



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA

**DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA
LA EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE AFB1 PARA SU
DETECCIÓN ELECTROANALÍTICA**

Tesis que para obtener el grado de
MAESTRO EN QUÍMICA

P R E S E N T A :

Q.A. Aldahir Alberto Hernández Hernández

Director:

Dr. Gian Arturo Álvarez Romero

Codirectora:

Dra. Araceli Castañeda Ovando

Mineral de la Reforma, Hgo., junio de 2017.



M. en C. Julio César Leines Medécigo

Director de Administración Escolar
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al Candidato a Maestro en Química, Q.A. Aldahir Alberto Hernández Hernández, quien presenta el trabajo **“Desarrollo y optimización de metodologías para la extracción y preconcentración de AFB1 para su detección electroanalítica”**, después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido **autorizar la impresión** del mismo, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal (ICBI-AAQ)

SECRETARIO: Dra. Ma. Elena Páez Hernández (ICBI-AAQ)

VOCAL: Dr. Gaaan Arturo Álvarez Romero (ICBI-AAQ)

SUPLENTE: Dra. Araceli Castañeda Ovando (ICBI-AAQ)

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Mineral de la Reforma, Hgo., a 12 de junio de 2017


Dr. Oscar Rodolfo Suárez Castillo
Director del ICBI



Algunos de los resultados del presente trabajo han sido presentados en los siguientes foros científicos:

- 1ª Jornada y 3^{er} Foro de Cuerpos Académicos del Área de Biotecnología y Alimentos. *Caracterización de partículas magnéticas para su posible uso como soportes de extracción de contaminantes emergentes*. Celebrado el 30 de noviembre de 2015. Francisco I. Madero, Hidalgo, México.
- Food & Biotechnology International Congress 2016. *Síntesis de nanomateriales para la microextracción acoplada de aflatoxina B1*. Celebrado del 19 al 21 de octubre de 2016. Pachuca, Hidalgo, México.
- XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica. *Cuantificación voltamperométrica de aflatoxina B1 en alimentos usando electrodo de Bismuto y optimización Box-Behnken*. Celebrado del 5 al 8 de junio de 2017. Guanajuato, Guanajuato, México.

Algunos resultados han sido enviados para su publicación en:

- Hernández-Hernández A.A., Álvarez-Romero G.A., Contreras-López E., Aguilar-Arteaga, K., Castañeda-Ovando, A. *Food analysis by microextraction methods based on the use of magnetic nanoparticles as supports: Recent advances*. Food Analytical Methods. *Article In Press*. doi:10.1007/s12161-017-0863-9.

El presente trabajo se realizó en los laboratorios número 2 y de Físicoquímica de Alimentos 2 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (Número de registro: 660522) para realizar estudios de maestría.
- El presente trabajo de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Número de proyecto: CB-2013-220163).

Índice general

Índice general.....	i
Índice de figuras	vi
Índice de tablas.....	ix
Índice de ecuaciones	x
Listado de abreviaturas, siglas y símbolos.....	xi
Resumen.....	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES	2
1.1. Introducción	2
1.2. Aflatoxinas	3
1.2.1. Generalidades.....	3
1.2.2. Propiedades químicas y degradación de aflatoxinas	4
1.2.3. Toxicidad de las aflatoxinas.....	5
1.2.4. Incidencia de las aflatoxinas en los alimentos	6
1.3. Métodos de extracción.....	6
1.3.1. Extracción líquido-líquido	7
1.3.2. Extracción por fluidos supercríticos.....	8
1.3.3. Extracción en fase sólida	8
1.4. Métodos de microextracción.....	9
1.4.1. Microextracción líquido-líquido dispersiva.....	10
1.4.2. Microextracción en fase microsólida magnética dispersiva.....	10
1.4.3. Acoplamiento de técnicas de microextracción.....	11
1.5. Objetivos	13
1.5.1. General.....	13
1.5.2. Específicos	13
Referencias	14
CAPÍTULO 2. SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SOPORTES DE EXTRACCIÓN MAGNÉTICOS.....	18
2.1. Introducción	18
2.2. Antecedentes	19
2.2.1. Métodos de síntesis	19
2.2.1.1. Método de coprecipitación	20

2.2.1.2.	Descomposición térmica	21
2.2.1.3.	Síntesis por microemulsión	21
2.2.1.4.	Síntesis solvotérmica o hidrotérmica	22
2.2.2.	<i>Estabilización y funcionalización. Recubrimientos</i>	23
2.3.	Metodología experimental	25
2.3.1.	<i>Síntesis en sistema abierto</i>	25
2.3.2.	<i>Síntesis por microondas</i>	25
2.3.2.1.	Efecto de los tiempos de reacción	26
2.3.2.2.	Optimización de la síntesis	26
2.3.3.	<i>Caracterización de los soportes magnéticos</i>	28
2.3.3.1.	Espectroscopia en el infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR) 28	
2.3.3.2.	Difracción de rayos X de polvos	28
2.3.3.3.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	28
2.3.3.4.	Potencial zeta	29
2.3.4.	<i>Análisis estadístico</i>	29
2.4.	Resultados y discusión	30
2.4.1.	<i>Soportes magnéticos sin funcionalizar</i>	30
2.4.1.1.	Sistema abierto	30
2.4.1.2.	Sistema por microondas	31
2.4.2.	<i>Efecto de los tiempos de reacción</i>	32
2.4.3.	<i>Optimización</i>	34
2.4.3.1.	DLS y potencial zeta	35
2.4.3.2.	DRX	39
2.4.3.3.	Efecto de la cantidad de acetato de amonio y la temperatura sobre el tamaño de partícula.	40
2.4.3.4.	Efecto de la cantidad de acetato de amonio y el tiempo	41
2.4.3.5.	Efecto del tiempo y la temperatura	42
2.4.4.	<i>Experimentos confirmatorios</i>	42
2.4.5.	<i>Caracterización de los soportes magnéticos funcionalizados</i>	43
2.4.5.1.	FT-IR	43
2.4.5.2.	SEM	44
2.4.5.3.	EDS	45

2.5. Conclusiones.....	46
Referencias	47
CAPÍTULO 3. DISEÑO DE UN MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN ACOPLADA PARA AFLATOXINA B1	
3.1. Introducción	50
3.2. Antecedentes	51
3.2.1. <i>Métodos de extracción y microextracción de aflatoxinas</i>	51
3.2.2. <i>Métodos de cuantificación de aflatoxinas</i>	52
3.3. Metodología experimental.....	54
3.3.1. <i>Pretratamiento de la muestra</i>	54
3.3.1.1. Preparación de solución sintética de AFB1	54
3.3.1.2. Preparación de muestras reales	54
3.3.2. <i>Microextracción dispersiva líquido-líquido</i>	54
3.3.3. <i>Extracción magnética en fase microsólida dispersa</i>	55
3.3.3.1. Elección del disolvente de redisolución	55
3.3.3.2. Extracción	55
3.3.4. <i>Derivatización de AFB1</i>	55
3.3.5. <i>Análisis de AFB1 por espectroscopia de fluorescencia</i>	55
3.4. Resultados y discusión	56
3.4.1. <i>Solvente de redisolución</i>	56
3.4.2. <i>Microextracción de aflatoxina B1</i>	57
3.5. Conclusiones.....	61
Referencias	61
CAPÍTULO 4. DISEÑO DE UN MÉTODO VOLTAMPEROMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA B1	
4.1. Introducción	64
4.2. Antecedentes	65
4.2.1. <i>Voltamperometría</i>	65
4.2.1.1. Voltamperometría cíclica	66
4.2.1.2. Voltamperometría de onda cuadrada	66
4.2.1.3. Voltamperometría diferencial de pulso.....	66
4.2.2. <i>Electrodos de trabajo</i>	67
4.2.2.1. Electrodo de mercurio	67

4.2.2.2.	Electrodo de bismuto	68
4.2.3.	<i>Determinación de aflatoxinas por técnicas electroanalíticas</i>	70
4.3.	Metodología experimental.....	72
4.3.1.	<i>Sistema electroquímico</i>	72
4.3.2.	<i>Estudios preliminares</i>	72
4.3.2.1.	Electrodeposición del bismuto.....	72
4.3.2.2.	Obtención de la señal analítica de AFB1.....	72
4.3.2.3.	Estudio voltamperométrico de AFB1	72
4.3.3.	<i>Diseño del electrodo de película de bismuto</i>	73
4.3.4.	<i>Optimización de la voltamperometría diferencial de pulso</i>	74
4.3.5.	<i>Curva de calibración para AFB1</i>	74
4.3.6.	Extracción, preconcentración y detección electroanalítica de AFB1	75
4.4.	Resultados y discusión	75
4.4.1.	<i>Elección de condiciones preliminares</i>	75
4.4.1.1.	Electrodeposición del bismuto.....	75
4.4.1.2.	Señal analítica de AFB1	76
4.4.1.3.	Estudio voltamperométrico de AFB1	77
4.4.2.	<i>Optimización del electrodo de película de bismuto</i>	78
4.4.3.1.	<i>Efecto del potencial de deposición y la concentración de bismuto en la señal catódica de AFB1</i>	80
4.4.3.2.	<i>Efecto del potencial de deposición y del tiempo de deposición en la señal catódica de AFB1</i>	80
4.4.3.3.	<i>Efecto de la concentración de bismuto y del tiempo de deposición en la señal catódica de AFB1</i>	81
4.4.3.	Experimentos confirmatorios	82
4.4.4.	<i>Optimización de la voltamperometría diferencial de pulso</i>	83
4.4.4.1.	<i>Efecto del paso de potencial y el ancho de pulso en la señal catódica de AFB1</i>	85
4.4.4.2.	<i>Efecto del paso de potencial y el periodo de pulso en la señal catódica de AFB1</i>	86
4.4.4.3.	<i>Efecto del paso de potencial y la amplitud de pulso en la señal catódica de AFB1</i>	86
4.4.4.4.	<i>Efecto del ancho de pulso y el periodo de pulso en la señal catódica de AFB1</i>	87

4.4.4.5.	<i>Efecto del ancho de pulso y la amplitud del pulso en la señal catódica de AFB1</i>	87
4.4.4.6.	<i>Efecto del periodo de pulso y la amplitud del pulso en la señal catódica de AFB1</i>	88
4.4.5.	<i>Experimentos confirmatorios</i>	89
4.4.6.	<i>Parámetros analíticos para la metodología por DPV</i>	90
4.4.7.	<i>Extracción, preconcentración y detección de AFB1</i>	91
4.5.	<i>Conclusiones</i>	92
	<i>Referencias</i>	92

Índice de figuras

	pág.
Figura 1.1. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas encontradas en los alimentos.	4
Figura 1.2. Representación del proceso de extracción líquido-líquido (LLE)	8
Figura 1.3. Representación del proceso de extracción en fase sólida (SPE)	9
Figura 1.4. Esquema de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).	10
Figura 1.5. Esquema de la extracción en fase microsólida magnética dispersiva (MDMSPE).	11
Figura 1.6. Esquema del acoplamiento entre D-LLME y MDMSPE.	12
Figura 2.1. Principales métodos de síntesis de nanopartículas.	19
Figura 2.2. Representación de la síntesis solvotérmica.	22
Figura 2.3. Principales recubrimientos de nanopartículas magnéticas	23
Figura 2.4. Sistema de reacción para la síntesis solvotérmica en sistema abierto.	25
Figura 2.5. Difractograma del soporte magnético obtenido (azul) comparado con el patrón de difracción estándar de magnetita (rojo) y hematita (verde)	30
Figura 2.6. Difractograma del soporte magnético obtenido (azul) comparado con el patrón de difracción estándar de magnetita (rojo)	30
Figura 2.7. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para evaluar el efecto de los tiempos de reacción ($\alpha=0.05$)	33
Figura 2.8. Funcionalización de nanopartículas de magnetita con TMSPT y ATM	34
Figura 2.9. Gráficas de distribución del diámetro hidrodinámico para el experimento 12 del diseño de experimentos.	36
Figura 2.10. Variación del potencial zeta de las partículas magnéticas en suspensión como función del pH	37
Figura 2.11. Efecto de la cantidad de acetato de amonio (mg) y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) sobre el tamaño de partícula (nm)	40
Figura 2.12. Efecto de la cantidad de acetato de amonio (mg) y el tiempo (s) sobre el tamaño de partícula (nm)	41
Figura 2.13. Efecto de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y el tiempo (s) sobre el tamaño de partícula (nm)	42

Figura 2.14. Espectro de Infrarrojo de soportes magnéticos funcionalizados con TMSPT y AMT.	44
Figura 2.15. Imágenes SEM de los soportes magnéticos funcionalizados con aumento 450x (A) y 2700x (B)	45
Figura 2.16. Espectro EDS del soporte magnético funcionalizado	45
Figura 2.17. Distribución elemental de los átomos de carbono (A), hierro (B), nitrógeno (C), oxígeno (D), azufre (F) y silicio (E)	46
Figura 3.1. Efecto del solvente de redisolución sobre los soportes magnéticos.	56
Figura 3.2. Mapa del potencial electrostático para la molécula de AFB1.	57
Figura 3.3. Mecanismo propuesto para el proceso de MDMSPE de la aflatoxina B1.	58
Figura 3.4. Reacción de derivatización de la AFB1 para su análisis por espectrofluorimetría.	58
Figura 3.5. Espectros de fluorescencia de estándares de AFB1 a 80 y 160 ngL ⁻¹ .	59
Figura 3.6. Espectros de fluorescencia de muestras de forraje analizadas, comparadas con el estándar de 80 ngL ⁻¹ , posterior al proceso de separación.	60
Figura 4.1. Esquema típico de una celda electroquímica formada por un WE, un RE y un AE.	64
Figura 4.2. Forma de onda de potencial para DPV	66
Figura 4.3 Configuración del electrodo de gota de mercurio.	67
Figura 4.4. Reducción de AFB1 (A) a aflatoxicol A (B).	70
Figura 4.5. Electrodeposición del bismuto a una concentración de 200 mgL ⁻¹ con HNO ₃ al 5% a 25 ciclos de -1000 a 1000 mV.	75
Figura 4.6. Voltamperograma obtenido para AFB1 (160 ngL ⁻¹) .en BRB pH=9 a 4 ciclos de -350 a -1000mV	76
Figura 4.7. Gráfico de log <i>v</i> vs log <i>i</i> para la reducción de AFB1 (160 ng L ⁻¹ en BRB).	77
Figura 4.8. Efecto del potencial de deposición (mV) y la concentración de bismuto (mg L ⁻¹) sobre la señal catódica (mA) de AFB1	79
Figura 4.9. Efecto del potencial de deposición (mV) y del tiempo de deposición (s) sobre la señal catódica (mA) de AFB1	80
Figura 4.10. Efecto de la concentración de bismuto (mg L ⁻¹) y del tiempo de deposición (s) sobre la señal catódica (mA) de AFB1	81
Figura 4.11. Experimentos confirmatorios para la fabricación de BiFEs	82

Figura 4.12. Efectos del paso de potencial (mV) y el ancho de pulso (ms) sobre la señal catódica (mA) de AFB1	84
Figura 4.13. Efectos del paso de potencial (mV) y el periodo de pulso (ms) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1	85
Figura 4.14. Efectos del paso de potencial (mV) y la amplitud de pulso (mV) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1	85
Figura 4.15. Efectos del ancho de pulso (ms) y el periodo de pulso (ms) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1	86
Figura 4.16. Efectos del ancho de pulso (ms) y la amplitud del pulso (mV) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1	86
Figura 4.17. Efectos del periodo de pulso (ms) y la amplitud del pulso (mV) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1	87
Figura 4.18. Experimentos confirmatorios y condiciones óptimas para la detección de AFB1 mediante DPV	88
Figura 4.19. Curva de calibrado de AFB1	90
Figura 4.20. Señal de AFB1 obtenida al realizar la DLLME y la MSMSPE	91

Índice de tablas

	pág.
Tabla 1.1. Propiedades físicas y químicas de algunas aflatoxinas y sus metabolitos.	5
Tabla 1.2. Incidencia de aflatoxinas en diferentes alimentos.	6
Tabla 2.1. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización del tamaño.	24
Tabla 2.2. Estimación de los tamaños de partícula mediante la ecuación de Debye-Scherrer para el soporte obtenido por un sistema abierto.	28
Tabla 2.3. Estimación de los tamaños de partícula mediante la ecuación Debye-Scherrer para el sistema por microondas.	29
Tabla 2.4. Diseño factorial fraccionado 2^2 para evaluar el efecto del tiempo en el rendimiento de la síntesis de soportes magnéticos.	30
Tabla 2.5. Matriz del diseño de experimentos y resultados obtenidos para el diámetro hidrodinámico medido por DLS.	32
Tabla 2.6. Cambios en la estabilidad de las suspensiones.	35
Tabla 2.7. Matriz del diseño de experimentos y resultados obtenidos tamaño de partícula mediante DRX.	37
Tabla 2.8. Experimentos confirmatorios para la síntesis de nanopartículas funcionalizadas.	38
Tabla 4.1. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización para la fabricación del electrodo.	65
Tabla 4.2. Niveles de los factores de control elegidos para la optimización de la VDP.	66
Tabla 4.3. Matriz del diseño de experimentos para la fabricación de BiFEs.	70
Tabla 4.4. Experimentos confirmatorios y condiciones óptimas para la fabricación de BiFEs.	71
Tabla 4.5. Matriz del diseño de experimentos para la detección de AFB1 mediante DPV.	73
Tabla 4.6. Experimentos confirmatorios y condiciones óptimas para la detección de AFB1 mediante DPV.	74

Índice de ecuaciones

	pág.
Ec. 2.1. $M^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^{-} \rightarrow MFe_2O_4 + 4H_2O$	18
Ec. 2.2. $\tau = \frac{K\lambda}{B\cos\theta}$	25
Ec. 2.3. $R = 1643 + 0.244A - 12.7B + 1.8C + 0.000436 A^2 + 0.0248B^2 -$ $0.563C^2 - 0.00207AB + 0.00041AC + 0.0252BC$	36
Ec. 4.1. $i = av^b$	68
Ec. 4.2. $R = 0.5233 - 0.0613A + 0.0712B + 0.0225C - 0.0392 A^2 -$ $0.0892B^2 + 0.0233C^2 - 0.0600AB + 0.0625AC + 0.0525BC$	70
Ec. 4.3. $R = 3.60 + 0.0340A + 0.0392B - 0.08001C - 0.01497D -$ $0.000513 A^2 - 0.001345 - 0.000366C^2 + 0.000039 - 0.001003AB +$ $0.00038AC - 0.000146AD - 0.000305BC + 0.000095BD + 0.000077CD$	72

Listado de abreviaturas, siglas y símbolos

Abreviatura, sigla o símbolo	Significado
AE	Electrodo auxiliar o contraelectrodo
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AMT	2-amino-5-mercapto-1,3,4-tiadizol
AQA	Garantía de calidad analítica
BiFE	Electrodo de película de bismuto
BRB	Buffer Britton-Robinson
CV	Voltamperometría cíclica
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CH ₃ OH	Metanol
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMF	Dimetilformamida
DMSPE	Extracción en fase microsólida dispersiva
DRX	Difracción de rayos X
DVP	Voltamperometría diferencial de pulso
ϵ	Constante dieléctrica
EDS	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
ELISA	Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas
FT-IR	Infrarrojo por Transformadas de Fourier
GC	Cromatografía de gases
HF-LPME	Microextracción en fase líquida usando membranas líquidas soportadas sobre fibras huecas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
kgpc	Kilogramo de peso corporal
LD ₅₀	Dosis letal media

LIs	Líquidos iónicos
LLE	Extracción líquido-líquido
LPME	Microextracción en fase líquida
LOD	Límite de detección
μg	Microgramo
μL	Microlitro
MDMSPE	Extracción en fase microsólida magnética dispersiva
MEPS	Microextracción en jeringa empacada
MeCN	Acetonitrilo
MNP	Nanopartícula magnética
MSPE	Extracción en fase microsólida
NP	Nanopartícula
NTCs	Nanotubos de carbono
P_c	Presión crítica
PHAs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
RE	Electrodo de referencia
SBSE	Extracción por sorción con barras magnéticas
SDME	Microextracción de la gota suspendida
SFE	Extracción por fluidos supercríticos
SPME	Microextracción en fase sólida
SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
T_c	Temperatura crítica
TD_{50}	Dosis tóxica media
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TFA	Ácido trofluoroacético
TMSPT	3-(trimetoxisilil)-1-propantiol
W:O	Agua:aceite (por sus siglas en Inglés)
WE	Electrodo de trabajo
ζ	Potencial zeta

Resumen

En el presente trabajo se realiza el desarrollo de metodologías para la extracción y detección electroquímica de aflatoxina B1, para lo cual el escrito se divide en cuatro capítulos. En el primer capítulo se presentan los *Antecedentes generales*, en los cuales se hace una revisión acerca de las propiedades de las aflatoxinas y los avances en los métodos de extracción y microextracción; terminando con el planteamiento de los objetivos de la investigación. El segundo capítulo trata de la *Síntesis, funcionalización y caracterización de soportes de extracción magnéticos*, presentando la síntesis por un método abierto y uno basado en microondas, el estudio de los soportes en solución, su funcionalización y su caracterización. Para el tercer capítulo se trabajó en el *Diseño de un método de microextracción acoplada para aflatoxina B1*, en el cual se presenta la estrategia que se siguió para la propuesta de un método de microextracción en dos pasos, basado en DLLME y MDMSPE, con detección por Fluorimetría, previa derivatización de la AFB1, alcanzándose un factor de preconcentración estimado de 500. Por último, el cuarto capítulo se relaciona con el *Diseño de un método voltamperométrico para la cuantificación de aflatoxina B1*, en el que se realiza el diseño de un electrodo de bismuto, para su posterior aplicación en la detección de AFB1; haciendo para ambos procedimientos un diseño de experimentos.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Introducción

Las aflatoxinas son sustancias de muy alta toxicidad, tanto aguda como crónica, y se encuentran entre los compuestos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos más potentes de la naturaleza. Se estima que cerca del 64% de la población mundial está en riesgo crónico de exposición a las aflatoxinas por alimentos contaminados (Filazi & Sireli, 2013).

Las aflatoxinas son un grupo de 18 difuranocumarinas con algunas variantes en su estructura química, siendo las más importantes la B1, B2, G1, G2, M1 y M2, de las que la primera es la más tóxica y abundante en alimentos. Diversos estudios demuestran que la AFB1 tiene actividad tóxica en seres humanos y se ha asociado a enfermedades carcinogénicas y a desórdenes en el crecimiento. Para la AFB1, se han establecido límites máximos permisibles de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (The Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain, 2007).

Debido a que las aflatoxinas se generan como metabolitos secundarios de algunas especies del hongo *Aspergillus*, estas micotoxinas están presentes en una amplia gama de productos alimenticios, sobre todo cereales.

Por otro lado, desde el punto de vista analítico, los alimentos son muestras complejas, ya que presentan una amplia diversidad de compuestos, que pueden interaccionar; lo que dificulta su análisis, sobre todo de aquellos que se encuentren en niveles traza. Una alternativa de solución a esta problemática es el uso de técnicas de microextracción, las cuales han demostrado ser eficientes para el análisis de compuestos minoritarios en muestras alimenticias.

1.2. Aflatoxinas

1.2.1. Generalidades

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por el hongo *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, estas micotoxinas contaminan diversas fuentes de alimentación como los cereales, los productos de panificación, las semillas oleaginosas y los piensos alimenticios, afectando también bioproductos como la carne, el huevo, la leche y sus derivados. La susceptibilidad de los alimentos al ataque de aflatoxinas varía con la ubicación geográfica, la agricultura y las prácticas agronómicas, por lo que, se ha vuelto un problema común, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales (Filazi & Sireli, 2013).

Las aflatoxinas pertenecen al grupo de derivados de las bisfurano-isocumarinas, existen diferentes tipos, las más comunes son la B1, B2, G1, G2, M1 y M2 (Figura 1.1), siendo las más relacionadas con efectos tóxicos, tales como carcinogénicos y mutagénicos (Hsieh, Lin, & Singh, 1976). No se sabe con exactitud el nivel de toxicidad de las aflatoxinas para consumo humano, sin embargo, se han reportado intervalos de toxicidad de 100 a 200 µg por kilogramo de peso corporal (kgpc), por ello su determinación se ha convertido en un tema importante para la inocuidad alimentaria (Eaton & Groopman, 1994).

Debido a la presencia del hongo *Aspergillus* y la toxina en el ambiente, se considera un problema casi inevitable la presencia de estos compuestos en los alimentos y/o piensos. Por ello, en diferentes países se han establecido límites máximos de aflatoxinas totales en alimentos; por ejemplo, en Estados Unidos y en la Comunidad Europea es de 4 µg kg⁻¹ en la mayoría de productos (The Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain, 2007).

Por otra parte, la alta complejidad de los alimentos (presencia de proteínas, lípidos, carbohidratos, agua y otros componentes minoritarios) hace que las micotoxinas contenidas en ellos requieran procesos de extracción para eliminar sustancias interferentes (Soriano, 2007).

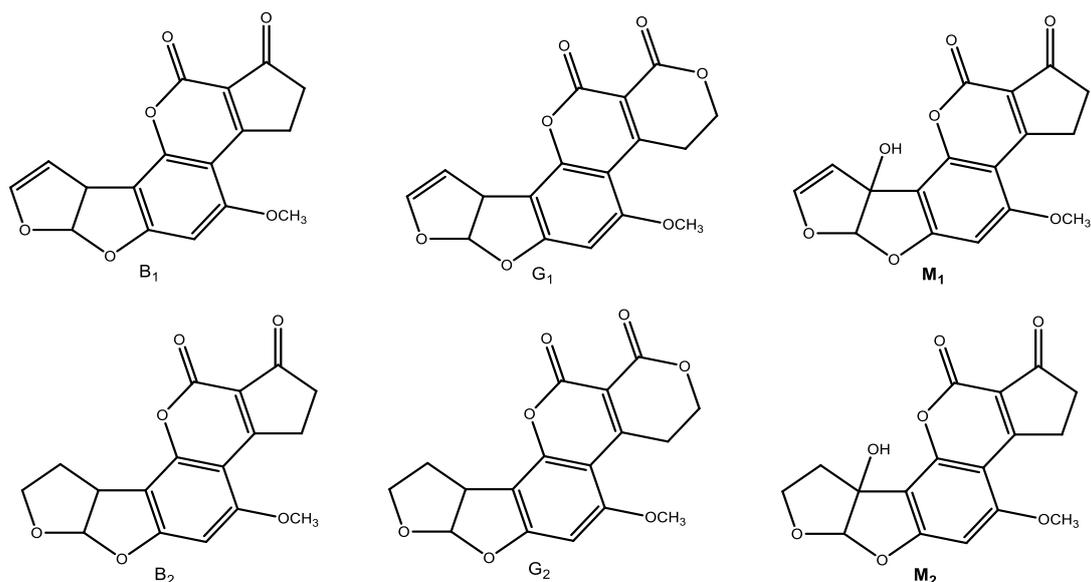


Figura 1.1. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas encontradas en los alimentos.

1.2.2. *Propiedades químicas y degradación de aflatoxinas*

Las aflatoxinas son compuestos cristalinos, solubles en solventes moderadamente polares, como cloroformo, metanol y dimetilsulfóxido. En su forma cristalina son altamente estables en ausencia de luz y a temperaturas por encima de los 100°C (Deshpande, 2002).

La estructura básica de las aflatoxinas consiste en una cumarina unida a un anillo bifurano junto con un anillo de cinco o seis carbonos (Figura 1.1). Las aflatoxinas tienen estructuras muy similares, la serie G difiere químicamente de la serie B por la presencia de un anillo de β -lactona, en lugar de un anillo de ciclopentanona (Goldblatt, 1969). Por otro lado, la AFB₁, AFG₁ y AFM₁ presentan un éter vinílico en el anillo furano terminal, el cual no se encuentra en AFB₂, AFG₂ y AFM₂, lo que hace que las de la serie 1 sean más tóxicas. En la Tabla 1.1 se muestran características de algunas aflatoxinas (Büchi et al., 1969).

Las aflatoxinas de la serie B y G emiten luz ultravioleta de onda larga, excitándose a 225-365 nm y emitiendo a 425-450 nm, lo que permite que sean observadas con una lámpara fluorescente, produciendo luz verde o azul. Por otro lado, la aflatoxina M₁ (AFM₁) produce una fluorescencia azul, mientras que la M₂ produce fluorescencia violeta.

Tabla 1.1. Propiedades físicas y químicas de algunas aflatoxinas y sus metabolitos.

Aflatoxina	Fórmula molecular	Masa molecular relativa	Punto de fusión, °C	Emisión de fluorescencia, nm
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	425
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	289	425
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328	246	450
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240	450
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	234	425

(Heathcote and Hibbert, 1978).

Se han realizado múltiples investigaciones relacionadas con la estabilidad de las aflatoxinas, Levi (1980) simuló condiciones de tostado (200±5°C, 20 min) en granos de café verde observando una disminución del 80% de AFB1. Lau y Chu (1983) reportaron que los hongos *Rhizopus oryzae* y *R. oligosporus* reducen el anillo de ciclopentanona en AFB1 formando aflatoxicol A, el cual es un metabolito que se encuentra en tejidos animales, leche y derivados.

Por otro lado, González y colaboradores (1998) estudiaron el efecto de la electrólisis, la irradiación ultravioleta y la temperatura en la descomposición de AFB1 y AFG1. La irradiación UV aplicada durante 60 min provocó una eliminación total de aflatoxinas. Sin embargo, cuando las aflatoxinas se colocaron en un baño a 90°C durante 3 min, se observó una disminución del 20% respecto a la cantidad total de AFB1 y AFG1.

El efecto de la radiación gamma fue estudiado por Azis y Moussa (2002) reportando una total desestabilización de AFB1 en muestras de fruta. Gurbay y colaboradores (2004) reportaron la estabilidad de AFM1 la cual es relativamente estable en las etapas de pasteurización, esterilización y almacenamiento de productos lácteos.

1.2.3. Toxicidad de las aflatoxinas

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) ha concluido que las aflatoxinas son carcinogénicas para humanos, particularmente como

agente etiológico de cáncer de hígado (Filazi & Sireli, 2013). La LD₅₀ en humanos se estima en 5 mg/kgpc al día, y la TD₅₀ en 132 µg/kgpc al día (Moss, 2003).

De acuerdo a una comisión de expertos de FAO/OMS, la aflatoxina B1 (AFB1) es la de mayor toxicidad aguda y crónica, estimando su potencia a partir de datos epidemiológicos (Filazi & Sireli, 2013), mientras que la AFM1 que deriva de ésta y se encuentra en la leche, es apenas ligeramente menos tóxica que su precursora (Moss, 2003), causando también cáncer hepático (Filazi & Sireli, 2013).

1.2.4. Incidencia de las aflatoxinas en los alimentos

La presencia de aflatoxinas en alimentos ha sido estudiada desde la década de los 90's; de hecho, ha habido un incremento importante de publicaciones relacionadas con este tema alrededor del mundo, por considerarse que la incidencia es muy alta y que se trata de un grave problema de salud pública que hay que atender. En la Tabla 1.2 se presentan los países en los que se ha estudiado la incidencia de aflatoxinas en alimentos (Williams et al., 2004).

Tabla 1.2. Incidencia de aflatoxinas en diferentes alimentos.

País	Alimento	Concentración (µg kg ⁻¹)
Argentina	Maíz	Positivo
Brasil	Maíz	0.2-129.0
	Cacahuete y derivados	43.0-1099.0
China	Maíz	>20.0
Portugal	Yogurt	19.0-98.0
México	Granos de maíz	5.0-465.0
Turquía	Queso	Positivo
India	Chile	>30.0

1.3. Métodos de extracción

Una de las medidas de control para la seguridad alimentaria es la aplicación de técnicas analíticas que generen datos confiables y permitan cumplir con los criterios establecidos por diversos organismos regulatorios. Es

así como los métodos utilizados durante el análisis de los componentes alimentarios deben cumplir con la garantía de calidad analítica (AQA).

Generalmente, las muestras alimenticias son muy diluidas o muy complejas para el análisis directo de un determinado componente minoritario o traza (aditivos, nutraceúticos, compuestos bioactivos, contaminantes, entre otros). Por lo que, la muestra requiere de un tratamiento, que incluye homogenización, extracción, limpieza (*clean-up*), preconcentración y derivatización (Suzanne, 2010).

Algunas técnicas convencionales para llevar a cabo esa “limpieza” de la muestra incluyen la evaporación, la destilación, la liofilización o las extracciones líquido-líquido (LLE).

1.3.1. *Extracción líquido-líquido*

La LLE es una técnica clásica de preparación de muestras; entre las aplicaciones que presenta son: 1) extracción de componentes de interés, 2) remoción de interferentes de la matriz, 3) preconcentración de analitos, y 4) intercambio de solvente para que la muestra en solución sea compatible con la técnica de análisis (Nickerson & Colón, 2010).

En la LLE se utilizan dos fases líquidas inmiscibles, que generalmente es una fase acuosa y una fase orgánica. El analito de interés deberá tener mayor solubilidad en una de ellas, por lo que se distribuirá en las dos fases, de acuerdo a la solubilidad relativa que presente (Nickerson & Colón, 2010).

Para elegir el solvente orgánico adecuado se considera la miscibilidad en agua y la polaridad. Entre los solventes que se suelen utilizar en el análisis de alimentos se encuentran el cloroformo, el diclorometano, el éter dietílico, los hexanos, el n-heptanol y el n-octanol (Wells, 2003).

En la LLE, la solución acuosa de la muestra se coloca en un recipiente separador (embudo de separación, tubo de ensaye o vial) y se le adiciona un solvente (o mezcla de solventes) que sea inmiscible en el agua. Posteriormente, la muestra se mezcla vigorosamente (por vórtex o agitación) para proveer la máxima superficie de contacto entre las dos fases, permitiendo la partición de

los componentes entre las dos fases (Cantwell & Losier, 2002). En la Figura 1.2 se muestra el proceso de LLE.

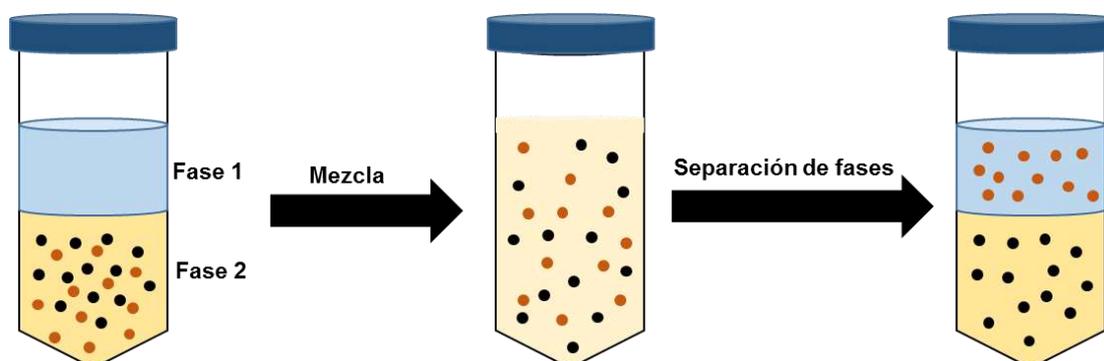


Figura 1.2. Representación del proceso de extracción líquido-líquido (LLE).

La fase que contiene el analito de interés se remueve y se colecta para su posterior tratamiento y/o análisis. Generalmente, es necesario realizar extracciones secuenciales para lograr la máxima extracción. Las colectas de fases se combinan y se les realiza tratamientos para eliminar el agua (adición de desecantes o congelación) o para concentrar el analito (evaporación de solvente) (Nickerson & Colón, 2010).

1.3.2. *Extracción por fluidos supercríticos*

La extracción por fluidos supercríticos (SFE) usa las propiedades características de los fluidos supercríticos (presión y temperaturas críticas) para facilitar la extracción de analitos en una determinada matriz. En la mayoría de los casos se utiliza CO_2 ($P_c=73.8$ bar y $T_c= 31.1^\circ\text{C}$) con o sin solvente orgánico como acetonitrilo (CH_3CN) o metanol (CH_3OH), el cual se comporta como un disolvente no polar (Batt, 2014).

1.3.3. *Extracción en fase sólida*

Otra técnica usada para el aislamiento o purificación del analito de interés en alimentos es la extracción en fase sólida (SPE), en la que grupos funcionales hidrofóbicos se unen químicamente a una superficie sólida, por ejemplo, sílice pulverizada. Los sorbentes utilizados son empacados en cartuchos (Figura 1.3). La SPE se ha utilizado para la determinación de pesticidas, colorantes,

compuestos fenólicos, cafeína, aflatoxinas, clenbuterol, entre otros (Kralj et al., 2009).

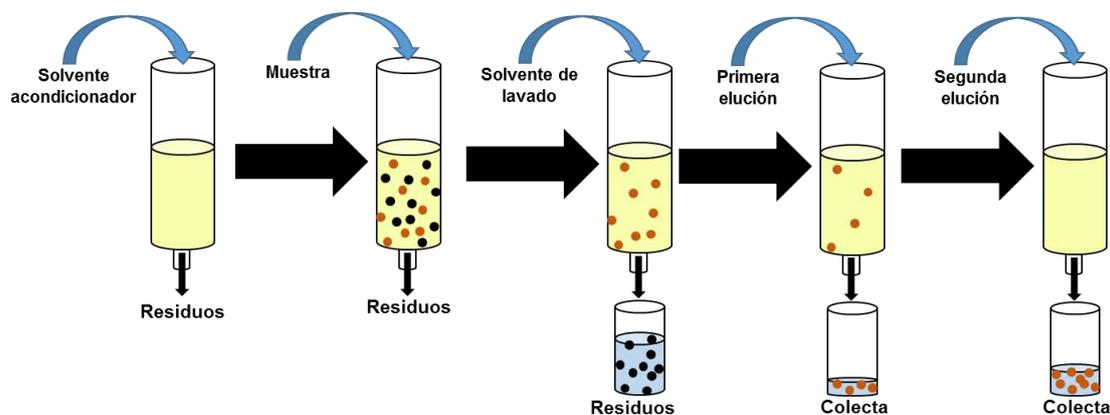


Figura 1.3. Representación del proceso de extracción en fase sólida (SPE).

1.4. Métodos de microextracción

Los métodos de extracción de muestras como la LLE y la SPE usualmente constan de varias etapas de pretratamiento, las cuales son tediosas, requieren mucho tiempo, grandes volúmenes de muestra y solventes tóxicos que provocan contaminación ambiental y riesgos para la salud con alto costo de operación. Por lo tanto, estas técnicas se han miniaturizado para acortar tiempos, crear procedimientos amables con el medio ambiente, aumentar la eficacia de los mismos y reducir las fuentes de error (Kataoka et al., 2000).

Las versiones miniaturizadas de SPE son: la extracción en fase microsólida (MSPE) (Naing et al., 2016), la microextracción en fase sólida (SPME), extracción por sorción con barras magnéticas (SBSE), microextracción en jeringa empacada (MEPS) (Nickerson & Colón, 2011), extracción en fase microsólida dispersiva (DMSPE), y extracción en fase microsólida magnética dispersiva (MDMSPE) (Asgharinezhad et al., 2014).

Las técnicas miniaturizadas de LLE son conocidas como microextracción en fase líquida (LPME) e incluyen la microextracción de la gota suspendida (SDME), microextracción en fase líquida usando membranas líquidas soportadas sobre fibras huecas (HF-LPME) (Nickerson & Colón, 2011) y la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Herrera et al., 2010; Farajzadeh et al., 2014).

1.4.1. Microextracción líquido-líquido dispersiva

Razae y colaboradores (2006) introdujeron la DLLME para lograr una extracción rápida y de alta eficiencia, la cual se ha utilizado en la preconcentración de analitos orgánicos contenidos en matrices acuosas.

La DLLME se basa en un sistema de solventes de tipo ternario, en el cual los solventes de extracción y dispersantes son rápidamente introducidos en la muestra acuosa para formar una dispersión. El equilibrio de extracción se alcanza rápido, debido a la gran superficie de contacto entre las gotas de los solventes de extracción y la muestra.

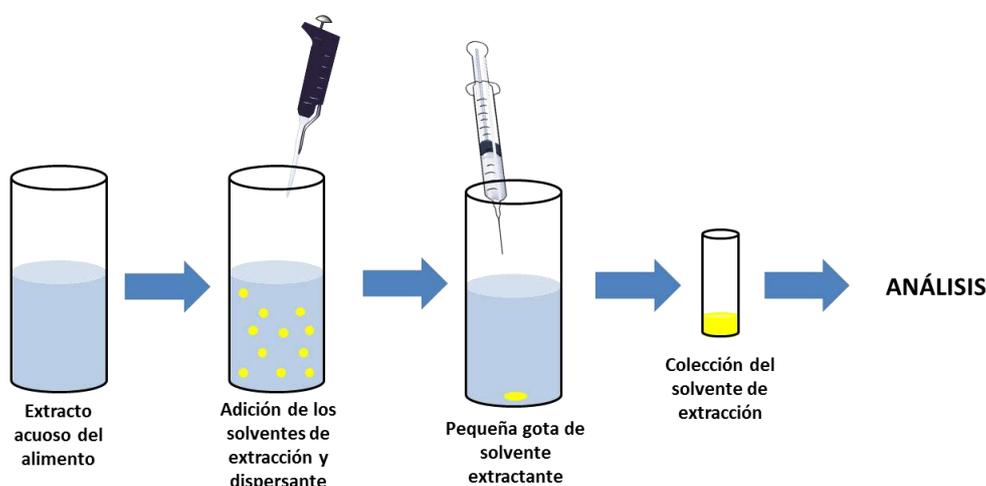


Figura 1.4. Esquema de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).

Después de la centrifugación, el solvente de extracción es sedimentado al fondo del tubo (en forma de gota) y tomado con una jeringa, una vez colectado, el concentrado es llevado al análisis correspondiente (Shi & Lee, 2010). En la Figura 1.4 se esquematiza el proceso llevado a cabo.

1.4.2. Microextracción en fase microsólida magnética dispersiva

La MDSPE es una de las técnicas más estudiadas en los últimos años. Safarikova y colaboradores (1999) reportaron por primera vez la separación de ftalocianina de cobre usando magnetita silanizada, en la que el analito es adsorbido en el soporte magnético, y mediante un campo magnético externo se realizó la separación. Finalmente, se hace la desorción con el solvente adecuado

para su posterior análisis. En la Figura 1.5 se muestra un esquema general de la MDMSPE.

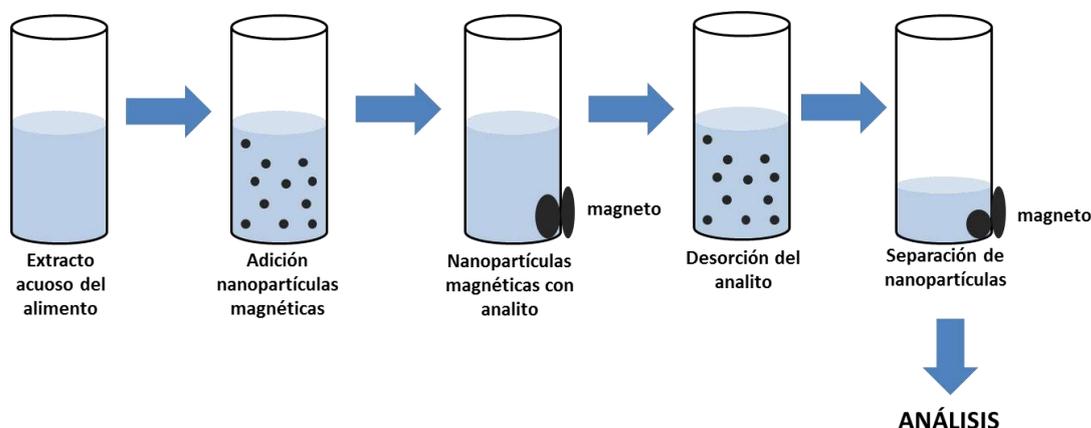


Figura 1.5. Esquema de la extracción en fase micro sólida magnética dispersiva (MDMSPE).

Al haber una fácil dispersión del soporte magnético en la muestra, la MDMSPE presenta múltiples ventajas, como una alta eficiencia de extracción, debido a la superficie de contacto del soporte magnético; la separación es muy rápida, comparada con otros métodos convencionales de SPE; presenta una buena reutilización y la preparación de la magnetita (soporte magnético) es sencilla (Faraji, 2016).

Entre las modificaciones que se han realizado en este método de extracción, se encuentra la modificación o funcionalización del soporte magnético, lo que proporciona características específicas al sólido, tales como la selectividad para la adsorción de un determinado analito (Giakisikli & Anthemidis, 2013), así como el control en el tamaño de partícula de las nanopartículas magnéticas (MNPs) utilizadas como soportes. La funcionalización de las MNPs se discutirá ampliamente en el Capítulo 2.

1.4.3. Acoplamiento de técnicas de microextracción

A pesar de que se han desarrollado diversas técnicas para la extracción y pre-concentración de componentes traza en diferentes tipos de matrices, en las que destacan la LLE, la DLLME, la SPE y la MSPE, ninguna de estas técnicas analíticas han resultado ser completamente eficientes.

Para muestras de tipo medio ambiental (agua y suelos) se ha planteado como alternativa utilizar un acoplamiento que incluye la DLLME y la MDMSPE, con la finalidad de aumentar la eficiencia de la extracción y mejorar las determinaciones de compuestos a niveles traza, siendo uno de los usos la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) (Shi & Lee, 2010).

Para realizar este acoplamiento, al concentrado colectado en la DLLME se le adicionan las MNPs funcionalizadas y se repite el procedimiento de la MDMSPE (Figura 1.6).

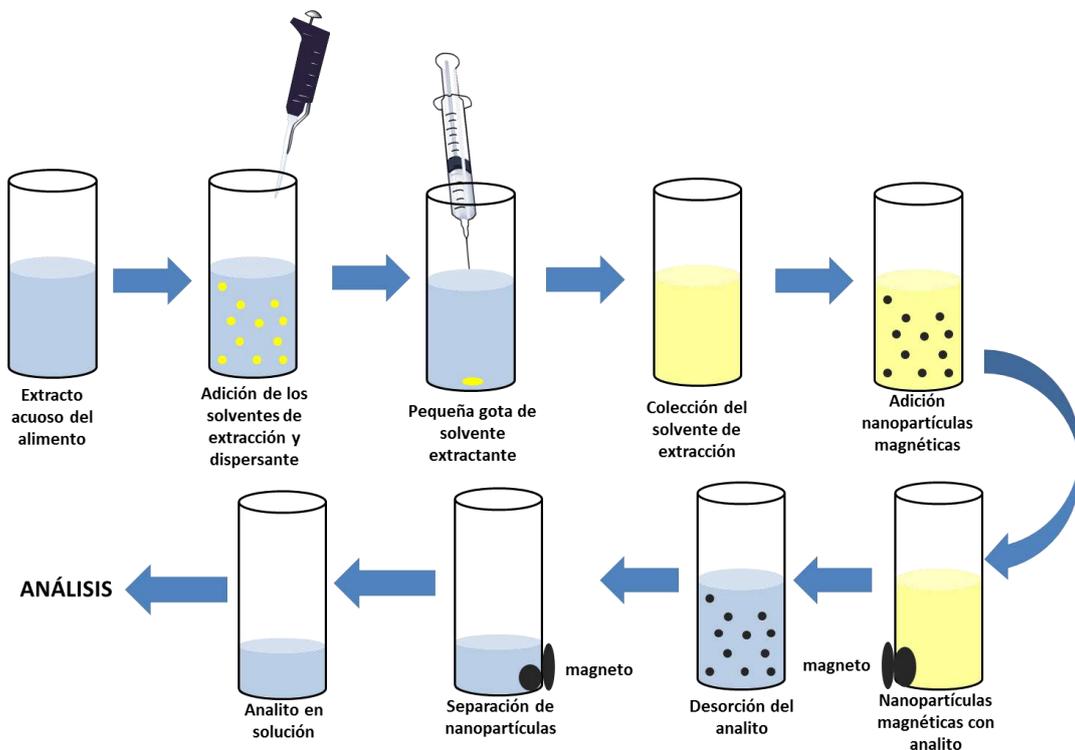


Figura 1.6. Esquema del acoplamiento entre DLLME y MDMSPE.

Por ello, en el presente trabajo se desarrolló una metodología para extraer y preconcentrar AFB1 en niveles traza mediante el acoplamiento de técnicas como la DLLME y la MDMSPE, además de establecer una metodología electroanalítica que permita detectar AFB1 de manera sencilla y rápida.

1.5. Objetivos

Debido a la importancia que tiene el control del contenido de aflatoxinas en los alimentos (tanto de origen animal, como vegetal) y a la necesidad de contar con métodos de cuantificación menos costosos y más sencillos, se han planteado los siguientes objetivos para dirigir este trabajo:

1.5.1. *General*

Desarrollar una metodología para la detección de la aflatoxina B1 mediante técnicas electroquímicas utilizando como pretratamiento para la muestra microextracciones líquido-líquido y sólido-líquido dispersivas.

1.5.2. *Específicos*

1. Sintetizar nanopartículas magnéticas mediante un método solvotérmico para obtener materiales que sirvan de soporte en la extracción en fase sólida dispersa de la aflatoxina B1.
2. Caracterizar las nanopartículas magnéticas utilizando diferentes técnicas analíticas para determinar sus propiedades.
3. Diseñar un proceso de preconcentración de la aflatoxina B1 utilizando una metodología en dos pasos (DLLME y MDMSPE) con la finalidad de separar la mayor cantidad del contaminante en la matriz alimenticia.
4. Optimizar el proceso de fabricación de un electrodo de película de bismuto a partir de un diseño de experimentos para utilizarlo en la detección de aflatoxina B1.
5. Diseñar un método electroanalítico a partir de la construcción de electrodos a base de bismuto para determinar aflatoxina B1.

Referencias

- Akbas M., Ozdemir M. (2006). Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13):2099-2104.
- Alcaide-Molina M., Ruiz-Jiménez J., Mata-Granados J., Luque de Castro M. (2009). High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solid phase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and determination by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(7):1115-1125.
- Alsharif M.A., Huat T.G., Mun C.Y., Lawal A. (2015). Liquid Phase Microextraction for Analysis of Mycotoxins in Food Samples: REVIEW. *Research Journal of Chemical & Environmental Science*, 3:05-21.
- Asgharinezhad A.A., Mollazadeh N., Ebrahimzadeh H., Mirbabaei F., Shekari N. (2014). Magnetic nanoparticles based dispersive micro-solid-phase extraction as a novel technique for coextraction of acidic and basic drugs from biological fluids and waste water. *Journal of Chromatography A*, 1338:1-8.
- Batt C.A. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. USA: Elsevier, p. 854-887.
- Cantwell F.F., Losier M. (2002). Liquid-liquid extraction (Chapter 11). In: Pawliszyn J (ed) *Sampling and sample preparation for field and laboratory*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Deshpande S.S. (2002). *Handbook of Food Toxicology*. USA: CRC Press, p. 393-394.
- Eaton D, Groopman J. (1994). *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. USA: Academic Press Inc, pp. 3-20.
- Faraji M. (2016). Recent analytical applications of magnetic nanoparticles. *Nanochemistry Research*, 1(2):264-290.
- Farajzadeh M.A., Mogaddam M.R., Ghorbanpour H. (2014). Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides

- residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 1347:8-16.
- Filazi A., Sireli T.U. (2013). Occurrence of Aflatoxins in Food. In: *Aflatoxins – Recent Advances and Future Prospects*. Razzaghi-Abyaneh M. (Eds). InTech, pp. 143-170.
- Giakisikli G., Anthemidis A.N. (2013). Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. A review. *Analytica Chimica Acta*, 789:1–16.
- Büchi G., Ian D.R. (1969). CHAPTER III: The structure and chemistry of the Aflatoxins en *Aflatoxin: Scientific Background, Control, and Implications*. USA: Academic Press, p. 55-75.
- Heathcote, J.G. and Hibbert, J.R (1984) *Aflatoxin: Chemical and Biological Aspect*. New York: Elsevier, pp. 134–150.
- Herrera-Herrera A.V., Asensio-Ramos M., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado M.A. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry*, 29:728-751.
- Hsieh D., Lin M., Singh R. (1976). Biosynthesis of aflatoxin: conversion of norsolonic acid and other hypothetical intermediates into aflatoxin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24:1170-1176.
- Hussain I. (2011). CHAPTER II: Aflatoxin Contamination and Research in China en *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control*. China: InTech, p. 129-146.
- Kataoka H. (2010). Recent Developments and Applications of Microextraction Techniques in Drug Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396:339-364.
- Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J. (2000). Applications of Solid-Phase Microextraction in Food Analysis. *Journal of Chromatography A*, 880:35–62.
- Kaushal K.S., Deepak B. (1998). *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. USA: CRC Press, p. 135-139.

- Kralj I., Prosen C., Prosen H. (2009). An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Science*, 10:62-115.
- Moss M.O. (2003). Aflatoxins. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero, B., Trugo, L., & Finglas P. (Eds.) Second Edition, Vol. 1. Elsevier Science Ltd., pp. 66-72.
- Naing N.N., Li S.F.Y., Lee H.K. (2016). Micro-solid phase extraction followed by thermal extraction coupled with gas chromatography-mass selective detector for the determination of polybrominated diphenyl ethers in water. *Journal of Chromatography A*, 1458:25–34.
- Nickerson B., Colón I. (2011). Liquid–Liquid and Solid-Phase Extraction Techniques (Chapter 4). In: Nickerson B (ed) *Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms: Challenges and Strategies for Sample Preparation and Extraction*. Springer, pp. 63-92.
- Pawliszyn J. (2002). Sampling and sample preparation for field and laboratory: fundamentals and new directions in sample preparation. (1st ed.). Amsterdam: Elsevier, (Chapter 9).
- Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E. (1999). Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 71:2650-2656.
- Quinto M., Spadaccino G., Palermo C., Cetonze D. (2009). Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216:8636-8641.
- Rezaee M., Assadi, Y., Hosseinia M.R.M., Aghaee E., Ahmado S., Berijani J. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2):1-9.
- Roseanu A., Jecu L., Badea M., Evans R. W. (2010). Mycotoxins: an overview on their quantification methods. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47:79-86.

- Seager S. (2011). Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed. USA: Elsevier, p. 50-51
- Šafaříková M., Šafaříková I. (1999). Magnetic solid-phase extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194:108–112.
- Shi, Z.-G., Lee, H.K. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with dispersive μ -solid phase extraction for the fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Analytical Chemistry*, 82:1540-1545.
- Soriano J. M., Moltó J.C., Mañes J. (2007). Análisis de micotoxinas en alimentos en *Micotoxinas en alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos, p. 92-100.
- Suzanne S.N. (2010). *Food Analysis*. USA: Springer, p. 321-323.
- The Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain. (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal*, 446:1-127.
- Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632:168-180.
- Ulrich S. (2000). Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A*, 902:167-194.
- Wells M.J.M. (2003). Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids (Chapter 2). In: Mitra S (ed) *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Wiley, Hoboken, NJ.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, Curtis, M., Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80:1106–1122.

CAPÍTULO 2. SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SOPORTES DE EXTRACCIÓN MAGNÉTICOS

2.1. Introducción

En los últimos años el campo de estudio de la nanotecnología se ha ampliado y se ha utilizado en diversas aplicaciones, como por ejemplo en la elaboración de nuevos materiales, la miniaturización de componentes eléctricos, el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades, la energía renovable y la fabricación de textiles (Murty et al., 2013).

El diseño de nuevos materiales nanométricos ha tenido una gran aplicación en Química, entre las que destacan su uso como catalizadores y como soportes de extracción. Entre los materiales que han sido ampliamente utilizados se encuentran las nanopartículas magnéticas (MNPs), las cuales, gracias a sus propiedades y a su gran variedad en recubrimientos, se han implementado en metodologías para la extracción de componentes en matrices complejas, particularmente en muestras ambientales, biológicas y en los alimentos (Wierucka et al., 2014).

Los métodos de síntesis de MNPs son muy variados, destacando el de coprecipitación y el solvotérmico. Cada uno de ellos presenta peculiaridades, pero lo que se persigue es que los tamaños de partículas de los materiales obtenidos sean nanométricos (no mayores 100 nm) y que sus propiedades magnéticas sean adecuadas para poder utilizarlas como soportes en métodos de extracción en fase microsólida dispersa.

La caracterización de las MNPs sintetizadas se utilizará para evaluar el funcionamiento de los materiales sintetizados como soportes de extracción de la aflatoxina B1.

2.2. Antecedentes

2.2.1. Métodos de síntesis

En los últimos años, se han propuesto diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas (NPs), en los cuales se busca proporcionar un mejor control sobre el tamaño, la forma y otras características. Las estrategias que se han sugerido para la síntesis de NPs son: 1) “*top-down*”, y 2) “*bottom-up*” (Lu et al., 2007).

En la estrategia “*top-down*”, las NPs se generan a partir de compuestos macroscópicos, mediante procesos físicos (Bréchnignac, 2006), tales como, la trituración mecánica, en donde las partículas chocan entre ellas generando NPs (Fuentes, 2013), o la ablación láser (Figura 2.1A), en la que un metal (por ejemplo, plata) es irradiado con un láser desprendiendo partículas (Barberio, 2013).

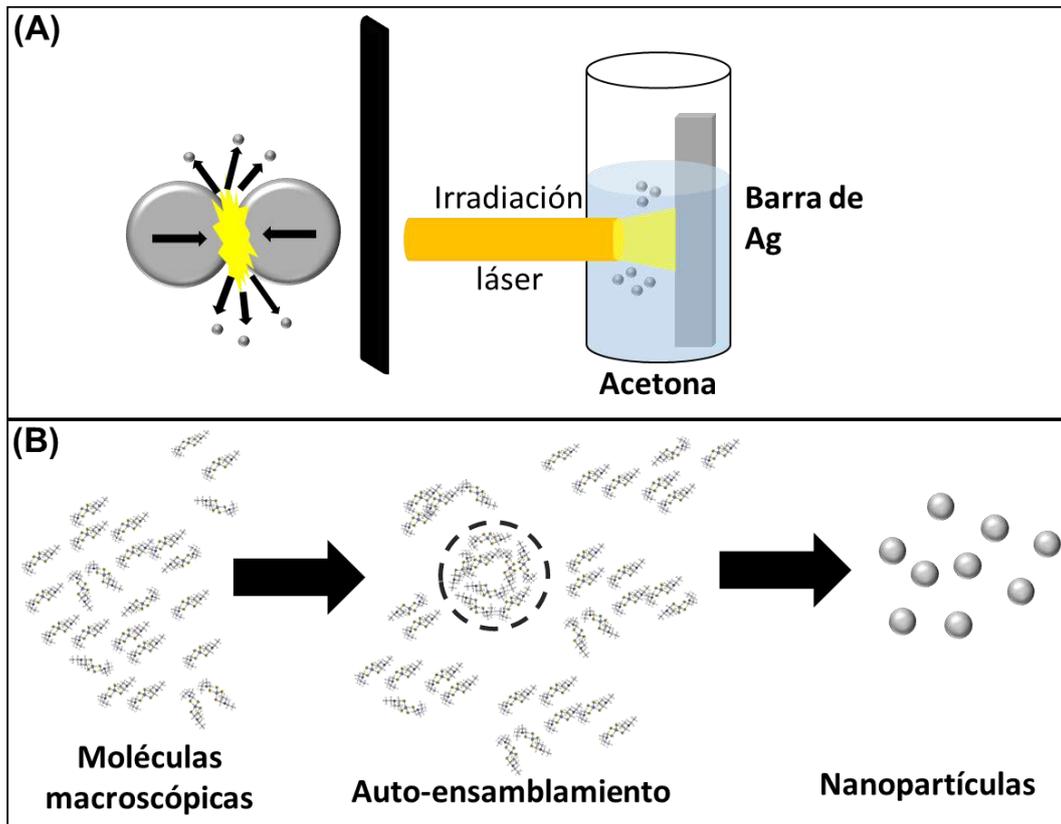
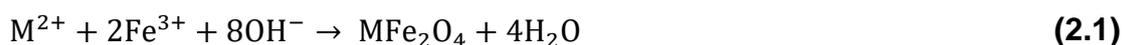


Figura 2.1. Principales métodos de síntesis de nanopartículas. (A) ablación láser y (B) auto-ensamblamiento.

En la estrategia “*bottom-up*”, las NPs se obtienen a partir de compuestos microscópicos, por auto-ensamblamiento o auto-organización de las moléculas mediante cambios en las condiciones en que se sintetizan las partículas, como modificaciones de pH, fuerza iónica, temperatura o concentración. Esta manipulación en las condiciones de síntesis permite controlar la morfología y adaptar las propiedades de un material a una actividad en específico. El enfoque *bottom-up* posibilita la producción de partículas más finas y con mejor control sobre sus propiedades como tamaño, morfología y estado físico, en comparación con los métodos *top-down* (Figura 2.1B).

2.2.1.1. Método de coprecipitación

Es uno de los métodos más simples para la síntesis de MNPs. Fue desarrollado por Massart en la década de 1980 y consiste en la adición de una base a una sal metálica en solución acuosa (Ecuación 2.1).



donde: M^{2+} es un ion metálico tal como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} .

El tamaño, la forma y la composición de las MNPs depende del tipo de sal (cloruro, sulfato, nitrato), la proporción de iones férrico, la temperatura de reacción, el pH y la fuerza iónica del medio (Lu et al., 2007). En la síntesis por coprecipitación se utilizan principalmente hidróxidos de amonio, potasio y sodio. La síntesis por coprecipitación se lleva a cabo entre 70 y 80°C (Mascolo et al., 2013). Wu y colaboradores (2008) también han llevado a cabo esta síntesis a 20 y 60°C, en cuyos estudios han investigado las propiedades magnéticas.

La precipitación se realiza usualmente en el intervalo de pH de 8-14, con una relación estequiométrica $Fe^{3+}:M^{2+}$ de 2:1 (Iida et al., 2007). La principal ventaja de este método es que se pueden sintetizar hasta 40 g de MNPs. Sin embargo, las MNPs son muy susceptibles a la oxidación o pueden disolverse en medio ácido.

Otra ventaja de la síntesis por coprecipitación es su simplicidad, ya que el tiempo y la temperatura de reacción son más bajos que en otros métodos, como la descomposición térmica. Además, el solvente (agua) es amigable con la naturaleza y el rendimiento es alto y escalable. No obstante, la distribución del

tamaño de partícula no se logra controlar y la forma de las MNPs es restringida (Faraji et al., 2010).

2.2.1.2. Descomposición térmica

Este método consiste en la descomposición química de una sustancia llevada a altas temperaturas. Existen tres factores significativos para la síntesis de nanopartículas: la temperatura de descomposición, la duración de la reacción y la concentración de precursores (Lu et al., 2007).

Las nanopartículas sintetizadas por este método son de alta calidad; sin embargo, se obtienen bajos rendimientos y durante la síntesis se requiere una velocidad de calentamiento constante. Uno de los principales inconvenientes de este método es la producción de MNPs orgánicamente solubles que limitan el alcance de los usos de aplicación de los mismos en campos biológicos (Wu et al., 2008). Asimismo, la descomposición térmica usualmente conduce a procesos complicados o requiere temperaturas relativamente altas.

Los precursores para esta síntesis son compuestos organometálicos, tales como acetilacetatos, cupferronatos o carbonilos metálicos (Farrell et al., 2003). Los ácidos grasos como el laúrico, mirístico, cáprico, esteárico (Jana et al., 2004), oleico (Samia et al., 2005) y la hexadecilamina son utilizados como agentes surfactantes (Li et al., 2006).

2.2.1.3. Síntesis por microemulsión

Las microemulsiones agua en aceite (W/O) son sistemas isotrópicos y termodinámicamente estables de una sola fase, las cuales consisten en tres componentes: agua, aceite y un surfactante. Los surfactantes reducen la tensión superficial entre el agua y el aceite, lo que permite que se mezclen.

Para la síntesis de MNPs los precursores se encuentran en la fase acuosa (nanogotas), se someten a una coalescencia rápida que mezcla, precipitan y aglomeran los componentes y se forman micelas. El tamaño puede ser controlado cambiando la relación molar de agua a tensoactivo (W:O), valores elevados de W:O generan tamaños de partícula grandes (Gupta y Gupta, 2005).

El método por microemulsión permite producir nanopartículas monodispersas con diversas morfologías. Sin embargo, este método requiere de una alta cantidad de solvente y los rendimientos de reacción son bajos (Faraji et al., 2010).

2.2.1.4. Síntesis solvotérmica o hidrotérmica

El método solvotérmico ha sido usado para la síntesis de una gran variedad de nanopartículas a través de una reacción líquido-sólido, esta técnica fue sugerida por Wang y colaboradores (2005). El sistema consiste de un linolato metálico (sólido), una fase líquida (etanol/ácido linoleico) y una mezcla de agua-metanol a diferentes condiciones de temperatura bajo condiciones hidrotérmicas (Lu et al., 2007).

Deng y colaboradores (2005), reportaron la síntesis de ferritas microesféricas por reducción hidrotérmica. El método consiste en mezclar FeCl_3 , etilenglicol, acetato de sodio y polietilenglicol hasta obtener una solución clara, la cual se somete a un tratamiento térmico en una autoclave de acero inoxidable a 200°C , durante 8-72 h (Figura 2.2). Además, se evaluó el efecto de los precursores en el control de la síntesis. En este método, el etilenglicol actúa como agente reductor, el acetato de sodio previene la aglomeración y el polietilenglicol funciona como surfactante.

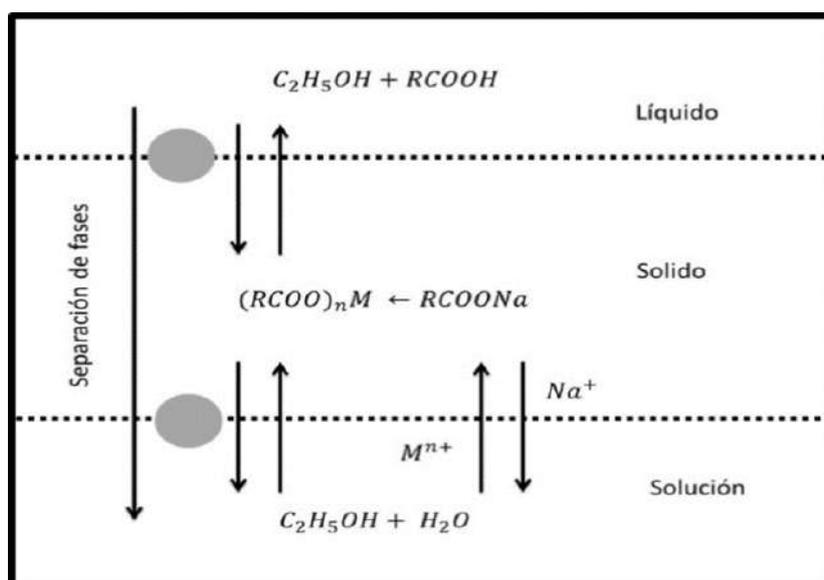


Figura 2.2. Representación de la síntesis solvotérmica.

Este método de síntesis presenta una cinética muy lenta, por lo que se ha planteado una modificación, la cual consiste en calentar mediante microondas, lo cual aumenta la formación de cristales. Sreeja y Joy (2007) sintetizaron nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, obtenidas en microondas en 25 min a 150°C .

2.2.2. Estabilización y funcionalización. Recubrimientos

A pesar de que existen diversas técnicas de síntesis, las MNPs presentan susceptibilidad a la oxidación y a la aglomeración, por ello se han diseñado estrategias que permitan su estabilidad; las cuales en muchos casos, pueden ser usadas para funcionalizar. Los principales recubrimientos usados se muestran en la Figura 2.3.

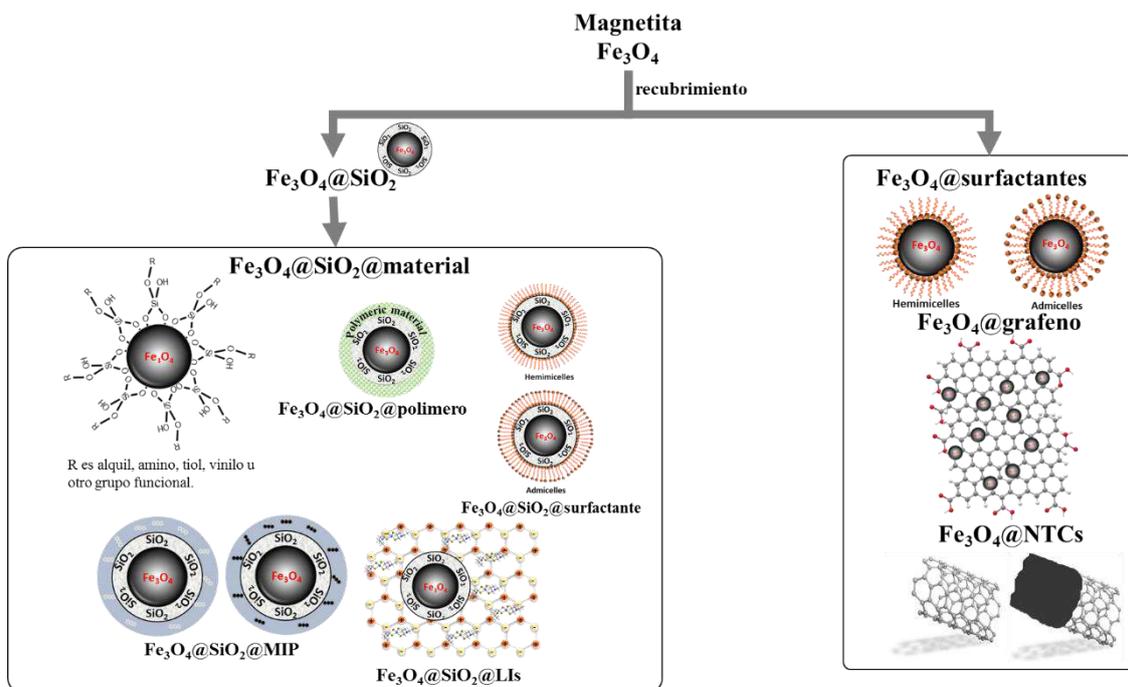


Figura 2.3. Principales recubrimientos de nanopartículas magnéticas.

Los recubrimientos previenen la agregación de las MNPs, durante o después de su síntesis, y pueden unirse química y físicamente para formar un recubrimiento simple o doble, por lo que el estado coloidal se puede mantener (Giakisikli & Anthemidis, 2013; Faraji et al., 2010). Los recubrimientos orgánicos más utilizados son: ácidos orgánicos, surfactantes (sales de amonio, polioles, lisina y ácidos grasos), líquidos iónicos (Lis) y polímeros (dextrano, almidón,

quitosano y alginato). Algunos recubrimientos inorgánicos son: sílice, grafeno, nanotubos de carbono (NTC), metales preciosos (plata u oro) y óxidos (ZnO, CaO, Fe_2O_3 , NiO y CoO).

Para el análisis de componentes en alimentos, los recubrimientos más utilizados son la sílice (MNP@SiO₂); los silanos (MNP@SiO₂@grupo funcional); sílice con otros materiales (MNP@SiO₂@materiales), como Lis, surfactantes, polímeros o polímeros de impresión molecular (MIP); grafeno (MNP@grafeno), y nanotubos de carbono (MNP@NTCs) (Lu et al., 2007). La Figura 2.2 muestra los principales recubrimientos para Fe₃O₄, como MNPs.

Por ello, los objetivos de este capítulo son: 1) sintetizar nanopartículas magnéticas mediante un método solvotérmico para obtener materiales que sirvan de soporte en la extracción en fase sólida dispersa de la aflatoxina B1; y 2) caracterizar las nanopartículas magnéticas utilizando diferentes técnicas analíticas para determinar sus propiedades.

2.3. Metodología experimental

2.3.1. Síntesis en sistema abierto

Para la síntesis en sistema abierto se tomó de referencia el método planteado por Li y colaboradores (2013), al cual se le realizaron modificaciones. El método consistió en mezclar 5 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 mmol de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ y 70 mL de etilenglicol, que se calentaron en un sistema a reflujo a 160°C por 2 h; en la Figura 2.4 se muestra el sistema de reacción.

La mezcla resultante se centrifugó a 10000 rpm por 10 min. Posteriormente, el sobrenadante se retiró y el sedimento se recolectó en un crisol de porcelana. Para obtener el sólido magnético, el crisol se colocó en la mufla a 250°C por 15 min. El sólido obtenido se almacenó en un vial de vidrio cerrado herméticamente, para su caracterización.

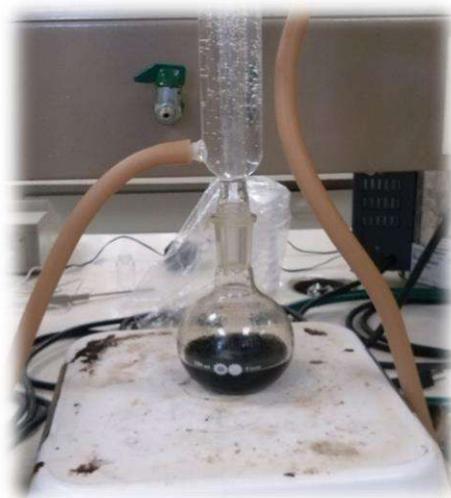


Figura 2.4. Sistema de reacción para la síntesis solvotérmica en sistema abierto.

2.3.2. Síntesis por microondas

La síntesis de MNPs se realizó en un equipo de microondas MONOWAVE Extra de Anton Ex. Primeramente, se realizó una síntesis bajo las siguientes condiciones: 590 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de acetato de amonio y 400 mg de citrato trisódico (amortiguadores de pH) en 6 mL de etilenglicol.

Para la síntesis por microondas se realizaron dos diseños de experimentos: 1) un diseño factorial 2^2 , para evaluar el efecto de los tiempos de

reacción (de gradiente y fijo); y 2) un diseño Box-Benhken para optimizar la síntesis. Estos procedimientos se detallan a continuación.

2.3.2.1. Efecto de los tiempos de reacción

Previo a la optimización de la síntesis, se realizó un diseño experimental Plackett-Burman, el cual es un diseño factorial fraccionado 2^n y se utilizó para evaluar el efecto del tiempo de gradiente, el cual es el tiempo en que aumenta la temperatura de 25 a 290°C, tomando como base lo reportado por Kozakova y colaboradores (2011). El rendimiento de la síntesis se tomó como factor respuesta. Se evaluaron dos tiempos de gradiente $t_1=1$ min y $t_2=3$ min, y se tomaron tiempos fijos de 3 y 7 min. La matriz del diseño realizado se muestra en la Tabla 2.2.

En cada experimento del diseño factorial planteado se mezclaron 590 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 mg de acetato de amonio y 400 mg de citrato trisódico (amortiguadores de pH), en 6 mL de etilenglicol. La mezcla se adicionó en un vial de reacción (G30) y se colocó en el equipo de microondas.

Transcurrido el tiempo de reacción, el sólido formado se separó utilizando un magneto de neodimio de 30000 Gauss, y se lavó con etanol al 70%. Finalmente, el sólido se secó en una estufa a 60°C y posteriormente se pesó. El rendimiento se calculó a partir de estequiometría.

2.3.2.2. Optimización de la síntesis

Se realizó una modificación a la metodología descrita por Li y colaboradores (2013), con la finalidad de optimizar el tamaño de partícula, mediante un diseño Box-Benhken.

Se tomaron como factores de control: la cantidad en mg de acetato de amonio (Factor A), ya que evita la aglomeración; la temperatura de reacción (Factor B), que influye favorablemente en la cinética de la reacción; y el tiempo de reacción (Factor C), al ser un parámetro termodinámico importante.

En la Tabla 2.1 se presentan los niveles de los factores de control elegidos. Los factores fijados fueron la cantidad de concentración de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

(590 mg), la cantidad de citrato trisódico (400 mg), el volumen de etilenglicol (6 mL) y el tiempo de gradiente (7 min).

Una vez definidas las condiciones de cada experimento, de acuerdo a la matriz del diseño (Tabla 2.3), los reactivos se mezclaron y se adicionaron en un vial de reacción para equipo de microondas (G30) y se colocaron en el carrusel del equipo. Al finalizar la síntesis, el sólido obtenido se separó del sobrenadante con la ayuda de un magneto de neodimio de 30000 Gauss y se lavó con etanol al 70%. Finalmente, el producto resultante se secó a 60°C para su caracterización y funcionalización. Cada experimento se realizó por duplicado.

Tabla 2.1. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización del tamaño.

Factor de control	Descripción	Niveles seleccionados		
		-1	0	1
Factor A	Cantidad de CH ₃ COONH ₄ , mg	300	400	500
Factor B	Temperatura, °C	255	265	275
Factor C	Tiempo fijo, min	5	7.5	10

2.2.1.1. Funcionalización

Para la funcionalización de los sólidos magnéticos obtenidos se realizó una modificación a la metodología descrita por Mashhadizadeh y colaboradores (2011). Para ello, los sólidos obtenidos se mezclaron con 6 mL de una solución etanólica de 3-(trimetoxisilil)-1-propantol (TMSPT) al (10%). La mezcla se sometió a calentamiento por microondas a 135°C durante 5 min; posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente y se realizaron lavados con agua desionizada.

Una vez obtenidas las partículas funcionalizadas se suspendieron en 1 mL de una solución de 2-amino-5-mercapto-1,3,4-tiadizol (AMT) en dimetil formamida (DMF) al 1% y se sometieron a ultrasonido durante 5 min. El sólido obtenido se lavó con etanol al 70% y se secó a 60°C.

2.3.3. Caracterización de los soportes magnéticos

2.3.3.1. Espectroscopia en el infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FT-IR Spectrum GX de Perkin Elmer y a partir de una pastilla de KBr, mezclando la muestra (soporte magnético) con KBr en relación 1:100.

2.3.3.2. Difracción de rayos X de polvos

Para los sólidos sintetizados por el método solvotérmico abierto y por microondas se determinó la composición y la estructura cristalina de la magnetita por difracción de rayos X (DRX) de polvos, con la finalidad de observar diferencias entre los métodos. Para ello, la muestra previamente seca se colocó y se distribuyó de manera uniforme en un portamuestras. Posteriormente, se realizó el análisis de la muestra en un difractómetro Equinox 2000 durante 5 min utilizando radiación de cobalto ($K_{\alpha 1}=1.789010 \text{ \AA}$) a 30 kV y 20 mA).

Para visualizar el patrón de difracción obtenido para cada una de las muestras y comparar con los difractogramas estándar de la base de datos de cristalografía (COD) se utilizó el programa Match! 3 (Crystal Impact, Alemania).

Los parámetros de DRX se utilizaron para hacer una estimación del tamaño de partícula de los polvos obtenidos, a partir de la ecuación de Debye-Scherrer (Ecuación 2.2).

$$\tau = \frac{K\lambda}{B\cos\theta} \quad (2.2)$$

donde: K es un factor de forma (esférica) con valor 0.9, λ es la longitud de onda de la radiación del análisis ($K_{\alpha 1}=0.178 \text{ nm}$), B ancho de pico medio, y θ es el máximo del pico 2θ (Leroy et al., 1949).

2.3.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los soportes magnéticos, así como su composición, se determinaron en un equipo de microscopia electrónica de barrido modelo JSM-6300 (JEOL®, Japón), con análisis elemental por espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS, por sus siglas en inglés).

Antes de analizar las muestras, éstas se dispersaron con ondas ultrasónicas utilizando acetonitrilo como disolvente, con el fin de reducir la aglomeración provocada por la fuerte interacción magnética que hay entre las partículas.

2.2.1.2. Difracción de luz dinámica (DLS)

Este análisis se realizó para estimar la distribución del tamaño del radio hidrodinámico de los sólidos obtenidos en la optimización de la síntesis. El equipo utilizado fue de la marca Malvern modelo Zetasizer Nano seriesmzs90. Para ello se pesaron 2 mg de muestra y se le adicionaron 10 mL de etanol al 70%, después se dispersaron por ultrasonido durante 30 min. Antes de analizar las muestras, se repitió la dispersión por ultrasonificación durante 60 s. La lectura se realizó por triplicado.

2.3.3.4. Potencial zeta

La medición de potencial zeta (ζ) se realizó en un equipo Malvern Zetasizer 3000. Para ello, se prepararon suspensiones en KNO_3 1×10^{-2} mol L^{-1} . Las medidas se realizaron a diferentes valores de pH, en el intervalo de 2-9. El control del pH se realizó por adición de solución de HNO_3 1:1 o NaOH 1:1.

2.3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los diseños de experimentos se realizó en el software Minitab (v.17).

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Soportes magnéticos sin funcionalizar

2.4.1.1. Sistema abierto

La Figura 2.5 muestra el difractograma obtenido de las partículas de hierro. Al comparar los resultados con la COD se observan dos fases cristalinas: la magnetita y la hematita con formas cúbicas y trigonales. Para la magnetita se observan los picos característicos en 42° (311), 77° (404) y 35° (202) y para hematita los picos característicos en 51° (110), 38° (104) y 63° (116).

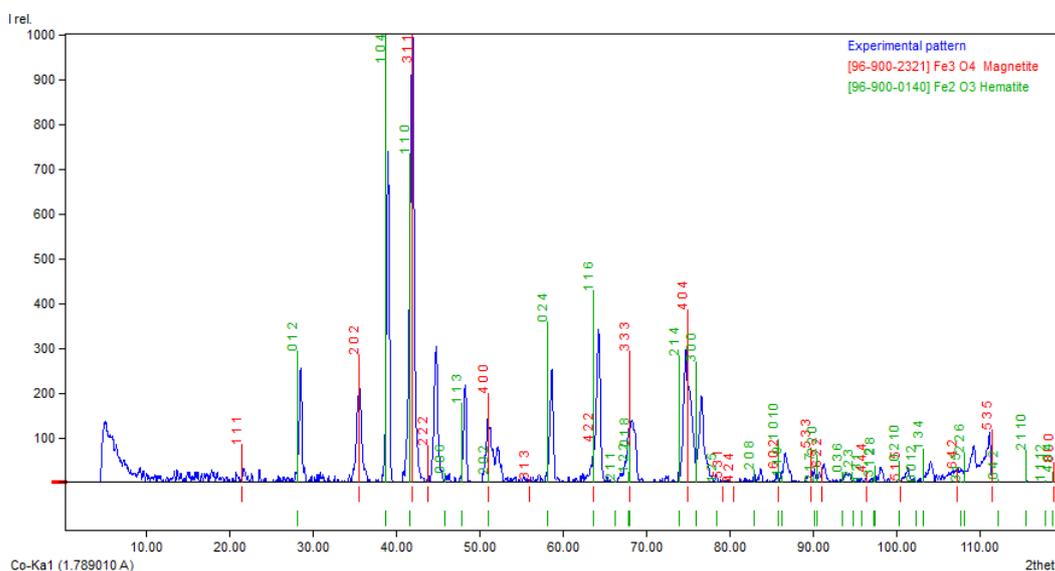


Figura 2.5. Difractograma del soporte magnético obtenido (azul) comparado con el patrón de difracción estándar de magnetita (rojo) y hematita (verde).

La Tabla 2.2 muestra los resultados de los cálculos realizados para la estimación del tamaño de partícula de los soportes magnéticos sin funcionalizar (obtenidos de la síntesis en sistema abierto) a partir de la ecuación de Debye-Scherrer.

La ecuación de Debye-Scherrer ha sido utilizada por otros autores para calcular el tamaño de partícula de nanopartículas magnéticas funcionalizadas (Kim et al., 2007; Nipelö et al., 2014) y los resultados han mostrado concordancia con datos obtenidos por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Tabla 2.2. Estimación de los tamaños de partícula mediante la ecuación de Debye-Scherrer para el soporte obtenido por un sistema abierto.

Parámetro	Valor
Θ	41.96
B (grados)	0.5058
B (rad)	0.0088
τ (nm)	24.40

La síntesis que se planteó para sistema abierto no ha sido reportada previamente, ya que requiere de mayor energía para llevarse a cabo, sin embargo, la estimación del tamaño de partícula es un indicativo que a partir de este método se pueden obtener nanopartículas magnéticas.

2.4.1.2. Sistema por microondas

La Figura 2.6 muestra el difractograma obtenido de las partículas de hierro sintetizadas por microondas. Al comparar los resultados obtenidos con la COD se observa una sola fase cristalina, que corresponde a la magnetita y tiene una forma cúbica. Se observan los picos característicos en 42° (311), 77° (404) y 35° (202).

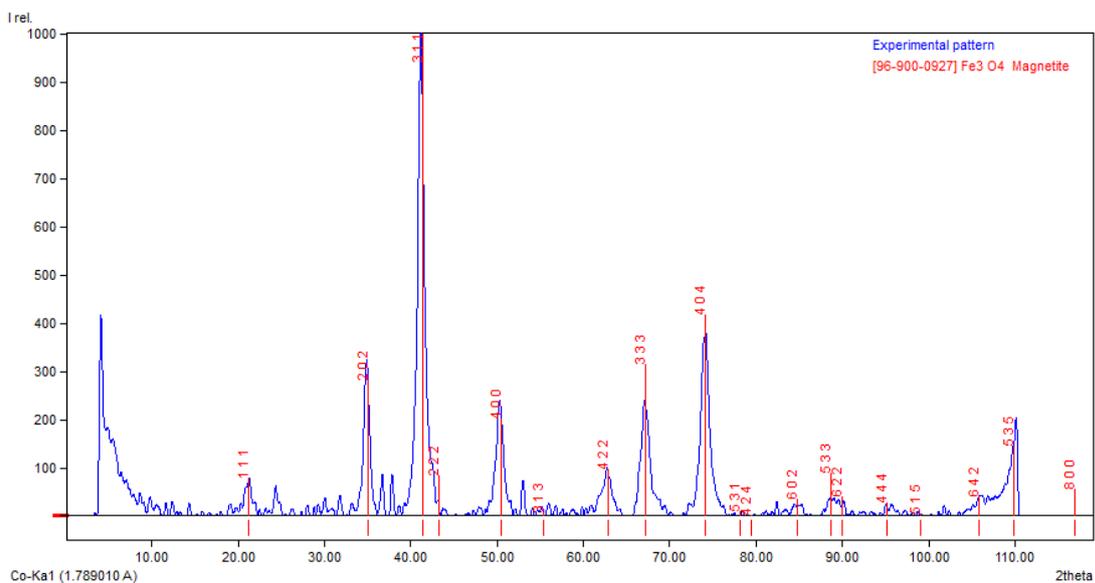


Figura 2.6. Difractograma del soporte magnético obtenido (azul) comparado con el patrón de difracción estándar de magnetita (rojo).

Nuevamente, se realizó la estimación del tamaño de partícula utilizando la Ecuación 2.2. La Tabla 2.3 muestra los resultados. Al comparar los resultados de DRX de los soportes magnéticos obtenidos por los dos métodos, se optó por la síntesis solvotérmica por microondas, debido a la reducción de tiempo en la síntesis y las características de los soportes obtenidos por este método.

Tabla 2.3. Estimación de los tamaños de partícula mediante la ecuación Debye-Scherrer para el sistema por microondas.

Parámetro	Valor
Θ	41.39
B (grados)	0.8
B (rad)	0.0139
τ (nm)	15 nm

Demazeau (2011) considera que el principal factor en los procesos solvotérmicos es la temperatura, debido a que modifica el estado de oxidación de los metales que se utilizan en la síntesis por lo que se favorece una estructura y un tamaño específico para un determinado material.

Por otro lado, Kappe (2004) reportó las ventajas de la síntesis asistida por microondas las cuales se relacionan con la transformación eficiente de energía y la distribución uniforme de calor en el sistema. Li y colaboradores (2013) sintetizaron MNPs mediante el método solvotérmico asistido por microondas obteniendo partículas con un tamaño estimado de 13.56 nm y altamente magnéticas.

2.4.2. Efecto de los tiempos de reacción

Para evaluar si el efecto de los tiempos de reacción (de gradiente y fijo) eran significativos en el método de síntesis de soportes magnéticos por microondas, se llevó a cabo un diseño factorial fraccionado, tipo Plackett-Burman. A los soportes magnéticos analizados no se les realizó un tratamiento de funcionalización. Los resultados obtenidos del diseño realizado se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Diseño factorial fraccionado 2^2 de tipo Plackett-Burman para evaluar el efecto del tiempo en el rendimiento de la síntesis de soportes magnéticos.

Experimentos	Tiempo de gradiente (min)	Tiempo fijo (min)	Rendimiento, %
1	3	7	72.01
2	3	3	72.44
3	1	7	74.58
4	1	7	56.44
5	1	3	90.26
6	3	3	93.05
7	1	3	81.39
8	3	7	82.87

Posteriormente, se realizó el análisis de datos y se obtuvo el diagrama de Pareto de efectos estandarizados (Figura 2.7), donde se observa que el factor que tiene un efecto positivo sobre el rendimiento es el tiempo de gradiente t_2 . Por ello, para la optimización de síntesis se utilizó un tiempo de gradiente de 7 min.

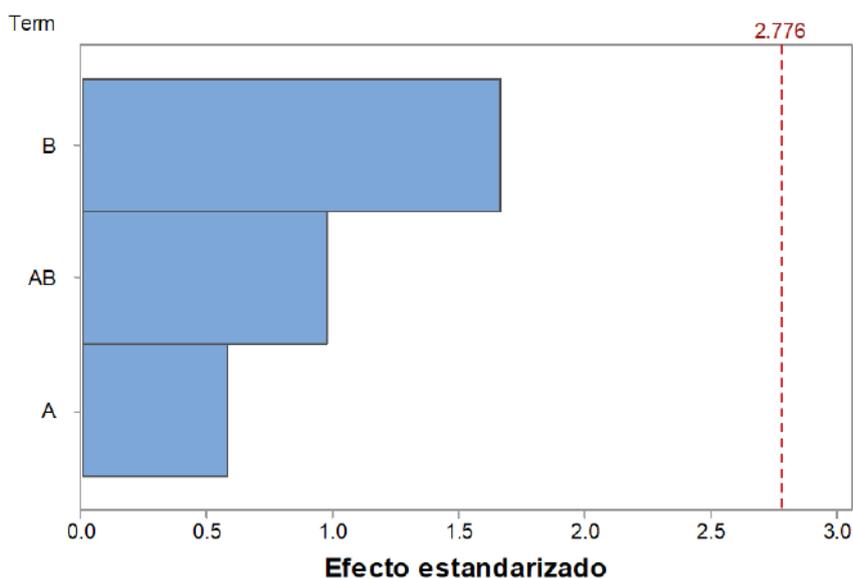


Figura 2.7. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para evaluar el efecto de los tiempos de reacción ($\alpha=0.05$).

Como se discutió en la sección 2.4.1.2., la temperatura es uno de los factores de mayor impacto en los procesos solvotérmicos, debido a que tiene un

efecto en el tamaño y la estructura de la partícula obtenida. Al aumentar la temperatura en un tiempo de gradiente mayor se observa un mayor rendimiento, esto podría asociarse a una mejor distribución de temperatura en el sistema por lo que se facilitan las reacciones de síntesis de los soportes magnéticos.

2.4.3. Optimización

Los análisis que se realizaron para evaluar el diseño de experimentos planteado para la optimización de la síntesis se realizaron con los soportes magnéticos funcionalizados.

La funcionalización de los soportes magnéticos ha sido reportada para la extracción en fase sólida de Ag, Cd, Cu y Zn presentes en muestras medioambientales (Mashhadizadeh & Karami, 2011) y para la extracción en fase sólida magnética de AFB1 y AFB2 (Hashemi et al., 2014). Mashhadizadeh y Karami (2011) propusieron el mecanismo de la modificación de la superficie de MNPS con TMSPT y ATM, el cual se presenta en la Figura 2.8.

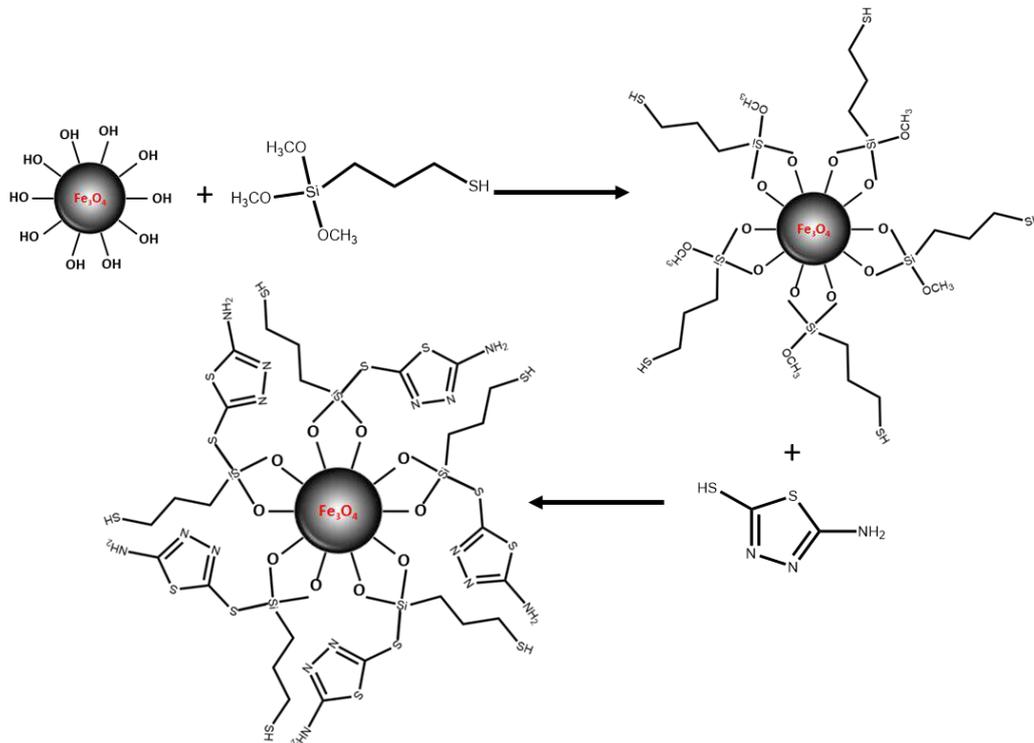


Figura 2.8. Funcionalización de nanopartículas de magnetita con TMSPT y ATM

De acuerdo al diagrama presentado en la Figura 2.8, los grupos funcionales con los cuales pueden interaccionar las aflatoxinas son los amino (-

NH₂) y los tiol (-SH). Hashemi y colaboradores (2014a) reportan que los grupos amino y tiol pueden interaccionar con los grupos carbonilo del anillo de lactona de AFB1.

Para evaluar el diseño de experimentos que se presenta en la Tabla 2.5 se realizaron algunas medidas, que involucraron distribución de diámetro hidrodinámico (medido por DLS), estabilidad de las partículas magnéticas funcionalizadas en solución (a través de las medidas de potencial zeta) y tamaño de partícula (utilizando las medidas de DRX).

2.4.3.1. DLS y potencial zeta

Los análisis por DLS se realizaron con el fin de estimar la distribución del tamaño de partícula (medido como diámetro hidrodinámico) de los sólidos obtenidos en cada experimento mostrado en la matriz de la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Matriz del diseño de experimentos y resultados obtenidos para el diámetro hidrodinámico medido por DLS. Factores: A, cantidad de acetato de amonio (mg); B, temperatura (°C); C, tiempo (min); R, respuesta (diámetro hidrodinámico (nm)).

Experimento	Factores			
	A	B	C	R
1	300	255	7.5	912±75
2	500	255	7.5	507±42
3	300	275	7.5	890±92
4	500	275	7.5	1380±141
5	300	265	5	955±0
6	500	265	5	968±201
7	300	265	10	955±0
8	500	265	10	785±240
9	400	255	5	825±0
10	400	275	5	2490±262
11	400	255	10	955±0
12	400	275	10	1200±120
13	400	265	7.5	1920±414
14	400	265	7.5	755±121
15	400	265	7.5	982±285

Las desviaciones estándar de los valores del diámetro hidrodinámico de la Tabla 2.5 son muy altas. De hecho, en la mayoría de experimentos se obtienen hasta dos distribuciones de tamaño diferentes (experimentos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 y 15). En la Figura 2.9 se presentan las gráficas de distribución del diámetro hidrodinámico obtenidas de las réplicas del experimento 12.

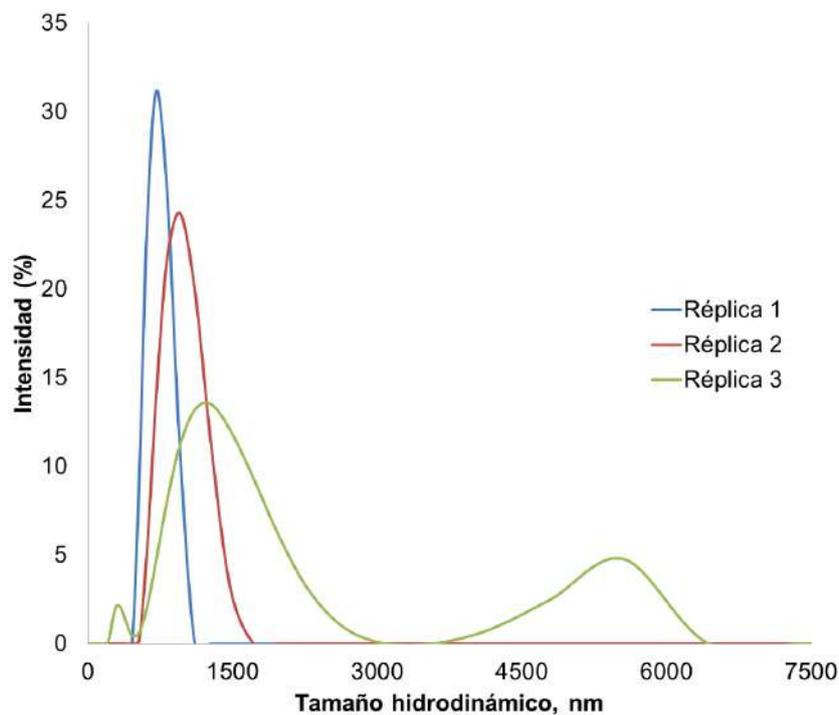


Figura 2.9. Gráficas de distribución del diámetro hidrodinámico para el experimento 12 del diseño de experimentos.

La dispersión que presentan las gráficas de distribución mostradas en la Figura 2.9 se puede deber a que los sólidos magnéticos analizados presentan alta saturación magnética, lo que evita que en suspensión sean estables y se aglomeren. Para comprobar esto, se realizaron mediciones de potencial zeta a diferentes valores de pH, para cada uno de los sólidos obtenidos de la matriz mostrada en la Tabla 2.5, esto ayudó a determinar la estabilidad de las partículas magnéticas en suspensión.

Los resultados de las medidas de potencial zeta (ζ) permitieron agrupar los sólidos obtenidos en cada experimento, dependiendo del comportamiento que presentaron en suspensión con respecto al pH (Figura 2.10).

Los experimentos que integran cada grupo (Figura 2.10) son:

- Grupo A: experimentos 7 y 13.
- Grupo B: experimentos 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11 y 14.
- Grupo C: experimento 6.
- Grupo D: experimentos 1 y 12.
- Grupo E: experimentos 5 y 15.

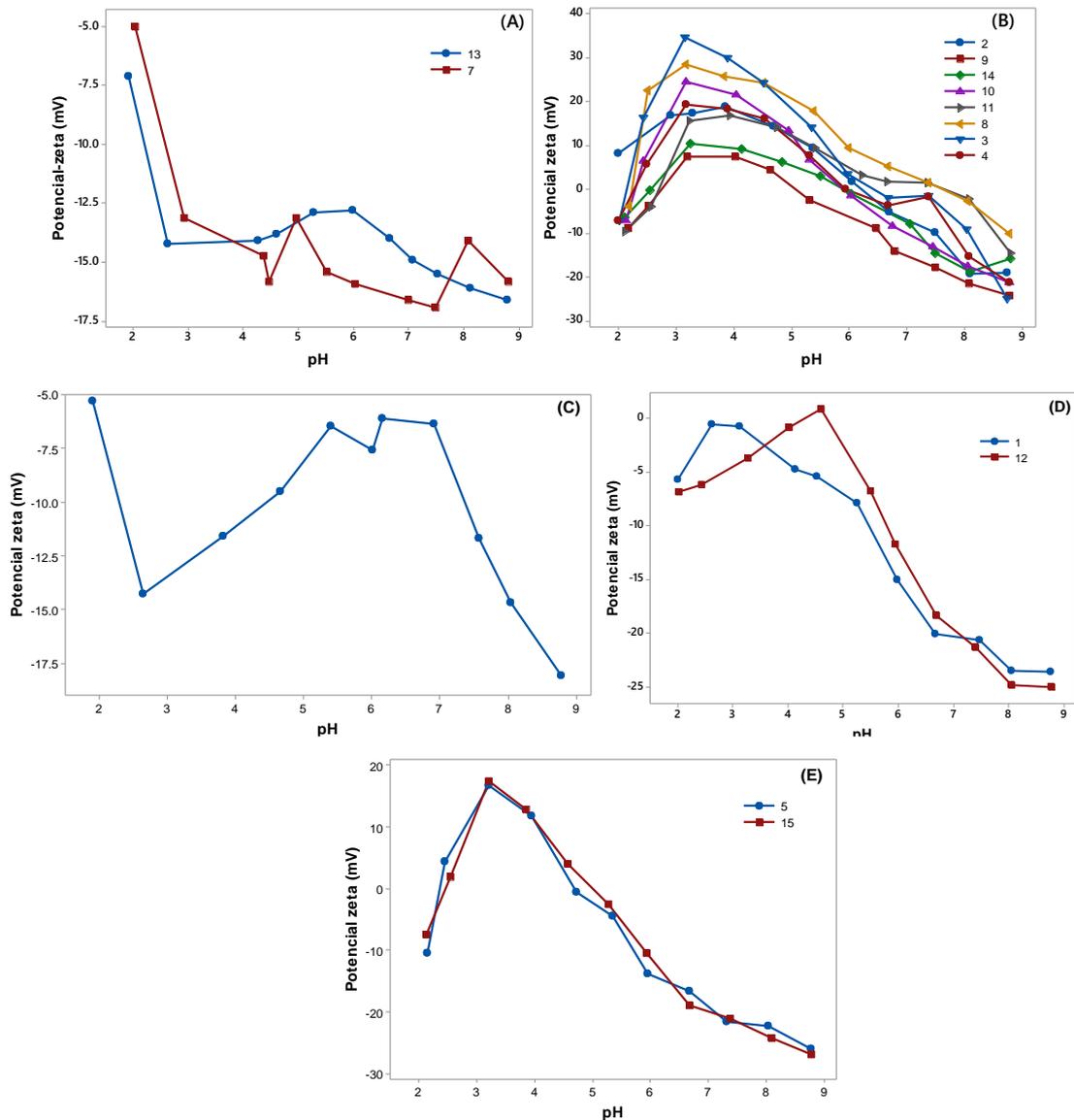


Figura 2.10. Variación del potencial zeta de las partículas magnéticas en suspensión como función del pH.

Las medidas del potencial zeta permiten estimar la estabilidad de la suspensión coloidal (Cosgrove, 2010). El sistema coloidal es estable cuando las

fuerzas que causan la repulsión de las partículas juegan un papel importante. Valores absolutos altos de potencial zeta indican la mayor probabilidad de que la suspensión sea estable, mientras que valores muy pequeños indican una tendencia a la desestabilización del sistema (Salopek et al., 1992).

Las suspensiones coloidales presentan la menor estabilidad en el punto isoeléctrico, donde la carga total de la capa de difusión alrededor de las partículas es igual a cero ($\zeta \approx 0$ mV). Aunque en la literatura, no hay reportes en los que las relaciones entre el valor potencial zeta y la estabilidad de sistemas coloidales estén estrictamente definidas, se ha asumido que los sistemas caracterizados por valores absolutos del potencial electrocinético en el rango de 31 a 40 mV tiene una moderada estabilidad (Ostolska & Wiśniewska, 2014). La Tabla 2.6 muestra los cambios en la estabilidad de las suspensiones.

Tabla 2.6. Cambios en la estabilidad de las suspensiones (Salopek et al., 1992).

Evaluación de la estabilidad	Potencial zeta (mV)
Máxima aglomeración y precipitación	0...±3
Región de fuerte aglomeración y precipitación	±5
Inicio de la aglomeración	±10...±15
Inicio de la peptización	±16...±30
Estabilidad media	±31...±40
Buena estabilidad	±41...±60
Muy buena estabilidad	±61...±80
Extremadamente buena estabilidad	±81...±100

De acuerdo a la información presentada en la Tabla 2.6, los sólidos del grupo A y C son los de menor estabilidad; de hecho, sus potenciales zeta se encuentran entre -5 y -17.5 mV, lo que indica que presentan aglomeración; este fenómeno se debe a que el recubrimiento superficial influye en el comportamiento de agregación, ya que las partículas no se están estabilizando por repulsión electrostática después de la funcionalización (Griffete et al., 2012).

Los sólidos del grupo B, aunque siguen la misma tendencia, sus potenciales zeta son variados, es decir, los experimentos 9 y 14 presentaron valores menores a 10 mV, lo que indica que hay un inicio de la aglomeración;

mientras que los demás experimentos presentan valores entre 16 y 30 mV, lo que indica que está iniciando la peptización.

Los experimentos del grupo D tuvieron valores de potencial zeta menores a 0 mV y hasta -25 mV, lo que los ubica en inicio de peptización, es decir, que también son inestables en suspensión.

Estos resultados permiten verificar que las medidas de radio hidrodinámico presentaron mucha variación, e incluso tamaños muy superiores a los obtenidos por DRX, debido a que sufren aglomeración en suspensión, lo que provoca que el tamaño de partícula medido por DLS presente valores extremadamente altos, además de que sus desviaciones estándar son muy altas (Tabla 2.5).

2.4.3.2. DRX

Para la optimización de la síntesis de las MNP se tomó como respuesta el tamaño de partícula calculado a partir de datos de difracción de rayos X y utilizando la ecuación de Debye-Scherrer (Ecuación 2.2). En la Tabla 2.7 se muestran los tamaños de partícula en nm.

Una vez realizados los experimentos del diseño experimental, se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados, obteniendo el polinomial de la Ecuación 2.3, que representa el efecto de cada uno de los factores (codificados) sobre la respuesta (tamaño de partícula), donde los factores son: A, cantidad de acetato de amonio; B, temperatura; y C, el tiempo.). La ecuación polinomial presentó un coeficiente de correlación (R^2) de 0.7692.

$$R = 1643 + 0.244A - 12.7B + 1.8C + 0.000436 A^2 + 0.0248B^2 - 0.563C^2 \\ - 0.00207AB + 0.00041AC + 0.0252BC$$

(2.3)

De acuerdo con la Ecuación 2.3, la temperatura presentó el coeficiente con un mayor efecto negativo en la respuesta; los factores que tuvieron un efecto positivo en la respuesta fueron el tiempo y la interacción de la temperatura y el tiempo.

Tabla 2.7. Matriz del diseño de experimentos Box-Behnken y resultados obtenidos tamaño de partícula mediante DRX. Factores: A, cantidad de acetato de amonio (mg); B, temperatura (°C); C, tiempo (min); R, respuesta (tamaño de partícula (nm)).

Experimento	Factores			
	A	B	C	R
1	300	255	7.5	11.46
2	500	255	7.5	31.64
3	300	275	7.5	10.90
4	500	275	7.5	22.79
5	300	265	5	10.71
6	500	265	5	12.96
7	300	265	10	13.23
8	500	265	10	15.89
9	400	255	5	12.33
10	400	275	5	10.17
11	400	255	10	11.21
12	400	275	10	11.59
13	400	265	7.5	12.94
14	400	265	7.5	13.43
15	400	265	7.5	10.70

Una vez realizado el análisis de datos se obtuvieron las superficies de respuesta y los gráficos de contorno para el tamaño de partícula.

2.4.3.3. Efecto de la cantidad de acetato de amonio y la temperatura sobre el tamaño de partícula.

En la superficie de respuesta y el gráfico de contorno que describen el efecto la cantidad de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Factor A) y la temperatura (Factor B) sobre la respuesta (Figura 2.10), se observa que cuando la cantidad de acetato de amonio es baja (300 mg) y la temperatura está en los niveles centrales (265) se obtienen menores tamaños de partícula.

Demazeau (2011) reporta que el principal factor que se considera en la síntesis solvotérmica es la temperatura, debido a que controla la nucleación y contribuye a la formación de una estructura específica. En la Figura 2.11 se

observa un incremento en el tamaño de partícula cuando se aumenta la temperatura por lo que se puede relacionar con la nucleación y formación del soporte magnético.

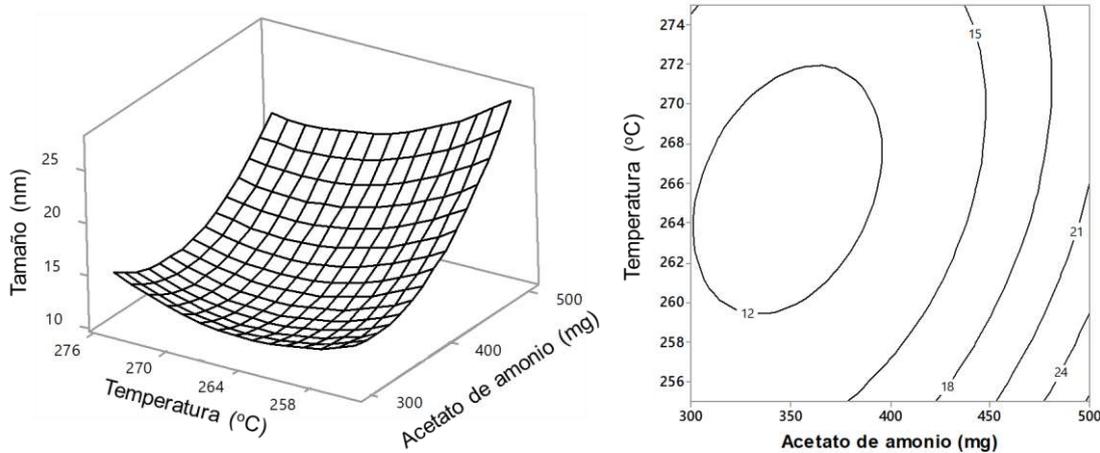


Figura 2.11. Efecto de la cantidad de acetato de amonio (mg) y la temperatura (°C) sobre el tamaño de partícula (nm).

2.4.3.4. Efecto de la cantidad de acetato de amonio y el tiempo

La superficie de respuesta y el gráfico de contorno del efecto de la cantidad de acetato de amonio (Factor A) y el tiempo (Factor C) sobre la respuesta se muestran en la Figura 2.12 observando un menor tamaño de partícula cuando la cantidad de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ es baja (500 mg) y el tiempo disminuye (5 min).

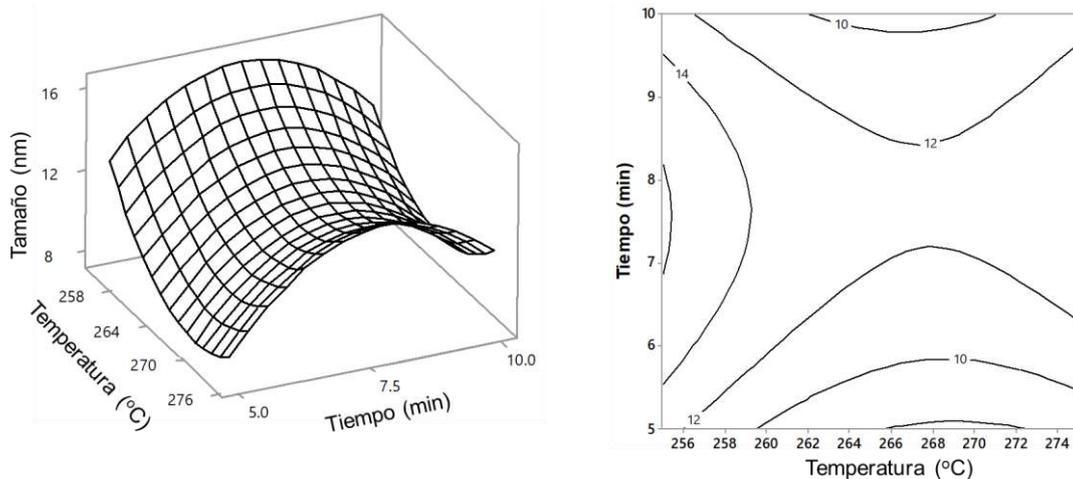


Figura 2.12. Efecto de la cantidad de acetato de amonio (mg) y el tiempo (s) sobre el tamaño de partícula (nm).

Wei y colaboradores (2013) reportan que para optimizar el tamaño y la forma de las nanopartículas se incrementa la temperatura o el tiempo de reacción debido a que tiene un efecto sobre la nucleación y formación de la partícula.

2.4.3.5. Efecto del tiempo y la temperatura

En la Figura 2.13 se muestra el efecto de la temperatura (Factor B) y el tiempo (Factor C) en el tamaño de partícula. Se observa que cuando se usa un tiempo la temperatura es baja (255°C) y el tiempo es bajo (5 min) el tamaño de partícula disminuye. La síntesis por método solvotérmico requiere altas temperaturas y tiempos largos, los cuales pueden ser reducidos por el uso de microondas (Kozakova et al., 2010). La interacción de la temperatura y el tiempo tuvo un efecto sobre la respuesta, cuando la temperatura está en los niveles centrales (265°C) con tiempos menores de 7 min se observa una disminución del tamaño de partícula.

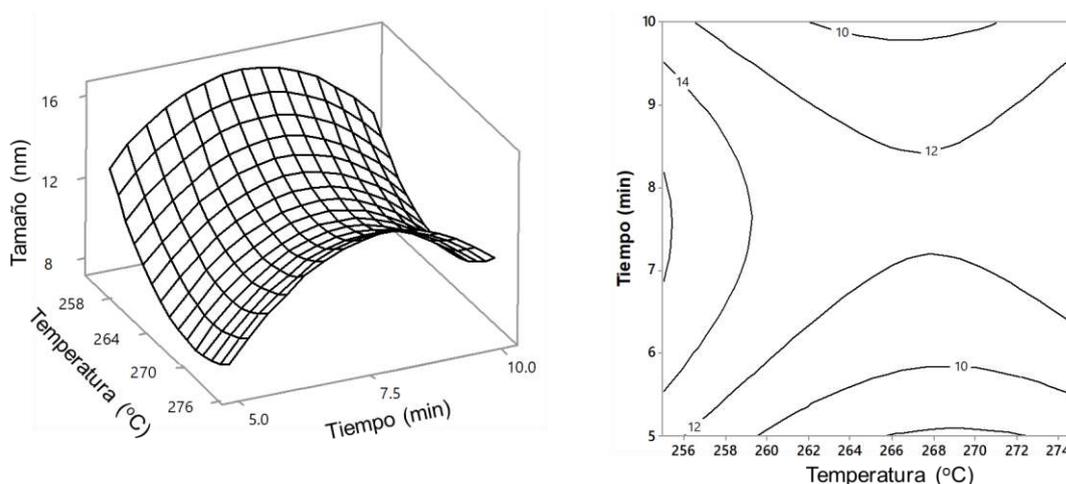


Figura 2.13. Efecto de la temperatura (°C) y el tiempo (s) sobre el tamaño de partícula (nm).

2.4.4. Experimentos confirmatorios

Una vez analizados los datos, se obtuvieron las condiciones óptimas de síntesis. Debido a que se obtienen tamaños de partícula entre 10 y 32 nm, se realizaron por triplicado experimentos confirmatorios con el fin de evaluar la confiabilidad del modelo teórico polinomial (Ecuación 2.3.)

En la Tabla 2.8 se observan los resultados obtenidos a las condiciones óptimas de síntesis, experimentalmente se tienen un tamaño de partícula de 14.19 nm con un %RSD de 0.04.

Tabla 2.8. Experimentos confirmatorios para la optimización del tamaño de partícula. Factores: A, cantidad de acetato de amonio (mg); B, temperatura (°C); C, tiempo (min); R, tamaño de partícula (nm).

Experimentos confirmatorios	Factores de control			R	
	A	B	C	Teórico	Experimental (n=3, %RSD)
3	350	255	10	10.51	14.19 (0.039)

La síntesis solvotérmica asistida por microondas tiene muchas ventajas, entre las que se pueden destacar: el incremento de la cinética de reacción, la temperatura deseada se alcanza de manera rápida, hay cristalización selectiva, buena fiabilidad y confiabilidad (Dhage et al., 2002; Komarneni et al., 2002).

La síntesis de MNPs mediante el método solvotérmico acoplado con microondas y utilizando como precursor el acetato de amonio, ya ha sido reportada previamente por Kozakova y colaboradores (2011), quienes reportan tamaños de partícula de aproximadamente 60 nm; sin embargo, la metodología planteada en este trabajo permite lograr tamaños de partícula menores a los reportados con anterioridad.

2.4.5. Caracterización de los soportes magnéticos funcionalizados

2.4.5.1. FT-IR

Una vez obtenidos los soportes magnéticos funcionalizados optimizados, se realizó el análisis por espectroscopia en el infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), el espectro obtenido se muestra en la Figura 2.14. Se observa una banda entre 3265-3080 cm^{-1} , debido a la vibración de estiramiento de grupos hidroxilo (-OH), los cuales están unidos a la superficie de la magnetita. Las bandas en 1108-1039 cm^{-1} corresponden a la vibración de estiramiento de -O-Si, la banda en 2955 cm^{-1} corresponde al estiramiento -CH y la de 1445 cm^{-1} se atribuye a -CH₂. La banda en 578 cm^{-1} corresponde a enlaces metal-oxígeno;

mientras que las que se encuentran en 1404 y 1634 cm^{-1} son debidas al estiramiento de grupos $-\text{CN}$ y anillos heterociclo, respectivamente. Estas bandas indican la inmovilización de TMSPT y AMT en la superficie de las MNPs (Mashhadizadeh, 2013).

Las bandas presentes en el espectro de FT-IR concuerdan con lo reportado por otros autores para magnetita funcionalizada con TMSPT y ATM (Mashhadizadeh et al., 2013; Hasemi et al., 2013^a; Hashemi et al., 2013b).

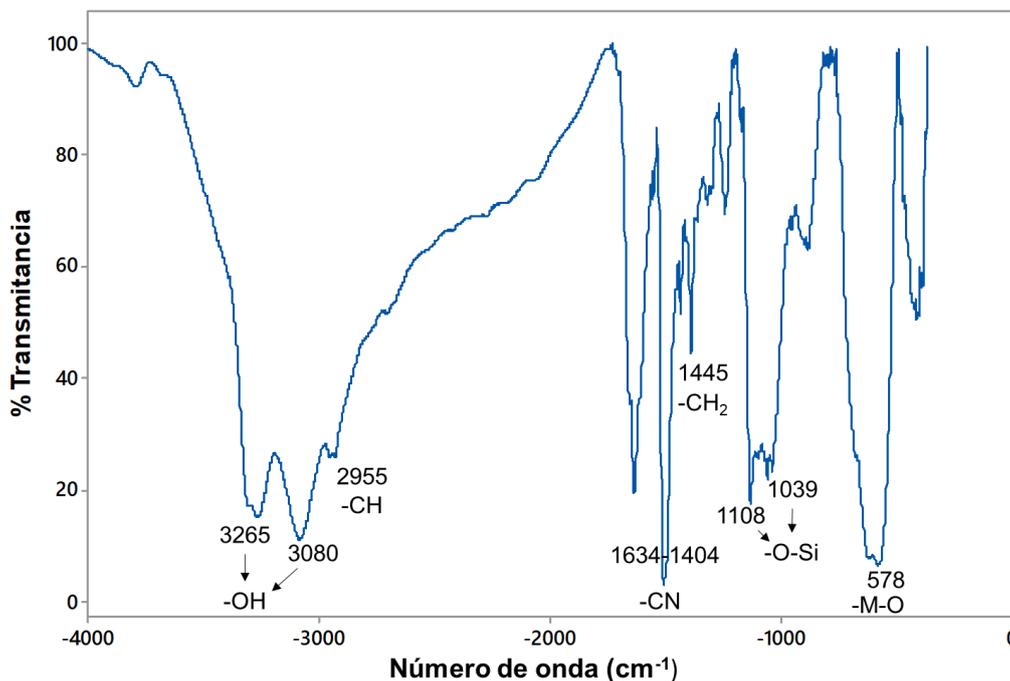


Figura 2.14. Espectro de Infrarrojo de soportes magnéticos funcionalizados con TMSPT y AMT.

2.4.5.2. SEM

En la Figura 2.15A se observan los soportes magnéticos funcionalizados, los cuales tienen una distribución homogénea y un tamaño pequeño.

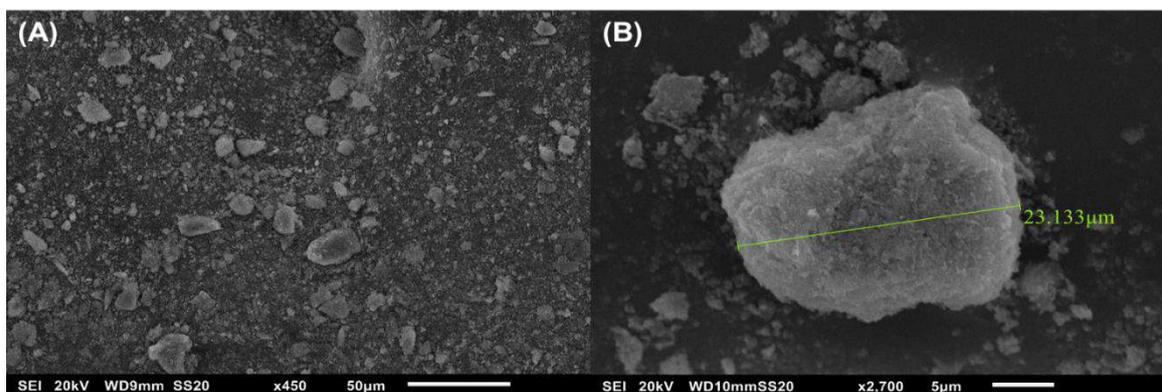


Figura 2.15. Imágenes SEM de los soportes magnéticos funcionalizados con aumento 450x (A) y 2700x (B).

Por otro lado, se observan aglomerados de mayor tamaño (Figura 2.15B) y esto puede estar asociado a la alta saturación magnética presente en los soportes magnéticos.

2.4.5.3. EDS

La Figura 2.16 muestra el espectro EDS obtenido de las soportes magnéticos funcionalizados, se observa la presencia de los componentes de la magnetita, con una distribución del 10.09% para el hierro y 28.97% para el oxígeno. Además, se muestra la presencia de Si, S, C y N con una distribución del 1.72, 6.33, 40.00 y 12.88% respectivamente. Cabe destacar que los elementos antes mencionados son componentes del TMPST y del AMT, por lo que el proceso de funcionalización se realizó correctamente.

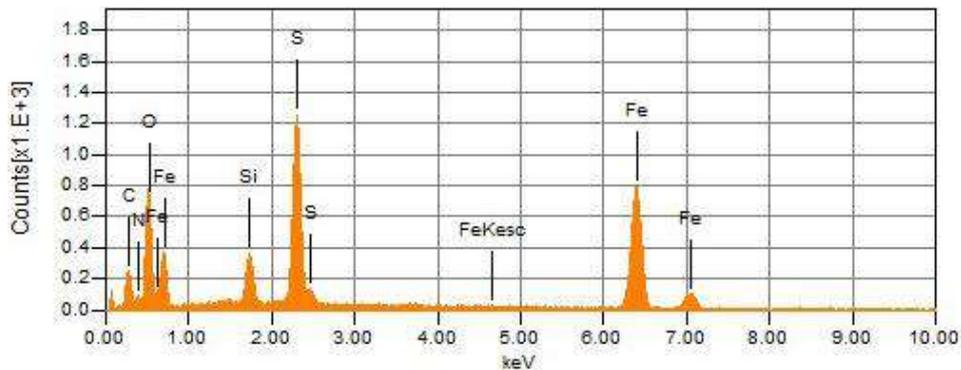


Figura 2.16. Espectro EDS del soporte magnético funcionalizado.

Por otro lado, se obtuvieron las distribuciones elementales de los soportes magnéticos funcionalizados, se observa una distribución homogénea de los átomos de hierro, oxígeno, azufre silicio (Figuras 2.17 B, D, E y F) mientras que la distribución de los átomos de carbono y nitrógeno (Figuras 2.17 A y C) no son muy homogéneas, pero si están presentes en los soportes magnéticos.

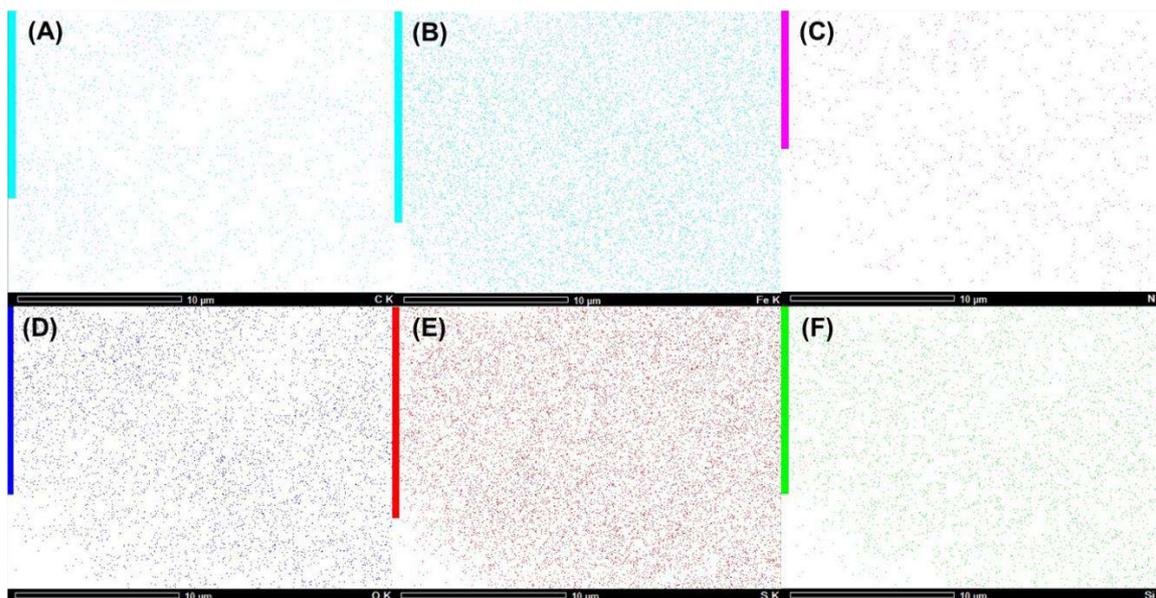


Figura 2.17. Distribución elemental de los átomos de carbono (A), hierro (B), nitrógeno (C), oxígeno (D), azufre (F) y silicio (E).

2.5. Conclusiones

Se sintetizaron nanopartículas magnéticas mediante un método solvotérmico en dos diferentes modalidades (abierto y por microondas), obteniendo menores tamaños de partícula en el sistema por microondas.

Por otro lado, se establecieron las condiciones óptimas para obtener materiales magnéticos de tamaño de partícula nanométrico que sirvan como soportes de extracción.

Los factores que más influyeron en el tamaño de partícula de los soportes magnéticos sintetizados por microondas fueron la temperatura y el tiempo de reacción.

El tiempo de reacción para obtener soportes magnéticos nanométricos fueron menores a los reportados en la literatura.

Los soportes magnéticos funcionalizados se caracterizaron mediante FT-IR, obteniendo señales similares a las reportadas en la literatura por lo que la funcionalización con TMSPT y AMT recubre la magnetita, la cual puede ser usada como soporte de extracción de AFB1 en los procesos de extracción en fase microsólida magnética dispersiva.

Referencias

- Akbas, M. and Ozdemir, M. (2006). Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and hysicochemical properties of pistachios. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:2099–2104.
- Alcaide-Molina, M., Ruiz-Jiménez, J., Mata-Granados, J., and Luque de Castro, M. (2009). High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solidphase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and determination by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216:1115–1125.
- Cosgrove T. (2010). *Colloid science principles, methods and applications*. New York: Wiley.
- Demazeau G. (2011). Solvothermal and hydrothermal processes: the main physico-chemical factors involved and new trends. *Research on Chemical Intermediates*, 37:107-123.
- Deng H., Li X., Peng Q., Wang X., Chen J., Li Y. (2005) Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microsphere. *Angewandte Chemie International Edition*, 44:2782-2785.
- Faraji M., Yamini Y., Rezaee M. (2010). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7:1-37.
- Shephard G.S. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5:1215-1224.
- Griffete, N., Clift, M.J.D., Lamouric, A., Digigowa R.G., Mihuta, A.M., Finka, A., Rothen-Rutishausera B., Dietsch, H. (2012). Amino covalent binding approach on iron oxide nanoparticle surface: Toward biological applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 415:98-104.
- Gupta A.K., Gupta M. (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26:3995-4021.
- Hashemi M., Taherimaslak Z., Rashidi S. (2014a). Application of magnetic solid phase extraction for separation and determination of aflatoxins B1 and B2

- in cereal products by high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 960:200-208.
- Hashemi M., Taherimaslak Z., Rashidi S. (2014b). Enhanced spectrofluorimetric determination of aflatoxin M1 in liquid milk after magnetic solid phase extraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128:583–590.
- Iida H., Takayanagi K., Nakanishi T., Osaka T. (2007). Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 314: 274–280
- Kappe C.O. (2004). Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 43:6250–6284.
- Kim, M.-J., Lim, B., Jeong, Y.-K., Cho, Y.W., Choa, Y.-H. (2007). Surface modification of magnetite nanoparticles for immobilization with lysozyme. *Journal of Ceramic Processing Research*, 8(4):293-295.
- Kozakova Z., Machovsky M., Babayan V., Pastorek M., Kurita I. (2011). Influence of synthesis parameter on the growth process of magnetic nanoparticles synthesized by microwave assisted solvothermal method. In: NANOCON. Brno: TANGER Ltd, p. 280-286.
- Li C., Wei Y., Liivat A., Zhu Y., Zhu J. (2013). Microwave-solvothermal synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Materials Letters*, 107:23-26.
- Lu A., Salabas E. L., Schuth F. (2007). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46:1222-1244.
- Mascolo M.C, Pei Y., Ring T.A. (2013). Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. *Materials*, 6:5549-5567.
- Mashhadizadeh M. H., Karami Z. (2011). Solid phase extraction of trace amounts of Ag, Cd, Cu, and Zn in environmental samples using magnetic nanoparticles coated by 3-(trimethoxysilyl)-1-propanol and modified with 2-amino-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole and their determination by ICP-OES. *Journal of Hazardous Materials*, 190:1023-1029.

- Mashhadizadeh M.H., Amoli-Diva M., Pourghazi K. (2013). Magnetic nanoparticles solid phase extraction for determination of ochratoxin A in cereals using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1320:17-26.
- Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetism*, 17:1247-1248.
- Murty B. S., Shankar P., Raj B., Murday J. (2013). *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*. USA: Springer, p. 107-148.
- Nypelö, T., Rodriguez-Abreu, C., Rivas, J., Dickey, M.D., Rojas O.J. (2014). Magneto-responsive hybrid materials based on cellulose nanocrystals. *Cellulose*, 21:2557–2566.
- Ostolska, I., Wiśniewska, M. (2014). Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr₂O₃ stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids. *Colloid and Polymer Science* 292(10):2453–2464.
- Salopek B, Krasić D, Filipović S. (1992). Measurement and application of zeta-potential. *Rudarsko-Geolosko-Naftni Zbornik*, 4:147–151.
- Sreeja V., Joy P.A. (2007). Microwave-hydrothermal synthesis of γ -Fe₂O₃ nanoparticles and their magnetic properties. *Materials Research Bulletin*, 42:1570-1576.
- Wang X., Zhuang J., Peng Q., Li Y.D. (2005). A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature*, 437:121-124.
- Wu W., He Q., Jiang C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3:397-415.
- Wu X., Hu J., Zhu B., Lu L., Huang X., Pang D. (2011). Aptamer-targeted magnetic nanospheres as a solid-phase extraction sorbent for determination of ochratoxin A in food samples. *Journal of Chromatography A*, 41:7341-7346.
- Xie L., Jiang R., Zhu F., Liu H., Ouyang G. (2014). Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406:377-399.

CAPÍTULO 3. DISEÑO DE UN MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN ACOPLADA PARA AFLATOXINA B1

3.1. Introducción

La aflatoxina B1 es la más abundante en los piensos; la cual, durante el metabolismo de los rumiantes, es hidrolizada y transformada a B2 y M1; ésta última, se ha encontrado principalmente en productos lácteos.

Las aflatoxinas son moléculas muy estables; de hecho, no se ven afectadas por procesos como la pasteurización o la producción de queso. Aunado a esto, se ha reportado una alta toxicidad de estas moléculas; tan sólo, la legislación de la Comunidad Europea ha establecido un límite máximo permisible de 0.050 mgL^{-1} para productos lácteos destinados a adultos y de 0.025 mgL^{-1} para los infantes.

Esto ha originado que estas moléculas sean monitoreadas en muchos alimentos. Sin embargo, los niveles traza en los que se suelen encontrar en los alimentos, han llevado al diseño de diversas metodologías de preparación de muestra, cuyos fines son la *"limpieza"* y la preconcentración de las aflatoxinas.

Debido a lo anterior, el objetivo del presente capítulo es diseñar un proceso de preconcentración de la aflatoxina B1 utilizando una metodología en dos pasos (DLLME y MDMSPE) con la finalidad de extraer la mayor cantidad del contaminante en la matriz alimenticia. Este acoplamiento de técnicas tiene la ventaja de aumentar la eficiencia de extracción, lo que permitirá mejorar la cuantificación de este compuesto en niveles traza.

3.2. Antecedentes

3.2.1. *Métodos de extracción y microextracción de aflatoxinas*

Existen muchos métodos para extraer micotoxinas de diversos tipos de matriz; por ejemplo, la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción por fluidos supercríticos (SFE), la extracción en fase sólida (SPE), entre otros (Roseanu et al., 2010).

El primer método para la extracción de aflatoxinas fue la LLE, pero ha sido remplazado por otras técnicas de extracción, debido a las desventajas que presenta como el tiempo de extracción elevado (90 min), la gran cantidad de solventes que se requiere, la eficacia depende de la matriz y los compuestos que se están analizando. Además, puede existir pérdida de muestra por adsorción sobre la cristalería (Turner, et al., 2009; Hussain, 2011).

La SFE se ha utilizado en la extracción de AFB1 (Batt, 2014), reportándose condiciones óptimas de 500 psi de CO₂ a 80°C con 15% de extractante orgánico (mezcla de CH₃CN:CH₃OH 2:1). La limitación de la SFE con las aflatoxinas se relaciona con su baja solubilidad en CO₂, adsorción en la matriz, baja difusión y altas concentraciones de impurezas extraídas, como lípidos (Wilson et al., 1998; Batt, 2014).

La SPE es la técnica más utilizada para el análisis de fumonisina, aflatoxina B1, patulina y ocratoxina en alimentos y piensos; la SPE es más rápida y requiere menos solvente. Sin embargo, no existe un cartucho universal que permita la extracción de todas las aflatoxinas, por lo que cada uno funciona con diferentes condiciones y el rendimiento puede verse afectado por el pH, el solvente y la concentración de la muestra. Además, la cinética de adsorción es lenta y los costos son elevados (Batt, 2014).

Las técnicas de LPME se han utilizado ampliamente en el análisis de aflatoxinas debido a la facilidad de limpieza de la muestra, los bajos límites de detección (LOD), la reducción de costos y a que son amables con el medio ambiente. Dentro de las técnicas de LPME para aflatoxinas sobresalen la microextracción en fase líquida en fibra hueca (HF-LPME) y la microextracción dispersiva líquido- líquido (DLLME) (Alsharif et al., 2015).

Sin embargo, el uso de la HF-LPME para el análisis de aflatoxinas ha sido poco reportado. Se han obtenido porcentajes de recuperación mayores al 70% con LOD del orden de ng L^{-1} (Alsharif et al., 2015).

Mediante la DLLME se han analizado diferentes micotoxinas, como el ácido fosfotúngstico, la zeralenona, la ocratoxina A, la aflatoxina B1, B2, G1, G2, etc., en diversas muestras de alimentos. La principal ventaja de la DLLME es la alta selectividad y su aplicación en matrices extremadamente complejas (Alsharif et al., 2015).

La extracción de aflatoxinas y derivados (AFB1, AFB2, AFM1 y ocratoxina A), en fase microsólida magnética dispersiva (MDMSPE), se ha reportado utilizando magnetita recubierta con TMSPT y ATM (Hashemi et al., 2014a; Hashemi et al., 2014b), obteniendo porcentajes de recuperación mayores al 90%.

Para el análisis de aflatoxinas, se ha reportado el uso de magnetita funcionalizada con 3-trimetilmetoxisilano-1-propantíol (TMPST) y 2-amino-5-mercapto-1, 3, 4-tiadizol (AMT) para extraer AFB1 y AFB2 en muestras de maíz y arroz, obteniendo un intervalo lineal de 0.20-15 ng mL^{-1} para B1 y 0.04-3 ng mL^{-1} y LODs de 0.041 y 0.013 ng mL^{-1} , para AFB1 y AFB2, respectivamente (Hashemi et al., 2014^a). Este tipo de soporte también se utilizó para la extracción AFM1 en leche obteniendo LODs de 0.011 ng mL^{-1} con un rango de 0.030-10 ng mL^{-1} (Hashemi et al., 2014b).

Wu y colaboradores (2011) reportaron el uso de aptámeros para extraer ocratoxina A en harina de trigo, café y cereales, logrando LODs entre 0.3-0.5 ng g^{-1} con un intervalo lineal de 2.5-5 ng g^{-1} . Para la extracción de ocratoxina A en muestras de arroz, trigo y maíz se ha utilizado magnetita funcionalizada con etilenglicol bis-mercaptoacetato y TMPST, obteniendo LOD de 0.037-0.065 ng mL^{-1} con un intervalo lineal de 0.5-40 ng mL^{-1} (Mashhadizadeh et al., 2013).

3.2.2. *Métodos de cuantificación de aflatoxinas*

Debido a los límites máximos establecidos por diferentes organismos regulatorios, la determinación analítica de aflatoxinas ha sido objeto de estudio a través de los años, normalmente implica procedimientos complejos, costosos

y lentos; por lo que, se han desarrollado métodos que minimicen estas desventajas.

La fluorescencia natural o inducida que presentan favorece su determinación por métodos cromatográficos. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se utiliza como método de análisis en la mayoría de alimentos; sin embargo, está limitado sobre todo al tipo de matriz que se analiza (composición del alimento) y a la concentración de la aflatoxina (Shephard, 2009).

Las aflatoxinas tienen una absorción máxima alrededor de 360 nm. Las aflatoxinas de la serie B y G tienen fluorescencia de color azul (425nm) y verde-azul (450nm) las cuales se producen por efecto de la luz ultravioleta (UV). Las aflatoxinas de la serie B son más comunes que las de la serie G. La emisión de fluorescencia de las aflatoxinas de la serie G es 10 veces mayor que la de las de la serie B (Akbas y Ozdemir, 2006).

La cromatografía de gases (GC) también se utiliza para la determinación de estas micotoxinas. No obstante, presenta desventajas, ya que algunas aflatoxinas no se volatilizan y su determinación puede conllevar algunos errores, a pesar de que se han desarrollado técnicas de derivatización para su análisis. Es por ello que su uso es limitado (Turner et al., 2009).

Además de los métodos cromatográficos, se han desarrollado otras técnicas de análisis, como los inmunoensayos, los cuales consisten en reacciones bioquímicas que miden la presencia o la concentración de aflatoxinas en una solución mediante el uso de un antígeno. Se han aplicado diferentes técnicas, las más comunes son los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). A pesar de la selectividad que tienen los inmunoensayos, el costo de análisis es alto y en algunos casos no cumplen los requisitos en matrices complejas, ni satisfacen los niveles de regulación (Shephard, 2009).

Otros métodos para la detección de aflatoxinas son los de absorción ultravioleta. Estos compuestos tienen una absorción máxima en 360 nm, con un coeficiente de absorción molar de $20,000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, sin embargo, la sensibilidad del método no permite detectar micotoxinas a nivel de $\mu\text{g L}^{-1}$ (Akbas & Ozdemir, 2006, Alcaide-Molina et al., 2009).

Para el estudio del efecto de aflatoxinas en seres vivos se han desarrollado los biomarcadores, que se utilizan en la mayoría de enfermedades para detectarlas, dar seguimiento y medir las complicaciones (Shephard, 2009).

Por ello, el objetivo de este capítulo es: diseñar un proceso de preconcentración de la aflatoxina B1 utilizando una metodología en dos pasos (DLLME y MDMSPE) con la finalidad de separar la mayor cantidad del contaminante en la matriz alimenticia.

3.3. Metodología experimental

3.3.1. Pretratamiento de la muestra

3.3.1.1. Preparación de solución sintética de AFB1

Se preparó una solución sintética de AFB1 (80 ngL^{-1}), la cual se mezcló con 1 g de KCl y 20 mL de buffer de fosfato salino: metanol (80:20) a pH 7.4. Después se filtró y se llevó a un volumen final de 30 mL, la solución se utilizó para la microextracción dispersiva líquido-líquido (Hashemi et al., 2014^a).

3.3.1.2. Preparación de muestras reales

Se utilizaron muestras de forraje que se obtuvieron del Centro de Acopio Real “El Capulín” de la región del Valle del Mezquital, Hidalgo. Se pesaron 5 g de forraje y se les adicionó 1 g de KCl y 20 mL de buffer de fosfato salino:etanol (80:20) a pH 7.4. Después se filtró y se llevó a un volumen final de 30 mL, la solución se utilizó para la DLLME.

3.3.2. Microextracción dispersiva líquido-líquido

Para la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) se realizó una modificación a la metodología descrita por Amoli-Diva y colaboradores (2014). Se mezclaron 6 mL de agua con 320 μL cloroformo, 1200 μL de MeCN: H₂O (20:80) y 20 μL de estándar o muestra en solución. Posteriormente, se colocaron en un tubo Eppendorf de 20 mL y se centrifugó por 2 min, después se recolectaron las gotas para concentrar.

3.3.3. *Extracción magnética en fase microsólida dispersa*

3.3.3.1. *Elección del disolvente de redisolución*

Una vez finalizada la DLLME, se evaporó el extractante (cloroformo) y se realizó una redisolución. Se probaron diferentes solventes de redisolución que permitieran la dispersión del soporte magnético. Para ello, el residuo obtenido de la DLLME se redisolvió en 500 μ L de solvente orgánico (octanol, heptanol, cloroformo o tolueno).

3.3.3.2. *Extracción*

A la redisolución se le añadieron 10 mg de soporte magnético funcionalizado y se mantuvo en agitación por ultrasonido por 5 min. El adsorbente se recolectó en el fondo del vial de reacción con la ayuda de un imán de neodimio y se eliminó el sobrenadante. La desorción se realizó con una mezcla de $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$:MeCN: CH_2Cl_2 (1:2:2) y se separó el soporte magnético.

3.3.4. *Derivatización de AFB1*

La solución obtenida se evaporó para la derivatización, en la cual se mezclaron 100 μ L de hexano y 100 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó por 2 min. Posteriormente, se evaporó la mezcla y se redisolvió con 3 mL de MeCN:H₂O (12:88) y se realizó el análisis por espectroscopia de fluorescencia.

3.3.5. *Análisis de AFB1 por espectroscopia de fluorescencia*

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron a temperatura ambiente en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55. La longitud de onda de excitación usada fue de 365 nm y las señales de emisión se colectaron en la ventana espectral de 250-600 nm. Las medidas se realizaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Solvente de redisolución

Después de realizar la DLLME, se realizaron pruebas para elegir el solvente de redisolución adecuado, considerando la estabilidad de los soportes magnéticos utilizados en la MDMSPE.

En la Figura 3.1 se muestran las imágenes del comportamiento de los soportes magnéticos con diferentes solventes de redisolución (tolueno, cloroformo, 1-octanol y 1-heptanol).

Con cloroformo y tolueno (Figuras 3.1 A y B) se observa que hay una mayor inestabilidad de los soportes magnéticos, lo cual evita que se separen de la solución por acción del imán de neodimio. Con el 1-octanol (Figura 3.1C) se presentó una ligera dispersión de los soportes magnéticos, aun con la presencia del imán de neodimio, lo cual se puede apreciar en el color aparente de la solución. El 1-heptanol (Figura 1D) se eligió como el mejor solvente de redisolución, debido a que fue más rápida la separación de los soportes magnéticos y a que éstos presentaron mayor estabilidad.

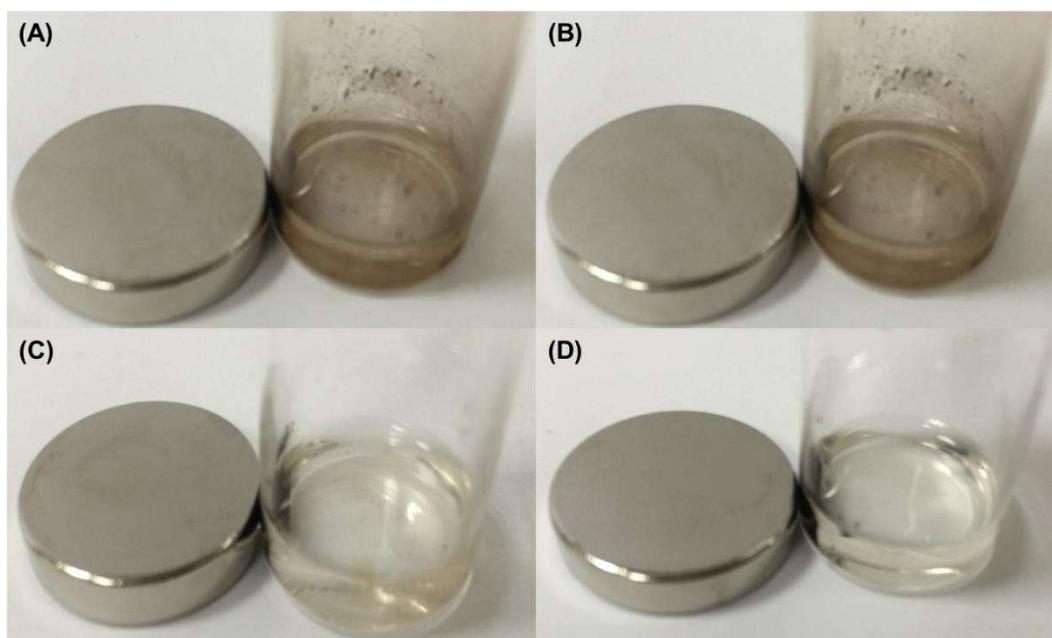


Figura 3.1. Efecto del solvente de redisolución sobre los soportes magnéticos. **(A)** tolueno, **(B)** cloroformo, **(C)** 1-octanol y **(D)** 1-heptanol.

Amoli–Diva y colaboradores (2015) determinaron AFM1 en muestras de leche y evaluaron diferentes tipos de solvente como el tolueno, 1-heptanol, 1-octanol, acetato de etilo y 2-etilhexanol obteniendo los mejores resultados con 1-heptanol.

Este comportamiento puede estar relacionado con la constante dieléctrica (ϵ) de los solventes estudiados, ya que se observa que a menor ϵ hay una inestabilidad aparente mayor. Los valores de las constantes dieléctricas de los solventes utilizados son: 2.4, 4.8, 10.3 y 12.0, para tolueno, cloroformo, 1-octanol y 1-heptanol, respectivamente (Reichardt, 2006). Chistensen y colaboradores (2015) reportaron el efecto de la dispersión de nanopartículas de Fe_2O_3 en diferentes solventes obteniendo una buena dispersión en alcoholes con un grupo $-\text{OH}$ y con un menor tamaño en la cadena hidrocarbonada.

3.4.2. *Microextracción de aflatoxina B1*

El método propuesto para la microextracción de AFB1 se basó en el acoplamiento de dos técnicas, la DLLME y la MDMSPE. Para la segunda separación se utilizaron los soportes magnéticos funcionalizados con TMSPT y ATM.

La Figura 3.2 muestra el mapa del potencial electrostático sobre una isosuperficie de densidad a un nivel AM1 para la estructura de la AFB1. Los cálculos teóricos se realizaron con el software Arguslab 4.0.1®. El color rojo representa las zonas de la molécula donde se concentra la mayor parte de carga, es decir, la región nucleofílica; mientras que en color blanco se encuentran las regiones con menor potencial electrostático, es decir, la zona electrofílica de la molécula.

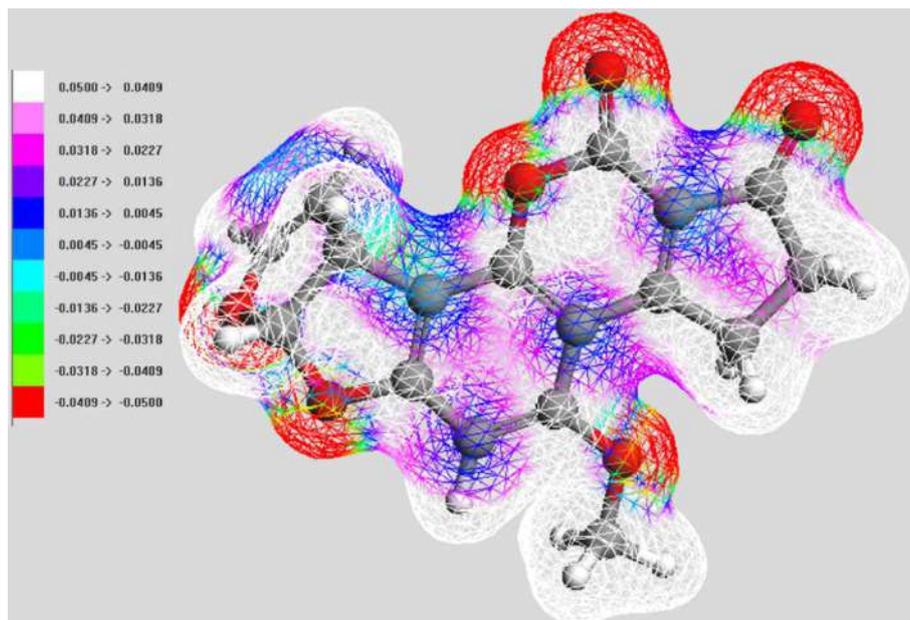


Figura 3.2. Mapa del potencial electrostático para la molécula de AFB1.

La ubicación de las regiones electrófilas y nucleófilas de la molécula de AFB1 permitió realizar una propuesta de la interacción de la aflatoxina con los soportes magnéticos funcionalizados.

En la Figura 3.3 se presenta la propuesta del mecanismo que se lleva a cabo durante el proceso de MDMSPE.

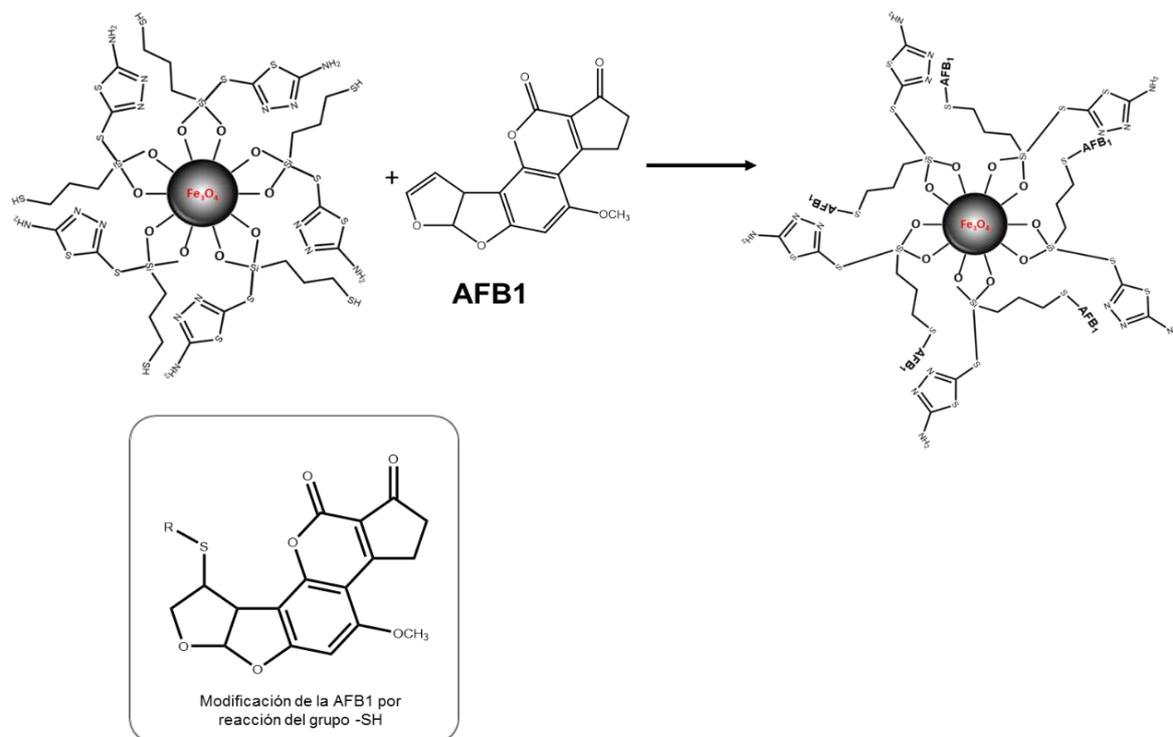


Figura 3.3. Mecanismo propuesto para el proceso de MDMSPE de la aflatoxina B1.

Después de llevar a cabo el proceso, al adicionar un solvente orgánico a los soportes magnéticos funcionalizados hay una ruptura del derivado azufrado, lo que provoca la desorción de la AFB1. En otros estudios se ha propuesto la interacción entre el grupo tiol y la AFB1, que han sido enfocados hacia la inhibición de la carcinogenicidad de las aflatoxinas (Friedman & Rasooly, 2013).

Para el análisis de aflatoxinas por espectroscopia de fluorescencia, se realizó una derivatización, el esquema de reacción se muestra en la Figura 3.4.

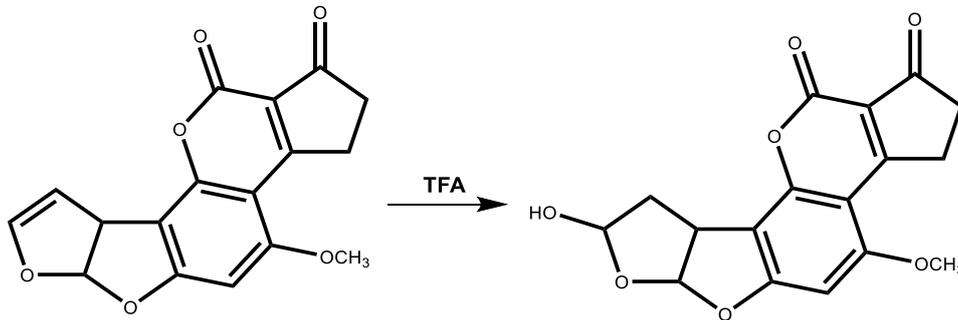


Figura 3.4. Reacción de derivatización de la AFB1 para su análisis por espectrofluorimetría.

En la Figura 3.5 se muestra el espectro de fluorescencia para los estándares de AFB1 de 80 y 160 ngL⁻¹, en los que se pueden observar dos bandas de emisión, una a 410 nm y otra en 465 nm. Para la detección de AFB1 se utiliza el máximo en 465 nm, ya que la molécula presenta mayor emisión, lo cual se ve reflejado en la intensidad; la banda en 410 nm puede ser atribuida a un derivado de la aflatoxina B1.

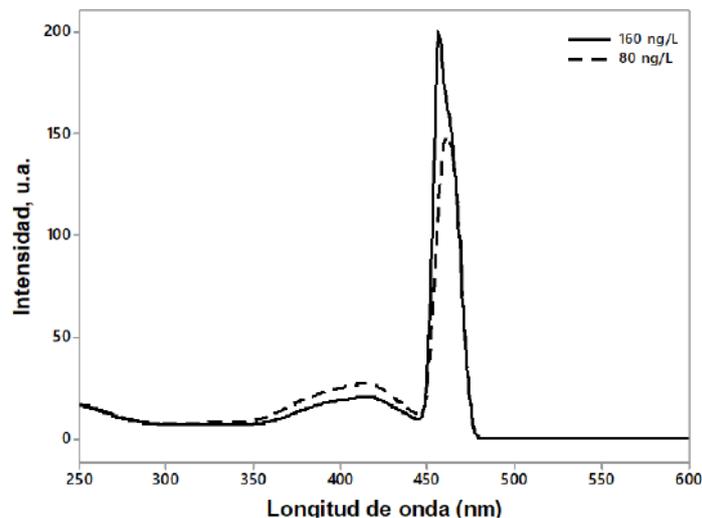


Figura 3.5. Espectros de fluorescencia de estándares de AFB1 a 80 y 160 ngL⁻¹.

Por otro lado, se realizó el análisis por fluorimetría para muestras reales (forrajes) tratados por los procesos de DLLME y MDMSPE, a fin de evaluar la eficiencia de los procesos de separación planteados. En la Figura 3.6 se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos de las muestras analizadas, comparándolos con el estándar de 80 ngL⁻¹.

De acuerdo con los espectros, en el estándar de 80 ngL⁻¹ sometido al proceso de separación (DLLME y MDMSPE) ya no está presente el máximo de emisión en 410 nm, el cual puede ser atribuido a un derivado de la AFB1, que se encuentra a niveles de concentración muy bajos, lo que permite que no sea detectado cuando se lleva a cabo el proceso de separación.

Comparando el espectro del estándar de 80 ngL⁻¹ sin tratamiento de separación (Figura 3.5) y sometido a los procesos de microextracción, se observa una aparente disminución en la intensidad, esto es debido al volumen pequeño de estándar sometido a los proceso de separación (20µL).

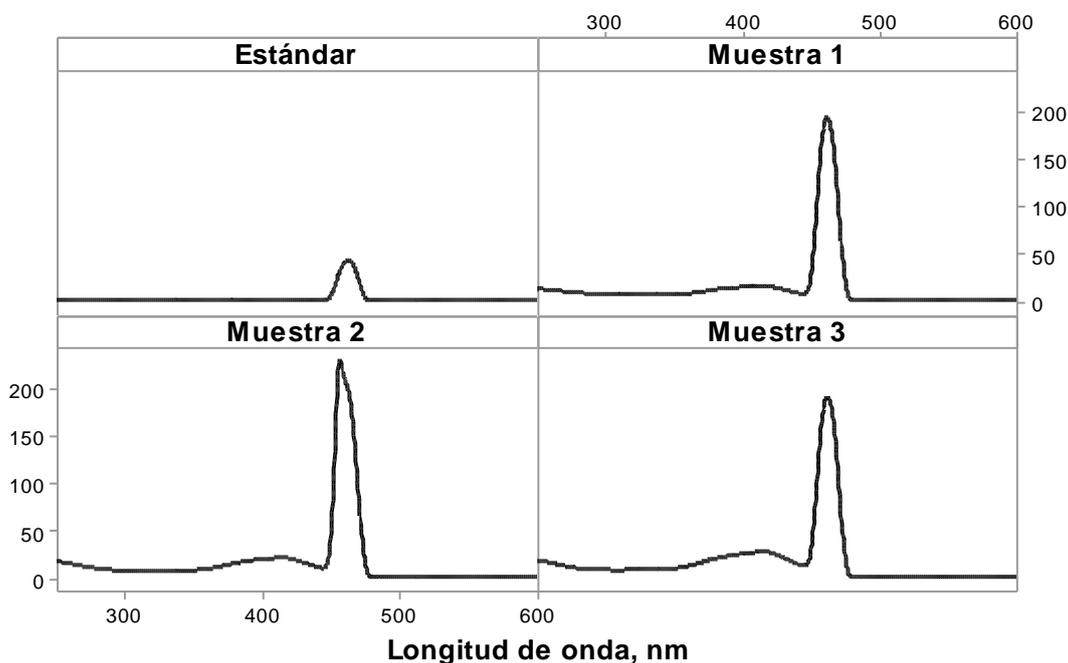


Figura 3.6. Espectros de fluorescencia de muestras de forraje analizadas, comparadas con el estándar de 80 ngL⁻¹, posterior al proceso de separación.

Haciendo esa comparación se puede calcular una estimación del factor de enriquecimiento que se obtiene al realizar el proceso de separación

(relacionando las intensidades de máxima emisión), el cual es de aproximadamente 1500. Hashemi y colaboradores (2014b) reportaron factores de enriquecimiento de 5 para AFB1 en leche, en procesos de separación basados en MDMSPE.

3.5. Conclusiones

Se diseñó una metodología para la extracción y preconcentración de AFB1, para la DLLME se establecieron las condiciones para la extracción. Además, se eligió 1-heptanol como solvente de redisolución para la MDMSPE, debido a la facilidad con la que se separan los soportes magnéticos funcionalizados.

Por otro lado, se establecieron las condiciones para la preconcentración de AFB1 usando nanopartículas magnéticas funcionalizadas y se mostró el posible mecanismo que se lleva a cabo en esta reacción.

Finalmente, se realizó la extracción de AFB1 en muestras de forraje mediante el acoplamiento de la DLLME y la MDMSPE obteniendo una señal máxima en la longitud de emisión de 460 nm y un factor de enriquecimiento estimado de 1500. Por ello, el acoplamiento de técnicas de microextracción podría ser una buena alternativa para la extracción y preconcentración de AFB1 en muestras reales.

Referencias

- Alsharif M.A., Huat T.G., Mun C.Y., Lawal A. (2015). Liquid Phase Microextraction for Analysis of Mycotoxins in Food Samples: REVIEW. *Research Journal of Chemical & Environmental Sciences*, 3:5-21.
- Amoli-Diva M., Taherimaslak Z., Allahyari M., Pourghazi K., Manafi M.H. (2015). Application of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with vortex-assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid-phase extraction for determination of aflatoxin M1 in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. *Talanta*, 134:98–104.
- Batt C.A. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. USA: Elsevier, p. 854-887.

- Friedman M., & Rasooly R. (2013). Review of the Inhibition of Biological Activities of Food-Related Selected Toxins by Natural Compounds. *Toxins*, 5:743-775.
- Hashemi M., Taherimaslak Z., Rashidi S. (2014a). Application of magnetic solid phase extraction for separation and determination of aflatoxins B1 and B2 in cereal products by high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 960:200-208.
- Hashemi M., Taherimaslak Z., Rashidi S. (2014b). Enhanced spectrofluorimetric determination of aflatoxin M1 in liquid milk after magnetic solid phase extraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128:583–590.
- Hussain I. (2011). CHAPTER II: Aflatoxin Contamination and Research in China en Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. China: InTech, p. 129-146.
- Mashhadizadeh M.H., Amoli-Diva M., Pourghazi K. (2013). Magnetic nanoparticles solid phase extraction for determination of ochratoxin A in cereals using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1320:17-26.
- Reichardt, C. (2006). *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. 3rd ed., Wiley-VCH Publishers:Germany.
- Roseanu A., Jecu L., Badea M., Evans R.W. (2010). Mycotoxins: An overview on their Quantification Methods. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47: 79–86.
- Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632:168-180.
- Wilson D.M., Sydenham E.W., Lombert G.A., Trucksess M.W., Abramson D., Bennett G.A. (1998). Mycotoxin Analytical Techniques. In: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. USA: CRC Press, p. 135-183.
- Wu X., Hu J., Zhu B., Lu L., Huang X., Pang D. (2011). Aptamer-targeted magnetic nanospheres as a solid-phase extraction sorbent for

determination of ochratoxin A in food samples. *Journal of Chromatography A*, 41:7341-7346.

CAPÍTULO 4. DISEÑO DE UN MÉTODO VOLTAMPEROMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINA B1

4.1. Introducción

En el análisis de alimentos se ha recurrido también a los métodos electroquímicos para la determinación de un gran número de analitos, ya que presentan muchas ventajas, tales como: límites de detección bajos, buena reproducibilidad, bajo costo y tiempos cortos de análisis. Entre las especies que se han determinado por técnicas electroanalíticas se encuentran iones inorgánicos, como Ca^{2+} , NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , principalmente. Dentro de los componentes orgánicos están algunos aditivos, benzoatos, colorantes azoicos, vitaminas, etc. (Farghaly, 2014).

Entre las técnicas electroanalíticas más ampliamente utilizadas se encuentra la voltamperometría, la cual se basa en la relación corriente-voltaje-tiempo que se origina en una celda de tres electrodos. En el electrodo de trabajo se llevan a cabo las reacciones redox de las especies electroactivas, se producen las transferencias de carga y están fabricados de diversos materiales como el mercurio (Bard y Faulkner, 2001).

Para el análisis de aflatoxinas se han utilizado electrodos de gota de mercurio, sin embargo, el mercurio tiene un efecto perjudicial en el medio ambiente, por lo que se han diseñado electrodos que sean amigables con éste, como los electrodos de película de bismuto (BiFEs).

Los BiFEs se han utilizado para el análisis de diversos metales pero existe muy poca información de su uso en el análisis de moléculas orgánicas, por lo que se deja un campo abierto a la investigación respecto a la fabricación y la aplicación de este tipo de electrodos

4.2. Antecedentes

4.2.1. Voltamperometría

Las técnicas electroquímicas son técnicas analíticas muy versátiles que ofrecen alta sensibilidad, exactitud, precisión y un intervalo lineal bajo; además se caracterizan por tener un bajo costo de instrumentación. Los estudios electroanalíticos se utilizan regularmente en aplicaciones industriales y ambientales, así como en el análisis de fármacos, alimentos y muestras biológicas.

Entre las técnicas electroanalíticas más ampliamente utilizadas se encuentra la voltamperometría, la cual se basa en la relación corriente-voltaje-tiempo que se origina en una celda de tres electrodos: un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) o contraelectrodo (Figura 4.1).

El potencial aplicado al electrodo de trabajo sirve como fuerza para que las especies químicas presentes en la solución se oxiden o reduzcan en la superficie del electrodo. El diagrama de corriente-voltaje se denomina voltamperograma, donde la intensidad de corriente se muestra en el eje vertical y el potencial en el eje horizontal.

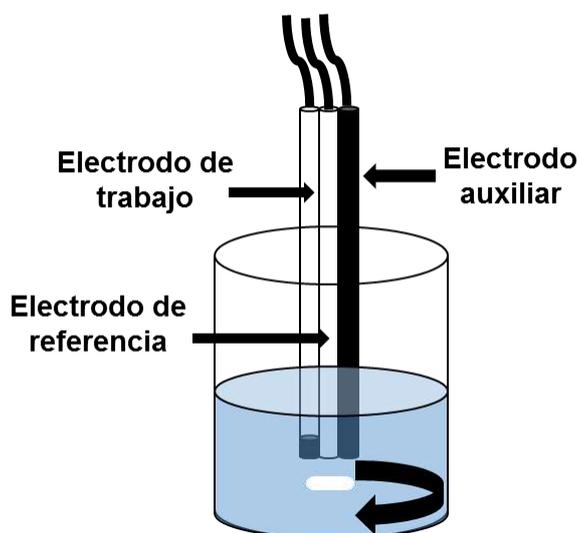


Figura 4.1. Esquema típico de una celda electroquímica formada por un WE, un RE y un AE.

Las técnicas voltamperométricas tienen múltiples ventajas en las que se incluyen la alta sensibilidad en la determinación de compuestos orgánicos, inorgánicos y metales en cantidades traza, son portátiles, de bajo costo y pueden ser aplicados en muestras ambientales, en alimentos y en fármacos (Fifield & Kealey, 2000; Gavriloca, 2014). Para el análisis de aflatoxinas se han utilizado técnicas voltamperométricas como la voltamperometría cíclica (CV), la voltamperometría diferencial de pulso (DVP) y la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) (Lezi et al., 2012, González et al., 1998).

4.2.1.1. Voltamperometría cíclica

La CV es una técnica en donde la dirección del escaneo de potencial se puede revertir con respecto al primer escaneo, por lo que se origina un ciclo entre dos potenciales, que se puede repetir hasta llegar al potencial final. La CV es una técnica ampliamente utilizada para obtener información cualitativa acerca de reacciones electroquímicas, y rara vez se utiliza para el análisis cuantitativo de sustancias (Farghaly et al., 2014).

4.2.1.2. Voltamperometría de onda cuadrada

La SWV es una técnica que consiste en aplicar una onda cuadrada regular, la cual se superpone en la base del potencial. Después, la corriente se duplica durante cada ciclo de onda cuadrada, una vez al inicio del pulso y la otra al final del mismo. La diferencia entre esas dos mediciones se representa en función del potencial de base. (Farghaly et al., 2014).

4.2.1.3. Voltamperometría diferencial de pulso

En la técnica de DVP la corriente es medida durante un pulso de potencial con una duración (T). La primera corriente medida se realiza en un tiempo (T_1) antes del paso de potencial de la amplitud de pulso (A) el cual tiene una determinada duración (W). La segunda medición de corriente se realiza en un periodo de tiempo similar después del paso de potencial, en (T_2) (Figura 4.2). La diferencia de las dos corrientes da lugar a un voltamperograma en forma de pico. (Farghaly et al., 2014).

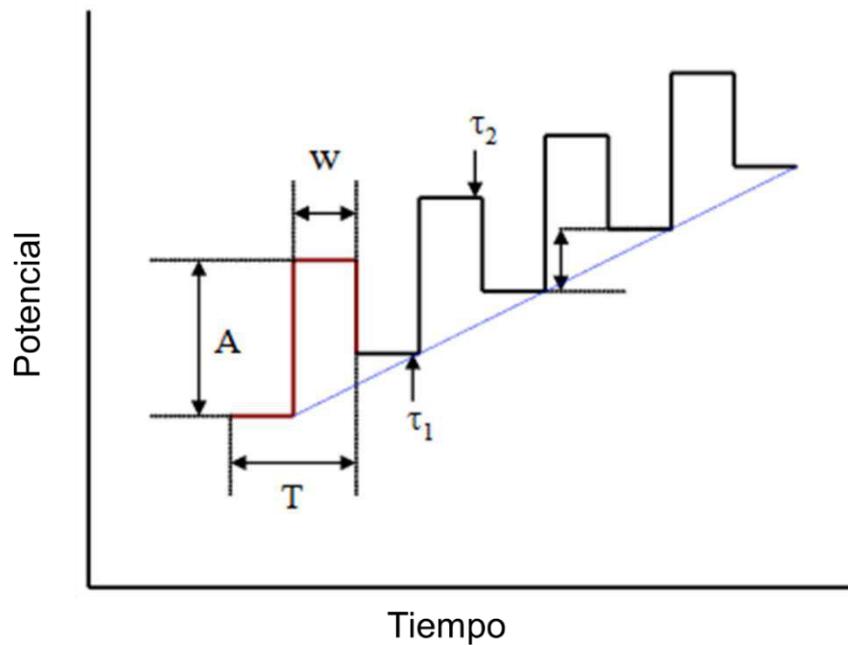


Figura 4.2. Forma de onda de potencial para DPV.

La ventaja más importante de la DVP es que permite distinguir corrientes faradaicas de las no faradaicas, incrementando la sensibilidad, lo cual es útil cuando se están analizando simultáneamente varias especies electroactivas (Fifield et al., 2000).

4.2.2. *Electrodos de trabajo*

Como se mencionó en la sección 4.2.1 la voltamperometría requiere una celda con tres electrodos. En el electrodo de trabajo se llevan a cabo las reacciones redox de las especies electroactivas y se producen las transferencias de carga, que dependen del tipo de electrodo que se utilice. Algunos de los materiales utilizados en estos electrodos son el mercurio, el platino, el oro, la plata y el carbono (Scholz, 2010; Li, 2013).

4.2.2.1. *Electrodo de mercurio*

El mercurio es un metal utilizado frecuentemente en técnicas voltamperométricas. La principal ventaja de este tipo de electrodos es que la superficie se puede renovar y limpiar constantemente (Scholz, 2010).

Debido al estado líquido del mercurio, los electrodos de trabajo consisten en suspender una gota de este metal al final de un capilar (Yaacob, 2008). En la Figura 4.3 se presenta un diagrama de un electrodo de gota de mercurio.

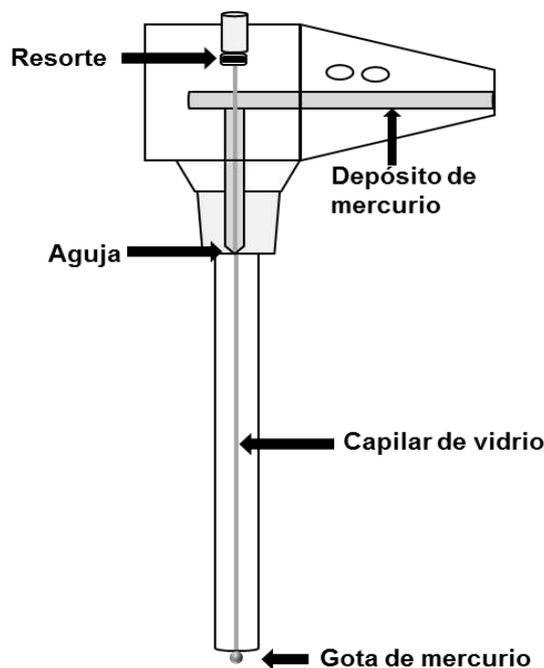


Figura 4.3. Configuración del electrodo de gota de mercurio.

El uso, manipulación y disposición de mercurio o sales de mercurio tiene un efecto perjudicial en el medio ambiente, por lo que se han diseñado otro tipo de electrodos que sean amigables con éste, como los electrodos de película de bismuto (BiFEs) (Kefala et al., 2003; Economou, 2005; Lin et al., 2005^a, Lin et al., 2005b).

4.2.2.2. Electrodo de bismuto

Los BiFEs se fabrican mediante electrodeposición de manera *in situ* o *ex situ* en una superficie o soporte conductor. Los recubrimientos *in situ* sólo son adecuados para el análisis de metales mediante voltamperometría de redisolución anódica. Por otro lado, en todas las aplicaciones reportadas de BiFEs para el análisis de moléculas orgánicas, se utiliza la electrodeposición de manera *ex situ* en medio ácido para evitar la hidrólisis del catión metálico (Lezi et al., 2012).

Las condiciones para la electrodeposición son: la concentración de Bi (III), la cual oscila entre los 50 y 500 mg L⁻¹ (Asadpour et al., 2011; Anik et al., 2010), el potencial de deposición, que es normalmente negativo a -0.6 V, aunque se han reportado potenciales entre 0.1 y -0.3 V (Daniele et al., 2012; Daniele et al., 2010; Figueiredo et al., 2010); y el tiempo utilizado es menor a 60 s (Gaál et al., 2007; Hutton et al., 2004).

Los materiales usados como soporte en la deposición del bismuto son el cobre, la amalgama de plata, el carbón vítreo, el platino, la pasta de carbono, el grafito y la tinta de carbono (Lezi et al., 2012).

Las ventajas de los BiFEs son la posibilidad de regeneración de la superficie del electrodo, la baja toxicidad de este metaloide (amigable con el medio ambiente), se pueden diseñar electrodos de forma más sencilla y práctica; además, producen señales de redisolución comparables con los electrodos de mercurio, alta reproducibilidad, bajos límites de detección (del orden de µg L⁻¹) y baja corriente de fondo (Wang, 2000).

La principal aplicación de los BiFEs en los compuestos orgánicos es en el análisis de compuestos tóxicos mediante DPV y SWV (Lezi et al., 2012). Hutton y colaboradores (2004) reportaron el uso de BiFEs en un electrodo de carbón vítreo y mediante SWV analizaron nitrofenoles obteniendo un LOD menores a 3.5 µg L⁻¹. Para el análisis de 2-nitrofenol y 4-nitrofenol se utilizó DPV con un electrodo de grafito recubierto con Bi (III) de manera *ex situ* (Asadpour y Nafaji, 2011). Lou y colaboradores (2010) utilizaron electrodos de pasta de carbono recubiertos con bismuto para la determinación de nitrobenceno obteniendo un LOD 8.3x10⁻⁷ mol L⁻¹.

Por otro lado, se han utilizado BiFEs para el análisis de pesticidas como el paraquat, en el que se utilizó DPV con un electrodo de cobre recubierto con una película de bismuto obteniendo LOD de 9.3x10⁻⁸ mol L⁻¹ (Figueiredo et al., 2010). Deylova y colaboradores (2012) electrodepositaron Bi (III) en un soporte de plata amalgamada para el análisis de 2-amino-6-nitrobenzotiazol obteniendo LOD de 0.16 µmol L⁻¹ mediante DPV. Figueiredo-Filho y colaboradores (2012) utilizaron DPV para la determinación de atrazina obteniendo LOD de 1.4x10⁻⁷ mol L⁻¹.

Además, los BiFEs se han utilizado en el análisis de vitamina B12, en el que se recubrió un sustrato de cobre y mediante SWV obtuvieron un LOD de $3.3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (Kreft et al., 2012). Sopa y colaboradores (2011) utilizaron un electrodo de carbón vítreo recubierto con bismuto para el análisis de citrato de sildenafil, logrando LOD de $1.8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Para el análisis de colchicina mediante DPV, Bodoki y colaboradores (2007) utilizaron carbón vítreo como soporte obteniendo un LOD de $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$. Campestrini y colaboradores (2010) electrodepositaron Bi (III) sobre carbón vítreo para el análisis de sulfadiazina por DPV obteniendo LOD de $2.1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

También se ha reportado el uso de BiFEs en el análisis de compuestos biológicos mediante DPV, como las metalotioneinas, cuyo LOD reportado fue de $3.8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (Yang et al., 2005).

4.2.3. Determinación de aflatoxinas por técnicas electroanalíticas

Smith y colaboradores (1979) realizaron la determinación de aflatoxinas en alimentos por polarografía diferencial de pulsos, encontrando el potencial de media onda de la reducción de diversas aflatoxinas, siendo de -1.26V, -1.27V, -1.21V y -1.23V para B1, B2, G1 y G2, respectivamente. El límite de detección de aflatoxina B1 en soluciones puras fue de aproximadamente $2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($25 \mu\text{g L}^{-1}$). Además, establecieron el mecanismo de reducción de AFG1 con un electrodo de gota de mercurio en buffer Britton-Robinson (BRB) a pH=9.

Lau y Chau (1983) reportaron la formación de aflatoxicol A mediante la reducción de AFB1 por *Rhizopus oryzae* y *R. oligosporus* (Figura 4.4). Este compuesto conserva la fluorescencia azul bajo luz UV. El aflatoxicol A es considerado uno de los metabolitos más importantes de AFB1, debido a la correlación entre la presencia de este metabolito en tejidos animales con la toxicidad de AFB1.

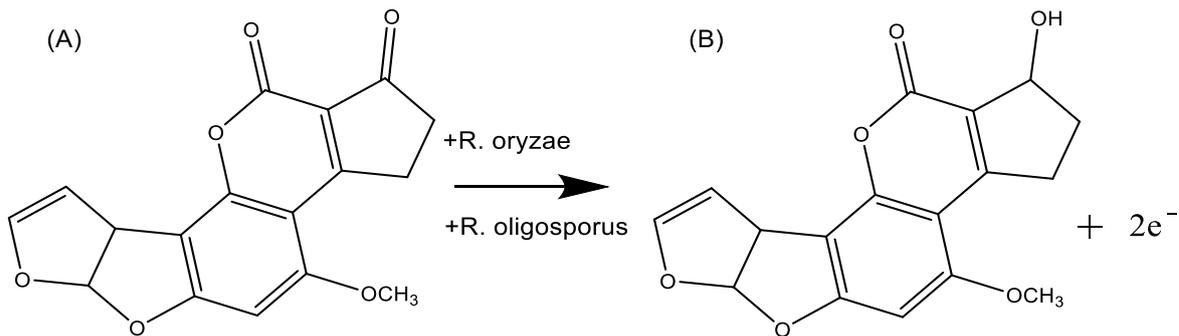


Figura 4.4. Reducción de AFB1 (A) a aflatoxicol A (B).

Por otro lado, Duhart y colaboradores (1988) determinaron diversas aflatoxinas utilizando HPLC con detección electroquímica. Para ello, utilizaron la DPV con un electrodo de gota de mercurio, a un tiempo de caída de 1 s. Las señales obtenidas fueron de -1.37 V, -1.36 V y -1.30 V para AFB1, AFB2 y AFG1 respectivamente. Además, obtuvieron porcentajes de recuperación de 76% (AFB1), 77% (AFB2) y 87% (AFG1). La principal ventaja de esta técnica es que no se requería una etapa de derivatización, como en la detección por fluorescencia.

González y colaboradores (1998) estudiaron aflatoxinas en metanol:agua (1:1 v/v) mediante CV con electrodos de carbón vítreo. De acuerdo con este estudio, la electroactividad de las aflatoxinas incrementó en el orden AFG2>AFB1>AFB2>AFG1, lo que indica la capacidad de las aflatoxinas para llevar una oxidación en un electrodo de carbón vítreo.

Yaacob y colaboradores (2008) determinaron AFB1 en cacahuates mediante SWV con un electrodo de gota de mercurio, alcanzando un LOD de 0.125×10^{-8} mol L⁻¹. Los resultados se compararon con los obtenidos por HPLC, por lo que la SWV demostró ser una técnica sensible, precisa y rápida. De igual manera, Hajian y colaboradores (2009) utilizaron SWV para determinar AFB1 y AFB2 en cacahuates mediante un electrodo de gota de mercurio obteniendo LOD de 15 µg L⁻¹ y 40 µg L⁻¹ respectivamente.

Por ello, los objetivos de este capítulo son: 1) optimizar el proceso de fabricación de un electrodo de película de bismuto a partir de un diseño de experimentos para utilizarlo en la detección de aflatoxina B1, 2) diseñar un método electroanalítico a partir de la construcción de electrodos a base de bismuto para determinar aflatoxina B1

4.3. Metodología experimental

4.3.1. Sistema electroquímico

Todos los experimentos se realizaron en una celda electroquímica convencional para tres electrodos fabricada de vidrio. Como electrodo de trabajo se utilizó una barra de grafito ($d=6\text{mm}$) recubierta con una película de bismuto, como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de $\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$ saturado y como contraelectrodo una barra de grafito. Las soluciones de trabajo fueron preparadas utilizando reactivos grado analítico y agua desionizada. Todos los experimentos fueron realizados en atmósfera de nitrógeno.

4.3.2. Estudios preliminares

4.3.2.1. Electrodeposición del bismuto

El potencial de deposición del bismuto se determinó mediante CV, para ello se colocó una barra de grafito ($d=6\text{mm}$) en una solución de bismuto (200mgL^{-1}) con HNO_3 al 5% (v/v) y se realizó un barrido de -1000 a 1000mV a 50mVs^{-1} . Además, se realizaron 25 ciclos con la finalidad de observar el comportamiento del bismuto sobre el electrodo de grafito.

4.3.2.2. Obtención de la señal analítica de AFB1

Para determinar la señal analítica de AFB1, se preparó un BiFE a una concentración de Bi (III) de 350mgL^{-1} , conociendo previamente el potencial de electrodeposición del bismuto (-250mV) y con un tiempo de 30 s. Posteriormente, se preparó una solución de AFB1 160ngL^{-1} en BRB ($\text{pH}=9$) y mediante CV se realizaron 4 ciclos de -350 a -1500mV a 50mV s^{-1} .

4.3.2.3. Estudio voltamperométrico de AFB1

Se realizó un estudio voltamperométrico de AFB1 con la finalidad de obtener información cualitativa acerca del comportamiento electroquímico de la molécula en el BiFE. Para ello, se preparó una solución de AFB1 160ngL^{-1} en 10 mL de BRB ($\text{pH}=9$) y mediante CV se realizaron distintas lecturas, variando

la velocidad de barrido en un intervalo de 10 a 40 mV s⁻¹. Se consideró un potencial inicial de barrido de -450 mV y un potencial final de -1000 mV.

4.3.3. *Diseño del electrodo de película de bismuto*

Para la fabricación del electrodo de película de bismuto se tomó como referencia la metodología descrita por Guzsvány y colaboradores (2011), a la cual se le realizaron modificaciones.

Se planteó un diseño Box-Benhken con la finalidad de optimizar la fabricación del electrodo de película de bismuto. Para ello, se tomaron como factores de control: el potencial de reducción del bismuto (A), ya que un potencial catódico adecuado facilita la deposición del bismuto; la concentración de bismuto (B); y el tiempo de deposición (C); estos últimos factores controlan el grosor de la película de bismuto. En la Tabla 4.1 se presentan los niveles de los factores de control elegidos.

Una vez definidas las condiciones de experimentación, se preparó una solución de AFB1 de 160 ngL⁻¹ en 10 mL de BRB y se realizó el análisis electroquímico de la molécula por CV (-350 a -1000 mv) con cada uno de los electrodos preparados conforme al diseño experimental (Tabla 4.3). Como respuesta se utilizó la señal catódica (mA) correspondiente a la reducción de la AFB1 y se realizaron dos ciclos con una velocidad de barrido de 50 mV s⁻¹.

Tabla 4.1. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización para la fabricación del electrodo.

Factor	Descripción	Niveles seleccionados		
		-1	0	1
A	Potencial de deposición, mV	-280	-555	-830
B	Concentración de bismuto, mgL ⁻¹	350	525	700
C	Tiempo de deposición, s	30	75	120

4.3.4. Optimización de la voltamperometría diferencial de pulso

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la fabricación del electrodo de película de bismuto, se estableció la DPV como técnica de cuantificación de AFB1.

Nuevamente, se utilizó un diseño experimental Box-Benhken, teniendo como fin la mejora de la señal analítica para la AFB1 en los electrodos de película de bismuto. Se tomaron como factores de control: el paso de corriente (A), el ancho de pulso (B), el periodo de pulso (C) y la amplitud de pulso (D), debido a que están directamente relacionados con la corriente generada en la transformación electroquímica. En la Tabla 4.2 se presentan los niveles de los factores de control elegidos.

Tabla 4.2. Niveles de los factores de control elegidos para la optimización de la VDP.

Factor	Descripción	Niveles seleccionados		
		-1	0	+1
A	Paso de corriente, mV	10	20	30
B	Ancho de pulso, ms	10	20	30
C	Periodo de pulso, ms	60	75	90
D	Amplitud de pulso, mV	100	150	200

Una vez definidas las condiciones de experimentación (Tabla 4.5), se preparó una solución de AFB1 de 160 ngL^{-1} en 10 mL de BRB y se realizó la VDP conforme al diseño experimental, considerando un potencial inicial de barrido de -350 mV y un potencial final de -1000 mV. El análisis estadístico se realizó con el software Minitab v. 17.

4.3.5. Curva de calibración para AFB1

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la fabricación de los BiFEs y para la detección por DPV, se prepararon soluciones estándar de AFB1 en BRB a pH=9 a concentraciones de 100, 120, 140, 160, 180 y 200 ng L^{-1} con la finalidad los parámetros analíticos.

El LOD y el LOQ se calcularon de acuerdo con las ecuaciones: $LOD=3S_b/B$ y $LOQ=10S_b/B$ donde S_b es la desviación estándar del eje y de la línea con mejor ajuste y B es la pendiente de esa línea.

4.3.6. Extracción, preconcentración y detección electroanalítica de AFB1

Para la detección de AFB1 se utilizaron como métodos de extracción y preconcentración la DLLME y la MDMSPE, para ello se realizó una modificación a la metodología descrita por Amoli-Diva y colaboradores (2014). Se mezclaron 6 mL de agua con 320 μ L cloroformo, 1200 μ L de MeCN: H₂O (20:80) y 20 μ L de estándar con una concentración de 200 ng L⁻¹. Posteriormente, se colocaron en un tubo Eppendorf de 20 mL y se centrifugó por 2 min, después se recolectaron las gotas para concentrar y se evaporó el extractante (cloroformo) y se redisolvió en 1- heptanol. A la redisolución se le añadieron 10 mg de soporte magnético funcionalizado y se mantuvo en agitación por ultrasonido por 5 min. El adsorbente se recolectó en el fondo del vial de reacción con la ayuda de un imán de neodimio y se eliminó el sobrenadante. La desorción se realizó con una mezcla de CH₃(CO)CH₃:MeCN:CH₂Cl₂ (1:2:2) y se separó el soporte magnético.

Finalmente, la mezcla obtenida se evaporó con gas nitrógeno y se redisolvió en BRB a pH=9 y se analizó considerando las condiciones óptimas para la fabricación de BiFEs y la DPV.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Elección de condiciones preliminares

4.4.1.1. Electrodeposición del bismuto

Las pruebas de electrodeposición del Bi se utilizaron para tener parámetros de referencia de potencial de deposición, concentración de bismuto y tiempo de deposición, los cuales fueron los factores de control utilizados en la optimización para la construcción de los BiFEs.

Por las características del analito en estudio (AFB1) se decidió utilizar una electrodeposición *ex-situ* del Bi, la cual consiste en llevar a cabo la

electrodeposición antes de transferir el electrodo a la solución que contenga la muestra para analizar (Economou, 2005).

La Figura 4.5 muestra el voltamperograma obtenido por VC. En el primer ciclo se observan ondas poco definidas, los ciclos posteriores muestran ondas más definidas, lo que se puede asociar a la formación de Bi^0 sobre el electrodo de grafito.

La onda catódica se observa en un potencial aproximado de -250 mV (I), el cual se utilizó para fijar los niveles del Factor A en la optimización del BiFE. También se observa la onda anódica del bismuto alrededor de los -100 mV (II).

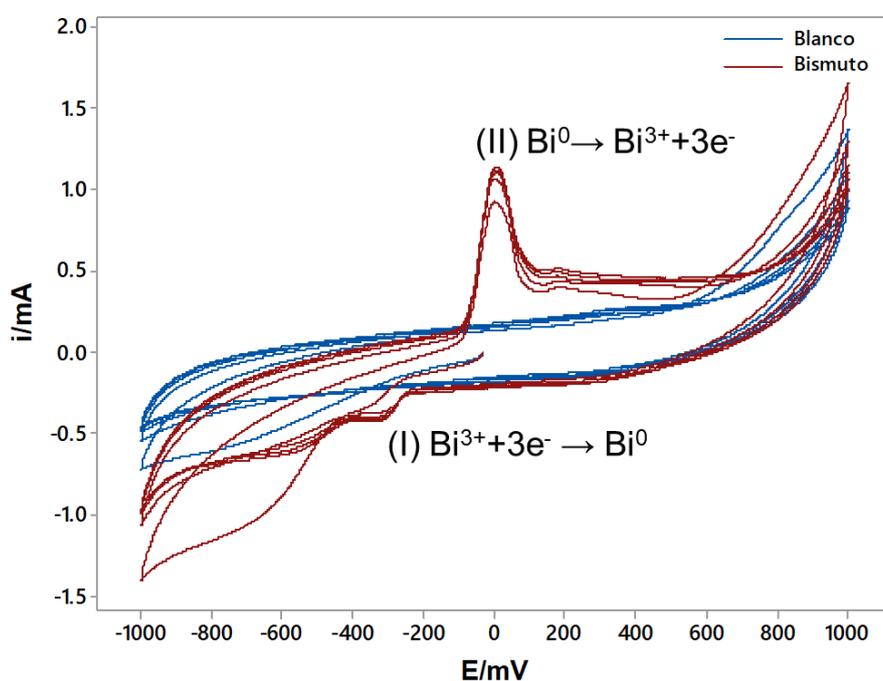


Figura 4.5. Electrodeposición del bismuto a una concentración de 200 mgL^{-1} con HNO_3 al 5% a 25 ciclos de -1000 a 1000 mV.

4.4.1.2. Señal analítica de AFB1

Del análisis voltamperométrico de AFB1 (160 ngL^{-1}) se obtuvo el voltamperograma mostrado en la Figura 4.6. La señal cercana a -650 mV podría estar relacionada con la reducción de AFB1, cuya reacción se muestra en la misma figura.

Es importante hacer mención que no hay reportes previos del uso de BiFEs para la detección de aflatoxinas, no obstante, se han reportado potenciales de

reducción entre -1250 mV y -1370 mV para la AFB1, utilizando un electrodo de gota de mercurio (Hajian et al., 2009). Por otro lado la señal catódica observada con los BiFEs se encuentra a un potencial más bajo comparada con lo reportado por los electrodos de gota de mercurio.

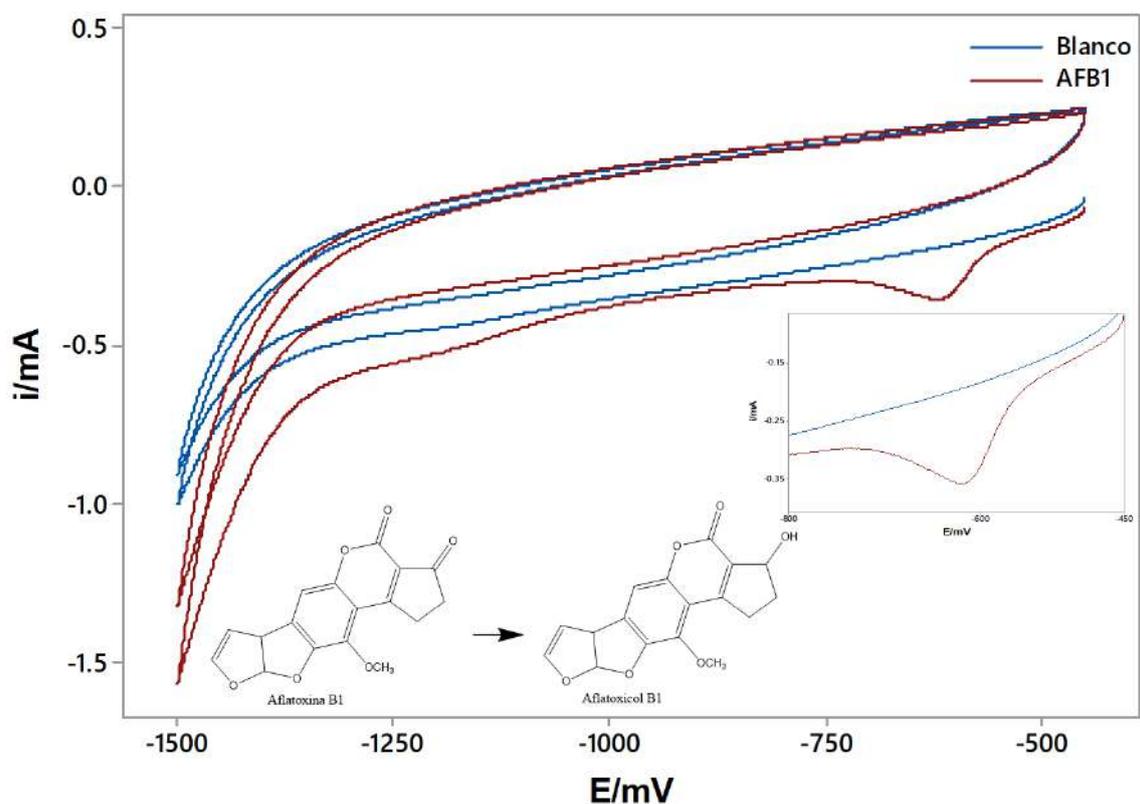


Figura 4.6. Voltamperograma obtenido para AFB1 (160 ngL⁻¹), en BRB pH=9 a 4 ciclos de -350 a -1000mV.

4.4.1.3. Estudio voltamperométrico de AFB1

La CV es una herramienta eficiente para investigar la cinética de reacción del electrodo. En teoría, la respuesta voltamperométrica de un material de electrodo activo a diferentes velocidades de barrido se puede resumir como:

$$i = av^b \quad (4.1)$$

Donde: la corriente medida (i) a un potencial fijo obedece una fuerte relación con la velocidad de barrido (v) y a es una constante que involucra la constante de Faraday y el área superficial electroactiva. Para una reacción redox limitada por difusión semi-infinita, el pico de corriente i varía con $v^{1/2}$ (esto es,

b=0.5); para un proceso de adsorción, varía con v (esto es $b=1$). Para obtener estos valores, se realiza la linealización, mediante una gráfica logarítmica, en la que la pendiente equivale al valor de b (Dong et al., 2016).

En la Figura 4.7 se presenta el gráfico linealizado ($\log v$ vs $\log i$), se observa un coeficiente de correlación $R^2=0.985$ y una pendiente de 0.3929, por lo cual el proceso que rige el sistema es la difusión (Gosser, 1993).

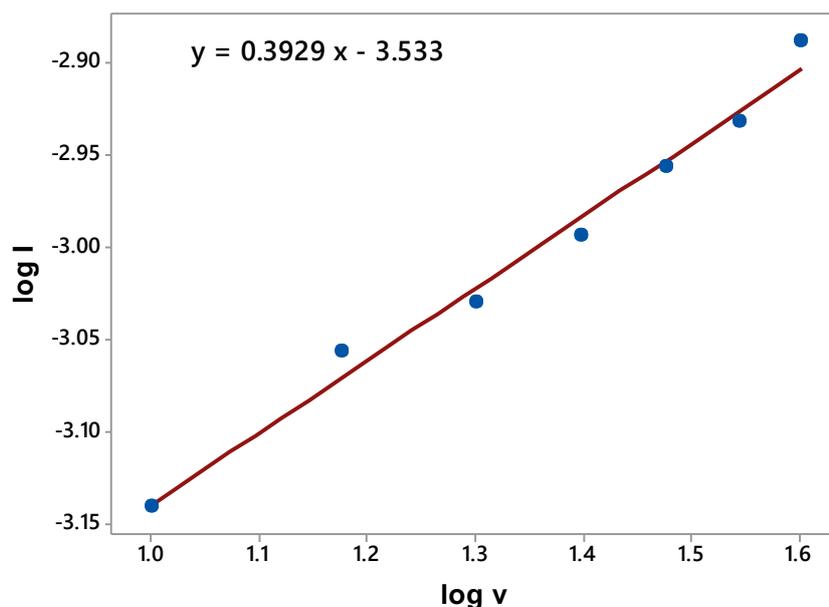


Figura 4.7. Gráfico de $\log v$ vs $\log i$ para la reducción de AFB1 (160 ng L^{-1} en BRB $\text{pH}=9$).

4.4.2. Optimización del electrodo de película de bismuto

En la Tabla 4.3 se muestra la matriz de experimentos, con sus respectivas señales de pico catódico, que corresponden a la reducción de la AFB1. Una vez obtenido todos los resultados para cada experimento, se llevó a cabo el análisis estadístico obteniendo la ecuación polinomial (Ecuación 4.2), que representa el efecto de cada uno de los factores (codificados) sobre la respuesta (señal catódica).

$$R = 0.5233 - 0.0613A + 0.0712B + 0.0225C - 0.0392 A^2 - 0.0892B^2 + 0.0233C^2 - 0.0600AB + 0.0625AC + 0.0525BC$$

(4.2)

De acuerdo con la Ecuación 4.2, los coeficientes más importantes, con efecto positivo en la respuesta fueron la concentración de Bi (III) y la interacción del potencial de deposición y el tiempo de deposición. Sin embargo, también hay términos en la ecuación que presentaron un efecto negativo en la respuesta, entre los que destacan el potencial de deposición y la interacción entre el potencial de deposición y la concentración de Bi (III). El coeficiente de correlación (R^2) de la ecuación fue de 0.8803.

Tabla 4.3. Matriz del diseño de experimentos para la fabricación de BiFEs. Donde A es el potencial de deposición (mV), B es la concentración de bismuto (mgL^{-1}) y C es el tiempo de deposición (s).

Experimento	Factores			
	A	B	C	Señal catódica (mA)
1	-280	350	75	0.33
2	-555	525	75	0.51
3	-280	525	120	0.48
4	-830	700	75	0.34
5	-555	350	120	0.40
6	-555	350	30	0.36
7	-830	525	120	0.48
8	-830	525	30	0.41
9	-555	700	120	0.66
10	-555	700	30	0.41
11	-830	350	75	0.33
12	-280	700	75	0.58
13	-555	525	75	0.52
14	-555	525	75	0.54
15	-280	525	30	0.66

Una vez realizado el análisis de datos se obtuvieron las superficies de respuesta y gráficos de contorno.

4.4.3.1. Efecto del potencial de deposición y la concentración de bismuto en la señal catódica de AFB1

En las superficies de respuesta y gráficos de contorno (Figura 4.8) se observa un aumento en la señal catódica cuando la concentración de Bi (III) es mayor a 550 mg L⁻¹ considerando un potencial de deposición de -280 mV.

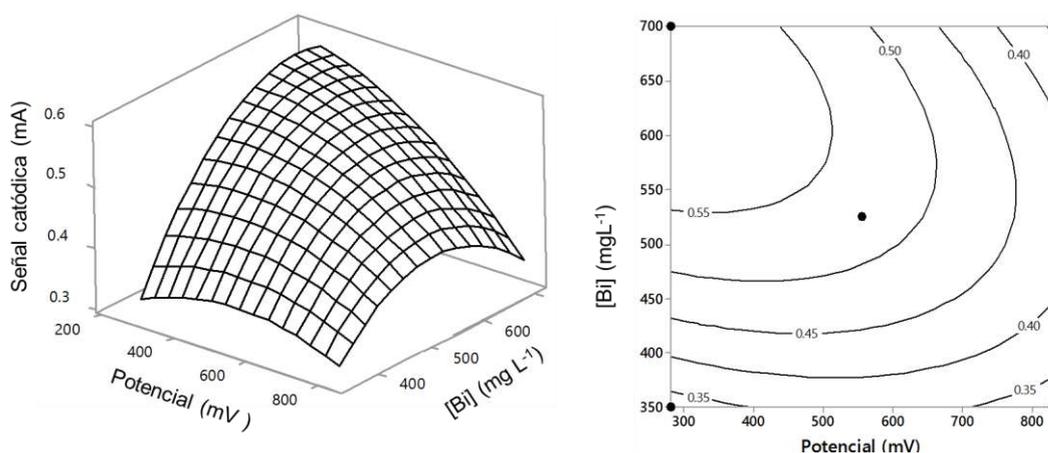


Figura 4.8. Efecto del potencial de deposición (mV) y la concentración de bismuto (mg L⁻¹) sobre la señal catódica (mA) de AFB1.

Para el análisis de metales, Economou (2005) reporta que los BiFEs fabricados por el método ex situ utilizan concentraciones entre 5-200 mg L⁻¹, la concentración de Bi (III) controla el grosor de la película y se ha demostrado que dicho grosor afecta la altura de pico dependiendo de los iones metálicos que se analicen (Kefala et al., 2003). Por otro lado, en el análisis de moléculas orgánicas los BiFEs se fabrican con concentraciones de Bi (III) entre los 50 y 500 mg L⁻¹ (Asadpour et al., 2011; Anik et al., 2010) lo que podría estar relacionado con el tipo de electrodo y la molécula que se analice.

4.4.3.2. Efecto del potencial de deposición y del tiempo de deposición en la señal catódica de AFB1

En la Figura 4.9 se observa que la respuesta aumenta cuando el potencial de deposición es bajo (aproximadamente -280 mV) y el tiempo de deposición está en el nivel central.

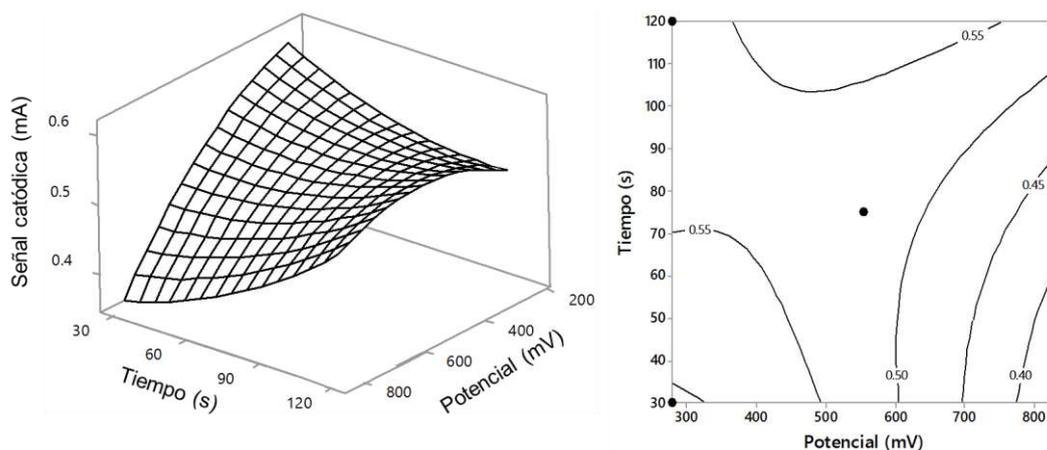


Figura 4.9. Efecto del potencial de deposición (mV) y del tiempo de deposición (s) sobre la señal catódica (mA) de AFB1.

El potencial de deposición afecta la calidad de la película de bismuto lo cual podría estar relacionado con la nucleación y formación de sitios activos (Królicka et al., 2004) mientras que el tiempo de deposición es el tiempo en el que es reducido de Bi(III) a Bi⁰ sobre la superficie del electrodo por lo que ambos factores están relacionados con el grosor de la película de bismuto (Arduini et al., 2010).

4.4.3.3. *Efecto de la concentración de bismuto y del tiempo de deposición en la señal catódica de AFB1*

La Figura 4.10 nos muestra que la respuesta aumenta cuando la concentración de bismuto aumenta (> 600 mg L⁻¹) y el tiempo de deposición es alto (120 s). Esto puede estar relacionado con el grosor de la película de bismuto, como se discutió en la Sección 4.4.3.2.

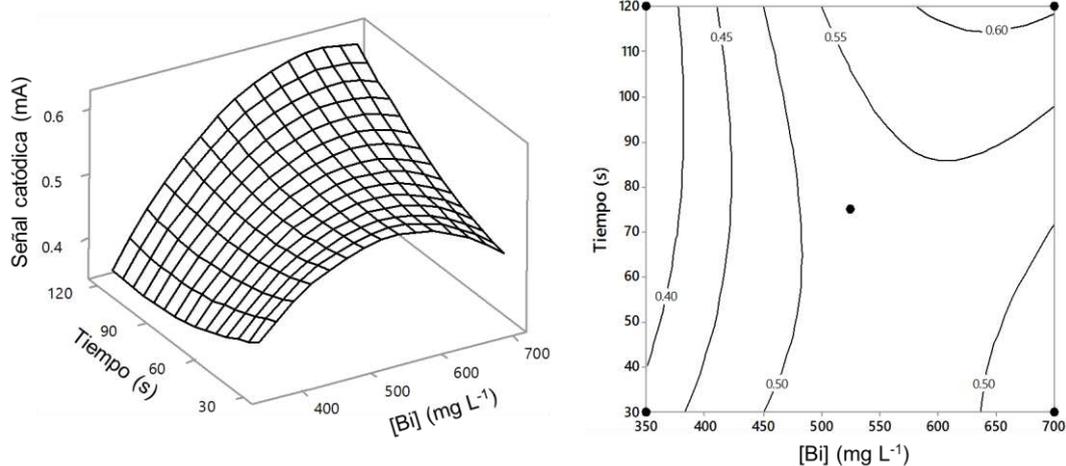


Figura 4.10. Efecto de la concentración de bismuto (mg L^{-1}) y del tiempo de deposición (s) sobre la señal catódica (mA) de AFB1.

Por otro lado, para el análisis de aflatoxinas no hay reportes donde se utilicen BiFEs por lo que es muy importante la fabricación y optimización de este tipo de electrodos con la finalidad de obtener la mejor señal analítica y tener una alternativa amigable con el Medio ambiente con respecto los electrodos de gota de mercurio (Lezi et al., 2012).

4.4.3. Experimentos confirmatorios

Con el fin de evaluar la confiabilidad del modelo teórico polinomial (Ecuación 4.2), se realizaron por triplicado experimentos confirmatorios y en base a la máxima señal catódica absoluta encontrada se comparó la respuesta teórica con la respuesta experimental.

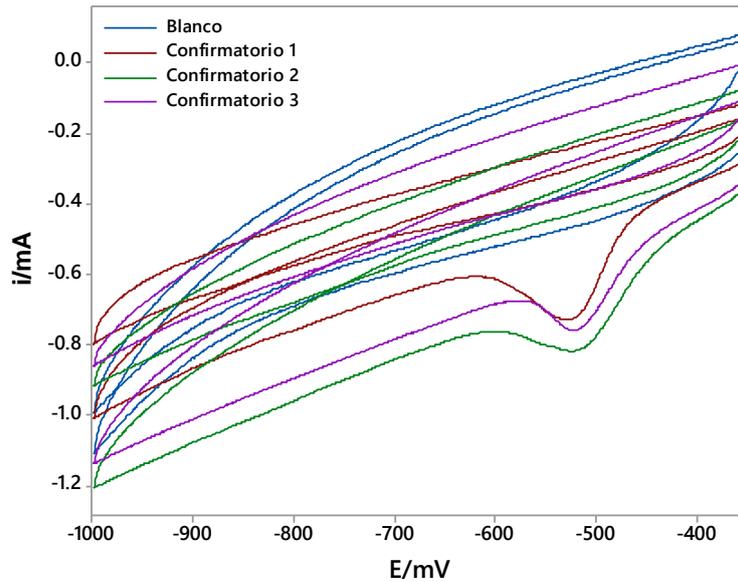


Figura 4.11. Experimentos confirmatorios para la fabricación de BiFEs.

En la Tabla 4.4 se muestran las condiciones óptimas a las cuales se debe depositar el bismuto en el electrodo de trabajo, experimentalmente se tienen una máxima intensidad de corriente de -0.77 mV con un %RSD de 5.19 (Figura 4.11).

Tabla 4.4. Experimentos confirmatorios para la fabricación de BiFEs. Factores: A, potencial de deposición (mV); B, concentración de Bi(III) (mg L^{-1}); C, tiempo de deposición (s); R, señal catódica (mA).

Experimentos confirmatorios	Factores			R	
	A	B	C	Teórica	Experimental (n=3, %RSD)
3	-280	602	60	-0.89	-0.77 (5.19)

4.4.4. Optimización de la voltamperometría diferencial de pulso

En la Tabla 4.5 se muestran los datos obtenidos por DPV, con los que se obtuvo la ecuación polinomial que representa el sistema (Ecuación 4.3); es decir, el efecto de cada uno de los factores (codificados) sobre la respuesta (señal catódica).

Tabla 4.5. Matriz del diseño de experimentos para la detección de AFB1 mediante DPV. Donde A es el paso de corriente (mV), B es ancho de pulso (ms), C es el periodo de pulso (ms) y D es la amplitud del pulso (mV).

Experimento	Factores de control				Señal catódica
	A	B	C	D	
1	20	20	90	200	0.621
2	10	20	90	150	0.310
3	20	30	60	150	0.335
4	20	20	90	100	0.362
5	20	20	75	150	0.310
6	20	20	75	150	0.361
7	20	10	75	200	0.187
8	30	20	75	200	0.277
9	30	20	90	150	0.341
10	20	10	90	150	0.093
11	20	10	60	150	0.360
12	30	20	75	100	0.256
13	10	10	75	150	0.000
14	30	30	75	150	0.000
15	10	30	75	150	0.130
16	20	30	75	100	0.176
17	20	10	75	100	0.122
18	20	20	60	100	0.428
19	20	20	75	150	0.223
20	30	20	60	150	0.181
21	20	30	75	200	0.431
22	20	20	60	200	0.457
23	30	10	75	150	0.271
24	10	20	75	200	0.608
25	10	20	75	100	0.295
26	10	20	60	150	0.353
27	20	30	90	150	0.251

En la ecuación 4.3 A-D representan los factores control: A (paso de corriente), B (ancho de pulso), C (periodo de pulso) y D (amplitud de pulso); y R el factor respuesta (señal catódica).

$$R = 3.60 + 0.0340A + 0.0392B - 0.08001C - 0.01497D - 0.000513 A^2 - 0.001345B^2 - 0.000366C^2 + 0.000039D^2 - 0.001003AB + 0.00038AC - 0.000146AD - 0.000305BC + 0.000095BD + 0.000077CD$$

(4.3)

Tomando en cuenta los términos de la Ecuación 4.3, el factor con un mayor efecto positivo en la respuesta es el ancho de pulso (B) y el paso de corriente (A); mientras que el factor que tuvo un efecto negativo el periodo de pulso (D).

La interacción entre el paso de corriente (A) con el ancho de pulso (B) tienen un efecto negativo sobre la respuesta. El coeficiente de correlación (R^2) fue de 0.8164. Una vez realizado el análisis de datos se obtuvieron las superficies de respuesta y gráficos de contorno.

4.4.4.1. Efecto del paso de potencial y el ancho de pulso en la señal catódica de AFB1

La Figura 4.12 muestra que la señal aumenta cuando el paso de potencial es bajo (10 mV) y el ancho de pulso es alto (aprox. 25 ms) pero cuando el paso de potencial y el ancho de pulso son bajos la respuesta disminuye

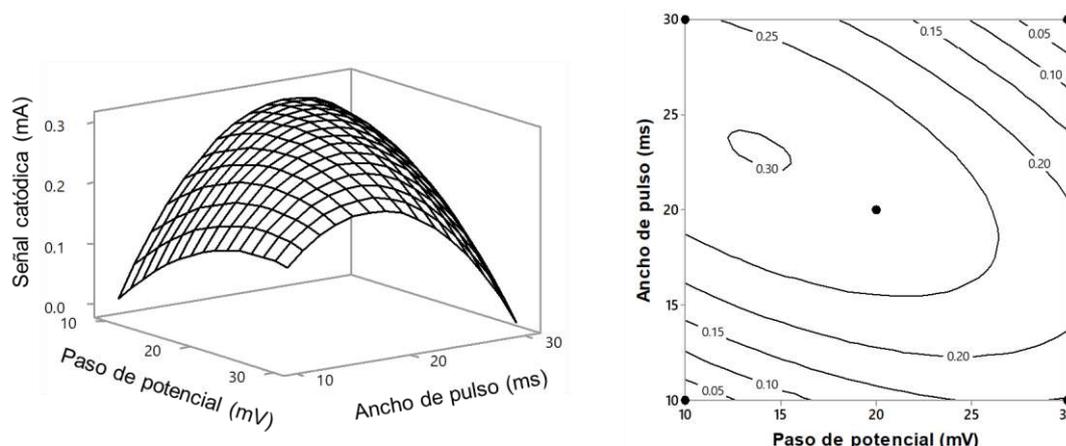


Figura 4.12. Efectos del paso de potencial (mV) y el ancho de pulso (ms) sobre la señal catódica (mA) de AFB1.

4.4.4.2. Efecto del paso de potencial y el periodo de pulso en la señal catódica de AFB1

En la Figura 4.13 se observa que la señal aumenta cuando el paso de potencial es bajo (10 mV) y el periodo de pulso está en los niveles centrales (aprox. 70 ms).

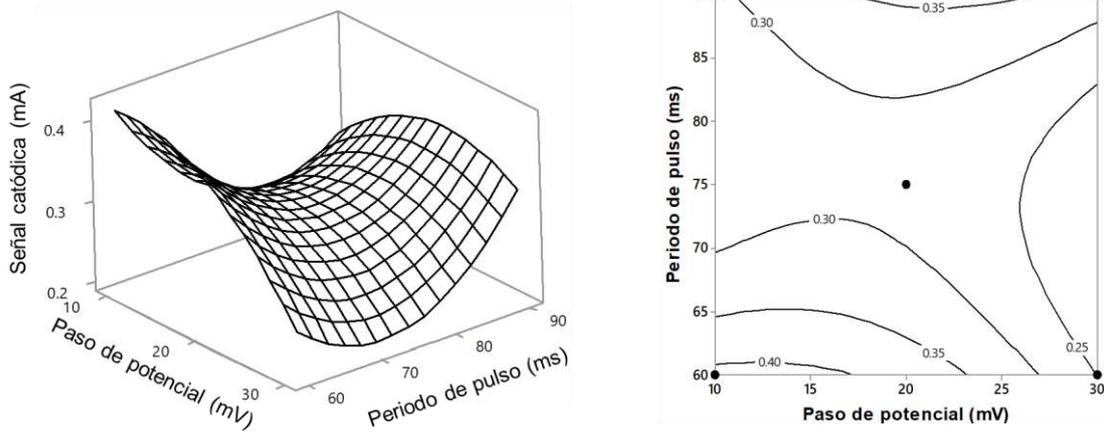


Figura 4.13. Efectos del paso de potencial (mV) y el periodo de pulso (ms) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1.

4.4.4.3. Efecto del paso de potencial y la amplitud de pulso en la señal catódica de AFB1

La señal de AFB1 aumenta cuando el paso de potencial es bajo (10 mV) y la amplitud de pulso es alta (200 mV) pero cuando el paso de potencial y la amplitud de pulso son bajas, la respuesta disminuye (Figura 4.14).

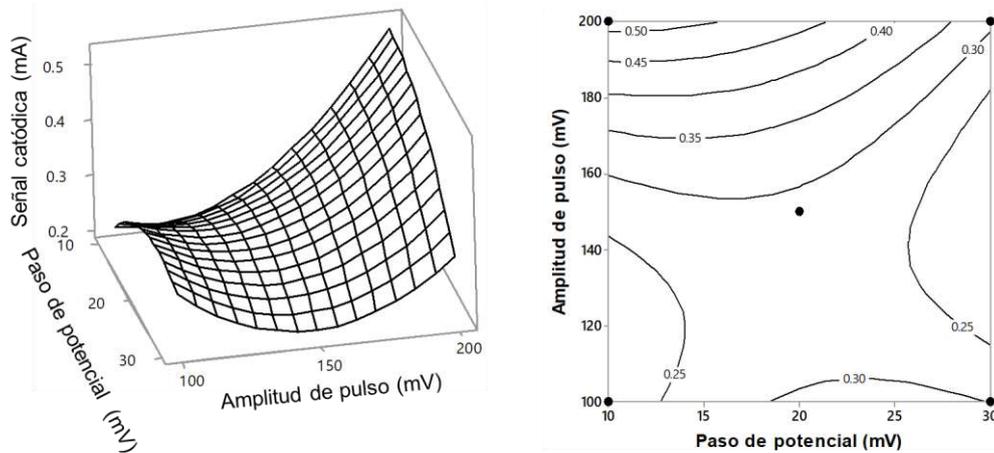


Figura 4.14. Efectos del paso de potencial (mV) y la amplitud de pulso (mV) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1.

4.4.4.4. Efecto del ancho de pulso y el periodo de pulso en la señal catódica de AFB1

En la Figura 4.15 se observa que la señal aumenta cuando el ancho de pulso está en los niveles centrales (aprox. 20 ms) y el periodo de pulso es bajo (60 ms). Por otro lado, la señal aumenta cuando el periodo de pulso es alto (90 ms) considerando un ancho de pulso de 25 ms.

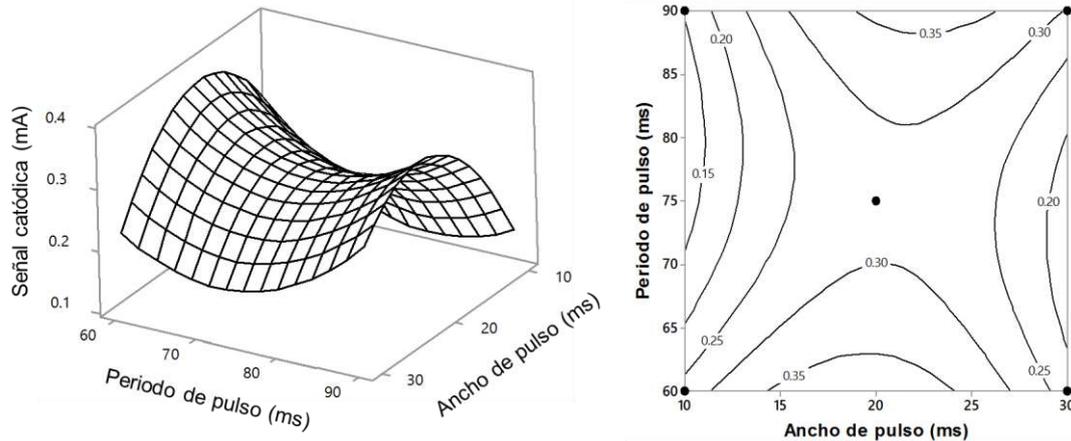


Figura 4.15. Efectos del ancho de pulso (ms) y el periodo de pulso (ms) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1.

4.4.4.5. Efecto del ancho de pulso y la amplitud del pulso en la señal catódica de AFB1

La Figura 4.16 muestra que la respuesta aumenta cuando el ancho de pulso esta niveles centrales (aprox. 23 ms) y la amplitud de pulso es mayor (200 mV).

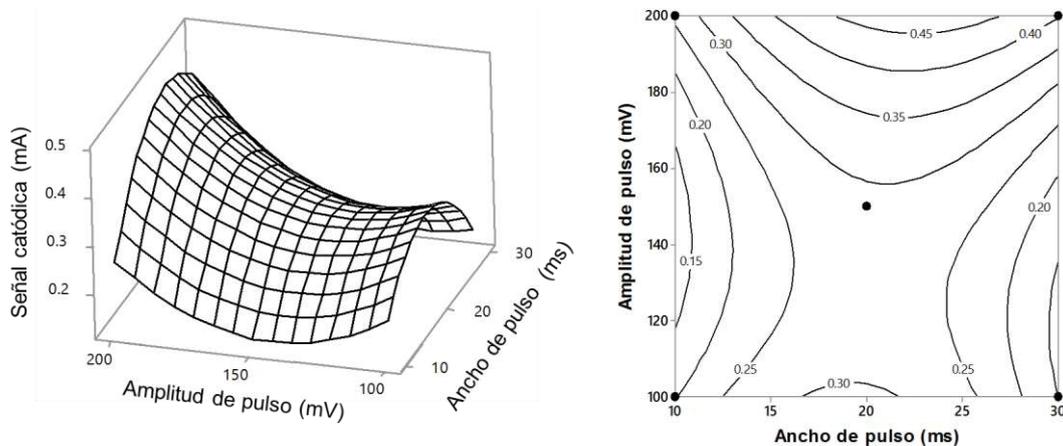


Figura 4.16. Efectos del ancho de pulso (ms) y la amplitud del pulso (mV) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1.

4.4.4.6. Efecto del periodo de pulso y la amplitud del pulso en la señal catódica de AFB1

La respuesta aumenta cuando el periodo de pulso es elevado (90 ms) y la amplitud de pulso es alto (200 mV) pero cuando la amplitud de pulso está en niveles bajos la respuesta disminuye (Figura 4.16).

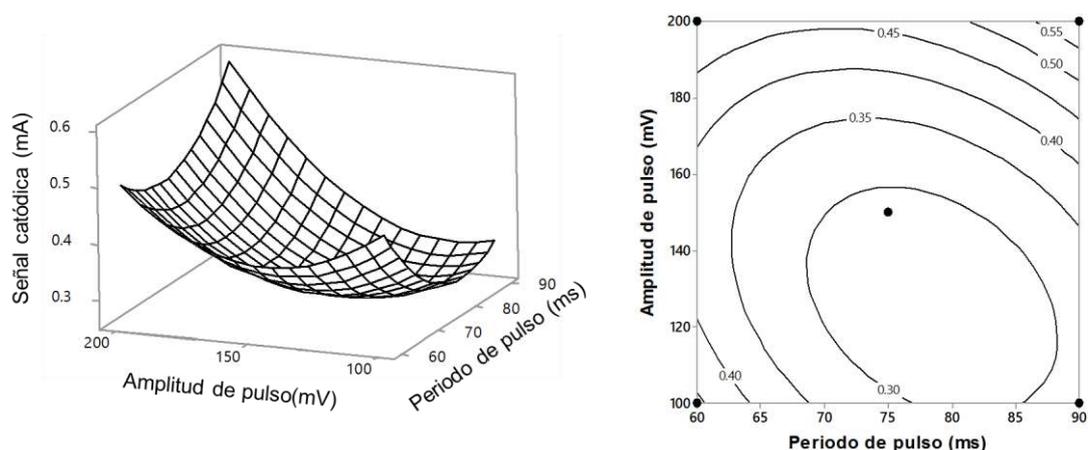


Figura 4.17. Efectos del periodo de pulso (ms) y la amplitud del pulso (mV) sobre la señal catódica (mA) sobre AFB1.

La diferencia de potenciales provoca un intercambio de electrones entre el electrodo de trabajo y las especies electroactivas en una celda. Sin embargo, esta diferencia también provoca la carga y descarga de la doble capa lo que induce un flujo de corriente capacitiva. Esta corriente es indeseable para fines cinéticos y analíticos. El fundamento de la DPV es disminuir el flujo de corriente capacitiva mediante un paso de potencial o pulso por lo que la disminución de la corriente faradaica es más lenta que la de la corriente no faradaica (Bard et al., 2001; Osteryoung et al., 1988).

Los parámetros más importantes para las técnicas voltamperométricas de pulsos son: la amplitud de pulso (mV), que es la altura de pulso de potencial, el ancho de pulso (ms), que es la duración del pulso, y el periodo de pulso (ms), definido como un tiempo al final de pulso en el que se mide la corriente (Gulaboski et al., 2008). Para el análisis de moléculas orgánicas utilizando BiFES y DPV no se han reportado ninguna optimización mediante un diseño experimental (Asadpour & Nafaji, 2011, Lou et al., 2010, Figueiredo et al., 2010, Figueiredo-Filho et al., 2012, Deylova et al., 2012, Bodoki et al., 2007,

Campestrini et al., 2010). La optimización de los parámetros involucrados en la DPV podría mejorar la separación de las corrientes faradaicas y no faradaicas favoreciendo la señal catódica de la AFB1.

4.4.5. Experimentos confirmatorios

Tomando como base la máxima señal catódica encontrada, se comparó la respuesta teórica con la respuesta experimental, con el fin de evaluar la confiabilidad del modelo polinomial (Ecuación 4.3). Para ello, se realizaron los respectivos experimentos confirmatorios por triplicado.

Tabla 4.6. Experimentos confirmatorios para la detección de AFB1. Factores: A, paso de corriente (mV); B, ancho de pulso (ms); C, periodo de pulso (ms); D amplitud de pulso (mV); R señal catódica (mV).

Experimentos confirmatorios	Factores de control				R	
	A	B	C	D	Teórico	Experimental (n=3, %RSD)
3	10	28	60	200	-0.68	-0.80 (10.06)

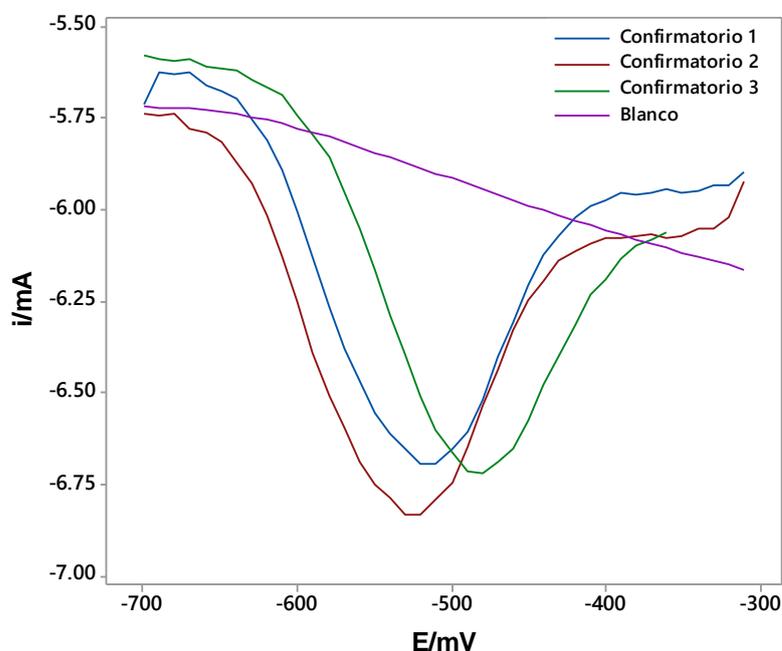


Figura 4.18. Experimentos confirmatorios y condiciones óptimas para la detección de AFB1 mediante DPV.

En la Tabla 4.6 se muestran las condiciones óptimas a las cuales se debe depositar el bismuto en el electrodo de trabajo, experimentalmente se tienen una máxima intensidad de corriente de -0.80 mA con un %RSD de 10.06 (Figura 4.18).

4.4.6. Parámetros analíticos para la metodología por DPV

Bajo las condiciones óptimas antes mencionadas, se obtuvo una curva de calibración para AFB1 (Figura 4.19) con estándares a diferentes concentraciones de AFB1. Mediante el correspondiente análisis estadístico, se tuvo una ecuación de regresión de i (mA) = 0.0144 [AFB1] (ng L⁻¹) - 1.1196 ($R^2=0.9899$). Para el método de análisis propuesto el LOD y el LOQ calculados tienen valores de 19.07 ng L⁻¹ y 63.56 ng L⁻¹ respectivamente. La curva de calibrado presentó una buena linealidad de rango de concentraciones entre 63.56 y 200 ng L⁻¹. La curva se construyó con estándares con concentraciones entre 100-200 ng L⁻¹ por lo que se podrían establecer concentraciones por debajo de ese intervalo. En la Tabla 4.7 se presentan los parámetros analíticos para DPV.

Tabla 4.7. Parámetros analíticos de AFB1 determinada por DPV.

Parámetros	Valores
Coeficiente de correlación	0.9899
Pendiente \pm sB (ng L ⁻¹)	0.0144 ± 0.0012
Ordenada al origen \pm sA	-1.1196 ± 0.1897
Límite de detección (ng L ⁻¹)	19.07
Límite de cuantificación (ng L ⁻¹)	63.56
Intervalo lineal (ng L ⁻¹)	63.56-200

Yaacob y colaboradores (2008) determinaron AFB1 en cacahuates mediante SWV utilizando un electrodo de gota de mercurio reportando un LOD de 390 ng L⁻¹. Por otro lado, Hajian y colaboradores (2009) determinaron AFB1 en cacahuates mediante DPV con un electrodo de gota de mercurio obteniendo un LOD de 15 μ g L⁻¹. El LOD obtenido con los BIFEs son menores que los reportados por autores antes mencionados lo que sugiere que este tipo de electrodos son una buena alternativa para el análisis de AFB1.

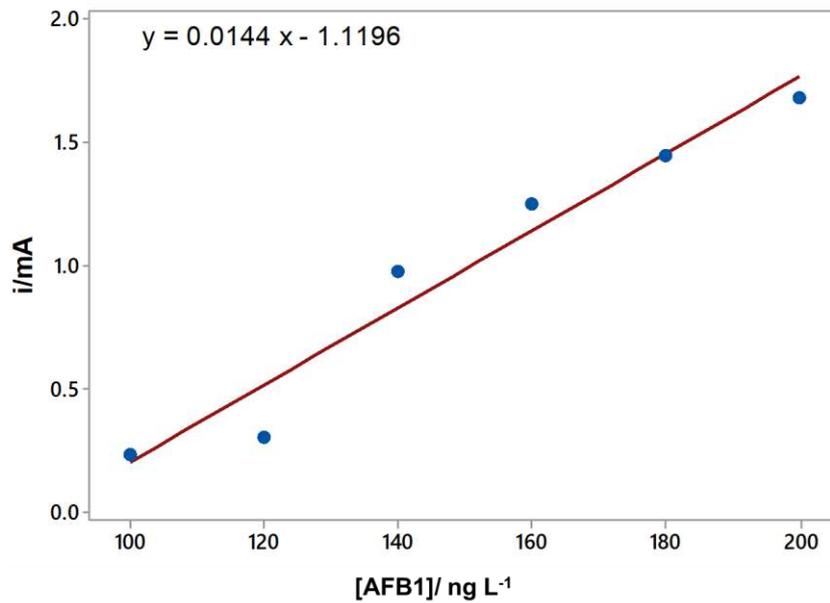


Figura 4.19. Curva de calibrado de AFB1.

Anukul y colaboradores (2013) reportaron los límites máximos permisibles de diversos países de Asia para diversos alimentos con AFB1, los valores están entre 100-2000 ng L⁻¹. En la metodología empleada se obtuvo se pueden detectar una concentración de 63.56 ng L⁻¹, que es un valor menor a los límites máximos permisibles por lo que la DPV utilizando BiFEs podría ser una alternativa sencilla y rápida para el análisis de AFB1 en alimentos.

4.4.7. Extracción, preconcentración y detección de AFB1

En la Figura 4.20 se observa la señal catódica para AFB1 una vez realizada DLLME y la MDMSPE. La metodología propuesta podría ser utilizada para el análisis de AFB1, además de ser un método que requiere menor cantidad de reactivos, amable con el ambiente, rápida y sencilla.

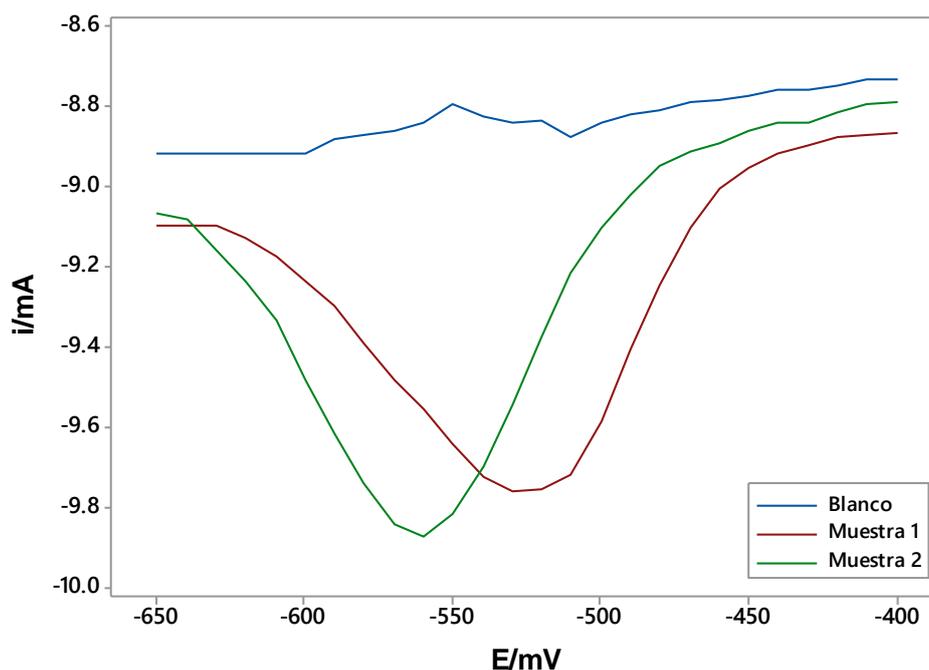


Figura 4.20. Señal de AFB1 obtenida al realizar la DLLME y la MSMSPE.

4.5. Conclusiones

Se estableció la metodología para la extracción, preconcentración y detección de AFB1 mediante DPV utilizando BiFes obteniendo un LOD y el LOQ obteniendo valores de 19.07 ng L^{-1} y 63.56 ng L^{-1} que son un valores menores comparados con los límites máximos permisibles por lo que la metodología empleada podría ser una excelente alternativa para el análisis de AFB1.

Por otro lado, el acoplamiento de la DLLME y la MDMSPE permitió extraer AFB1 de una manera eficiente, rápida y sencilla, además, se comprobó que dichas técnicas se pueden acoplar a métodos voltamperométricos como la DPV, la cual es una técnica sensible, rápida y sencilla. También se utilizaron BiFes como alternativa a los electrodos de gota de mercurio por lo que la metodología empleada es barata, rápida, sencilla, amigable con el ambiente y permite detectar concentraciones traza en el orden de ng L^{-1} .

Referencias

Amoli-Diva M., Taherimaslak Z., Allahyari M., Pourghazi K., Manafi M.H. (2015). Application of dispersive liquid–liquid microextraction coupled with vortex-

- assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid-phase extraction for determination of aflatoxin M1 in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. *Talanta*, 134:98–104.
- Anik U., Çubukçu M., Cevik S., Timun S. (2010). Usage of Bismuth Film Electrode as Biosensor Transducer for Alkaline Phosphatase Assay. *Electroanalysis*, 22:1519
- Arduini F., Quintana C.J., Amine A., Palleschi G., Moscone D. (2010). Bismuth-modified electrodes for lead detection. *Trends in Analytical Chemistry*, 29:1295-1304.
- Asadpour K., Nafaji P. (2011). Bismuth Modified Disposable Pencil-Lead Electrode for Simultaneous Determination of 2-Nitrophenol and 4-Nitrophenol by Net Analyte Signal Standard Addition Method. *Electroanalysis*, 23:2241.
- Bard A.J. and Faulkner, L., *Electrochemical Methods*, Wiley, New York, 2001, pp. 3-25.
- Bodoki E., Sandulesc R., Roman L. (2007). Method validation in quantitative electrochemical analysis of colchicine using glassy carbon electrode. *Cent. Eur. J. Chem.* 5 (2007) 766.
- Campestrini I., Braga C.B., Vieira I.C., Spinelli A. (2010). Application of bismuth-film electrode for cathodic electroanalytical determination of sulfadiazine. *Electrochim. Acta* 55: 4970
- Daneile S., Battistel D., Bergamin S., Bragato S. (2010). Voltammetric Determination of Glucose at Bismuth-Modified Mesoporous Platinum Microelectrodes. *Electroanalysis* 22: 1511
- Daniele S., Bragato C., Battistel D. (2012). Bismuth-Coated Mesoporous Platinum Microelectrodes as Sensors for Formic Acid Detection. *Electroanalysis* 24 (2012) 759.
- Deboyla D., Vyskočil V., Barek J., Economou A. (2012). Bismuth film electrode at a silver solid amalgam substrate as a new tool for voltammetric determination of electrochemically reducible organic compounds. *Talanta*, 102:68–74.

- Dong X., Chen L., Liu J., Haller S., Wang Y., Xia Y. (2016). Environmentally-friendly aqueous Li (or Na)-ion battery with fast electrode kinetics and super-long life. *Science Advances* 2(1):e1501038.
- Duhart B.T., Shaw S., Wooley M., Allen T. Grimes, C. (1988). Determination of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detector. *Anal. Chim. Acta.* 208: 343-346.
- Economou A. (2005). Bismuth-film Electrode: Recent Development and Potentialities for Electroanalysis. *Trends Anal. Chem.* 24(4): 334-340.
- Fifield F.W., Kealey, D. (2000). *Principle and Practice of Analytical Chemistry* 3rd Edition. UK: Blackwell Science.
- Farghaly O.A., Abdel Hameed R.S., Abu-Nawwas A.H. 2014. Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques *Int. J. Electrochem. Sci.* 9: 3287 – 3318.
- Figueiredo L.C., Dos Santos V.B., Janegitz B.C., Guerreiro T.B., Fatibello O., Faria R.C., Marcolino L.H. (2010). Differential pulse voltammetric determination of Paraquat using a Bismuth-film electrode. *Electroanalysis* 24: 303.
- Figueiredo L.C., Azzi D.C., Janegitz (2012). Determination of Atrazine in Natural Water Samples by Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry Using a Bismuth Film Electrode. *Electroanalysis* 24:303.
- Gaal F., Guzsvany V., Bjelica L. (2007). Determination of various insecticides and pharmaceuticals using differently modified glassy carbon electrodes. *J. Serb. Chem. Soc.* 72: 1465.
- Gavriloca M.A., Slepchenko G.B., Mikheeva E.V., Derybina V.I. (2014). Voltammetric determination of aflatoxin B1. *Procedia Chemistry* 10: 114-119.
- Gonzalez, M.P.E., Mattusch, J. Wennrich, R. (1998). Stability and Determination of Aflatoxins by High-performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection. *J.Chromatography A.* 828: 439-444
- Gosser D.K. (1993). *Cyclic Voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms.* USA VCH

- Hajian R., Ensafi A.A. (2009). Determination of aflatoxins B1 and B2 by adsorptive cathodic stripping voltammetry in groundnut. *Food Chemistry* 115: 1034–1037.
- Hashemi M., Taherimaslak Z., Rashidi S. (2014b). Enhanced spectrofluorimetric determination of aflatoxin M1 in liquid milk after magnetic solid phase extraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 128:583–590.
- Hutton E.A., Ogorevc B., Smyth M.R. (2004). Cathodic Electrochemical Detection of Nitrophenols at a Bismuth Film Electrode for Use in Flow Analysis. *Electroanalysis* 16: 1616.
- Kefala G., Economou A., Voulgaropoulos A., Sofoniou, M. (2003). A Study of Bismuth-film Electrode for the Detection of Trace Metals by Anodic Stripping Voltammetry and Their Application to the Determination of Pb and Zn in Tapwater and Human Hair. *Talanta*, 61:603-610.
- Kreft G.L., Braga O.C., Spinelli A. (2012). Analytical electrochemistry of vitamin B12 on a bismuth-film electrode surface. *Electrochim. Acta*. 83: 125–132
- Królicka A., Bobrowski A. (2004). Bismuth film electrode for adsorptive stripping voltammetry – electrochemical and microscopic study. *Electrochemistry Communications*, 6:99–104.
- Lau P.H., Chu, F.S. (1983). Preparation and Characterisation of Acid Dehydration Product of Aflatoxinol. *J. Assoc. Off. Anal Chem.* 66(1): 98-101.
- Lezi N., Vyskočil V., Economou A., Barek J. (2012). Electroanalysis of Organic Compounds at Bismuth Electrodes: A Short Review. *Sensing in Electroanalysis*, 7:71-78.
- Lin L., Lawrence N.S., Thongngamdee S., Wang J., Lin, Y. (2005). Catalytic Adsorptive Stripping Determination of Trace Chromium (VI) at the Bismuth Film Electrode. *Talanta*, 65:144-148.
- Lin L., Thongngamdee S., Wang J., Lin Y., Sadik O.A., Ly S.-Y. (2005). Adsorptive Stripping Voltammetric Measurements of Trace Uranium at the Bismuth Film Electrode. *Anal. Chim. Acta*. 535: 9-13.
- Lou L., Wang X., Ding Y., Li Q., Jia J., Deng D. (2010). Electrochemical determination of nitrobenzene using bismuth-film modified carbon paste

- electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. *Anal. Methods* 2: 1095
- Osteryoung J.G., Schreiner M.M. (1988). Recent advances in pulse voltammetry, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 19.
- Smyth M. R., Lawellin D. W., Osteryoung, J.G. (1979). Polarographic Study of Aflatoxin B1, B2, G1 and G2: Application of Differential-pulse polarography to the determination of Aflatoxin B1 in Various Foodstuff. *Analyst*. 104:73–78.
- Sopha H., Hocevar S.B., Pihlar B., Ogorevc B. (2012). Bismuth film electrode for stripping voltammetric measurement of sildenafil citrate. *Electrochim. Acta* 60: 274.
- Wang, J. (2000). *Analytical Electrochemistry*. USA: WILEY-VCH.
- Yaacob M.H., Yusoff A.R., Ahamad R. (2008). Square Wave Cathodic Stripping Voltammetric Technique for Determination of Aflatoxin B1 in Ground Nut Sample. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 12:132-141.
- Yang M., Zhang Z., Hu Z., Li J. (2005). Differential pulse anodic stripping voltammetry detection of metallothionein at bismuth film electrodes. *Talanta*, 69:1162

Conclusiones generales

Se optimizó por primera vez la síntesis de nanopartículas magnéticas mediante un método solvotérmico acoplado a microondas obteniendo tamaños nanométricos, además, se mejoró la funcionalización con TMSPT y AMT lo que permitió su uso como soporte de extracción de AFB1. Se logró diseñar un método de preconcentración de AFB1 utilizando el acoplamiento de la DLLME y la MDMSPE permitiendo extraer en el orden de los ng L^{-1} .

Por otro lado, se optimizó la fabricación de un electrodo de película de bismuto para maximizar la señal catódica de AFB1 con lo que se establece una alternativa a los electrodos de gota de mercurio y a el análisis de micotoxinas utilizando este tipo de electrodo, también se optimizaron variables que afectan a la voltamperometría diferencial de pulso, lo que permitió mejorar la señal catódica del analito, además de que se reporta por primera vez la aplicación de un diseño experimental para mejorar la señal de AFB1. Asimismo, se realizaron los cálculos de los parámetros analíticos obteniendo LOD y LOQ en el de los ng L^{-1} .

Con los resultados obtenidos se pudo establecer una metodología para la detección de AFB1, la cual es una metodología sencilla, rápida, amable con el ambiente, requiere menor cantidad de recursos y detecta cantidades traza.

Perspectivas

Con base a los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto, se presentan a continuación las perspectivas:

1. Realizar un estudio cinético de la estabilidad y/o degradación de AFB1 en solución (tanto en solvente orgánico como en BBR).
2. Determinar las propiedades magnéticas de los soportes sintetizados y evaluar su dispersión en diferentes solventes.
3. Optimizar el proceso de extracción de la AFB1 en muestras reales.
4. Acoplar las metodologías de extracción de AFB1 con la determinación voltamperométrica del analito en cuestión.
5. Mejorar y validar la metodología empleada con métodos ya reportados como el HPLC acoplado a fluorescencia,