en la **Figura 10**. La primera imagen corresponde a la zona central del ECV-PDA, aquí se observan pequeñas partículas de PDA que se encuentran dispersas en toda la región. Al analizar la parte media del electrodo se observa como las partículas comienzan a aglomerarse hasta formar una masa de mayor tamaño. Y al evaluar la zona externa, es decir la frontera entre la parte vítrea y la resina que recubre el electrodo, se observa una mayor acumulación de PDA evidenciando un crecimiento tridimensional del polímero que aporta cierto relieve a la superficie estudiada.

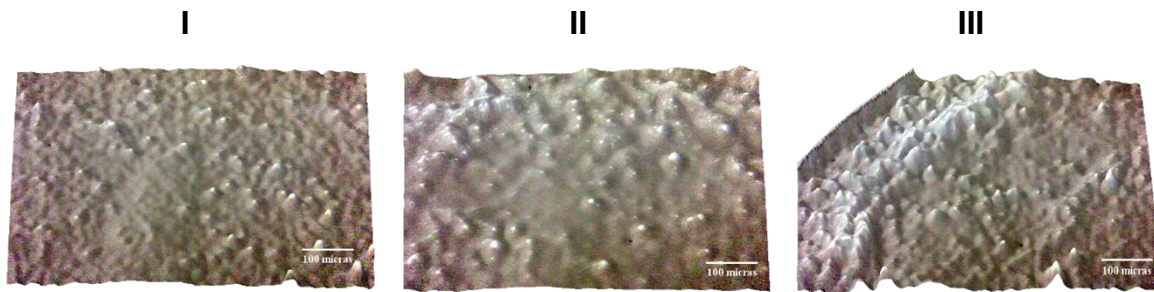


Figura 10. Microscopías ópticas y gráficos de superficie 3D que muestra la disposición del polímero sobre: I el centro, II la zona media y III la frontera del ECV-PDA obtenidas con 250x.

También se obtuvieron las microscopías por SEM del ECV y ECV-PDA, **Figura 11**. En ellas se corrobora la información recabada por las microscopías ópticas, en donde el ECV posee una superficie lisa. Mientras que en el caso del ECV-PDA se evidencia que la distribución del polímero sobre el electrodo inicia formando una capa delgada, que incluso cambia la coloración al fondo de la microscopía, tornándose ligeramente más oscura en comparación con el electrodo sin modificar. Esta capa delgada da lugar a la formación de pequeños núcleos de PDA que van creciendo hasta llegar a traslaparse.

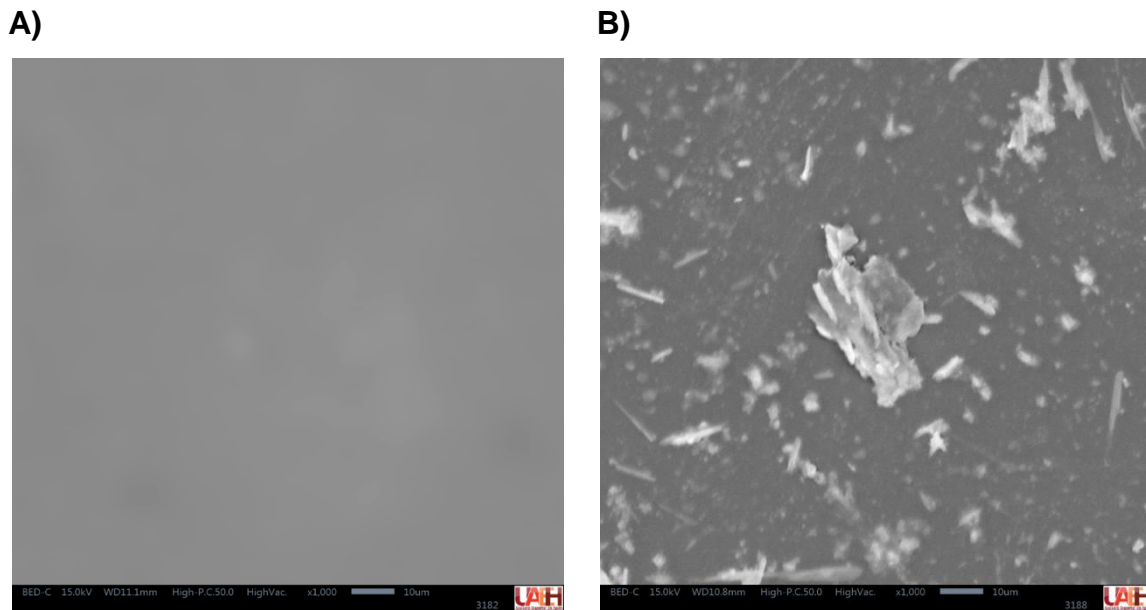


Figura 11. Microscopías SEM de A) ECV y B) ECV-PDA ambas obtenidas con un detector de electrones retrodispersados a 1000x.

Por otra parte, los espectros obtenidos por EDS, **Figura 12**, muestran el mapeo elemental del electrodo sin modificar y la película formada en la superficie del electrodo. En el caso de ECV únicamente se cuenta con la presencia de carbono y oxígeno, elementos que forman parte de la composición del electrodo, mientras que en el caso del ECV-PDA se confirma la presencia del polímero ya que además de contener carbono y oxígeno, aparece el nitrógeno, elemento que se encuentra presente en los grupos amino que componen la estructura química de la PDA, **Figura 1**.

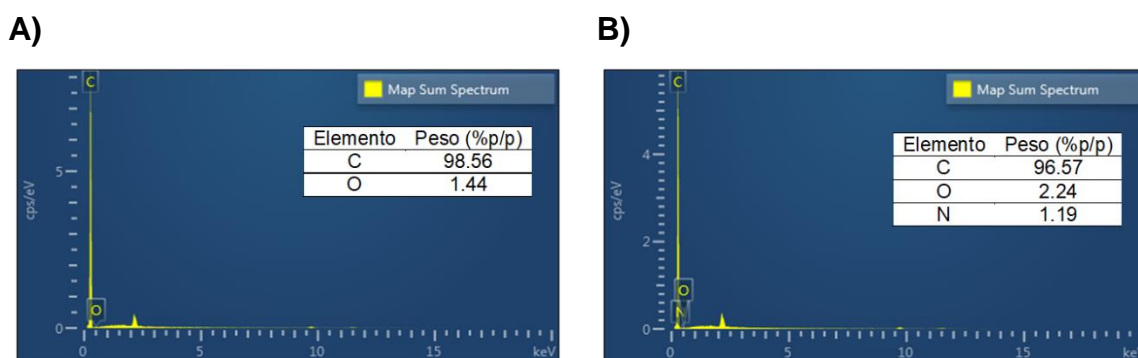


Figura 12. Espectros obtenidos del análisis EDS de A) ECV y B) ECV-PDA.

Finalmente, se realizaron estudios de impedancia electroquímica analizando el ECV y el electrodo modificado con PDA crecida por cronoamperometría a 550 mV y en 180 s (ECV-PDA), posteriormente mediante el análisis de impedancia a diferentes frecuencias, se trazaron los diagramas de Nyquist que se muestran en la **Figura 13**.

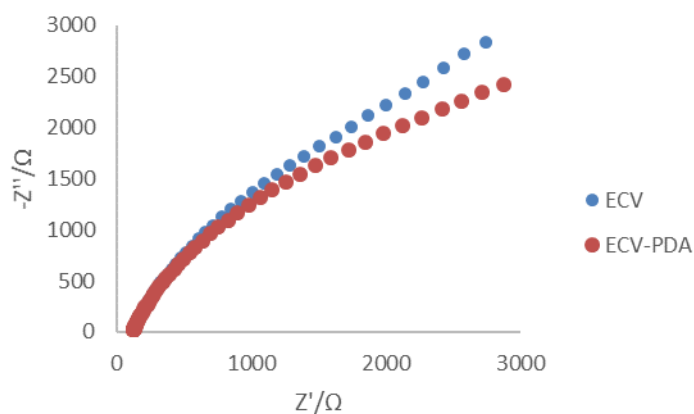


Figura 13. Diagramas de Nyquist para verificar la modificación del ECV empleando $K_3Fe(CN)_6$ 0.01 M en KCl 0.1 M en un intervalo de frecuencia de 0.1 - 100000 Hz.

Los diagramas de Nyquist evidencian que el ECV cuenta con un intervalo lineal en resistencias de 1000 a 3000 Ω , cuyo comportamiento se asemeja a la Ley de Ohm, esto se asocia a que el carbón vítreo es un material que presenta alta conductividad eléctrica. Por otro lado, en presencia del agente modificante, ECV-PDA, el semicírculo característico de los diagramas de Nyquist resulta más evidente en comparación con el ECV. Esto ocurre debido a las propiedades físicas de la PDA, ya que al ser catalogado como un material semiconductor provoca una disminución en la resistencia a la transferencia de carga, como consecuencia, el gráfico que involucra el ECV-PDA se curva (Ang-Mei & Pilo, 2017). Los diagramas de Nyquist permiten corroborar que la técnica de electropolimerización propuesta representa una modificación exitosa sobre la superficie del ECV.

6.3 Determinación del área electroactiva.

La determinación del área electroactiva se lleva a cabo mediante voltamperometría cíclica evaluando diferentes velocidades de barrido de potencial, **Figura 14**. Cada voltamperograma se inició en el potencial de corriente nula y en una ventana de potencial de -1000 a 1000 mV previamente al análisis se electropolimerizó PDA mediante cronoamperometría a 550 mV con un tiempo de imposición de 180 s y una vez crecida la película se evaluó su respuesta en una solución de $K_3Fe(CN)_6$ 0.01 M en KCl 0.1 M como electrolito soporte; por esta razón en este análisis se siguió el proceso de reducción y por consiguiente se calcularon las alturas de pico catódico. El procedimiento se replicó para analizar el comportamiento del ECV con el fin de tener una comparativa entre el electrodo modificado y sin modificar.

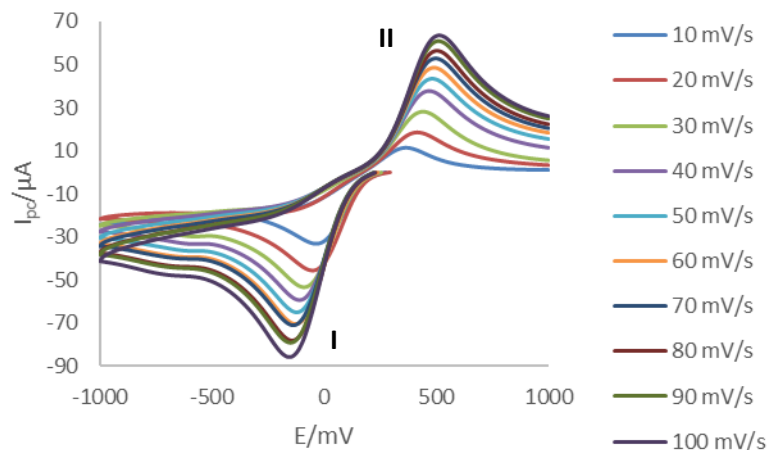


Figura 14. Voltamperogramas cíclicos para determinar el área electroactiva del ECV-PDA variando la velocidad de barrido de potencial desde 10 a 100 mV s^{-1} empleando una solución de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 0.01 M en cloruro de potasio (KCl) 0.1 M como electrolito soporte.

Con la información proporcionada por los voltamperogramas, se realizó un análisis por regresión lineal. Relacionando la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial en Volts por segundo (V s^{-1}) vs la intensidad de pico catódico en Amperes (A), gráficos mostrados en la **Figura 15**. Para realizar la determinación del área electroactiva se despejó este parámetro de la **Ecuación 1**. Posteriormente se relacionó la pendiente del análisis de regresión lineal para obtener la **Ecuación 2**.

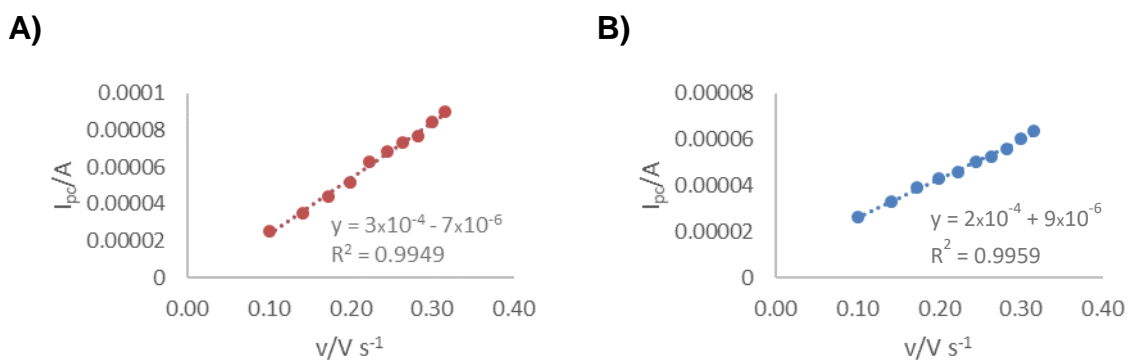


Figura 15. Regresión lineal a diferentes velocidades de barrido de potencial vs intensidad de corriente catódica asociada a la reducción del $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ para la determinación del área electroactiva del A) ECV y B) ECV-PDA.

El área electroactiva del ECV contó con un valor de 0.0303 cm² mientras que el ECV-PDA 0.0455 cm², estos datos resultan coherentes ya que al modificar la superficie del electrodo se espera un cambio en la morfología, tal y como se observa en la **Figura 9 B**, donde los relieves obtenidos se relacionan con un aumento en la rugosidad de la superficie y con un mayor número de sitios activos.

También se determinó el área geométrica del ECV, empleando la **Ecuación 11**, para ello se determinó el diámetro de la parte vítrea del electrodo usando un Vernier digital obteniendo un valor de 0.636 cm. Posteriormente, se obtuvo un valor de 0.3177 cm² para el área geométrica del electrodo. Aquí es importante destacar que el área geométrica describe los aspectos lineales, o bien, el tamaño del electrodo. Mientras que el área electroactiva se relaciona con la superficie del electrodo que presentará actividad electroquímica con el analito. Por esta razón arrojan valores muy diferentes entre sí.

$$A = \pi r^2 \quad \text{Ecuación 11}$$

6.4 Perfil electroquímico de la aflatoxina B1.

El comportamiento electroquímico de la AFB1 sobre el ECV, se evaluó mediante voltamperometría cíclica en una solución de AFB1 a 40 ng L⁻¹ usando un buffer de boratos 0.1 M pH 9 como electrolito soporte, los voltamperogramas obtenidos se presentan en la **Figura 16**.

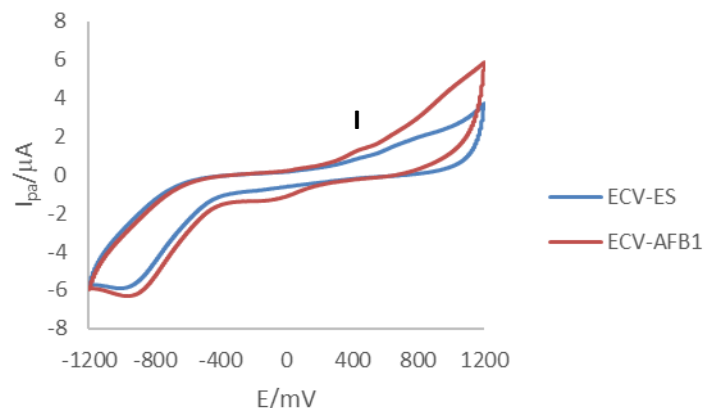


Figura 16. Voltamperogramas cíclicos que muestran el perfil electroquímico de la aflatoxina sobre el electrodo de carbón vítreo en una solución de AFB1 40 ng L⁻¹ usando como electrolito soporte un buffer de boratos pH 9 a 0.1 M y una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s⁻¹.

En el primer barrido anódico del sistema que contiene a la AFB1 se observa la formación de un hombro pronunciado aproximadamente a un potencial de 370 mV el cual se puede asociar al proceso químico-electroquímico de oxidación de la AFB1. El proceso de oxidación corresponde a la hidrólisis del grupo éster, precursor importante para la obtención del ácido cúmarico que finalmente se oxida hasta formar la cetona, **Figura 17**, esta señal se considera como respuesta analítica de AFB1 para los análisis posteriores. Al invertir el barrido se observa una onda catódica alrededor de 100 mV que podría relacionarse con el proceso de reducción correspondiente.

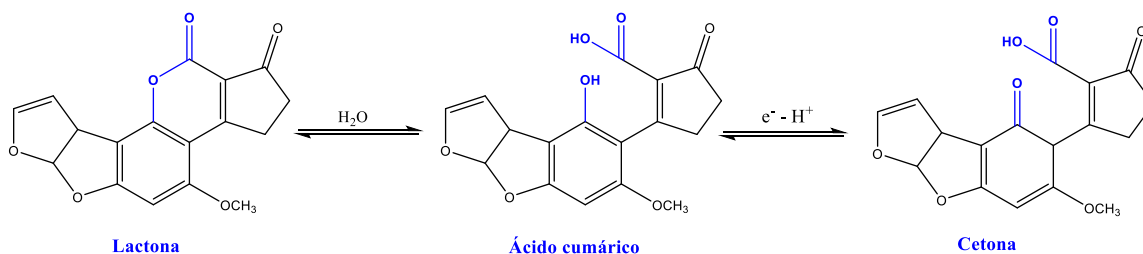


Figura 17. Mecanismo de reacción para la oxidación de AFB1 (Gevaerd et al., 2020).

Una vez que se identificó el comportamiento de la AFB1 sobre el ECV, se procede a evaluarlo sobre el ECV-PDA. La electropolimerización de PDA se realizó con el método potencioestático, con el fin de imponer un potencial lo suficientemente intenso para lograr la oxidación del monómero DA. Una vez sintetizada la película, se procedió a realizar la

voltamperometría cíclica a una solución de AFB1 40 ng L^{-1} en un buffer de boratos 0.1 M a pH 9 que fungió como electrolito soporte, obteniendo los voltamperogramas mostrados en la **Figura 18**.

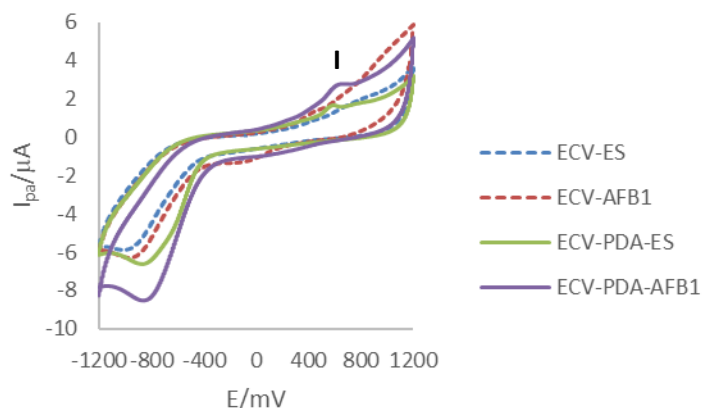


Figura 18. Voltamperogramas cíclicos del perfil electroquímico de la AFB1 sobre el electrodo de carbón vítreo y el electrodo de carbón vítreo modificado con polidopamina en una solución de AFB1 40 ng L^{-1} usando como electrolito soporte un buffer de boratos 0.1 M a pH 9 y una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s^{-1} .

Pérez-Fernández y de la Escosura Muñiz (2022) mencionan que la modificación del electrodo de trabajo con PDA ejerce un efecto electrocatalítico sobre la oxidación de AFB1, por esta razón tal y como se puede observar en la **Figura 18**, la onda anódica relacionada a la oxidación de la AFB1 en el ECV-PDA aparece a un potencial de 580 mV , lo cual resulta ser mayor al hombro observado en el ECV, **Figura 16**, aunque también influye que la PDA es un material semiconductor y por esta razón se requiere mayor energía para lograr la oxidación (Geleta, Zhao y Wang, 2018).

6.4.1 Caracterización mediante espectroscopía de impedancia electroquímica.

Una vez que se identificó que la modificación del ECV-PDA poseía un efecto en los diagramas de Nyquist, se procedió a identificar el comportamiento de la AFB1 sobre la película electropolimerizada. Por esta razón se electropolimerizó DA sobre el ECV, empleando el método potencioestático con un potencial aplicado de 550 mV durante 180 s .

Una vez que se obtuvo el ECV-PDA, se colocó en una solución que contenía AFB1 60 ng L⁻¹ empleando un buffer de acetatos 0.1 M a pH 4 como electrolito soporte con el fin de adsorber la micotoxina sobre el ECV-PDA.

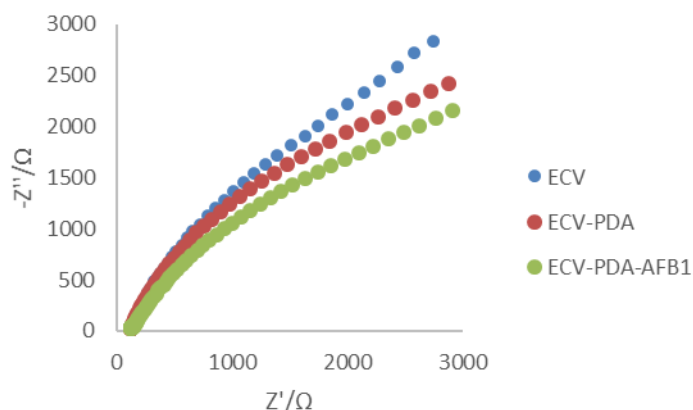


Figura 19. Diagramas de Nyquist para verificar la modificación del electrodo de trabajo en la determinación de AFB1 empleando $K_3Fe(CN)_6$ 0.01 M en KCl 0.1 M en un intervalo de frecuencia de 0.1 - 100000 Hz.

Retomando los tres casos que se analizaron mediante los diagramas de Nyquist, representados en la **Figura 19**, es evidente que el diámetro del semicírculo disminuye en presencia de la AFB1. Este comportamiento se relaciona con un aumento en la resistencia a la transferencia de carga, debido a esto se puede aseverar que la película de PDA interacciona con la AFB1, a pesar de que se analizaron concentraciones en el orden de las partes por billón (ppb) el semicírculo modifica su diámetro y mejora su definición en presencia de la micotoxina.

6.4.2 Comportamiento electroquímico de la aflatoxina B1 en el electrodo modificado

El comportamiento electroquímico de la AFB1 se evaluó con voltamperometría cíclica variando la velocidad de barrido de potencial dentro del intervalo de 20 a 100 mV s⁻¹ en una solución de AFB1 a 40 ng L⁻¹ empleando un buffer de boratos 0.1 M a pH 9 como electrolito soporte; previo a esto se modificó la superficie del electrodo. Los voltamperogramas

obtenidos para este análisis se representan en la **Figura 20**. Para verificar bajo qué régimen se lleva a cabo la oxidación de la AFB1 sobre el ECV-PDA, se usó la ecuación de Randles-Sevcik (**Ecuación 1**) que puede ajustarse a un modelo lineal como la ecuación de la recta (**Ecuación 8**).

Posteriormente se relacionaron la velocidad de barrido de potencial y la raíz de la velocidad de barrido de potencial, ambos términos en función de la intensidad de pico anódico. De acuerdo con un análisis por mínimos cuadrados se determinó que la **Figura 21 A** presenta un ajuste lineal de acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik (**Ecuación 1**), esto se relaciona con el proceso que rige el comportamiento de la AFB1 hasta la superficie del electrodo y en este caso se presenta un régimen difusional.

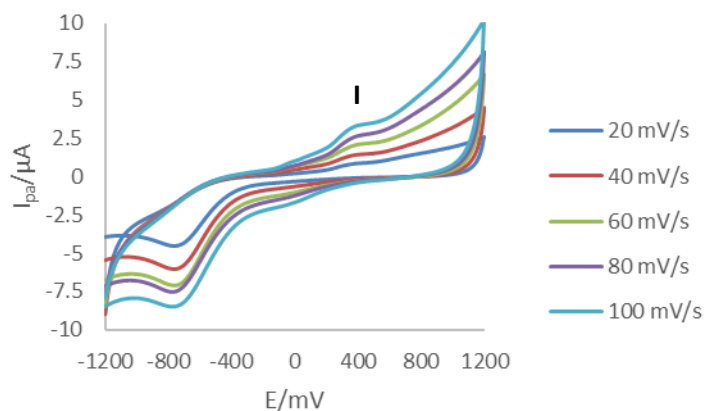


Figura 20. Voltamperogramas cíclicos en una solución de AFB1 40 ng L⁻¹ usando como electrolito soporte un buffer de boratos 0.1 M a pH 9, variando la velocidad de barrido de potencial de 20 a 100 mV s⁻¹.

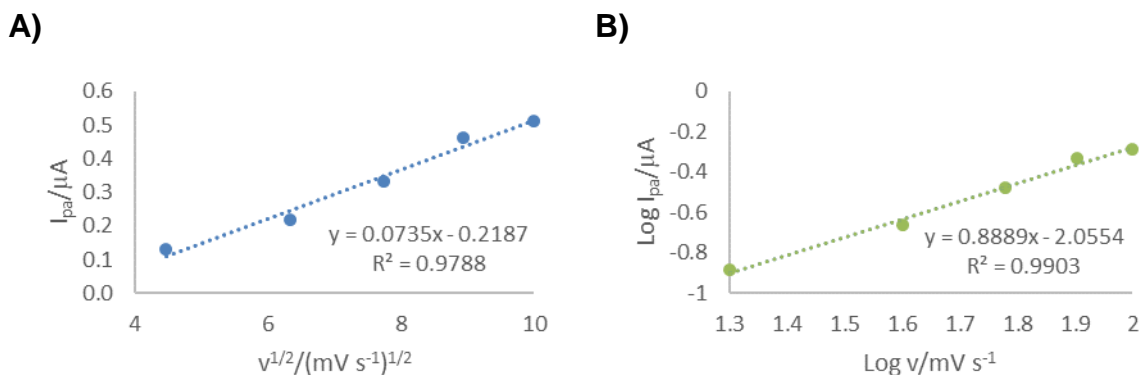


Figura 21. A) Gráfico de Randles-Sevcik en una solución de AFB1 40 ng L⁻¹ usando como electrolito soporte un buffer de boratos 0.1 M a pH 9. B) Gráfico logarítmico que señala la relación Log v vs Log I.

También es importante conocer el proceso que controla el sistema electroquímico y para ello se retoma la ecuación de Randles-Sevcik pero ahora en términos logarítmicos (**Ecuación 3**) con el fin de obtener un gráfico que se encuentra representado en la **Figura 21 B**. Para el análisis de esta prueba se verificó que existiera un ajuste lineal y mediante el análisis por mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta; en donde se retoma el valor de la pendiente para realizar una aproximación considerando la **Ecuación 4** y **Ecuación 5**, esta última retoma el criterio de Randles-Sevcik en donde el término de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial aparece como 0.5 debido a arreglos matemáticos.

La pendiente del análisis que relaciona el comportamiento del electrodo y la AFB1, indicada en la **Figura 21 B**, da un valor de 0.8889, este valor se asemeja al comportamiento de la **Ecuación 4** que muestra una pendiente cercana a 1, por esta razón se establece que el proceso que controla el sistema se ve influenciado tanto por difusión y mayoritariamente por adsorción, por esta razón la voltamperometría por redisolución adsorptiva (VRA) resulta una opción viable y es la técnica que se escoge para la determinación de AFB1.

6.5 Optimización del tiempo de contacto y pH para el análisis de AFB1.

6.5.1 Tiempo de contacto.

Una vez que se estableció la VRA para la determinación de AFB1, es importante estudiar el tiempo de contacto óptimo. Este parámetro, hace referencia al tiempo de contacto entre la AFB1 y el ECV-PDA con el fin de establecer un proceso de adsorción de la micotoxina sobre la superficie del electrodo. Esto resulta en una alternativa que permite la cuantificación a nivel traza de la AFB1. Para ello se optimizó de forma univariable el tiempo de contacto entre la solución de AFB1 40 ng L^{-1} sobre el electrodo modificado de forma que se maximice la respuesta anódica

Para la optimización, se probaron tiempos desde 30 segundos hasta 10 minutos, los voltamperogramas obtenidos se muestran en la **Figura 22**. De acuerdo con las intensidades reportadas en la **Tabla 7**, se encuentra una altura de pico anódico mayor en 1 min de preconcentración, por lo que se usa este tiempo para las determinaciones posteriores.

Tabla 7. Intensidad de corriente anódica relacionada a la oxidación de AFB1 vs el tiempo de preconcentración (%RSD).

t / min	I _{pa} / μ A
0	0.2171 (1.85)
0.5	0.3429 (4.94)
1	0.4845 (2.42)
3	0.4447 (3.78)
5	0.3735 (4.23)
10	0.3302 (5.75)

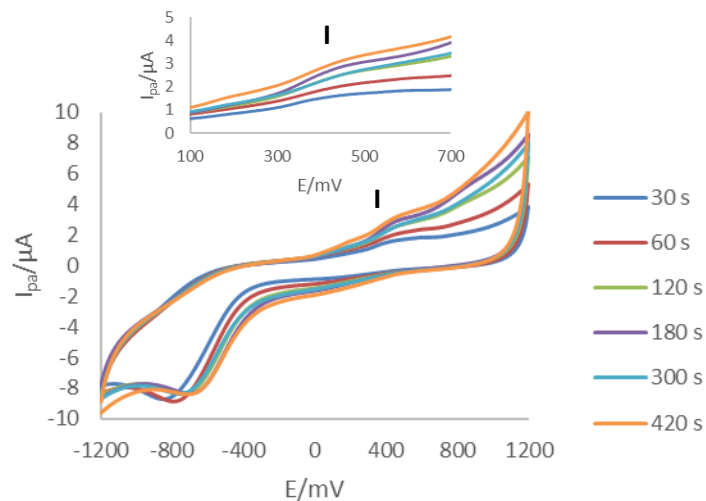


Figura 22. Voltamperogramas cíclicos en una solución de AFB1 40 ng L⁻¹ en un buffer de boratos 0.1 M a pH 9, a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s⁻¹, variando el tiempo de preconcentración previo al análisis.

Los tiempos de preconcentración superiores al valor seleccionado como óptimo, evidencian un decremento en la intensidad de pico anódico y esto se debe a que las interacciones que se forman entre la AFB1 y la PDA son débiles, por lo que al exponer el sistema a la fuerza centrífuga por tiempos prolongados las interacciones se desestabilizan y por ende el pico anódico que corresponde a la AFB1 se ve disminuido.

6.5.2 pH del medio de análisis.

El análisis de pH resulta interesante ya que al estar relacionado con la protonación y desprotonación de las especies puede favorecer o retardar los procesos RedOX que se están estudiando. Considerando esto, se estudió el efecto del pH que aumentará la intensidad de la señal analítica asociada con el proceso de oxidación de AFB1. Empleando voltamperometría cíclica iniciando en sentido anódico y en una ventana de potencial de -1200 a 1200 mV se estudió un intervalo de pH desde 1 hasta 11 amortiguando con un buffer Britton Robinson 0.1 M en soluciones de AFB1 a una concentración 60 ng L⁻¹. Antes de iniciar el análisis, se electropolimerizó la película de PDA con cronoamperometría a 550 mV y con un tiempo de imposición de 180 s, seguido de eso se ajustó cada valor de pH empleando una solución de NaOH 0.5 M. Los voltamperogramas obtenidos se presentan en la **Figura 23**, el potencial de pico anódico (E_{pa}) así como la intensidad de pico anódico (I_{pa}) para cada valor de pH se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Intensidad de corriente anódica relacionada a la oxidación de AFB1 vs los diferentes pH del electrolito soporte, así como el desplazamiento de potencial hacía valores más negativos conforme aumenta el pH (%RSD).

pH	E_{pa} / mV	I_{pa} / μ A
1	553	0.1791 (3.08)
2	490	0.1905 (2.95)
3	446	0.2086 (3.60)
4	396	0.4129 (2.19)
5	343	0.3281 (1.96)
6	285	0.2549 (4.25)
7	209	0.2411 (3.69)
8	141	0.3098 (5.28)
9	81	0.3449 (2.50)
10	31	0.3143 (2.91)
11	-43	0.3204 (1.90)

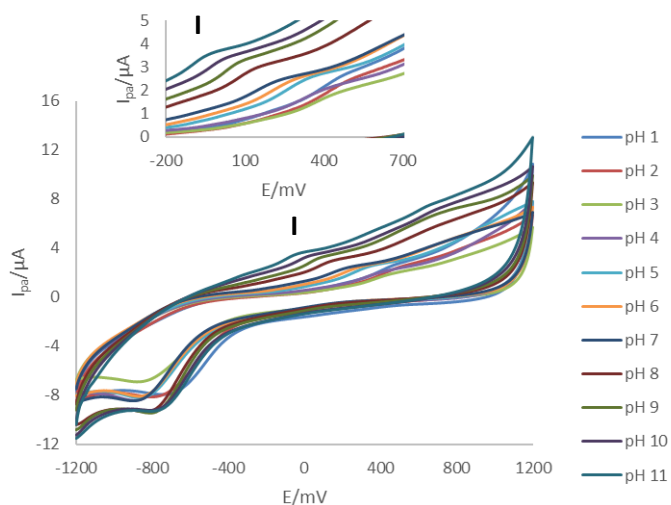


Figura 23. Voltamperogramas cíclicos en una solución de AFB1 40 ng L^{-1} usando como electrolito soporte un buffer Britton-Robinson 0.1 M a diferentes pH, en dirección anódica y una velocidad de barrido de potencial de 100 mV s^{-1} .

Al estudiar un pico anódico como señal analítica se prioriza la elección de potenciales menos positivos, sin embargo, en esta ocasión se priorizó tomar el valor óptimo con base a la altura de pico anódico que arrojó una mayor intensidad. Bajo esta premisa el valor óptimo para el análisis se establece en pH 4, lo cual coincide con valores reportados en la literatura (Gevaerd et al., 2020) en donde se establece que el proceso de oxidación de AFB1 se ve favorecido en un medio ácido, esto ocurre debido a la estructura química de la AFB1 en la que destacan los grupos funcionales furano y cumarinas, los cuales al ser especies que dependen del pH se encuentran en forma de lactonas y ácido cúmarico. Mediante una hidrólisis ocurre la apertura del anillo, proceso químico que precede la oxidación de la AFB1, retomando el mecanismo de oxidación de la AFB1 reportado en la **Figura 17**; por otro lado, a valores de pH básico la forma de lactona es más estable por lo que el proceso de oxidación de la molécula de AFB1 no se puede llevar a cabo si el anillo permanece cerrado.

En los análisis que involucran modificar el valor del pH resulta interesante visualizar este parámetro en función del potencial de pico anódico, **Figura 24**, mediante la obtención de la ecuación de la recta es importante visualizar el valor de la pendiente, en este caso de -59.591 con un coeficiente de correlación de 0.9966 , esto nos permite corroborar que el

intercambio de protones y electrones durante el mecanismo de oxidación, **Figura 17**, es 1:1 debido a que el valor muestra similitud con el comportamiento Nernstiano (59 mV / pH).

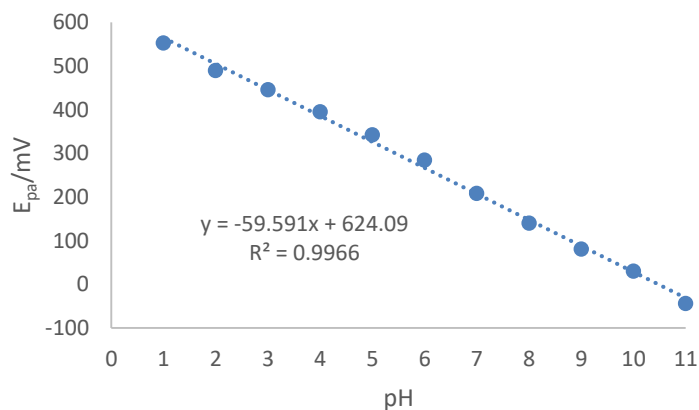


Figura 24. Gráfico lineal que muestra la relación entre el pH del electrolito soporte de la AFB1 y su dependencia con el potencial de pico anódico.

6.6 Optimización de las variables relacionadas con la voltamperometría de onda cuadrada.

La técnica usada para la cuantificación de AFB1 es la voltamperometría de onda cuadrada debido a que es una técnica bien conocida por separar la corriente faradaica de la no faradaica y por ende mejorar la sensibilidad de las determinaciones. Para optimizar las variables relacionadas a esta técnica se empleó un diseño de experimentos Box-Behnken a tres niveles con el fin de maximizar la respuesta de la señal anódica de la AFB1. El diseño de experimentos de superficie de respuesta permite considerar el efecto de las variables cuando éstas se encuentran altamente correlacionadas.

Para plantear el diseño se realizaron 15 experimentos, considerando 3 réplicas del punto central y cada experimento se analizó por triplicado. En la **Tabla 4** se encuentran reportadas las variables estudiadas y la codificación de cada una de ellas. Una vez realizados los experimentos, se analizaron estadísticamente con el software Minitab y se obtuvo la ecuación cuadrática (**Ecuación 11**) para la superficie de respuesta con un coeficiente de correlación del 98.67% para los resultados.

$$y = -1.192 + 0.01077A + 0.1002B + 0.01163C - 0.000013A^2 - 0.001405B^2 - 0.000023C^2 - 0.000509AB + 0.0001AC - 0.00043BC \quad \text{Ecuación 12}$$

Mediante la ecuación anterior se puede observar que los factores por separado poseen un mayor efecto positivo en la señal analítica mientras que las interacciones entre factores no tienen un efecto significativo. Los valores óptimos para los factores se pueden deducir analizando los gráficos presentados en la **Figura 25**.

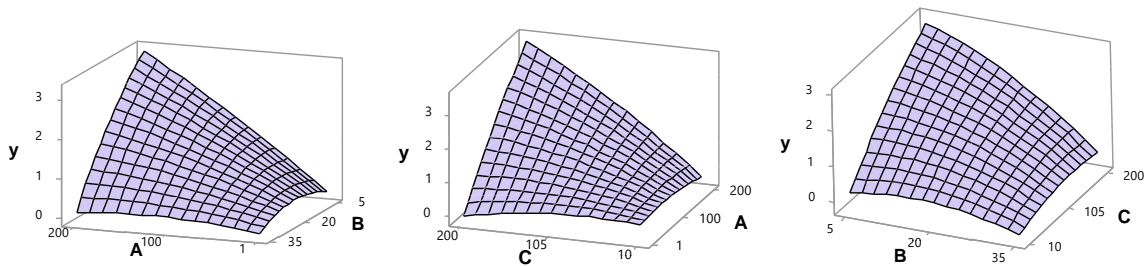


Figura 25. Gráficos de superficie de respuesta que muestran el efecto de las variables A) Frecuencia de pulso, B) Paso de potencial y C) Amplitud de pulso con respecto a la señal analítica y) Intensidad de pico anódico asociado a la oxidación de AFB1.

De acuerdo con el análisis estadístico y los gráficos de superficie de respuesta se obtiene que los valores que maximizan la intensidad de pico anódico son: frecuencia de pulso de 200 Hz, 5 mV de paso de potencial y una amplitud de pulso de 200 mV.

6.7 Determinación de las características analíticas cuantitativas de la metodología propuesta.

Con el fin de determinar los parámetros analíticos de la metodología propuesta para la cuantificación de AFB1 se planteó una curva de calibración analizando doce estándares de AFB1 en concentraciones desde 20 a 75 ng L⁻¹ cada determinación se realizó por triplicado. Primero se electropolimerizó PDA sobre el ECV empleando cronoamperometría a 550 mV y a un tiempo de imposición de 180 s. Posteriormente el ECV-PDA se sumergió en cada estándar de AFB1 empleando un buffer de acetatos pH 4 a 0.1 M como electrolito soporte;

el ECV-PDA se colocó sobre una parrilla de agitación a 500 rpm dejando un tiempo de preconcentración de 1 min dentro del estándar de AFB1. Finalmente, el electrodo se enjuagó y seco para analizarlo mediante voltamperometría de onda cuadrada a una frecuencia de pulso de 200 Hz, el paso de potencial fue de 5 mV y la amplitud de pulso se fijó en 200 mV, sin embargo, esta vez se leyó en el electrolito soporte sin AFB1 ya que con el proceso de preconcentración cierta cantidad de AFB1 quedó adsorbida sobre la película de PDA.

Una vez analizados los estándares se estableció la relación entre cada concentración de AFB1 en función de la intensidad de pico anódico y con estos datos se construyó la correspondiente curva de calibración que se muestra en la **Figura 26**. Mediante un análisis estadístico, se obtuvieron los parámetros analíticos relevantes del método propuesto que se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Parámetros analíticos correspondientes a la curva de calibrado en la determinación de AFB1 mediante voltamperometría de onda cuadrada.

Ecuación de la recta	0.1364 [AFB1] + 0.0042
Sensibilidad	0.1364 $\mu\text{A} / [\text{ng L}^{-1}]$
R²	0.9939
LOD	5.56 ng L^{-1}
LOQ	18.54 ng L^{-1}
Intervalo lineal	18.54 – 75 ng L^{-1}
%RSD	< 6.9% n= 10

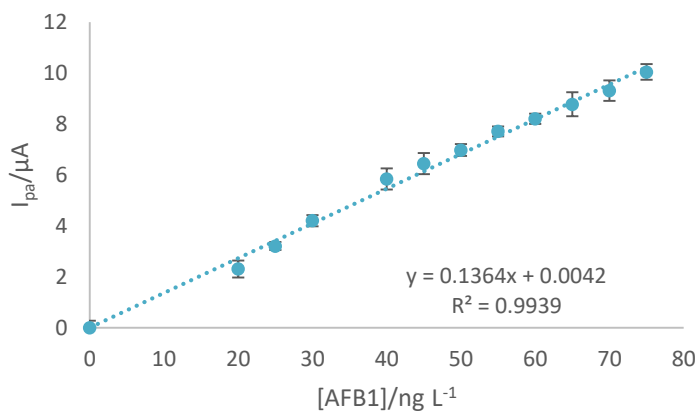


Figura 26. Curva de calibración obtenida aplicando voltamperometría de onda cuadrada para la determinación de AFB1 con n=3 y %RSD<10 para cada estándar.

El intervalo lineal evidencia un comportamiento directamente proporcional entre la concentración de AFB1 y la intensidad de pico anódico, es decir, que el sistema responde de forma favorable al intervalo de concentración de AFB1 desde 0 a 75 ng L⁻¹. Y de acuerdo con el límite de detección y cuantificación, 5.56 ng L⁻¹ y 18.54 ng L⁻¹ respectivamente se determina que la metodología de cuantificación propuesta resulta una excelente alternativa para el análisis a nivel traza de AFB1. De igual forma es importante destacar que los límites de detección y cuantificación obtenidos son competitivos con las metodologías que se encuentran reportadas en la literatura (Dos Santos et al., 2023; Kaminiaris et al., 2020).

Por último, se evaluó la reproducibilidad de la metodología. Para ello se electropolimerizó PDA sobre el ECV 10 veces, posteriormente se analizó una solución de AFB1 a 50 ng L⁻¹ en un buffer de acetatos 0.1 M a pH 4 para conseguir el promedio de las intensidades de pico anódico y calcular el %RSD, mediante la **Ecuación 9**, obteniendo un valor de 6.9%. Este valor se relaciona con la dispersión de los datos con respecto al promedio, con lo que se establece que la metodología propuesta es lo suficientemente reproducible para emplearse en la determinación de AFB1.

6.8 Análisis de muestras reales.

Para iniciar con el análisis cuantitativo de AFB1 en muestras de almendra, nuez y pistache, se realizó una dilución de la solución madre obtenida del proceso de extracción partiendo de la suposición de que las semillas oleaginosas contenían el límite máximo permisible reportado en normativas de 20 µg kg⁻¹. Seguido de esto se seleccionó un valor medio en la curva de calibración y se preparó una concentración de 50 ng L⁻¹ para cada una de las muestras. Después, las muestras se sometieron a una cuantificación directa empleando la metodología propuesta y se registró la intensidad de pico anódico considerando lecturas por triplicado para cada matriz alimentaria, obteniendo los datos mostrados en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Intensidad de corriente anódica relacionada a la oxidación de AFB1 en matrices alimentarias para n=3 (%RSD) y cuantificación mediante voltamperometría de onda cuadrada.

Muestra	$I_{pa}/\mu A$	[AFB1]/ $\mu g\ kg^{-1}$
Almendra	5.3 (2.86)	14.97
Nuez	10.8 (5.33)	31.09
Pistache	8.2 (3.52)	23.47

Sin embargo, con el fin de considerar el posible efecto matriz en las diferentes matrices alimentarias, se analizaron también las determinaciones con adición patrón. En este caso, se doparon los extractos de las muestras con diferentes concentraciones de un estándar de AFB1 que se encuentran dentro del intervalo de 5 a 25 ng L⁻¹.

Una vez preparados los estándares de almendra, nuez y pistache, se sometieron al análisis mediante la metodología propuesta y se estableció una curva de adición patrón para cada matriz alimentaria considerando 3 réplicas, obteniendo los datos mostrados en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Determinación de AFB1 en muestras reales mediante adición patrón n=3.

Muestra	m	b	R ²	[ng L ⁻¹]	[$\mu g\ kg^{-1}$]
Almendra	0.4834	5.2571	0.9915	10.88	4.35
Nuez	0.5360	3.1667	0.9957	5.91	2.36
Pistache	0.3920	7.3667	0.9940	18.79	7.52

De acuerdo con la NOM-188-SSA1-2002, el límite máximo permisible de AFB1 en muestras es de 20 $\mu g\ kg^{-1}$, dejando en evidencia que, en el caso de la determinación directa, las muestras de nuez y pistache superan el límite establecido en la norma mientras que la muestra de almendra cumple con los criterios indicados manteniéndose por debajo de los parámetros fijados. También es importante destacar que al implementar la cuantificación por adición patrón se obtienen concentraciones más bajas de AFB1 en las muestras. Aunque al implementar el uso de adición patrón se evidencia que la metodología propuesta

no es lo suficientemente selectiva para la determinación de semillas oleaginosas puesto que se ve reflejado el efecto de interferentes en la cuantificación.

6.9 Validación de la técnica de cuantificación propuesta.

La validación es un proceso importante debido a que se relaciona con la confiabilidad de la metodología. Por esta razón a lo largo de todos los análisis realizados se calculó el %RSD (porcentaje de desviación estándar relativo) y en cada caso no superó el 10.00%. Este parámetro se relaciona con una dispersión mínima de los datos, por lo que resulta un indicativo en cuanto a la reproducibilidad de los análisis.

De igual forma, se llevaron a cabo determinaciones para la evaluación de la exactitud. Para ello se preparó un *set* de muestras las cuales se doparon con una concentración conocida de AFB1 ($0.01 \mu\text{g kg}^{-1}$), posteriormente se llevó a cabo su cuantificación y a través de la **Ecuación 11**, se determinó el porcentaje de recuperación para cada semilla oleaginosa analizada. Obteniendo los resultados mostrados en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Evaluación de la exactitud en muestras reales empleando la metodología propuesta.

Muestra	$Y_i (\mu\text{g kg}^{-1})$	$X_i (\mu\text{g kg}^{-1})$	$X_0 (\mu\text{g kg}^{-1})$	% Recuperación
Almendra	0.0300	0.0218	0.01	94.4
Nuez	0.0203	0.0118	0.01	93.1
Pistache	0.0461	0.0376	0.01	96.8

De acuerdo con el análisis realizado se determinó que para cada una de las muestras el porcentaje de recuperación se encuentra arriba del 90.0%, esto indica que la metodología propuesta es adecuada, confiable y estadísticamente aceptable para realizar la cuantificación de AFB1 en muestras de almendra, nuez y pistache.

7. CONCLUSIONES.

Basándonos en la información proporcionada, podemos concluir que la modificación del ECV con PDA mejora la respuesta electroquímica de la AFB1. Se observó que la presencia de PDA en el electrodo modificado aumenta la intensidad de corriente anódica relacionada con la oxidación de la AFB1. Esto indica una mayor interacción entre la AFB1 y el ECV-PDA, lo cual es benéfico para la detección y cuantificación en muestras reales.

De igual forma, se evidenció que la sensibilidad de un electrodo de trabajo mejora al implementar la modificación sobre la superficie, esto debido a las interacciones entre la AFB1 y la PDA. Además, se realizó la caracterización de la película de PDA electropolimerizada sobre el electrodo, utilizando técnicas microscópicas, espectroscópicas y electroquímicas lo que determinó que la película de PDA presenta una textura rugosa evidenciando una electropolimerización exitosa del polímero.

También se determinó el área electroactiva del ECV-PDA, la cual resultó ser mayor que la del ECV. Esto sugiere que la modificación con PDA proporciona una mayor superficie activa para la interacción con la AFB1.

Se comprobó que la técnica voltamperométrica propuesta para cuantificar AFB1 permite el análisis de concentraciones desde 18.54 ng L^{-1} alcanzando niveles por debajo de los establecidos por normativas nacionales e internacionales fijados desde $5 \text{ a } 20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ por lo cual resulta una excelente alternativa para el análisis a nivel traza de este contaminante.

Por otro lado, la implementación de la voltamperometría por redisolución adsorbtiva contribuyó a obtener parámetros analíticos competitivos y equiparables con metodologías electroquímicas reportadas por otros autores.

En resumen, la modificación del ECV con PDA mejora la respuesta electroquímica de la AFB1, lo cual puede ser útil para el desarrollo de métodos de detección de esta micotoxina en muestras alimentarias. La propuesta presentada es una técnica verde que minimiza el uso de solventes orgánicos empleando soluciones en medios acuosos, esto permite catalogar a la voltamperometría de onda cuadrada mediante redisolución adsorbtiva empleando electrodos modificados con PDA como una alternativa económica, rápida y confiable para la determinación de AFB1 en semillas oleaginosas.

8. REFERENCIAS

- Allende-Sánchez, B. (2012). Modificación de superficies con polidopamina. (Tesis de maestría, Universidad de Oviedo. Departamento de Química orgánica e inorgánica).
- Almeida, L. C., Correia, R. D., Squillaci, G., Morana, A., La Cara, F., Correia, J. P., & Viana, A. S. (2019). Electrochemical deposition of bio-inspired laccase-polydopamine films for phenolic sensors. *Electrochimica Acta*, 319, 462-471.
- Amiri, M., Amali, E., & Nematollahzadeh, A. (2015). Poly-dopamine thin film for voltammetric sensing of atenolol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 216, 551-557. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.snb.2015.04.082>
- Ang-Mei, B. & Pilo, L. (2017). Interpretation of Nyquist Plot for Characterization of Electrode and Electrolyte Material Properties for Electrical Double Layer Capacitors. *Electrochemical Society Meeting Abstracts* 231. No. 31, pp. 1468-1468. <https://doi.org/10.1149/MA2017-01/31/1468>
- Bacil, R. P., Chen, L., Serrano, S. H., & Compton, R. G. (2020). Dopamine oxidation at gold electrodes: mechanism and kinetics near neutral pH. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(2), 607-614. <https://doi.org/10.1039/c9cp05527d>
- Bagotsky, V. S. (2005). *Electrochemical Research Techniques in V. Bagotsky, Fundamentals of electrochemistry*. (2nd ed., pp. 191-216). John Wiley & Sons.
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2022). *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
- Beheshti-Marnani, A., Hatefi-Mehrjardi, A., & Es' hagh, Z. (2019). A sensitive biosensing method for detecting of ultra-trace amounts of AFB1 based on "Aptamer/reduced graphene oxide" nano-bio interaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.087>
- Bogantes, L. P., Bogantes, L. D., y Bogantes, L. S. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46(4), 174-178. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022004000400004

- Carrasco-Rodríguez, J. (2013). Recubrimiento de acero con polidopamina. (Tesis de maestría, Universidad de Oviedo. Departamento de Química orgánica e inorgánica).
- Castro-Beltrán, A. (2017). Manejo de sensores potencioestáticos mediante patrones de potencial. (Tesis de maestría, Universidad Autónoma De Madrid. Escuela Politécnica Superior).
- Chen, L., Mamat, X., & Aisa, H. A. (2023). Determination of aflatoxin B1 by biomass derived porous carbon modified electrode with molecularly imprinted polymer. *Electroanalysis*, 35(5). <https://doi.org/10.1002/elan.202200371>
- Cho, S., Lee, C., Jang, M., Son, Y., Lee, S., Choi, I., Kim, S. H., & Kim, D. (2008). Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry*. 107(3), 1283-1288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.049>
- Ciobanu, D., Hosu-Stancioiu, O., Melinte, G., Ognean, F., Simon, I., & Cristea, C. (2023). Recent Progress of Electrochemical Aptasensors toward AFB1 Detection (2018–2023). *Biosensors*, 14(1), 7. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11090478>
- Diario Oficial de la Federación. (2002). NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=2056230
- Diario Oficial de la Federación. (2008). NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. 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. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5100356
- Dos Santos, D. M., Migliorini, F. L., Soares, A. C., Mattoso, L. H., Oliveira Jr, O. N., & Correa, D. S. (2023). Electrochemical Immunosensor Made with Zein-based Nanofibers for On-site Detection of Aflatoxin B1. *Electroanalysis*, 35(1), e202100672. <https://doi.org/10.1002/elan.202100672>
- Dowell, E., Pearson, T., Maghirang, E., Xie, F., & Wicklow, D. (2002). Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*. *Cereal Chemistry* 79(2), 222-226.

- Estrada, A. J. (2012). Electrodo de pasta de carbón modificados con residuos de café para cuantificar metales pesados en solución acuosa (Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas).
- Espinoza-Castellón, E. R., y Alvarado-Gómez, A. L. (2012). Desarrollo y validación de un método voltamperométrico para determinar estaño total en agua. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(1), 61-72.
- Flowers, P., Theopold, K., y Langley, R. (2019). *Química general (OpenSTAX). La electroquímica*. Ed. NICE CXone Expert. [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Libro%3A_Quimica_General_\(OpenSTAX\)](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Libro%3A_Quimica_General_(OpenSTAX))
- Food and Agriculture Organization. (1995). Norma general del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXS_193s.pdf
- Forrister, T. (2018). Analyzing Cyclic Voltammetry at a Microdisk Electrode with Simulation. <https://www.comsol.fr/blogs/analyzing-cyclic-voltammetry-at-a-microdisk-electrode-with-simulation/>
- Gevaerd, A., Banks, C. E., Bergamini, M. F., & Marcolino-Junior, L. H. (2020). Nanomodified Screen-Printed Electrode for direct determination of Aflatoxin B1 in malted barley samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 307, 127547. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127547>
- Gómez, B. S., Soria, E., y Vivó, M. (2002). Análisis electroquímico. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 51(1), 18-27. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S0034-79732002000100005&lng=es&tlng=es
- González, C. A. G., Japón, A. T., Dias, K. B., y Zambrano, C. (2018). Técnicas y métodos electroquímicos: galvanoplastia y potenciometría. *Alternativas*, 19(1), 80-87. <https://editorial.ucsg.edu.ec/ojs-alternativas/index.php/alternativas-ucsg/article/view/196>
- Gosser, D. K. (1993). *Cyclic Voltammetry. Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*. VCH Publishers, Inc. ISBN 1-56081-026-2.
- Green, K. (2022). *Analytical Chemistry. Cyclic Voltammetry (CV)*. JoVE Science Education Database. Cambridge, MA. <https://www.jove.com/v/5502/cyclic-voltammetry-cv>

- Hajian, R., & Ensafi, A. A. (2009). Determination of aflatoxins B1 and B2 by adsorptive cathodic stripping voltammetry in groundnut. *Food chemistry*, 115(3), 1034-1037. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.009>
- Hastoy, X., Marquier, S., Blanc, G., y Lagarde, P. C. (2020). Uso de voltametría de barrido lineal para determinar la fecha de vendimia de Sauvignon Blanc. *Revista en Internet de Viticultura y Enología*. https://www.infowine.com/es/art%C3%ADculos_t%C3%A9cnicos/art%C3%ADculos_t%C3%A9cnicos_cat_6p3.htm
- Hernández, A. A. H., Ovando, A. C., Huizar, L. H. M., Guzmán, M. F., Pimentel, K. X. M., Vidal, C. A. G., Hernández, M. E. P., & Romero, G. A. 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. <http://dx.doi.org/10.1149/1945-7111/abe349>
- International Agency for Research on Cancer. (2012). Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, V 100. Lyon, France.
- Kalvoda, R., & Kopanica, M. (1989). Adsorptive stripping voltammetry in trace analysis. *Pure and applied chemistry*, 61(1), 97-112. <https://doi.org/10.1351/pac198961010097>
- Kaminiaris, M. D., Mavrikou, S., Georgiadou, M., Paivana, G., Tsitsigiannis, D. I., & Kintzios, S. (2020). An Impedance Based Electrochemical Immunosensor for Aflatoxin B1 Monitoring in Pistachio Matrices. *Chemosensors*, 8(4), 121. <https://doi.org/10.3390/chemosensors8040121>
- Kim, S., Jang, L. K., Park, H. S., & Lee, J. Y. (2016). Electrochemical deposition of conductive and adhesive polypyrrole-dopamine films. *Scientific reports*, 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep30475>
- Kozub, B. R., Rees, N. V., & Compton, R. G. (2010). Electrochemical determination of nitrite at a bare glassy carbon electrode; why chemically modify electrodes? *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143(2), 539-546. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.09.065>
- Krepper, G. (2018). Desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de contaminantes en productos apícolas: empleo de sistemas electroquímicos (Tesis de doctorado, Universidad Nacional del Sur, Departamento de Química Analítica).

- Krska, R., Schubert, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives and Contaminants* 25(2), 152-163. <https://doi.org/10.1080/02652030701765723>
- Lattanzio, V., Gatta, S., Godula, M., & Visconti, A. (2011). Quantitative analysis of mycotoxins in cereal foods by collision cell fragmentation-highresolution mass spectrometry: performance and comparison with triple-stage quadrupole detection. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 28(10), 1424-1437. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.593192>
- Li, S., Luo, J., Fan, J., Chen, X., & Wan, Y. (2018). Aflatoxin B1 Removal by Multifunctional Membrane Based on Polydopamine Intermediate Layer. *Separation and Purification Technology*, 199, 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.02.008>
- Li, P., Zhang, Z., Hu, X., & Zhang, Q. (2013). Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: status and prospects. *Mass Spectrometry Reviews*. 32(6), 420-452. <https://doi.org/10.1002/mas.21377>
- López, P. (2018). Consumo diario de aflatoxinas. *Gaceta UNAM*. <https://www.gaceta.unam.mx/consumo-diario-de-aflatoxinas/>
- Maragos, C. M. (2001). Measurement of aflatoxins using capillary electrophoresis. *Mycotoxin Protocols*, 51-58. <https://doi.org/10.1385/1-59259-064-0:51>
- Maragos, C. M. (2004). Emerging technologies for mycotoxin detection. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 23(2-3), 317-344. <https://doi.org/10.1081/txr-200027859>
- Maragos, C. M., & Greer, J. I. (1997). Analysis of aflatoxin B1 in corn using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(11), 4337-4341. <https://doi.org/10.1021/jf9704874>
- Martínez, M. M., Vargas del Río, L. M., y Gómez, V. M. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 12(2), 89-109. <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v12n2/v12n2a08.pdf>
- Menolasina, S. (2004). *Fundamentos y aplicaciones de Electroquímica*. Ed. Consejo de Publicaciones de la Universidad de Los Andes. Venezuela.

- National Center for Environmental Health. (2012). Aflatoxins, Understanding Chemical Exposures. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. 53(34); 790-793. <https://www.cdc.gov/nceh/hsb/chemicals/aflatoxin.htm>
- Ong, J. Y., Phang, S. W., Goh, C. T., Pike, A., & Tan, L. L. (2023). Impedimetric Polyaniline-Based Aptasensor for Aflatoxin B1 Determination in Agricultural Products. *Foods*, 12(8), 1698. <https://doi.org/10.3390/foods12081698>
- Ordóñez, H. C. (2017). Análisis Voltamétrico para la cuantificación de Aciclovir. (Trabajo de grado para licenciatura. Instituto Colombiano de Estudios Superiores de Incolda. Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Química).
- Ouahssase, A., Fatini, N., & Ait Addi, E. (2021). A simple extraction method with no lipid removal for the determination of aflatoxins in almonds by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(9), 1561-1570. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1925167>
- Pascale, M. (2009). Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (117), 15-25. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN0917015P>
- Pearson, T., & Wicklow, D. (2006). Detection of corn kernels infected by fungi. *Transactions of the ASAE*. 49(4), 1235-1245. <https://doi.org/10.13031/2013.21723>
- Piratoba-Morales, U., Vera-López, E., y Ortiz-Otálora, C. E. S. A. R. (2010). Aspectos básicos en la interpretación de diagramas de impedancia electroquímica. *Dyna*, 77(162), 13-19.
- Pittet, A. (2005). Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 96(6), 424-444.
- Quinchanegua, B., I. D., y Cortés, A., C. E. (2018). Propuesta de trabajos prácticos de laboratorio para el aprendizaje de contenidos procedimentales a partir de la síntesis y caracterización de polidopamina. (Trabajo de grado para licenciatura. Universidad Pedagógica Nacional. Facultad de Ciencia y Tecnología. Departamento de Química).
- Rafiee, M., Abrams, D. J., Cardinale, L., Goss, Z., Romero-Arenas, A., & Stahl, S. S. (2024). Cyclic voltammetry and chronoamperometry: mechanistic tools for organic electrosynthesis. *Chemical Society Reviews*. <https://doi.org/10.1039/D2CS00706A>

- Rahmani, A., Jinap, S., & Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 202-251. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x>
- Reglamento de la Unión Europea. (2010). Contenido máximo de aflatoxina B1 y el contenido máximo total de aflatoxinas (B1 + G1 + B2 + G2) en una serie de productos alimenticios. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:050:0008:0012:ES:PDF>
- Sanabria, N., Martínez, Y., y López, A. (2017). Métodos para la determinación de aflatoxinas en alimentos. *Revista Agrollania de Ciencia y Tecnología*, 14, 51-58.
- Scully, J. R. (1993). *Electrochemical impedance: analysis and interpretation*. Ed. ASTM International.
- Scussel, V. M. (2003). Comparison of methods by TLC and HPTLC for determination of aflatoxin M1 in milk and B1 in eggs. *Food Science and Technology*, 23, 46-52. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000400009>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2019). Y a ti ¿te gusta el pistache? <https://www.gob.mx/senasica/articulos/y-a-ti-te-gusta-el-pistache?idiom=es>
- Sheng, J., Zuo, J., Liu, K., Ma, L., Li, C., Li, Y., & Kong, D. (2020). Highly selective enrichment of aflatoxin B1 from edible oil using polydopamine-modified magnetic nanomaterials. *Food Science and Technology*, 41, 321-327. <https://doi.org/10.1590/fst.34619>
- Shephard, G. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), 1215-1224. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2857-y>
- Si, J., & Yang, H. (2011). Preparation and characterization of bio-compatible Fe₃O₄@Polydopamine spheres with core/shell nanostructure. *Materials Chemistry and Physics*, 128(3), 519-524. <https://doi:10.1016/j.matchemphys.2011.03.039>
- Shi, Z., Xia, L., & Li, G. (2023). Recent Progress of Electrochemical Sensors in Food Analysis. *Chemosensors*, 11(9), 478. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11090478>
- Slepchenko, G. B., Gindullina, T. M., Gavrilova, M. A., & Auelbekova, A. Z. (2018). The Simultaneous Voltammetric Determination of Aflatoxins B1 and M1 on a Glassy-Carbon

Electrode. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/6285623>

Tallada, J., Wicklow, D, Pearson, T., & Armstrong, P. (2011). Detection of fungus-infected corn kernels using near infrared reflectance spectroscopy and color imaging. *Transactions of the ASAE*. 54(3) 1151-1158. <https://doi.org/10.13031/2013.37090>

Tahavori, A., Ghaderi, F., & Nemati, M. (2012). Determination of aflatoxins in nuts of Tabriz confectionaries by ELISA and HPLC methods. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2(1), 123.
<https://doi.org/10.5681%2Fapb.2012.018>

United Nations Environment Programme (UNEP). (2013). Minamata Convention on Mercury.
<https://minamataconvention.org/en>

Urrego, N. J. R., y Díaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina*, 54(2), 108-116.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112006000200006

Vidal, J. C., Bonel, L., Ezquerro, A., Hernández, S., Bertolín, J. R., Cubel, C., & Castillo, J. R. (2013). Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.05.008>

Vivier, V., & Orazem, M. E. (2022). Impedance analysis of electrochemical systems. *Chemical Reviews*, 122(12), 11131-11168. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00876>

Wang, C., Zhang, H., Jiang, X., & Zhou, B. (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*, 52(16), 2439-2453.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1610418>

Wang, P., Luo, B., Liu, K., Wang, C., Dong, H., Wang, X., & Li, A. (2022). A novel COOH–GO–COOH–MWNT/pDA/AuNPs based electrochemical aptasensor for detection of AFB 1. *RSC advances*, 12(43), 27940-27947. <https://doi.org/10.1039/D2RA03883H>

Wang, Z., Li, J., Xu, L., Feng, Y., & Lu, X. (2014). Electrochemical sensor for determination of aflatoxin B 1 based on multiwalled carbon nanotubes-supported Au/Pt bimetallic

nanoparticles. Journal of Solid State Electrochemistry, 18, 2487-2496.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10008-014-2506-z>

World Health Organization. (2018). Mycotoxins. Fact sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>

Yaacob, M., Yusoff, M., Rahim, A., & Ahmad, R. (2008). Square wave cathodic stripping voltammetric technique for determination of aflatoxin B1 in ground nut sample. The Malaysian Journal of Analytical Sciences, 12(1), 132-141.

Zhao, J., Wang, Z., Chen, Y., Peng, D., & Xianyu, Y. (2021). Horseradish peroxidase-catalyzed formation of polydopamine for ultra-sensitive magnetic relaxation sensing of aflatoxin B1. Journal of Hazardous Materials, 419, 126403.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126403>

ANEXOS

A.1 Técnicas electroanalíticas

La electroquímica es una rama de la fisicoquímica que estudia los efectos eléctricos en las transformaciones químicas; en otras palabras, la transferencia de electrones que ocurre en las reacciones químicas. Estas reacciones reciben el nombre de reacciones de óxido-reducción, mejor conocidas como RedOx (Flowers et al., 2019).

En las reacciones RedOx, intervienen simultáneamente los procesos de oxidación y reducción. La oxidación es un proceso químico en el que determinada especie pierde electrones, y por lo tanto su número de oxidación se hace más positivo; en contraste la reducción es el proceso en que una especie química gana electrones, y su número de oxidación se hace más negativo. El número de oxidación indica la cantidad de electrones que un determinado elemento puede perder, ganar o compartir con otro (Menolasina, 2004).

Los métodos electroquímicos tienen su fundamento en la medición de corrientes eléctricas, carga y/o potenciales. Para que una muestra pueda ser evaluada mediante esta técnica debe ser propensa a que se lleve a cabo un proceso de oxidación o reducción. Algunas de las ventajas de los métodos electroquímicos es que presentan una alta sensibilidad, gran selectividad y elevada precisión (Gómez et al., 2002).

Las técnicas electroquímicas se clasifican en dos grupos: electrónicos e iónicos. Los primeros se encargan de la medida de las magnitudes asociadas a procesos relacionados con reacciones electroquímicas, y las del grupo iónico se basan en la medida de las propiedades de disolución iónica (González et al., 2018). Para efectos del presente estudio, se enfatizarán los métodos electrónicos, en particular las técnicas electroanalíticas.

A.1.1 Voltamperometría.

En la voltamperometría se mide la corriente que circula por la celda electroquímica bajo aplicación de una determinada función potencial variable con el tiempo. Para llevar a cabo el análisis mediante esta técnica, resulta indispensable contar con tres electrodos: de

trabajo, de referencia y auxiliar (Gómez et al., 2002). La representación general de un sistema de voltamperometría se muestra en la **Figura I**.

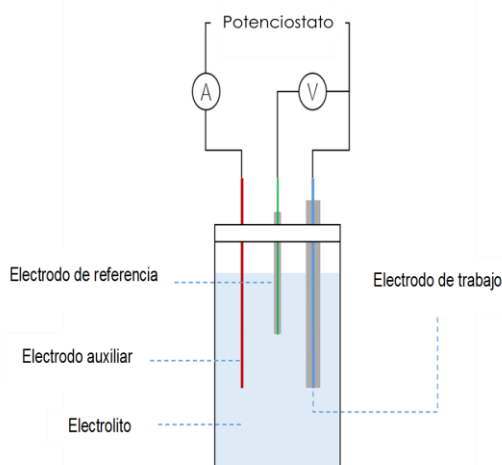


Figura I. Representación de un sistema voltamperométrico (Forrister, 2018).

El electrodo de trabajo será aquel donde el analito sufra la transformación electroquímica, mientras que el de referencia, como su nombre lo indica, únicamente tiene como función proveer un potencial de referencia para conocer el potencial del electrodo de trabajo; no pasará ninguna corriente a través de él. La implementación del electrodo auxiliar permite la transferencia de corriente y el cierre del circuito eléctrico (Forrister, 2018). A continuación, se describen algunas de las técnicas voltamperométricas más usadas.

A.1.1.1 Voltamperometría cíclica.

Es una técnica electroquímica potenciodinámica que se caracteriza por realizar un barrido lineal, en sentido anódico (cuando se desea estudiar la oxidación del analito) y sentido catódico (cuando se prioriza la reducción de la especie), es decir, que el potencial se impondrá desde un estado inicial hasta uno final; luego el sentido de barrido se invierte regresando al valor inicial o no necesariamente, pero si existirá un cambio de sentido en el barrido de potencial, completando así un ciclo completo, de la corrida electroquímica se

obtiene un gráfico de potencial contra corriente, mejor conocido como voltamperograma el cual se muestra en la **Figura II** (Castro-Beltrán, 2017). La técnica permite obtener información referente a los compuestos electroquímicamente activos que se encuentran dentro de la muestra de interés (Hastoy et al., 2020).

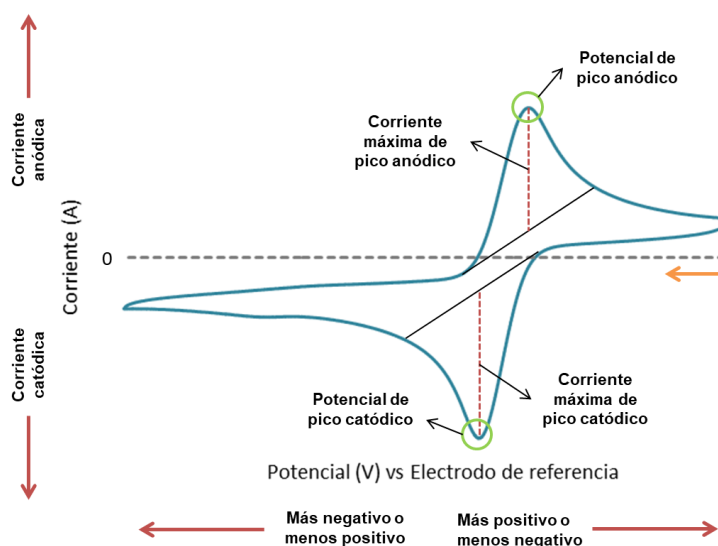


Figura II. Representación de un voltamperograma cíclico y sus componentes.

Del voltamperograma se pueden identificar dos parámetros importantes: la corriente máxima de pico anódico o catódico, que se ve influenciada por la velocidad del barrido y es el parámetro usado para análisis cuantitativo, y el potencial de pico, que indica el mejor potencial para la oxidación o reducción de la especie en cuestión (Castro-Beltrán, 2017). De igual forma el análisis del voltamperograma aporta variables clave para obtener información del sistema en estudio: potencial inicial, ventana de potencial, corriente de pico anódico y corriente de pico catódico. Con respecto a la separación de picos, entre más grande sea esta distancia, se tendrá un proceso donde la transferencia de carga entre la especie química y el electrodo se dificulta cada vez más (Green, 2022).

En este sentido es importante resaltar la diferencia entre el área geométrica que se relaciona con el ancho y longitud del electrodo y suele ser medida con instrumentos típicos de medición como la escala de Vernier, por otro lado, el área electroactiva es la superficie del electrodo que presentará actividad electroquímica con el analito que se desee analizar,

para llevar a cabo la determinación de este parámetro se emplea la ecuación de Randles-Sevcik, **Ecuación A**, en donde se realizan voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido de potencial.

$$i_p = 2.65 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v \quad \text{Ecuación A}$$

En donde: i_p = corriente (A); n = número de electrones intercambiados en la reacción; A = área electroactiva (cm^2); C = concentración de la especie electroactiva (mol cm^{-3}); D = coeficiente de difusión de la especie electroactiva ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); v = velocidad de barrido de potencial (V s^{-1}).

A.1.1.2 Voltamperometría a base de pulsos.

Las técnicas voltamperométricas a base de pulsos se basan en la voltamperometría de pulso normal, que refiere la forma de onda como una serie de pulsos que aumentan en amplitud potencial, lo que indica que el potencial retoma el valor inicial después de cada pulso (Ordóñez, 2017).

Esto nos lleva a definir la voltamperometría diferencial de pulso (DPV) como una técnica que ejemplifica la señal de excitación a modo de escalera, en donde se observa un aumento gradual en el valor base del potencial (intervalos entre 10 y 100 mV). Es importante destacar que la amplitud de pulso permanece constante con respecto al potencial de base (Castro-Beltrán, 2017; Ordóñez, 2017).

En contraste, la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) es una técnica diferencial que evidencia un comportamiento simétrico en la base del potencial que aumenta en forma de escalera. La corriente se mide dos veces durante cada ciclo de la onda cuadrada: una al final del pulso directo y otra al final del pulso inverso. Como consecuencia de este proceso, se obtiene un voltamperograma en forma de pico simétrico, debido a la suma de corrientes anódicas y catódicas que se generan en el proceso de oxidación y reducción del analito, lo que aumenta la sensibilidad de la técnica (Espinoza-Castellón y Alvarado-Gámez, 2012).

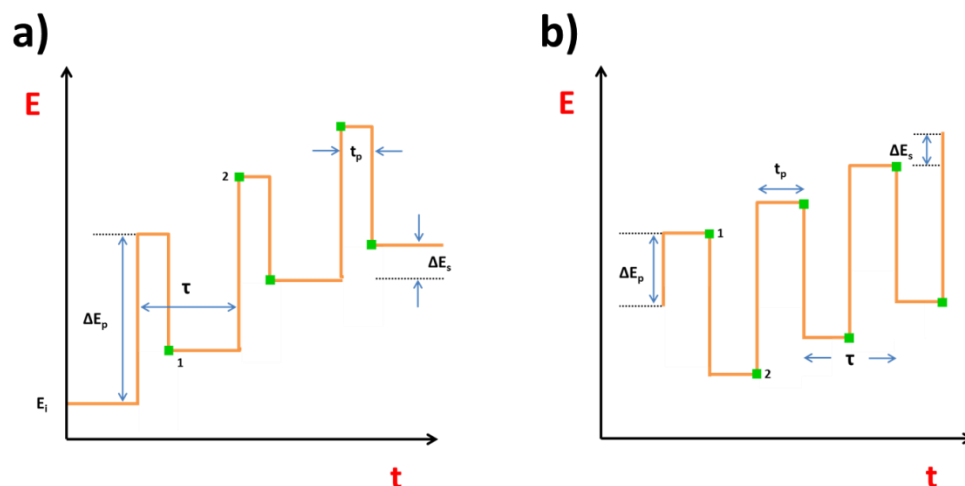


Figura III. Representación de la modulación del potencial con respecto al tiempo de las voltamperometrías de pulsos. **a)** voltamperometría diferencial de pulsos y **b)** voltamperometría de onda cuadrada. En donde: E_i Potencial inicial, ΔE_p Amplitud de pulso, τ Frecuencia del pulso, t_p Tiempo del pulso, ΔE_s Paso de potencial, 1 final del pulso directo y 2 final del pulso inverso.

La principal diferencia entre las técnicas a base de pulsos es que la forma en la que se define cada escalón, el cual se relaciona con la amplitud de pulso, mientras que en la voltamperometría diferencial de pulsos dicho valor permanece constante para cada “escalón” en el caso de la voltamperometría de onda cuadrada, la amplitud de pulso inicial corresponde a la mitad de la amplitud total que conformará a los siguientes escalones, tal y como lo muestran los gráficos de modulación del potencial con respecto al tiempo indicados en la **Figura III**.

A.1.1.3 Voltamperometría de redisolución adsortiva.

La técnica de redisolución se basa en la preconcentración sobre la superficie del electrodo, involucra dos etapas, la primera etapa se basa en la electropolimerización de algún agente modificante seguido de la preconcentración del analito en cuestión, mientras que la segunda involucra la redisolución y su determinación (Estrada, 2012).

La etapa de preconcentración es clave en la aplicación de la técnica, ya que la convierte en una excelente alternativa para mejorar la sensibilidad debido a que permite alcanzar bajos

límites de detección en el análisis de concentraciones trazas de las especies electroactivas en solución (Kalvoda y Kopanica, 1989).

Existen tres diferentes tipos de análisis por redisolución y para lograr su clasificación interviene la forma en la que se realiza preconcentración, si ocurre de forma electrolítica tenemos dos variantes: anódica o catódica o de acuerdo al proceso de acumulación del analito encontramos la adsortiva. Debido al proceso que involucra cada tipo de redisolución las de tipo electrolítico son ampliamente utilizadas para el análisis de especies inorgánicas mientras que las adsortivas se aplican en su mayoría para la determinación de compuestos orgánicos, la semirreacciones que ocurren en la redisolución anódica y adsortiva, que son las técnicas más comunes, se representan en la **Figura IV** (Krepper, 2018).

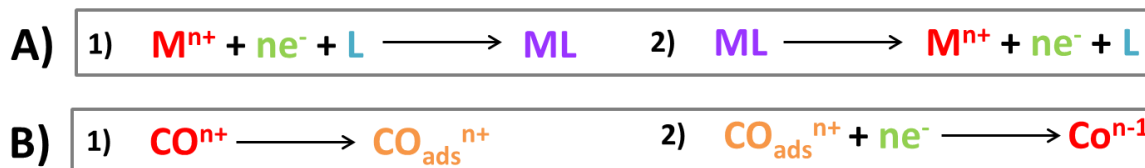


Figura IV. Etapas de la redisolución anódica y adsortiva. Procesos que involucran la A) redisolución anódica y B) redisolución adsortiva en las etapas de preconcentración (1) y redisolución (2) (Krepper, 2018).

El proceso por redisolución adsortiva se puede llevar a cabo por interacciones entre un electrodo modificado y el analito que se desee determinar, para ello es necesario sumergir el electrodo de trabajo durante un tiempo controlado en una solución que se encuentre en agitación constante con el fin de propiciar la acumulación sobre la superficie del electrodo y para el análisis cuantitativo suelen acoplarse a técnicas voltamperométricas, como son la cíclica o las de pulsos.

A.1.2 Cronoamperometría.

La cronoamperometría es un método electroquímico que consiste en imponer un potencial al sistema de electrodos para obtener una determinada intensidad de corriente asociada a procesos de oxidación o reducción y observar su cambio con respecto al tiempo, una vez

obtenidos estos datos, se procede a la construcción de un gráfico que involucre ambas variables mejor conocido como transitorio potencioestático y se encuentra representado en la **Figura V a** (Bagotsky, 2005).

La cronoamperometría de doble paso de potencial involucra un salto de potencial, esto provoca un ajuste en la doble capa eléctrica y debido a esta acción la técnica se aplica en la determinación de coeficientes de difusión de las especies que están siendo transformadas **Figura V b**, para esto se parte de la **Ecuación B**, que representa la ecuación de Cottrell y describe la relación entre la intensidad de corriente y el tiempo asociado al agotamiento de iones en la solución (Bagotsky, 2005; Rafiee et al., 2024).

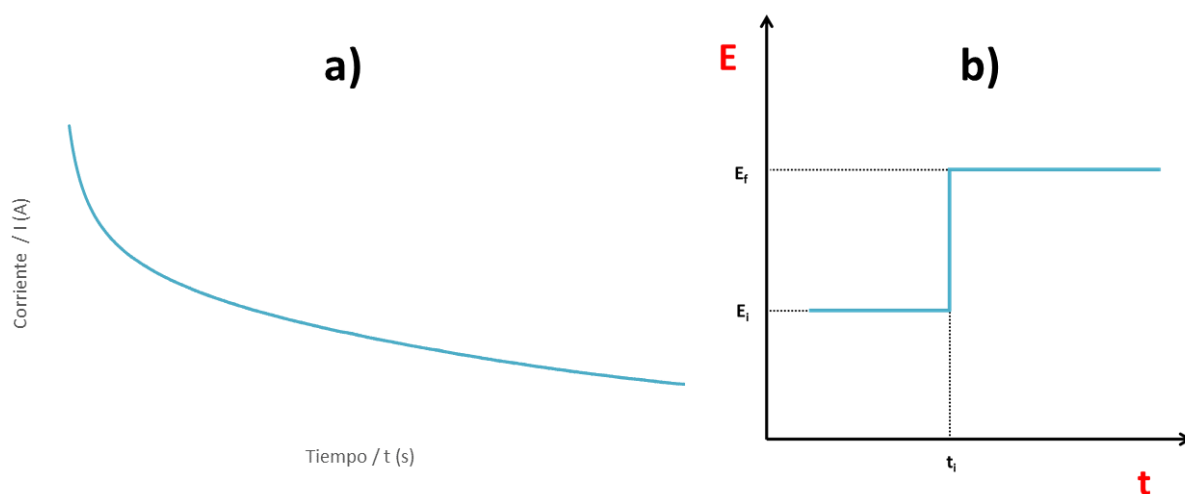


Figura V. Representación de un transitorio potencioestático. a) Representación de un transitorio potencioestático y b) Ejemplificación de la modulación del potencial con respecto al tiempo en un transitorio potencioestático de doble paso de potencial.

$$i = \frac{n F A C_0 \sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}} \quad \text{Ecuación B}$$

En donde: i = corriente (A); n = electrones en la reacción; F = constante de Faraday ($C \text{ mol}^{-1}$); A = área electroactiva (cm^2); C_0 = concentración del analito (mol cm^{-3}); D =coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$); t = tiempo (s).

Una de las principales aplicaciones de la cronoamperometría es la evaluación de los coeficientes de difusión de especies electroactivas en solución, esto mediante la cronoamperometría de doble paso de potencial y empleando la ecuación de Cottrell, aunque de igual forma se ha utilizado como técnica de electropolimerización de diferentes materiales sobre la superficie de electrodos de trabajo, principalmente polímeros donde recibe el nombre de electropolimerización (Rafiee et al., 2024).

A.1.3 Impedancia.

La impedancia es una técnica que permite caracterizar el comportamiento electroquímico de una interfase electrodo-electrolito. Por lo regular la impedancia se representa con Z_{ω} la relación matemática que define la impedancia, **Ecuación C**, se asemeja a la definición de resistencia de acuerdo con la ley de Ohm, representada en la **Ecuación D**, la diferencia entre la resistencia y la impedancia se basa en la aparición de la frecuencia radial (ω), término que se expresa de acuerdo con la **Ecuación E** (Scully, 1993). Debido a las expresiones matemáticas previamente señaladas, se establece que el análisis muestra una dependencia con la frecuencia radial, o bien, la señal de excitación, ya sea la variación del potencial o de la corriente alterna, se expresan en función del tiempo tal y como se representa en la **Figura VI**.

$$Z_{\omega} = \frac{E_{\omega}}{I_{\omega}} \quad \text{Ecuación C}$$

En donde: Z_{ω} = impedancia; E_{ω} = potencial que depende de la frecuencia angular; I_{ω} = corriente que depende de la frecuencia angular.

$$R \equiv \frac{E}{I} \quad \text{Ecuación D}$$

En donde: R= resistencia; E= potencial; I= corriente.

$$\omega = 2\pi * f \quad \text{Ecuación E}$$

En donde: ω = frecuencia radial (rad s^{-1}); f= frecuencia (Hz).

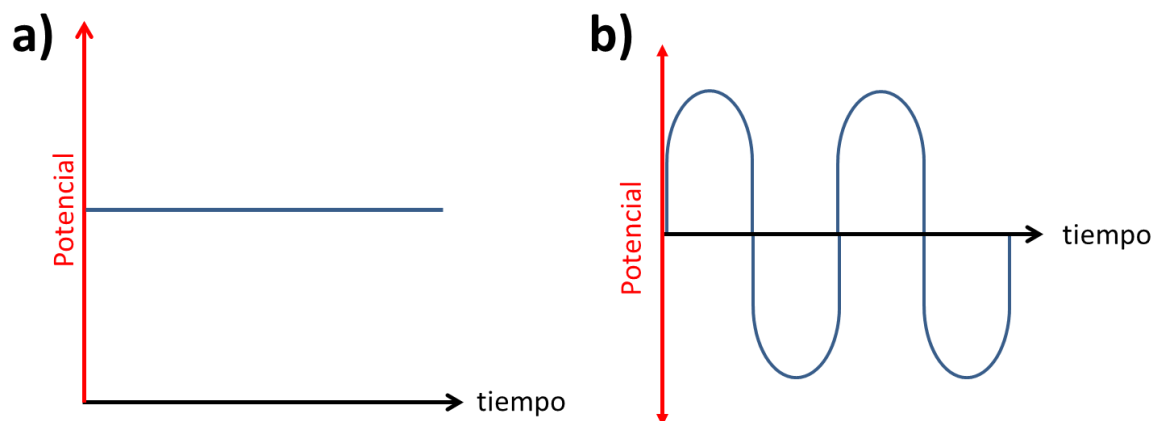


Figura VI. Representación de a) corriente directa y b) corriente alterna.

La impedancia del sistema es una cantidad compleja con una magnitud y un cambio de fase que dependen de la frecuencia de la señal. Por lo tanto, al variar la frecuencia de la señal aplicada, se puede calcular la impedancia del sistema en función de la frecuencia (Piratoba-Morales et al., 2010).

Para visualizar de forma gráfica el análisis de impedancia se hace uso de dos gráficos, el de Bode que es una representación de la parte real, es decir impedancia Z_{ω} contra frecuencia angular ω y por otro lado se tienen los diagramas de Nyquist que representan la parte real que se denota con Z' y una parte imaginaria negativa que se identifica con Z'' , es importante mencionar que los diagramas de Nyquist se encuentran ampliamente reportados en la bibliografía tan es así que una de sus principales aplicaciones es la caracterización de los sistemas electroquímicos mediante el estudio del proceso de adsorción sobre la superficie de los electrodos (Vivier & Orazem, 2022).