

Desarrollo de una metodología voltamperométrica para la determinación de Aflatoxina B1 usando un electrodo de carbón vítreo modificado con una película de bismuto y nanopartículas de oro

González Aguilar Luis Ángel¹, Álvarez Romero Gaaan Arturo¹, Castañeda Ovando Araceli¹, Chávez Flores Benito², Hernández León Sergio², Franco Guzmán Miriam^{2*}

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Química. Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, Mineral de la Reforma, Hidalgo, C.P. 42184. México.

²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales. Avenida Universidad Km 1 s/n Exhacienda Aquetzalpa, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, C.P. 43600. México.

*Autor para correspondencia: miriam_franco@uaeh.edu.mx

ORCID : 0000-0002-8149-2419

Recibido:

30/junio/2022

Aceptado:

14/septiembre/2022

Palabras clave:

Aflatoxina B1,
voltamperometría de onda cuadrada,
nanopartículas de oro

Keywords:

Aflatoxin B1,
square wave voltammetry,
gold nanoparticles

RESUMEN

La Aflatoxina B1 es una micotoxina altamente cancerígena que se encuentra en una gran variedad de alimentos y piensos, por lo tanto, su cuantificación es importante para la industria de los alimentos. En este trabajo de investigación se describe el desarrollo de una metodología electroanalítica utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado superficialmente con una película de bismuto y nanopartículas de oro para la cuantificación de Aflatoxina B1, por las ventajas que presenta frente a otras metodologías que ya se han estudiado y validado para la cuantificación de esta sustancia. Los límites de detección y de cuantificación que se obtuvieron después de la de la optimización de la Voltamperometría de Onda Cuadrada mediante un diseño Box-Behnken fueron 11.19 y 37.31 ng L⁻¹, respectivamente. Estos parámetros nos indican que es posible cuantificar la aflatoxina B1 en un intervalo de concentraciones a nivel traza, tal como se encuentra en alimentos.

ABSTRACT

Aflatoxin B1 is a highly carcinogenic mycotoxin found in a wide variety of foods and feeds, therefore, its quantification is important for the food industry. This research paper describes the development of an electroanalytical methodology using a glassy carbon electrode modified with a bismuth film and gold nanoparticles for quantification of Aflatoxin B1, due to the advantages it presents over other methodologies that have already been studied and validated for the quantification of this substance. The detection and quantification limits obtained after optimization of Square Wave Voltammetry using a Box-Behnken design were 11.19 and 37.31 ng L⁻¹, respectively. These parameters indicated that it is possible to quantify the Aflatoxin B1 in a wide concentration range at trace levels, as expected in food.

Introducción

Las aflatoxinas B1 (AFB1) son un grupo de micotoxinas naturales producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que pueden encontrarse en una extensa variedad de alimentos y piensos (Feng et al., 2020; Tan et al., 2009). En la naturaleza existen diferentes aflatoxinas, incluidas las B1, B2, G1 y G2. Estas sustancias exhiben una amplia gama de efectos biológicos, y las micotoxinas individuales pueden ser mutagénicas, cancerígenas, embriotóxicas, teratogénicas, estrogénicas o inmunosupresoras (Paniel et al., 2010). Sin embargo, la AFB1 es la más abundante y cancerígena (Feng et al., 2020; Tan et al., 2009), por lo que fue clasificada como sustancia cancerígena del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Kolossova et al., 2006).

Estos hongos crecen en una gran variedad de productos alimenticios bajo una variedad de condiciones de temperatura y humedad (Paniel et al., 2010), y mediante la contaminación de los materiales de alimentación animal. Dentro de los productos alimenticios se incluyen el maíz, el maní, los frijoles, el arroz, la semilla de algodón, los cultivos de cereales, ya sea antes o después de la cosecha (Tan et al., 2009; Radoi et al., 2008; Creppy, 2002; Ellis et al., 1991). Por esto, los humanos están expuestos a las aflatoxinas ya sea directamente al comer granos contaminados o indirectamente a través de productos animales (Tan et al., 2009). Debido a que las aflatoxinas son relativamente estables al calor, es difícil destruirlas una vez que se forman; por lo que la contaminación de los cultivos por aflatoxinas es inevitable en la mayoría de los casos. Esto las convierte en un tema muy importante para la seguridad alimentaria global (Paniel et al., 2010), por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU. ha establecido el límite máximo de 20 g/kg de aflatoxinas en todos los alimentos, y los niveles máximos de AFB1 y la suma de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2) estrictamente establecidos por la Comisión Europea son, respectivamente, 2 µg/kg y 4 µg/kg en algunos tipos de cereales y los productos derivados de estos cereales (Ma et al., 2016).

La importante amenaza que representa para la salud humana la contaminación de los alimentos ha motivado a una extensa investigación sobre esta toxina (Feng et al., 2020; Paniel et al., 2010; Tan et al., 2009), en donde se incluye identificar las fuentes de contaminación mediante ensayos rápidos, selectivos y sensibles para minimizar la aparición de AFB1 en los alimentos (Paniel et al., 2010).

A lo largo del tiempo se han establecido varios métodos para la detección de AFB1, incluida la cromatografía en capa fina (TLC) (Var et al., 2007; Trucksess et al., 1984), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Andrade et al., 2013; Campone et al., 2013; Jaimez et al., 2000) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Christoforidou et al., 2015; Lee et al., 2004; Stroka et al., 2000). TLC es un método relativamente económico que requiere poco equipo, pero no nos permite hacer un análisis cuantitativo; la HPLC suele combinarse con diferentes procedimientos de limpieza, como la extracción en fase sólida, la extracción con fluidos supercríticos, la cromatografía de inmunoafinidad y la dispersión en fase sólida de la matriz; lo que implica que el análisis sea más largo, complicado, costoso y menos amigable con el ambiente.

Finalmente, están los ensayos inmunoquímicos, que son rápidos, simples, específicos, sensibles e incluso portátiles (Magliulo et al., 2005; Thirumala-Devi et al., 2002). Sin embargo, el complejo proceso de preparación de anticuerpos y enzimas bloquea la aplicación de ELISA. Por lo tanto, es una tarea apremiante desarrollar una tecnología simple para monitorear AFB1 en productos agrícolas (Wang et al., 2019). Recientemente, el método electroquímico atrajo más la atención para detectar trazas de AFB1, debido a sus ventajas de fácil operación, rapidez, alta sensibilidad y selectividad, bajo consumo de reactivos, amplio rango dinámico, bajo límite de detección y bajo costo (Feng et al., 2020).

En la última década, los electrodos de película de bismuto (BFEs) han demostrado ser una alternativa verde para los electrodos de mercurio, debido a su baja toxicidad y con propiedades electroquímicas similares a las del mercurio.

Se ha reportado en la literatura su uso para la determinación y cuantificación exitosa de metales en cantidades traza y en el análisis de diferentes compuestos orgánicos (Nigović et al., 2009).

Los BFEs, sin embargo, no han sido utilizados para el análisis de aflatoxinas lo que representaría un avance importante en el análisis cuantitativo y limpio de estas micotoxinas.

Más allá de los BFEs, en años recientes los electrodos basados en nanoestructuras han causado una revolución en el análisis de moléculas orgánicas al aumentar los parámetros analíticos de los métodos y técnicas electroquímicas logrando mejorar su sensibilidad, límites de detección, de cuantificación, y la selectividad.

Además de este material, el uso de nanopartículas de ciertos metales u óxidos de hierro, han demostrado tener afinidad a la adsorción de ciertas moléculas orgánicas cuando se utilizan para modificar electrodos; beneficiando con esto las reacciones REDOX en su superficie (Tiwari y Turner, 2014).

Es por esto, que en este manuscrito se describe el desarrollo de una metodología voltamperométrica optimizada mediante un diseño Box-Behnken para la cuantificación de AFB1 utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado superficialmente con una película de bismuto y nanopartículas de oro (ECVBiAu), aprovechando las ventajas que estos materiales tienen.

Metodología

Sistema electroquímico

Todos los experimentos se realizaron en una celda convencional de tres electrodos. Se utilizaron una barra de grafito de 6 mm de diámetro como electrodo auxiliar, uno de Ag/AgCl saturado como electrodo de referencia y el ECVBiAu como electrodo de trabajo. Todas las soluciones se prepararon utilizando reactivos grado analítico y agua desionizada. Además, se sometieron a una atmósfera de nitrógeno antes de usarlas.

Construcción del ECVBiAu

Estudio del potencial de deposición de bismuto sobre el electrodo de carbón vítreo

El potencial de deposición del bismuto se determinó aplicando voltamperometría cíclica (VC) a una solución de bismuto con una concentración de 200 mgL⁻¹ en HNO₃ al 5%, en una ventana de potencial de -1000 a 1000 mV con una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹ y aplicando un ciclo en sentido catódico.

Electrosíntesis de las nanopartículas de Au sobre el electrodo de carbón vítreo con la película de bismuto

Para la síntesis de las nanopartículas de Au se aplicó VC a una solución de HAuCl₄ 2 mM con KNO₃ 0.1 M como electrolito soporte. Se utilizó una ventana de potencial de -300 a -650 mV para evitar reducir y oxidar al bismuto que está depositado sobre la superficie del electrodo, con una velocidad de barrido de 50 mVs⁻¹ y aplicando 35 ciclos en sentido catódico.

Comportamiento electroquímico de AFB1 sobre el ECVBiAu

El perfil electroquímico de la AFB1 se estudió aplicando VC a una solución de AFB1 con una concentración de 160 ngL⁻¹ en buffer Britton-Robinson 0.1 M a pH 9.

Se utilizó una ventana de potencial de -200 a -900 mV para evitar reducir y oxidar al bismuto que está depositado sobre la superficie del electrodo, con una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹ y aplicando un ciclo en sentido catódico.

Optimización de la Voltamperometría de Onda Cuadrada (VOC)

Con la finalidad de resolver e incrementar la corriente de la señal electroanalítica de la AFB1 se decidió utilizar la VOC y realizar su optimización para el análisis cuantitativo. La optimización de sus parámetros, que son: el potencial de paso, la amplitud de pulso y la frecuencia se realizaron utilizando un diseño Box-Behnken. Los valores de los niveles máximo, intermedio y mínimo de los parámetros o factores que se utilizaron para la construcción de la matriz experimental fueron los que se muestran en la tabla 1.

El diseño es una matriz de 27 experimentos (ya que se realizaron los experimentos por triplicado) y dentro de estos se incluyen 3 puntos centrales. Todos los experimentos se realizaron utilizando una solución de AFB1 con una concentración de 160 ngL⁻¹ en buffer Britton-Robinson 0.1 M a pH 9.

Tabla 1. Valores de los parámetros o factores de la VOC.

Parámetro o factor	Mínimo	Intermedio	Máximo
Potencial de paso (mV)	1	10	19
Amplitud de pulso (mV)	1	10	19
Frecuencia (Hz)	1	10	19

Caracterización analítica de la metodología propuesta

Parámetros analíticos de la metodología propuesta

Bajo los parámetros óptimos de la VOC se realizaron medidas por triplicado de soluciones estándar de AFB1 en un rango de concentraciones de 1 a 200 ngL⁻¹ en buffer Britton-Robinson 0.1 M a pH 9.

Posteriormente se construyó una curva de calibración y se obtuvieron los parámetros analíticos mediante un análisis estadístico.

La sensibilidad, el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se determinaron siguiendo las recomendaciones de la IUPAC.

Repetibilidad

El estudio se realizó haciendo 9 mediciones consecutivas a una solución de AFB1 con una concentración de 160 ngL^{-1} en buffer Britton-Robinson 0.1 M a pH 9, empleando la VOC previamente a la optimización de sus parámetros con el ECVBiAu. La repetibilidad del método se midió por medio del %DER.

Resultados y discusión

Estudio del potencial de deposición de bismuto sobre el electrodo de carbón vítreo

El voltamperograma de la figura 1, obtenido mediante VC y bajo las condiciones descritas en el apartado de la metodología, muestra una onda anódica en un potencial de 0 mV y una onda catódica en -120 mV aproximadamente, que se asocian a los procesos de oxidación y reducción del bismuto respectivamente. Por lo que se decidió utilizar un potencial de -120 mV para depositar el bismuto sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo para los estudios posteriores.

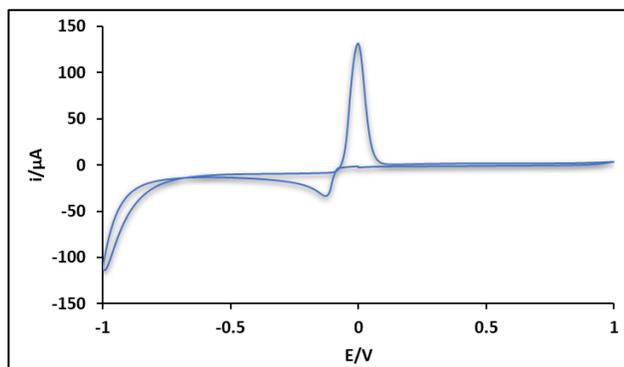


Figura 1. VC de una solución de bismuto con una concentración de 200 mgL^{-1} en HNO_3 al 5% en una ventana de potencial de -1000 a 1000 mV con una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} y aplicando un ciclo en sentido catódico.

Electrosíntesis de las nanopartículas de Au sobre el electrodo de carbón vítreo con la película de bismuto

La síntesis de las nanopartículas de oro sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo con la película de bismuto se realizó siguiendo la metodología descrita por Wan et al., en 2016 con algunos cambios, como se describió también en la sección de la metodología. La figura 2 muestra los 35 ciclos del VC que se impusieron en el sistema electroquímico para la electrodeposición de las partículas de Au.

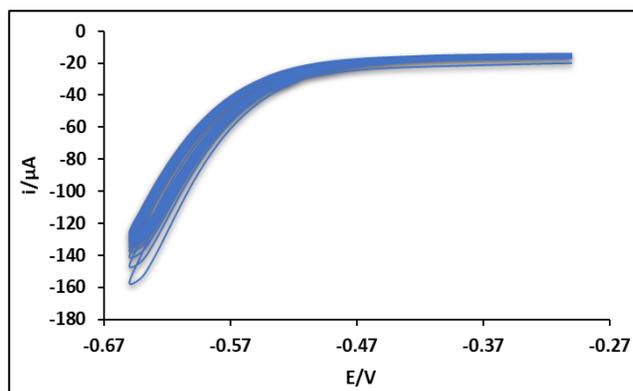


Figura 2. VC a una solución de HAuCl_4 2 mM con KNO_3 0.1 M como electrolito soporte, en una ventana de potencial de -300 a -650 mV con una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} y aplicando 35 ciclos en sentido catódico.

Comportamiento electroquímico de AFB1 sobre el ECVBiAu

El voltamperograma de la figura 3 muestra el perfil electroquímico de la AFB1 sobre el ECVBiAu (línea roja). En este se observan dos ondas catódicas con la máxima corriente en los potenciales de -420 y -750 mV aproximadamente, y una onda anódica con la máxima corriente en un potencial de -500 mV.

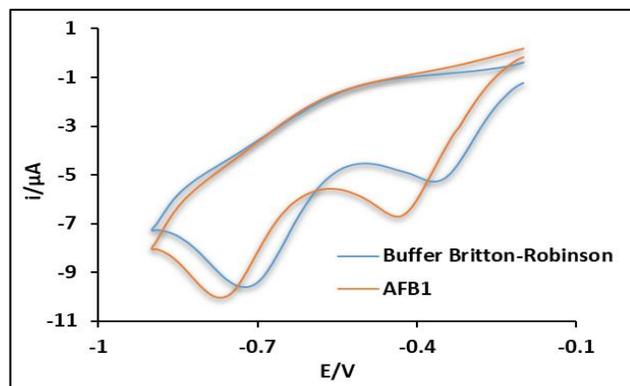


Figura 3. VC a una solución de AFB1 con una concentración de 160 ngL^{-1} en buffer Britton-Robinson 0.1 M a pH 9, en una ventana de potencial de -200 a -900 mV con una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} y aplicando un ciclo en sentido catódico.

Si se comparan las máximas intensidades de corriente de las ondas catódicas de los voltamperogramas con y sin AFB1 se puede observar que la de la onda ubicada en el potencial de -420 mV en donde está presente la AFB1 incrementa considerablemente con respecto a la del sistema que únicamente contiene al buffer Britton-Robinson (línea azul).

Este hecho hizo suponer que la AFB1 se está reduciendo en este potencial y su corriente catódica se superpone con la del blanco, dando como resultado el incremento considerable. Por lo tanto, se decidió considerar esta onda como la señal electroanalítica para llevar a cabo el análisis cuantitativo de la AFB1.

Optimización de la VOC

La optimización de la técnica voltamperométrica se realizó utilizando un diseño Box Behenken como se describió anteriormente. Los resultados del análisis estadístico que se obtuvieron usando Minitab 17 se describen a continuación.

La ecuación de orden cuadrático que se obtuvo es la siguiente:

$$i (\mu A) = -2.978 + 0.1740 A + 0.1250 B + 0.4110 C + 0.01210 A^2 + 0.01090 B^2 - 0.00063 C^2 - 0.03412 A*B - 0.01453 A*C - 0.03856 B*C$$

Donde A es el potencial de paso, B es la amplitud de pulso y C es la frecuencia.

De acuerdo con la ecuación se puede ver que los tres parámetros tienen un efecto positivo sobre la respuesta electroanalítica de la AFB1. El coeficiente de correlación resultante (R^2) fue de 0.951, lo que demuestra que existe un buen ajuste entre el modelo teórico y los datos experimentales.

Los valores de los parámetros óptimos y las respuestas teórica y experimental encontradas se reportan en la tabla 2. La respuesta teórica fue comparada con la respuesta experimental para confirmar la predicción del modelo cuadrático. Los experimentos de confirmatorios se realizaron por triplicado.

Tabla 2. Valores de los parámetros óptimos encontrados de la VOC.

Parámetro	Valor
Potencial de paso (mV)	19
Potencial de amplitud (mV)	19
Frecuencia (Hz)	19
Respuesta teórica (μA)	-12.89
Respuesta experimental (μA)	-11.75

Caracterización analítica de la metodología propuesta

Bajo los parámetros óptimos de la VOC, se obtuvo una curva de calibración con estándares de AFB1 con diferentes concentraciones.

La Figura 4 muestra la curva de calibración y el análisis de ajuste lineal. La ecuación de regresión encontrada fue $i (\mu A) = 0.0337 [AFB1] (ng L^{-1}) - 7.4781$ con una R^2 de 0.992. Los datos estadísticos LD y LC encontrados fueron $11.19 ng L^{-1}$ y $37.31 ng L^{-1}$ respectivamente.

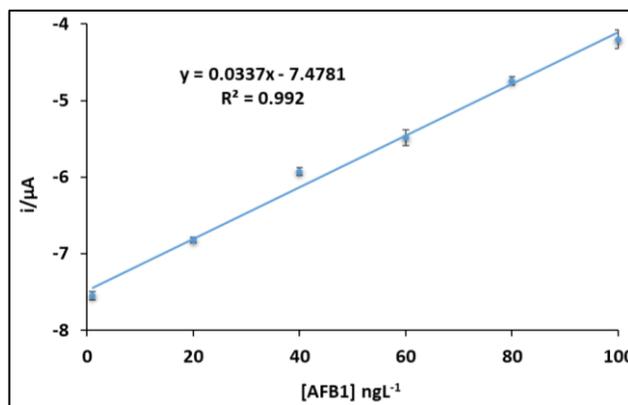


Figura 4. Curva de calibración (intensidad de corriente de onda anódica vs diferentes concentraciones de AFB1) obtenidas con los parámetros óptimos de la VOC.

En el estudio de repetibilidad de la metodología propuesta se obtuvo un %DER de 4.28, al ser un porcentaje menor al 5% se puede considerar que esta metodología es repetible.

Conclusiones

Los resultados de los análisis realizados empleando la metodología desarrollada demostraron que ésta puede utilizarse como una alternativa para el monitoreo de AFB1, ya que el método es altamente repetible, reproducible y presenta límites de detección y cuantificación competitivos. Además, es importante mencionar que la metodología tiene las ventajas de ser rápida, precisa, amigable con el ambiente y de menor costo en comparación con otras metodologías utilizadas para la cuantificación de AFB1.

Finalmente se debe hacer hincapié en que este trabajo de investigación da pauta para realizar otros trabajos en un futuro que permitan realizar el análisis cuantitativo de AFB1 en productos agrícolas y otros que la contengan, de una manera eficiente y que permitan realizar la validación de la metodología propuesta mediante un análisis estadístico al comparar los resultados obtenidos con los de una metodología oficial.

Agradecimientos

MFG agradece a BCF y SHL del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por el espacio experimental otorgado para realizar este trabajo de investigación.

GAAR y ACO agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Sistema Nacional de Investigadores por el reconocimiento y apoyo económico otorgado.

Referencias

- Andrade, P.D., da Silva, J.L. G., y Caldas, E.D. (2013). Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP). *Journal of Chromatography A*, 1304, 61-68.
- Campone, L., Piccinelli, A.L., Celano, R., Russo, M., y Rastrelli, L. (2013). Rapid analysis of aflatoxin M 1 in milk using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(26), 8645-8652.
- Christoforidou, S., Malissiova, E., Gortzi, O., y Hadjichristodoulou, C. (2015). Comparative evaluation of ELISA kits' reliability for the aflatoxin M 1 determination in goat milk. *European Food Research and Technology*, 240(4), 701-706.
- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127(1-3), 19-28.
- Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K., Oldham, J. H., y Scott, P. M. (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 30(4), 403-439.
- Feng, Z., Gao, N., Liu, J., y Li, H. (2020). Boron-doped diamond electrochemical aptasensors for trace aflatoxin B1 detection. *Analytica Chimica Acta*, 1122, 70-75.
- Jaimez, J., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Franco, C. M., Cepeda, A., Mahuzier, G., y Prognon, P. (2000). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2), 1-10.
- Kolosova, A. Y., Shim, W. B., Yang, Z. Y., Eremin, S. A., y Chung, D. H. (2006). Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B 1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(1), 286-294.
- Lee, N. A., Wang, S., Allan, R. D., y Kennedy, I. R. (2004). A rapid aflatoxin B1 ELISA: Development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(10), 2746-2755.
- Ma, H., Sun, J., Zhang, Y., y Xia, S. (2016). Disposable amperometric immunosensor for simple and sensitive determination of aflatoxin B1 in wheat. *Biochemical Engineering Journal*, 115, 38-46.
- Magliulo, M., Mirasoli, M., Simoni, P., Lelli, R., Portanti, O., y Roda, A. (2005). Development and validation of an ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3300-3305.
- Nigović, B., Šimunić, B., y Hocevar, S. (2009). Voltammetric measurements of aminosalicilate drugs using bismuth film electrode. *Electrochimica Acta*, 5678-5683.
- Paniel, N., Radoi, A., y Marty, J. L. (2010). Development of an electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M1 in milk. *Sensors*, 10(10), 9439-9448.
- Radoi, A., Targa, M., Prieto-Simon, B., y Marty, J. L. (2008). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M1 detection. *Talanta*, 77(1), 138-143.
- Stroka, J., Van Otterdijk, R., y Anklam, E. (2000). Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of chromatography A*, 904(2), 251-256.
- Tan, Y., Chu, X., Shen, G. L., y Yu, R. Q. (2009). A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice. *Analytical biochemistry*, 387(1), 82-86.
- Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., Hall, A. J., Craufurd, P. Q., Wheeler, T. R., Waliyar, F., ... y Reddy, D. V. R. (2002). Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunoassay for aflatoxin M1 in milk and milk-based confectionery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 933-937.
- Tiwari, A., y P F Turner, A. (2014). Biosensors nanotechnology. Estados Unidos de América: Wiley.
- Trucksess, M. W., Brumley, W. C., y Nesheim, S. (1984). Rapid quantitation and confirmation of aflatoxins in corn and peanut butter, using a disposable silica gel column, thin layer chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 67(5), 973-975.
- Var, I., Kabak, B., y Gök, F. (2007). Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC. *Food Control*, 18(1), 59-62.
- Wan, Y., Zheng, Y.F., Yin, H.Y., y Song, X.C. (2016). Au nanoparticle modified carbon paper electrode for an electrocatalytic oxidation nitrite sensor. *New Journal of Chemistry*, 40(4), 3635-3641.
- Wang, C., Qian, J., An, K., Lu, X., y Huang, X. (2019). A semiconductor quantum dot-based ratiometric electrochemical aptasensor for the selective and reliable determination of aflatoxin B1. *Analyst*, 144(16), 4772-4780.