

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DEL PERÚ**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**Biosensores nanoplasmonicos
para la detección de micotoxinas**

Trabajo de investigación para obtener el grado académico de
Bachiller en ciencias con mención en Química presentado por:

Andrés Benjamín Fabián Salinas

Asesora:

Betty Cristina Galarreta Asian

Lima, julio 2023

Informe de Similitud

Yo, Betty Cristina Galarreta Asian, docente de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor(a) del trabajo de investigación titulado "Biosensores nanoplasmónicos para la detección de micotoxinas", del autor Andrés Benjamín Fabián Salinas, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 14%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 06/10/2023.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha: San Miguel, 06 de octubre 2023.

Apellidos y nombres del asesor / de la asesora: Galarreta Asian, Betty Cristina	
DNI: 41839254	Firma
ORCID: 0000-0003-4860-3161	



Resumen

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos cuya detección tiene un rol sustancial en la seguridad de los productos alimentarios. Sin embargo, los métodos convencionales de detección de micotoxinas requieren de instrumentos especializados, laboratorios costosos y personal altamente capacitado. Esto reduce la accesibilidad de estos métodos para los usuarios finales, que son los agricultores, los productores y los exportadores. Así, el desarrollo de biosensores altamente sensibles, selectivos, reutilizables y capaces de detectar múltiples micotoxinas representa una alternativa novedosa frente a los métodos convencionales.

En este trabajo de investigación, se hace un enfoque especial en los biosensores a nanoescala aplicados a la detección de micotoxinas. Se hace énfasis en los agentes de reconocimiento más usados en la detección de los analitos de interés y en el uso de transductores ópticos basados en metales nobles a nanoescala. Dentro de este grupo de biosensores, los anticuerpos y aptámeros son los agentes de reconocimiento más usados; mientras que, por el lado de la transducción, este trabajo se enfoca en los sensores nanoplasmonicos por ser una alternativa óptica novedosa que permite obtener niveles de detección similares o mejores a los métodos convencionales, sin perder accesibilidad, y que se encuentra en constante desarrollo.

Finalmente, se presentan los tres principales tipos de sensores nanoplasmonicos reportados en los últimos años, los cuales aprovechan las extraordinarias propiedades ópticas de los nanomateriales de metales nobles como la resonancia del plasmón superficial, la resonancia de plasmones superficiales localizados y la amplificación del campo eléctrico que da pie a la espectroscopía Raman amplificada en superficie. Además, se discuten las ventajas y desventajas de estos sensores nanoplasmonicos con el fin de desarrollar nuevos biosensores que puedan ser aplicados en la detección de micotoxinas a bajas concentraciones.

Tabla de contenidos

Tabla de contenidos	i
Lista de figuras.....	ii
Lista de Tablas	iv
Lista de abreviaturas	v
Capítulo 1. Las micotoxinas como contaminantes naturales de alimentos.....	1
1.1. Definición, tipos de micotoxinas y sus efectos sobre la salud	1
1.2. Efectos económicos, regulación y situación actual.....	4
1.3. Métodos convencionales para la detección de micotoxinas.....	7
Capítulo 2. Consideraciones en el diseño de un biosensor óptico	10
2.1. Principales agentes de reconocimiento	11
2.2. Principales sistemas de transducción	15
2.3. Nanomateriales de metales nobles como transductores ópticos.....	19
2.3. Estrategias de inmovilización de los agentes de reconocimiento en la superficie de los transductores ópticos a nanoescala.....	25
Capítulo 3. Biosensores plasmónicos para la detección de micotoxinas.....	29
3.1. Biosensores basados en la resonancia del plasmón superficial.....	32
3.2. Biosensores basados en la resonancia de plasmones superficiales localizados	39
3.3. Biosensores basados en la espectroscopía Raman amplificada en superficie.....	46
Capítulo 4. Conclusiones y perspectivas	56
Referencias Bibliográficas	58

Lista de figuras

Figura 1. Estructuras de las principales micotoxinas encontradas en alimentos.	1
Figura 2. Esquema general de un biosensor.....	10
Figura 3. Estructura representativa de un anticuerpo.....	11
Figura 4. Representación esquemática de anticuerpos policlonales y monoclonales.....	12
Figura 5. Principales motivos estructurales encontrados en aptámeros.....	13
Figura 6. Esquema representativo del biosensor gravimétrico de Tang.	16
Figura 7. Esquema representativo del biosensor electroquímico de Tang.....	18
Figura 8. Esquema representativo del biosensor óptico de Jalalian.....	18
Figura 9. Esquema representativo de las técnicas <i>bottom-up</i> y <i>top-down</i>	20
Figura 10. Principales estrategias de funcionalización de la superficie de nanomateriales.....	28
Figura 11. Representación esquemática de un plasmón.	30
Figura 12. Esquema representativo de las propiedades de la resonancia del plasmón de superficie.....	31
Figura 13. Representación de un plasmón superficial localizado.....	31
Figura 14. Concepto de un biosensor basado en la técnica SPR.	34
Figura 15. Representación esquemática del sensor SPR planteado por el grupo de Joshi	35
Figura 16. Representación esquemática del sensor SPR planteado por el grupo de Wei.....	36
Figura 17. Diagrama representativo del proceso de detección de AFB1 con el sensor aptamérico LSPR del grupo de Sun.....	37
Figura 18. Esquema representativo de los dos principales mecanismos de detección de analitos por la técnica LSPR..	40
Figura 19. Esquema representativo del proceso de detección de los sensores LSPR de Park y Lee.....	41
Figura 20. Esquema del proceso de detección de la AFB1 con el nanosensor LSPR AuNTs@Apt@MPA.....	42
Figura 21. Esquema representativo del proceso de detección LSPR pro agregación propuesto por Luan y colaboradores.....	43
Figura 22. Esquema representativo de la estrategia de detección del sensor LSPR por agregación de Lerdsri y colaboradores.	44
Figura 23. Esquema representativo de la dispersión Raman convencional	46
Figura 24. Representación gráfica de la diferencia entre la espectroscopía Raman y SERS. .	48

Figura 25. Esquema representativo de la estrategia de detección del sensor SERS de Hernández y colaboradores.49

Figura 26. Esquema representativo del chip SERS y el proceso de detección del sensor diseñado por Li y colaboradores.50

Figura 27. Esquema representativo de la estrategia de detección del sensor SERS de Song y colaboradores.51

Figura 28. Esquema representativo del sensor SERS propuesto por Zhao y colaboradores. ..52



Lista de Tablas

Tabla 1. Niveles máximos permitidos de micotoxinas en los alimentos en la UE, la FDA y la FAO.....	5
Tabla 2. Resumen del número de casos de contaminación por micotoxinas y su procedencia en los últimos 3 años por la UE.....	6
Tabla 3. Resumen de biosensores basados en la técnica SPR.	38
Tabla 4. Resumen de biosensores basados en la técnica LSPR.....	45
Tabla 5. Tabla resumen de biosensores basados en la técnica SERS.....	53



Lista de abreviaturas

AF	Aflatoxina
Ab	Anticuerpo
Apt	Aptámero
AuNEs	Nanoesferas de oro
AgNEs	Nanoesferas de plata
AuNTs	Nanotriángulos de oro
AuNRs	Nanovarillas de oro
BAT	Tecnología de arreglos de biochips
BSA	Albúmina de suero bovino
CPP	Sonda catiónica de perileno
DSNB	5,5-ditiobis(succinimidil-2-nitrobenzoato)
ELISA	Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Administración de alimentos y drogas de los EEUU
Fe ₃ O ₄ @Au	Nanopartícula magnética recubierta con oro
FUM	Fumonisina
\hbar	Constante de Planck reducida
HC	Hebra complementaria
$k_{\text{evan}, }$	Vector onda del campo evanescente
k_{SP}	Vector onda del plasmón superficial
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LSPR	Resonancia de plasmones superficiales localizados
MeOH	Metanol
4-MBA	4-ácidomercaptobenzoico

MNP	Nanopartícula magnética
MPA	Ácido mercaptopropiónico
OT	Ocratoxina
OTA	Ocratoxina A
PAT	Patulina
PDDA	Poli(cloruro de dialildimetilamonio)
RF	Recubrimiento funcional
RO	Recubrimiento de oro
SERS	Espectroscopía Raman amplificada en superficie
SNP	Nanopartícula de sílica
SPCM	Microesferas de cristal fotónico de sílica
SPR	Resonancia del plasmón superficial
T-2	Toxina T-2
UE	Unión Europea
ZEA	Zearalenona
$\Delta \omega_{LSPR}$	Cambio en la frecuencia LSPR
θ_c	Ángulo crítico
θ_{SPR}	Ángulo SPR
ν_{Raman}	Frecuencia del fotón Raman
ν_{SERS}	Frecuencia del fotón SERS
ω_p	Frecuencia de plasmón
@	Funcionalizado con

Capítulo 1. Las micotoxinas como contaminantes naturales de alimentos

1.1. Definición, tipos de micotoxinas y sus efectos sobre la salud

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.¹ Estas moléculas contaminan a diversos productos agrícolas como los granos de cereales, cacao, arroz, granos de café, hierbas y especias, entre otros, cuando el producto pasa por ciertas condiciones ambientales en cualquier etapa de la cadena productiva.^{1,2} Las principales micotoxinas presentes en alimentos son las aflatoxinas (AFs), las ocratoxinas (OTs), las fumonisinas (FUMs), la patulina (PAT), la zearalenona (ZEA) y el deoxinivalenol (DON),¹ cuyas estructuras se ilustran en la Figura 1 y se describen en los siguientes párrafos.

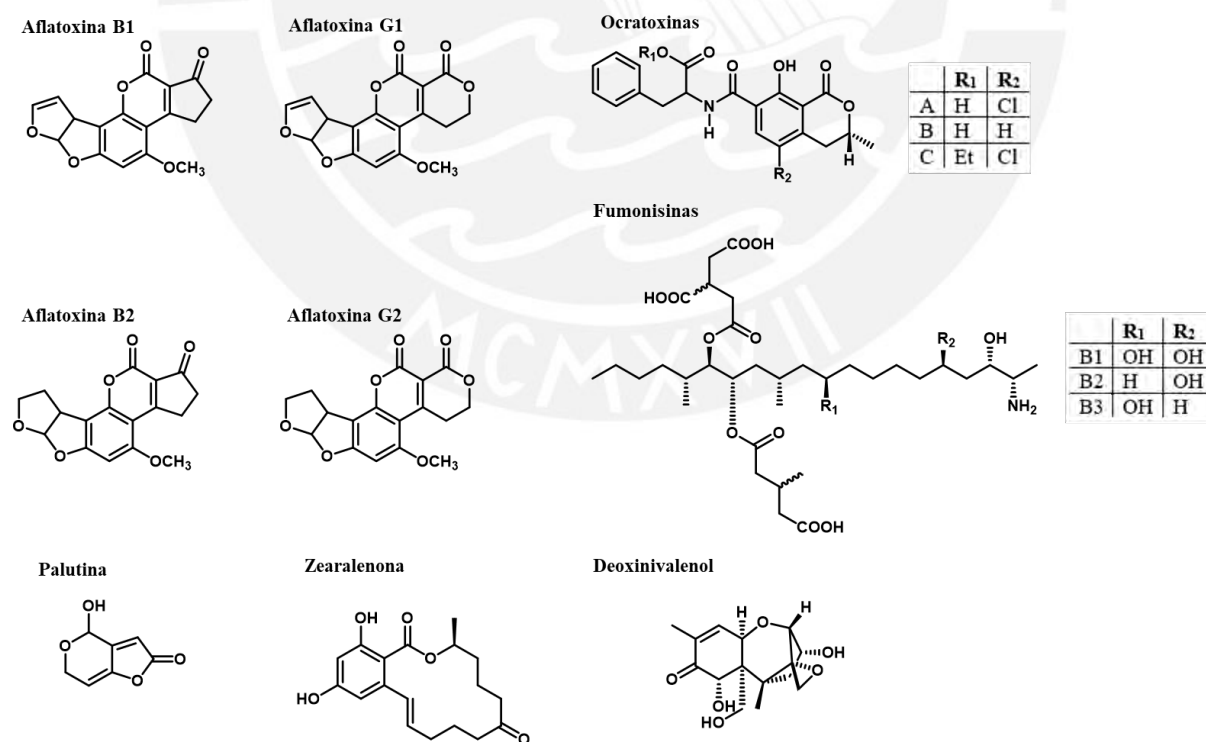


Figura 1. Estructuras de las principales micotoxinas encontradas en alimentos.

Las aflatoxinas (AFs) son producidas principalmente por las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*,³ y dentro de este grupo de micotoxinas, las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 son las que generalmente contaminan los cultivos. Además, la aflatoxina M1 contamina la leche de vacas que comen cultivos contaminados con aflatoxina B1 (AFB1) debido al metabolismo que sufre la AFB1 en el hígado de las vacas.⁴ La producción de estas micotoxinas se encuentra regulada por las condiciones de temperatura, humedad y cantidad de lluvia durante el crecimiento, la cosecha y el almacenamiento. Los productos más susceptibles a aflatoxinas son el maní, el maíz, los frutos secos, los pistachos y el arroz.⁵ La ingesta de esta micotoxina está asociada con efectos a largo plazo como el aumento del riesgo de cáncer de hígado, la aparición de defectos congénitos, problemas renales y del sistema inmune, y, a corto plazo, problemas hepáticos e incluso la muerte.⁵

Otra clase de micotoxinas producidas por el género *Aspergillus* son las ocratoxinas. Estas son producidas principalmente por las especies *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*,⁶ y se pueden encontrar 3 tipos: A, B y C, siendo la ocratoxina A (OTA) la más dañina.⁷ La producción de esta micotoxina está asociada con un mal almacenamiento y secado de granos como el trigo, el centeno, la avena, la cebada, el café, las uvas y el vino.⁵ La presencia de OTA en la dieta humana y animal genera tumores renales, aberraciones cromosómicas y problemas en los riñones.⁷

Los hongos del género *Penicillium* también producen patulina (PAT). Esta micotoxina es producida por las especies *Penicillium expansum* y *Penicillium griseofulvum*.⁸ La producción de esta micotoxina se ve favorecida por el almacenamiento de frutos dañados a temperatura ambiente.⁸ Los casos más conocidos de contaminación se reportan en los jugos o sidra hecha de manzanas que presentan zonas podridas, pero también se ha reportado su presencia en cereales, queso y frutas.⁵ La exposición aguda a patulina puede causar náuseas y vómitos,

mientras que se ha reportado que la exposición crónica afecta el riñón, el hígado, el colon y el sistema inmune, y causa aberraciones en el ADN.⁵

Por otro lado, a diferencia de las otras micotoxinas, las fumonisinas (FUMs) son producidas por la especie *Fusarium verticillioides* y entre ellas se encuentran las fumonisinas B1, B2 y B3.⁹ Su producción se ve incrementada cuando el cultivo atraviesa una temporada de alta humedad luego de un periodo de clima seco y cálido; sin embargo, los niveles de estas micotoxinas también pueden ser afectados por los procesos de molienda, fabricación y almacenamiento.⁵ El principal producto infectado por esta familia de micotoxinas es el maíz, pero también puede contaminar otros granos como el trigo.⁵ La exposición aguda a fumonisinas puede producir diarrea y dolor abdominal mientras que la exposición crónica puede producir cáncer al esófago.¹⁰

El género *Fusarium* también es responsable de producir zearalenona (ZEA). Esta es producida principalmente por las especies *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*,⁹ y se produce principalmente en la post-cosecha de los cereales. Los alimentos en los cuales más se ha reportado la presencia de esta micotoxina son el maíz, el trigo, la cebada, la avena, el arroz y el pan.¹¹ Altos niveles de esta micotoxina se relacionan con alteraciones endometriales y con el crecimiento de carcinomas mamarios; sin embargo, tiene una baja bioacumulación.¹²

La especie *Fusarium graminearum* también produce deoxinivalenol (DON), siendo este hongo el principal productor de esta micotoxina.¹³ Aunque su producción ocurre en condiciones climáticas normales, está especialmente favorecida en condiciones frescas y húmedas. Los productos principalmente afectados son el trigo, el maíz, la avena, la cebada, el pan, los fideos y la cerveza.^{5,14} La ingesta de alimentos con altos niveles de esta micotoxina puede causar vómitos y náuseas.⁵

Como se puede apreciar, la proliferación de estos contaminantes depende de factores ambientales pre- y post-cosecha, de la temperatura y humedad, pero también de otros factores relacionados a la biodisponibilidad de micronutrientes y el daño del cultivo por plagas, siendo un fenómeno complejo.¹⁴ Adicionalmente, se ha reportado que las micotoxinas se pueden encontrar presentes en el producto final procesado debido a que sus estructuras químicas son estables y resistentes a altas temperaturas.¹⁴ Por ello, la presencia de micotoxinas en alimentos representa un problema preocupante para la salud pública.

1.2. Efectos económicos, regulación y situación actual

La presencia de micotoxinas no solo tiene consecuencias sobre la salud de los seres humanos y animales, sino que también genera pérdidas económicas. Estas pérdidas están asociadas a los cuidados de la salud de la población, a la pérdida de alimentos, y al gasto adicional que efectúa el consumidor o el productor para cumplir con la carga económica de regular el suministro de alimentos y piensos, relacionado a estrategias correctivas de cultivo y al análisis exhaustivo de sus productos.⁹

Frente a estos problemas, diferentes organismos han planteado límites máximos permitidos de estas micotoxinas en alimentos. En la Tabla 1, se resumen los valores establecidos por la Unión Europea (UE),¹⁵ la Administración de alimentos y fármacos de los E.E.U.U. (FDA, por sus siglas en inglés),¹⁶ y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés).¹⁷

Gracias a la regulación estricta para la mayoría de micotoxinas que impone límites del orden de las partes por billón (ppb), la Unión Europea sigue reportando casos de alimentos contaminados por micotoxinas. Con la finalidad de contar con información más precisa y

resumida, se trabajó con la base de datos del Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos (RASFF por sus siglas en inglés).¹⁸ El análisis, presentado en la Tabla 2, identifica un total de 1278 casos de contaminación de micotoxinas en alimentos alrededor del mundo, siendo la media mayor a 400 casos por año.

Tabla 1. Niveles máximos permitidos de micotoxinas en los alimentos en la UE, la FDA y la FAO.

Micotoxina	Alimento	UE ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ¹⁵	FDA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ¹⁶	FAO ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ¹⁷
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Cereales, arroz, frutos secos, especias, nueces	4 – 15	20	10 – 15
Aflatoxina M1	Leche, productos lácteos	0.05 leche 0.025 fórmulas infantiles	0.5	0.5
Ocratoxina A	Cereales, frutos secos de la vid, vino, uvas, café, cacao, especias	0.50 – 80	20*	5
Fumonisinias B1, B2, B3	Maíz y derivados	200 – 4000	2000 – 4000	2000 – 4000
Patulina	Zumos de frutas y manzanas, productos de manzana, alimentos infantiles	10 – 50	50	50
Zearalenona	Cereales y derivados, maíz, aceite de maíz, alimentos infantiles	20 – 400	–	–
Deoxinivalenol	Granos, cereales y derivados, harina, alimentos infantiles	200 – 1750	1000 – 5000	200 - 2000

* Este valor no corresponde a un límite máximo permitido; sin embargo, la FDA recomienda que concentraciones de OTA menores o iguales a $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ no requieren mayor evaluación.

Según este análisis, se identificó que las principales categorías de alimentos contaminados fueron las nueces y derivados, semillas, frutas, vegetales, cereales y productos de panadería, hierbas y especias. En particular, las dos primeras categorías representan casi el 78% del total de alimentos contaminados. La mayor cantidad de estos presentaron aflatoxinas (86.78%), ocratoxina A (10.95%) y fumonisinias (1.02%) mientras que para las demás micotoxinas como

PAT, DON y ZEA se reportaron menos de 10 ocurrencias. De los casos totales, 132 provinieron de la región sudamericana, siendo Argentina el país con mayor número de casos reportados (92), seguido de Bolivia (18) y Brasil (12), todos ellos con más de diez casos registrados. El Perú presentó seis casos de contaminación: cinco de estos en la categoría de cereales y productos de panadería, y uno en la categoría nueces y sus derivados, así como de semillas. En cuatro de ellos se reportó la presencia de fumonisinas, uno de aflatoxinas y uno de ocratoxina A. En la Tabla 2, se muestra un resumen de las principales micotoxinas encontradas, el número de casos totales y los países incidentes obtenidos de la base de datos de RASFF.

Tabla 2. Resumen del número de casos de contaminación por micotoxinas y su procedencia en los últimos 3 años por la UE*.

Micotoxina	Nº de casos*	Países incidentes
Aflatoxinas	1109	Argentina, Egipto, India, Irán, Turquía, Estados Unidos
Ocratoxina A	140	India, Indonesia, Turquía
Fumonisinias	13	Argentina, Perú, Eslovaquia
Patulina	8	Dinamarca, Alemania, Países Bajos, Rumania, Serbia, España
Deoxinivalenol	6	China, Francia, Hungría, Ucrania
Zearalenona	1	Bélgica

*Datos obtenidos del portal RASFF de la Comunidad Europea¹⁸ La información fue filtrada mediante un procesador de textos teniendo en cuenta productos contaminados, países incidentes y registro de la micotoxina detectada.

Ante esta situación, se hace evidente la necesidad de contar con métodos de detección que sean sensibles, selectivos, rápidos y accesibles a las agencias responsables de asegurar el control de calidad de estos productos de forma que se pueda entregar un producto seguro para el consumidor; así mismo, estos métodos pueden ayudar a los productores que desean garantizar

la calidad de sus productos y generar estrategias de corrección temprana con el fin de que sus pérdidas económicas sean menores.

1.3. Métodos convencionales para la detección de micotoxinas

Los productos agrícolas presentan una matriz compleja y el análisis de micotoxinas en estos requiere de procesos de extracción y separación previos, o de técnicas altamente selectivas para una determinada micotoxina.¹⁹ Adicionalmente, los métodos de análisis tienen el desafío de identificar estas sustancias a bajas concentraciones, en el orden de las ppb por lo que también se necesita de métodos altamente sensibles.

Actualmente, uno de los métodos más empleados está basado en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) debido a su alta selectividad y sensibilidad. Así, por ejemplo, esta técnica ha permitido detectar simultáneamente hasta 69 micotoxinas.²⁰ y alcanzar límites de detección en el orden de las partes por trillón (ppt),^{20,21} lo que permite detectar concentraciones por debajo de los límites máximos permitidos por las agencias reguladoras. El problema de este método cromatográfico es que se requieren etapas previas de extracción y purificación de la muestra, y se necesita la implementación de laboratorios especializados con equipos costosos y personal altamente capacitado para la ejecución del método. En consecuencia, los usuarios finales –agricultores, productores y exportadores– tienen poco acceso a este tipo de método y su implementación puede, en algunos casos, ser limitada.

Otro de los métodos más empleados consiste en los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en la inmovilización de un antígeno o un anticuerpo sobre una superficie que es responsable de la captura de un anticuerpo

o un antígeno, respectivamente. Luego, estos se unen a un anticuerpo conjugado enlazado a una enzima, que da una respuesta colorimétrica o fluorescente que se puede relacionar con la concentración del analito.²² Este método es sencillo, accesible, y permite llegar a límites de detección del orden de las ppb.²³ Sin embargo, el uso de anticuerpos y proteínas conjugadas hace que el método sea menos robusto que los métodos LC-MS/MS y que los kits de ELISA tengan un tiempo de vida limitado. Además, estos kits suelen ser vendidos para la detección de solo un analito, por tanto, no es sencillo realizar el monitoreo de más de una micotoxina. Por último, como estas técnicas son de un solo uso, el costo global se ve incrementado en caso de un muestreo masivo.²³

En vista de los últimos dos problemas mencionados con la técnica ELISA, la empresa Randox Food Diagnostics ha aprovechado la tecnología de arreglos de biochips (BAT, por sus siglas en inglés) para desarrollar un método para la detección de micotoxinas. Este método está basado en la técnica ELISA y permite la detección en simultáneo de 7 micotoxinas: AFB1, AFG1, DON, FB1, OTA, ZEA y la toxina T2.²⁴ Asimismo, ha sido validado por la Unión Europea en las siguientes doce matrices: colza, remolacha azucarera, centeno, maíz, soja, cebada, trigo, semillas de algodón, avena, semilla de girasol y cereales para animales.²⁵ Sin embargo, a diferencia de los kits ELISA convencionales, estos presentan biochips funcionalizados en la superficie con anticuerpos de las 7 micotoxinas. Dado que este método está basado en ELISA, comparte tanto las ventajas y desventajas de esta última, aunque sí permite un monitoreo múltiple como algunos de los protocolos basados en LC-MS/MS. Los límites de detección de este método varían en función de la micotoxina analizada, pero en su mayoría se encuentra en el rango de las ppb con excepción del DON y las FUMs, las cuales presentan límites de detección en el orden de las 100 ppbs.²⁵

Ante esta realidad, se requiere de métodos alternativos que sean tan selectivos y sensibles, como LC-MS/MS, accesibles y fáciles de implementar, como ELISA, y que puedan combinar

las mejores características de ambas técnicas como la tecnología BAT. En los últimos años se han desarrollado biosensores ópticos que pretenden reemplazar estos métodos convencionales.



Capítulo 2. Consideraciones en el diseño de un biosensor óptico

Un biosensor es un dispositivo de análisis capaz de detectar uno o más analitos por medio de un evento de reconocimiento biológico, o biomimético, asociado a un transductor fisicoquímico. Este último transforma la interacción entre el analito y el agente de reconocimiento en una señal medible por un sistema de procesamiento instrumental.^{19,26} De esta definición, se puede desprender que los biosensores constan de tres componentes: el elemento de reconocimiento biológico, el transductor y el sistema instrumental (Figura 2).

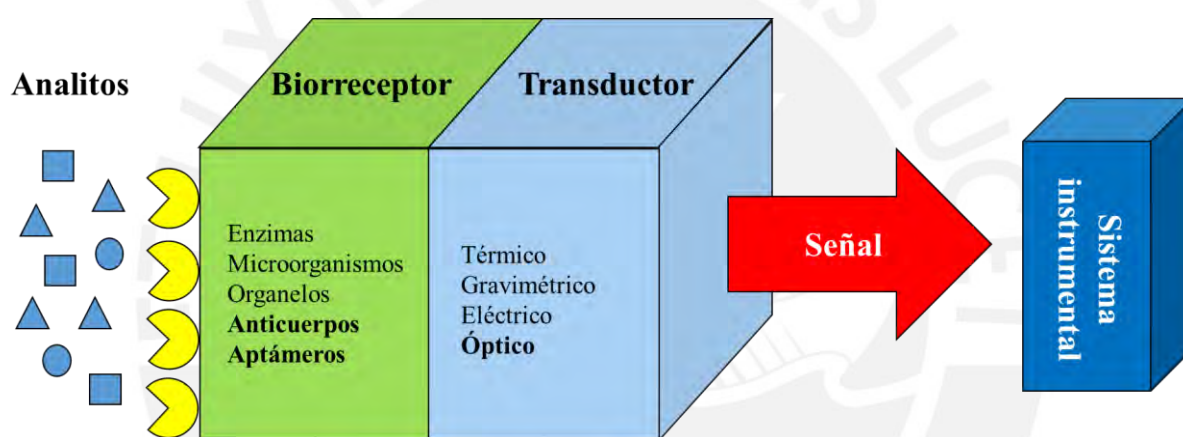


Figura 2. Esquema general de un biosensor. Adaptada de Terry y colaboradores.²⁶

Entre las características más buscadas en los biosensores destacan la alta selectividad y la fácil implementación. Diferentes biomoléculas han sido empleadas como agentes de reconocimiento selectivos y sensibles a bajas concentraciones para diversos analitos. Asimismo, diversos estudios se han enfocado en el diseño de sistemas de transducción basados en el uso de nanomateriales, y métodos que permitan la adsorción de los agentes de reconocimiento en los transductores.

2.1. Principales agentes de reconocimiento

Diferentes biosensores emplean enzimas, células, tejidos, aptámeros y anticuerpos como agentes de reconocimiento. En el caso de la detección de micotoxinas se destaca el uso de anticuerpos y aptámeros.

Los anticuerpos (Ab) son proteínas con un peso molecular entre 150 y 1000 kDa que pertenecen a la familia de las proteínas globulares.²⁷ Estos forman parte del sistema inmune adaptativo y sirven para proteger a los organismos de diferentes agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos, entre otros. Todos los tipos de anticuerpos comparten una estructura en forma de Y,²⁷ en la cual se pueden distinguir tres regiones: la región de unión al antígeno (Fab), la región variable (Fv) y la región cristalizante (Fc) (Figura 3).

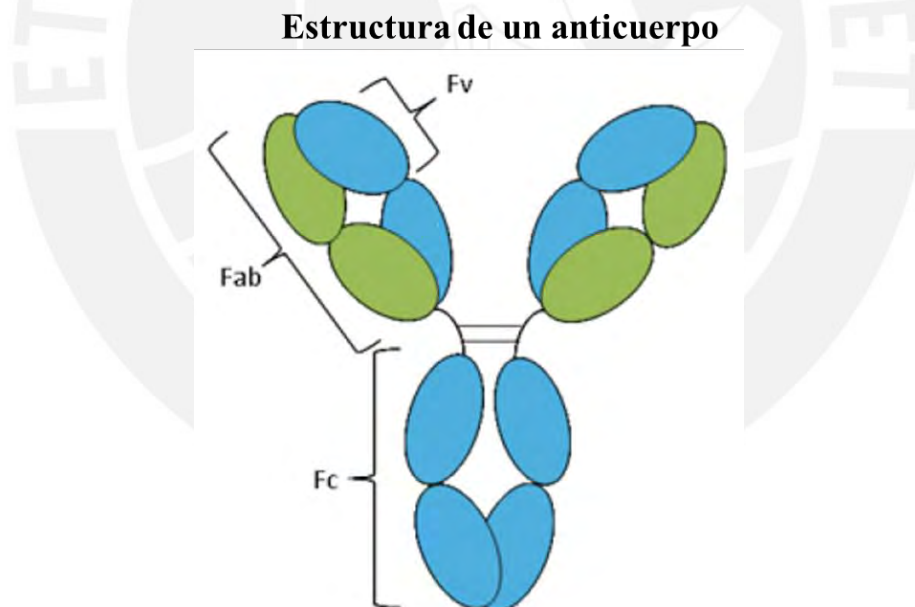


Figura 3. Estructura representativa de un anticuerpo. Las regiones indicadas con Fab, Fv y Fc representan la región de unión al antígeno, la región variable y la región cristalizante, respectivamente. Adaptado de Hidding.²⁷

Así, la zona Fab de un Ab interactúa por medio de fuerzas no covalentes con una región del antígeno denominada epítipo. Esta interacción altamente selectiva genera un complejo que

sirve como marcador para que el sistema inmune reconozca al agente infeccioso y pueda inhibirlo o eliminarlo del organismo.

Cuando se desea producir un anticuerpo para un determinado antígeno, se puede optar por la producción en animales vivos, que genera anticuerpos policlonales, o la producción *in vitro* utilizando técnicas de cultivo de tejidos, que genera anticuerpos monoclonales.²⁸ Los anticuerpos policlonales se caracterizan por interactuar con más de un epítipo del antígeno; en cambio, los monoclonales son producidos por una misma célula inmune y se enlazan a solo un epítipo del antígeno (Figura 4).

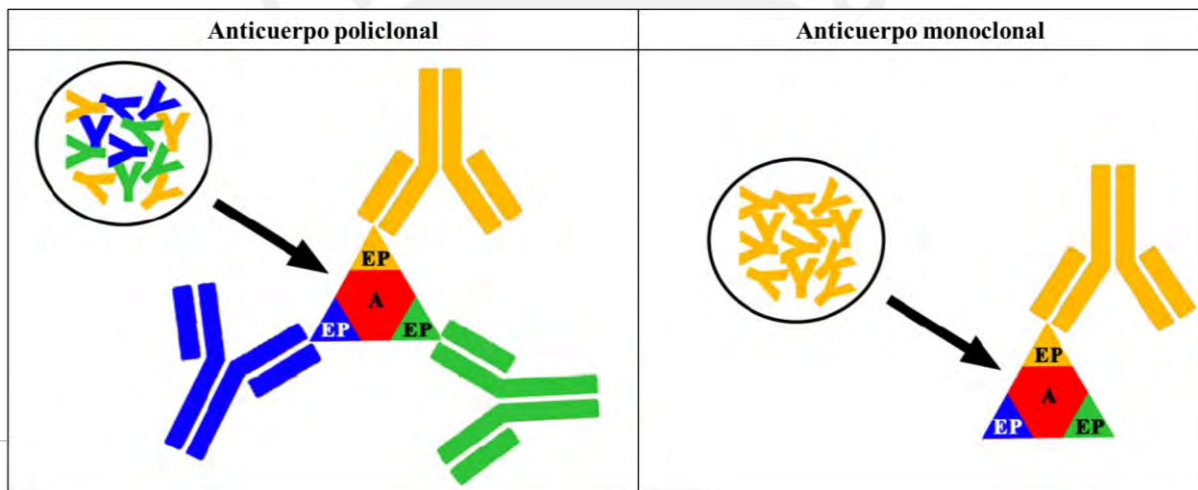


Figura 4. Representación esquemática de anticuerpos policlonales y monoclonales. A: antígeno; EP: epítipo. Adaptado de Vázquez-Gutiérrez y Langton.²⁹

El empleo de este tipo de biomoléculas presenta diversas ventajas y desventajas. Por un lado, se destaca que ofrecen una gran sensibilidad con constantes de afinidad (K_d) entre 1 y 10 nmol.L^{-1} ,³⁰ gran parte de ellos son comercialmente accesibles y es sencillo inmovilizarlos sobre plataformas.³¹ Sin embargo, su estabilidad está limitada por las condiciones fisiológicas de pH y temperatura, lo que también dificulta su transporte y almacenamiento. Además, se desnaturalizan totalmente en medios no acuosos; y su producción puede ser altamente

costosa.^{32,33} Estas limitaciones han llevado a la introducción de nuevas biomoléculas receptoras, en las que los aptámeros representan una atractiva alternativa para los anticuerpos.

Los aptámeros (Apt) son oligonucleótidos monocatenarios de entre 20 a 60 bases con un peso molecular entre 6 y 20 kDa.³⁴ A diferencia de los Ab, los Apt sufren de un cambio conformacional durante el proceso de enlace al analito. Los Apt pueden adoptar una conformación tridimensional aleatoria o motivos estructurales como horquillas, bucles internos, bultos, dúplex, bucles de múltiples ramificaciones y cuádruplex dependiendo del medio en el que estén disueltos, y si se encuentran solos o interactuando con un analito. Algunos de estos motivos se pueden apreciar en la Figura 5.^{27,35}

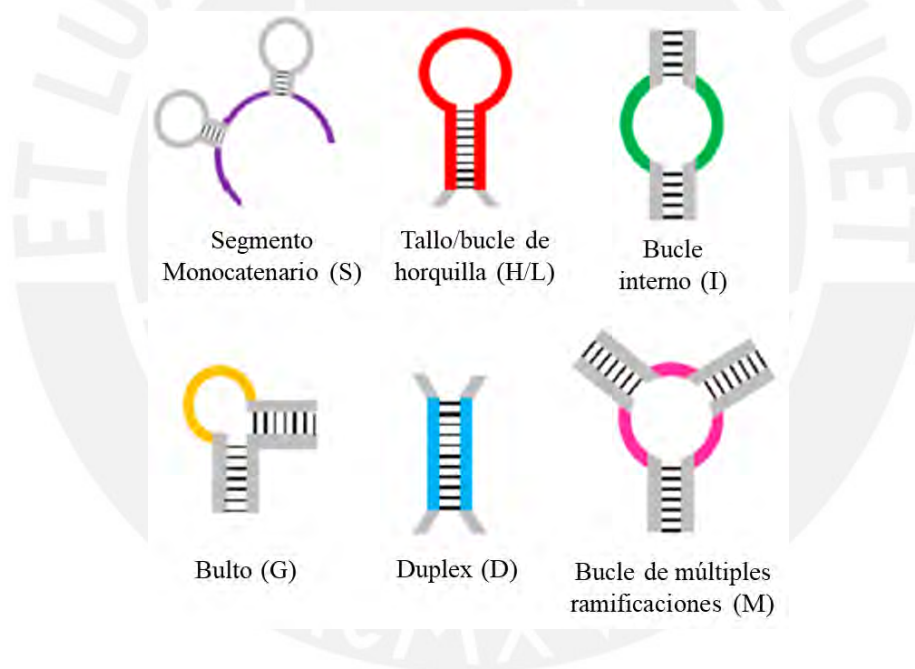


Figura 5. Principales motivos estructurales encontrados en aptámeros. Adaptado de Sullivan y colaboradores.³⁵

La formación del complejo Apt-analito genera un cambio conformacional de la hebra oligonucleótida, y está dirigido por fuerzas no covalentes como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, de apilamiento o hidrofóbicas. El diseño de aptámeros se realiza por medio de un proceso denominado evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX, por sus siglas en inglés).³⁶ Este es un proceso realizado *in vitro* en el

cual, en un ciclo, se selecciona a los candidatos con mayor afinidad por un determinado analito, a partir de una librería de 10^{13} – 10^{15} oligonucleótidos. Este ciclo se repite entre 5 a 15 veces hasta obtener una pequeña secuencia de oligonucleótidos con alta afinidad por el analito,³⁶ que puede ser luego sintetizada y químicamente modificada en los extremos con grupos funcionales o marcadores de interés. Uno de los métodos de síntesis de aptámeros más empleados es la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida;³⁷ este está basado en el acoplamiento de nucleótidos desde el término 3' a 5' en un soporte sólido, que puede ser un vidrio de poro controlado o perlas de poliestireno.³⁸

El uso de aptámeros en biosensores representa un campo de estudio reciente y ha traído bastantes ventajas respecto al uso de anticuerpos. Entre ellas destacan las siguientes:

- La producción de aptámeros se realiza de manera sintética y con muy buenos rendimientos a diferencia de los anticuerpos, para cuya producción se requiere de organismos vivos o técnicas de cultivo *in vitro*.³³
- Los aptámeros tienen un mayor rango de estabilidad de temperatura y pH, por lo que tienen una mayor aplicabilidad en medios no fisiológicos o no acuosos.³³
- Los aptámeros permiten detectar una mayor gama de analitos que los anticuerpos. Estos últimos no son buenos para detectar ni moléculas pequeñas ni iones, por lo que su aplicabilidad se ve reducida.³⁹ Además, no es necesario que el analito genere una respuesta inmune en el organismo.
- Los aptámeros tienen constantes de afinidad similares a los anticuerpos e incluso pueden llegar al orden de los pmol.L⁻¹.³⁹
- Dependiendo de la estrategia de detección en el biosensor, el empleo de aptámeros podría, potencialmente, dar lugar a sensores reutilizables. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado en la literatura,^{40,41} muy pocos sensores han aprovechado esta característica.

A pesar de las ventajas que ofrecen los aptámeros, también presentan algunas desventajas que podrían limitar su aplicación. Así, el principal problema radica en la rápida degradación por nucleasas en medios biológicos.³⁴

En ambos casos, sea mediante el uso de un anticuerpo o de un aptámero, el agente de reconocimiento actúa como el principal responsable de la selectividad del sensor; mientras el transductor toma un rol importante en la sensibilidad del sistema, al ser el responsable de producir una señal medible producto de la interacción entre el agente de reconocimiento y el analito.

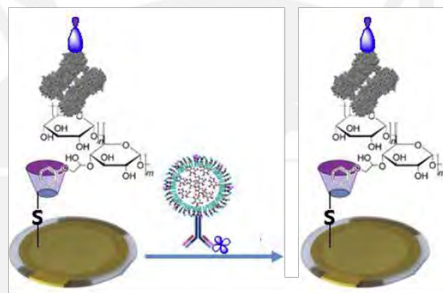
2.2. Principales sistemas de transducción

Entre los diferentes sistemas de transducción empleados en biosensores se encuentran los sistemas de transducción térmicos, gravimétricos, eléctricos y ópticos. En cuanto a la detección de micotoxinas destacan los 3 últimos.

Los sistemas de transducción gravimétricos aprovechan el cambio de masa que ocurre en la superficie de un cristal de cuarzo piezoeléctrico. Cuando estos cristales son sometidos a la presencia de un campo eléctrico alternante, se generan deformaciones mecánicas sobre el cristal.²⁶ A una determinada frecuencia, se inducirá una resonancia acústica o mecánica sobre el material; esta frecuencia depende de la masa del cristal, por tanto cualquier cambio de masa como la unión de una toxina a un anticuerpo será detectado por medio de la variación de la frecuencia de oscilación del cristal.²⁶ Un destacable ejemplo de un biosensor gravimétrico es el propuesto por Ying Tang y colaboradores para detectar AFB1 en muestras de maní con un límite de detección igual a 0.83 ng.kg^{-1} .⁴² Como se puede observar en la Figura 6, el sensor inicialmente consta de una lámina de oro funcionalizada con un residuo de

conavalina A (Con A) unida al complejo BSA-AFB1.⁴² Este residuo es liberado en ausencia de AFB1, pues el anticuerpo de AFB1 se encuentra unido a un nanoliposoma cargado con glucosa. El anticuerpo se une a la plataforma, libera glucosa por la adición de Triton-X-100 y desplaza a la Con A de su anclaje, dando como resultado la pérdida del residuo ConA-AFB1-BSA. En presencia de AFB1, el sensor se mantiene igual, pues los sitios de reconocimiento del Ab de AFB1 están ocupados y no se unen a la plataforma.⁴² Para una revisión de más biosensores gravimétricos, se puede consultar la referencia ⁴³.

En presencia de AFB1:



En ausencia de AFB1:

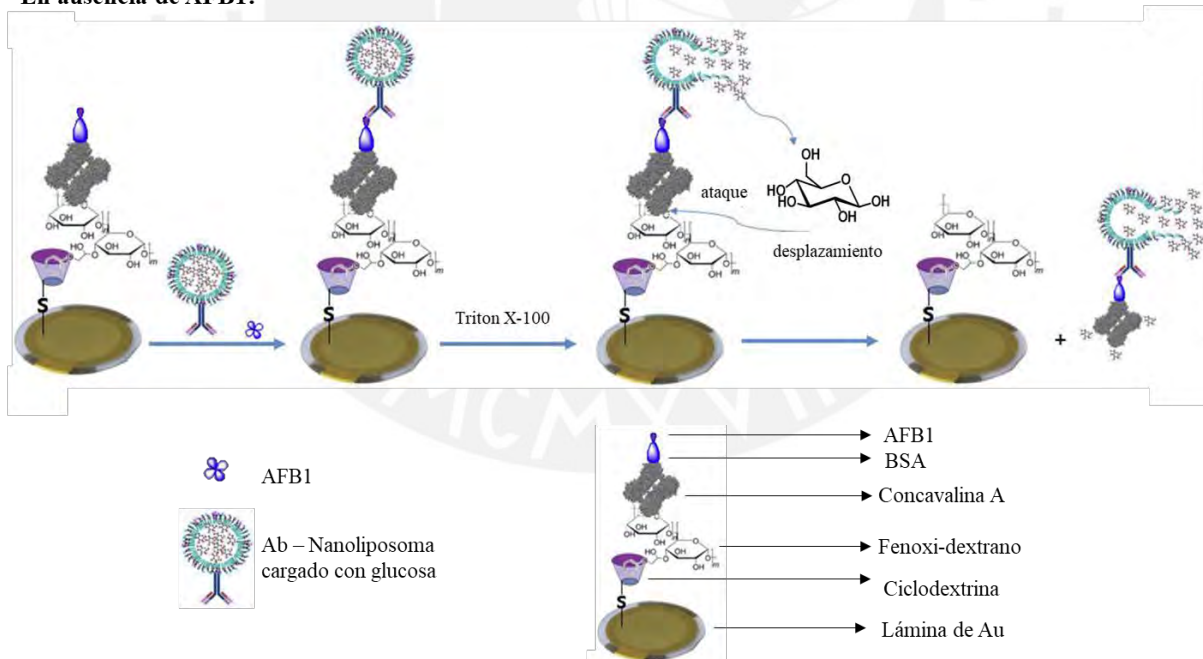


Figura 6. Esquema representativo del biosensor gravimétrico de Tang. Adaptado de Tang y colaboradores.⁴²

Por otro lado, los sistemas de transducción electroquímicos miden los cambios en las propiedades eléctricas del sistema como la conductividad, la corriente, el potencial o la

impedancia. Estos cambios son generados por la producción o el consumo de especies electroactivas, o por procesos de adsorción de analitos sobre la superficie de electrodos.^{26,43} Para medir estas variaciones, se suelen usar técnicas como la potenciometría y la amperometría, principalmente. Un ejemplo importante de un sistema de transducción electroquímico es el biosensor de OTA planteado por Tang y colaboradores que alcanzó un límite de detección de 0.23 pg.mL^{-1} .⁴⁴ Este consta de un electrodo de oro funcionalizado con el complejo aptámero-ADN auxiliar que contiene una región complementaria al aptámero de OTA. En presencia de OTA, el aptámero se separa del complejo anterior producto del enlace OTA-Apt; lo que permite que, al añadir hojas de MoS_2 , estas puedan adsorberse al electrodo de oro.⁴⁴ Luego se aprovecha la propiedad catalasa del MoS_2 para catalizar la oxidación de la quinona a hidroxiquinona, esta reacción redox genera una corriente proporcional a la concentración de OTA. En la Figura 7, se muestra un esquema representativo del sensor electroquímico de Tang. Finalmente, los sistemas de transducción ópticos se basan en los cambios en las propiedades ópticas del sistema generados por el proceso de reconocimiento del analito. Estas propiedades son medidas por diferentes técnicas instrumentales como la espectroscopía ultravioleta-visible y la espectroscopía Raman, entre otras.²⁶ En la literatura, un ejemplo de sistema de transducción óptico se encuentra en el biosensor para detectar AFM1 planteado por Jalalian y colaboradores, el cual permitió alcanzar un límite de detección de 30 ng.L^{-1} .⁴⁵ Este biosensor consta de una nanopartícula de silica (SNP) funcionalizada con el aptámero de AFM1 que se encuentra unido a su hebra complementaria (HC) inicialmente. En presencia del analito, la HC se desprende de la SNP y se adsorbe a las nanoesferas de oro (AuNS), protegiéndose así de la agregación frente a la adición de NaCl. En ausencia de analito, la HC no se desprende, por lo que las AuNS agregarán por la adición de NaCl. Esto generará cambios en los valores de absorbancia a 650 nm (AuNS agregadas) y 520 nm (AuNS estables) varíe en función de la

concentración de AFM1.⁴⁵ En la Figura 8, se muestra un esquema representativo de este biosensor.

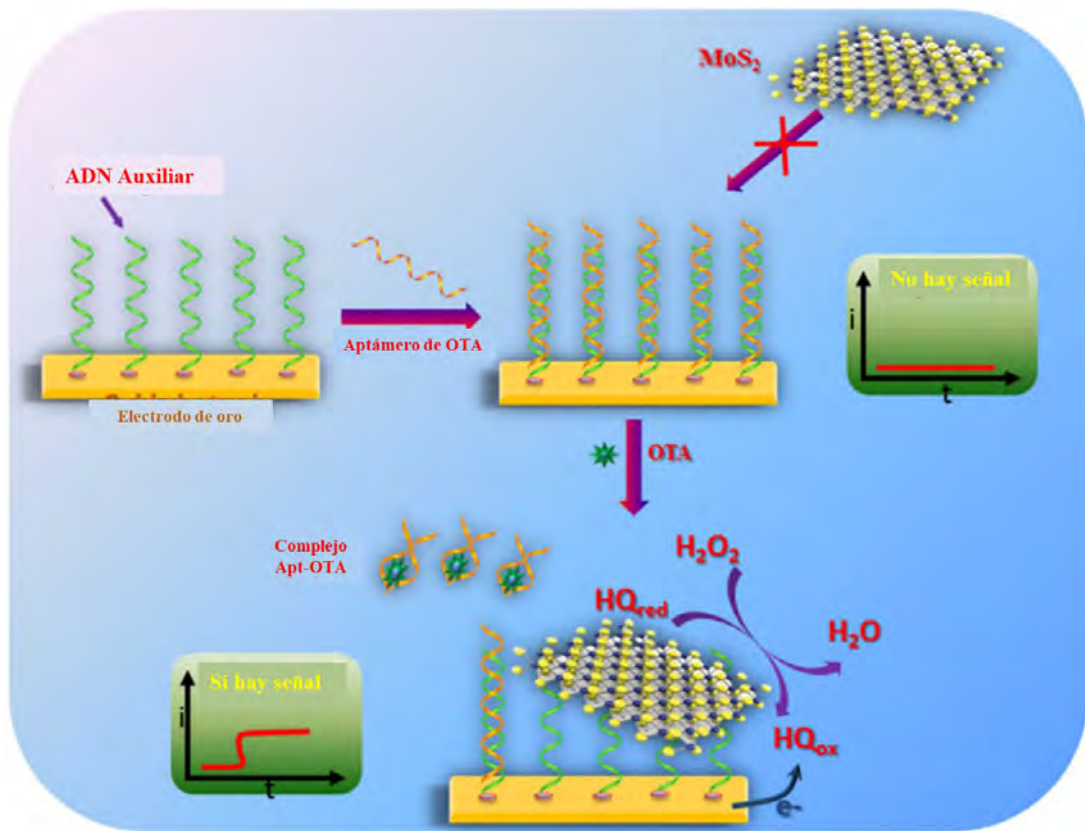


Figura 7. Esquema representativo del biosensor electroquímico de Tang. Adaptado de Tang y colaboradores.⁴⁴

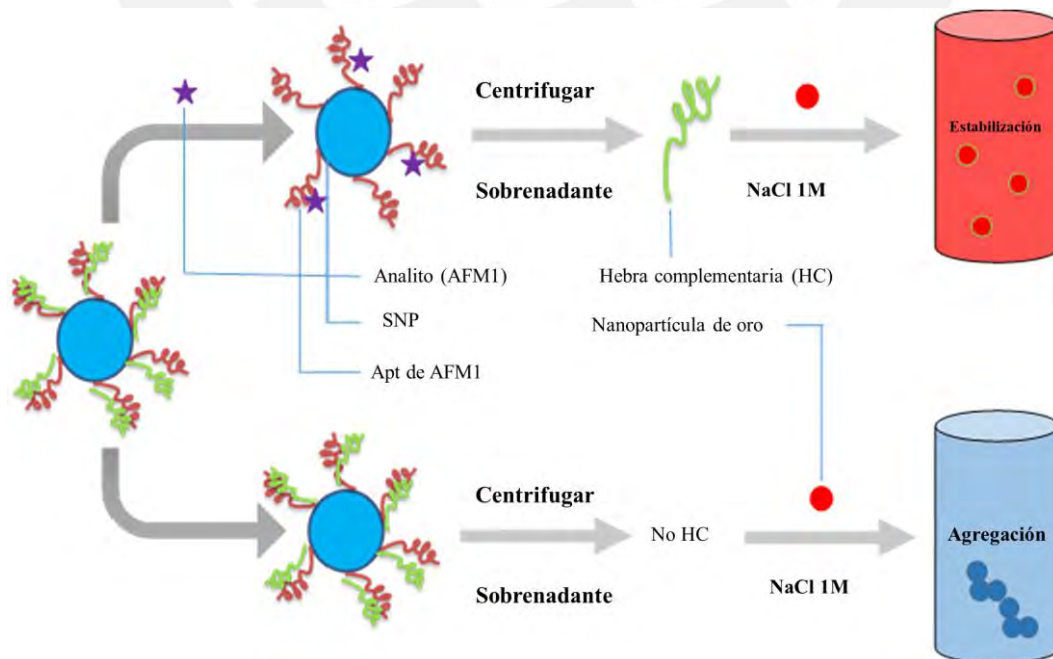


Figura 8. Esquema representativo del biosensor óptico de Jalalian. Adaptado de Jalalian y colaboradores.⁴⁵

A pesar de los diferentes tipos de transductores existentes, este trabajo de investigación se enfocará en el empleo de nanomateriales como transductores ópticos, específicamente en los sensores nanoplasmónicos, un campo que viene en constante desarrollo y crecimiento debido a sus excelentes propiedades a nanoescala.

2.3. Nanomateriales de metales nobles como transductores ópticos

Los nanomateriales son estructuras que tienen al menos una dimensión en la escala de los nanómetros (10^{-9} m) y están formados por átomos y moléculas.⁴⁶ Estos presentan una gran variedad de propiedades ópticas, magnéticas, químicas y eléctricas únicas debido a su pequeño tamaño.⁴⁷

En el caso de los nanosensores ópticos para la determinación de micotoxinas, destacan 3 tipos de nanomateriales: los puntos cuánticos (QDs), las nanopartículas magnéticas (MNPs) y los nanomateriales de metales nobles. Los puntos cuánticos han sido empleados en métodos basados en la luminiscencia como marcadores fluorescentes y como agentes de mejora o de extinción de la fotoluminiscencia.⁴⁸ Por otro lado, aunque las nanopartículas magnéticas no destacan especialmente por sus propiedades ópticas, se suelen emplear en procesos que permiten adsorber los analitos en su superficie y lograr una separación magnética rápida y sencilla. Luego, entran en sinergia con los transductores ópticos y permiten obtener sistemas de detección con una sensibilidad y selectividad mejorada.⁴⁹⁻⁵³ Finalmente, los nanomateriales de metales nobles también son empleados como plataformas de adsorción del analito. A diferencia de las MNPs, el proceso de adsorción de los analitos sobre la superficie metálica genera cambios en sus propiedades ópticas que permiten la detección y cuantificación de las sustancias de interés y con ello el desarrollo de transductores plasmónicos.⁵⁴ Este trabajo de investigación se enfocará principalmente en este último tipo de transductores ópticos.

Los metales nobles son un grupo de elementos que se caracteriza por ser químicamente inertes a la corrosión, o la oxidación, cuando se exponen a ambientes acuosos, ácidos o en presencia de oxígeno, entre ellos se encuentran la plata, el oro, el platino, el rutenio y el osmio, entre otros. Los nanomateriales de oro y plata son los más estudiados y empleados como transductores ópticos debido a sus excelentes propiedades en el rango visible-infrarrojo cercano,⁵⁵ así como por su alta estabilidad, fácil síntesis y funcionalización superficial con distintos agentes de reconocimiento, convirtiéndose en prometedoras herramientas alternativas en el diseño de biosensores ópticos.

La síntesis de estos nanomateriales puede ser abordada por dos diferentes aproximaciones: de arriba hacia abajo (*top-down*) o de abajo hacia arriba (*bottom-up*). Las técnicas *top-down* son aquellas que sintetizan los nanomateriales a partir del metal en grueso y, por medio de técnicas físicas y químicas, llegan hasta la nanoestructura deseada. Las técnicas *bottom-up*, por otro lado, consisten en la construcción de las nanoestructuras a partir de sales y compuestos.⁴⁷ En este tipo de síntesis, los factores como la temperatura, la concentración del agente precursor metálico, el agente reductor y el agente estabilizante determinan la forma y tamaño del nanomaterial sintetizado. En la Figura 9, se muestra un esquema representativo de estas dos formas de sintetizar nanoestructuras.

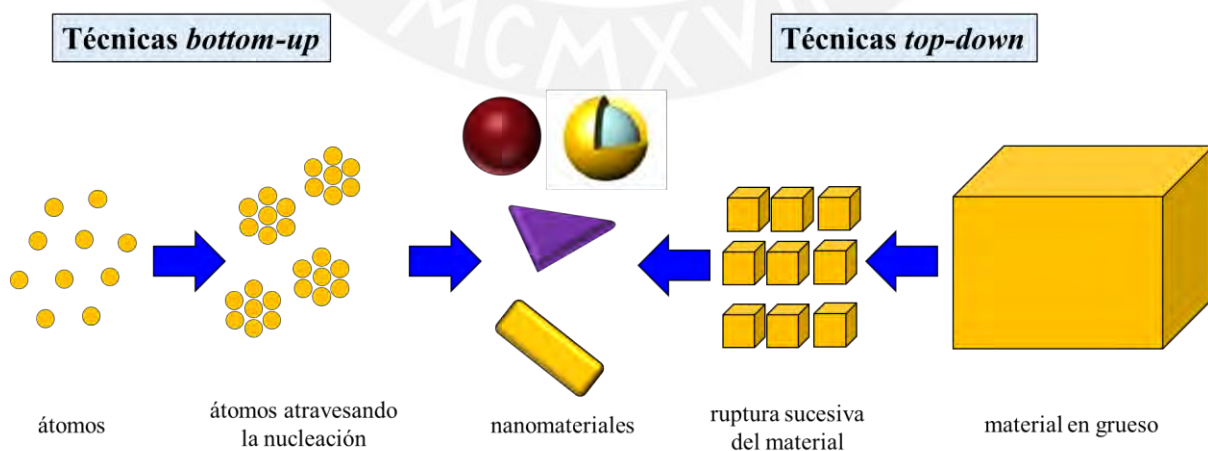


Figura 9. Esquema representativo de las técnicas *bottom-up* y *top-down*. Adaptado de Habibullah y Kim.^{56,57}

Con el desarrollo y la optimización de los métodos de síntesis, se han logrado obtener nanomateriales de diversas geometrías y tamaños que son altamente estables y con una distribución uniforme.⁵⁸ Dentro del campo de aplicación de los biosensores ópticos de micotoxinas, la síntesis de nanopartículas por la aproximación *top-down* es reportada como la menos recurrente, y solo resaltan algunos ejemplos basados en la deposición física de vapor y la electrodeposición de metales.⁵⁹⁻⁶³ En todos estos casos se hace necesario contar con laboratorios de nanofabricación especializados, o salas blancas, que no son fácilmente accesibles y que reducen su recurrencia en este campo de aplicación. Por su parte, los métodos *bottom-up* son los más usados debido a que no requieren de instrumentación avanzada, pueden sintetizarse en un laboratorio con equipamiento básico, y tienen la capacidad de producir nanoestructuras uniformes, comparables a las producidas por los métodos *top-down*.

En los métodos de síntesis *bottom-up*, se requieren 3 componentes: la sal precursora, el agente reductor y el agente estabilizante. La sal precursora es la fuente de átomos metálicos para construir la nanoestructura; esta suele ser HAuCl_4 para el oro, o AgNO_3 para la plata.⁵⁷ Esta sal es reducida por el agente reductor, el cual puede ser citrato de sodio, borohidruro de sodio o tiosulfato de sodio, entre otros.^{57,64} La importancia de este componente es que determina la velocidad de producción de átomos metálicos reducidos que van formando centros de nucleación o semillas. Luego, el agente estabilizante se adsorberá en la superficie de estos centros de forma que se reduce la energía de la superficie y se favorece el crecimiento de estos en una determinada dirección, dando como resultado una gama de diferentes formas y tamaños. Entre los agentes estabilizantes más comunes destacan el ion citrato,⁶⁵ el ion tiosulfato,⁶⁴ y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB por sus siglas en inglés),⁶⁶ entre otros. En la literatura, las nanopartículas cuasiesféricas de oro (AuNEs) y de plata (AgNEs) sintetizadas por el método de reducción con citrato son las más comunes en el desarrollo de biosensores basados en nanomateriales. No obstante, también existen trabajos en los que se han empleado

nanopartículas anisotrópicas, como las nanovarillas de oro (AuNRs) y los nanotriángulos de oro (AuNTs), o nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ del tipo núcleo-cascarón. Por ello, a continuación, se explicará brevemente los métodos de síntesis de estas nanopartículas más usadas en la detección de micotoxinas.

El método de reducción con citrato para la síntesis de las AuNEs fue planteado por Turkevich en 1951,⁶⁵ y luego fue refinado por Frens y colaboradores en 1973.⁶⁷ En este, se utiliza ácido cloroáurico (HAuCl_4) como la sal precursora que es reducida por el ion citrato de Au(III) a Au(0). Además, el citrato sirve como agente estabilizante, pues se adsorbe sobre la superficie de las nanoesferas a medida que se va formando e impide la agregación de estas como producto de la repulsión entre nanopartículas. Mediante la variación de la relación oro/citrato se han podido sintetizar nanopartículas de entre 9 y 120 nm de diámetro; sin embargo, la principal limitación de este método es la calidad de las partículas, pues se obtienen algunas impurezas de nanoelipsoides y nanotriángulos.⁶⁸ Para solucionar este problema, Bastús y colaboradores en el 2011 plantearon un método de síntesis por crecimiento de semillas controlado cinéticamente.⁶⁹ En este método se separa el proceso de nucleación y crecimiento de partícula temporalmente. Primero, se produce la formación de semillas de oro de ~ 10 nm de diámetro a 120°C ; luego, se disminuye la temperatura a 90°C , y se agrega más citrato y HAuCl_4 para favorecer el crecimiento de la semilla. Con este método de síntesis se ha podido producir nanopartículas de entre 10 a 180 nm de diámetro con un alto grado de monodispersidad y con un menor grado de impurezas, a diferencia del método de Turkevich y Frens.⁶⁹

Análogamente, se planteó un método similar para la síntesis de AgNEs, que fue propuesto por Lee y colaboradores en 1982;⁷⁰ sin embargo, a diferencia de las AuNEs, la modulación de la relación plata/citrato no permite controlar de manera muy precisa la forma y tamaño de las nanopartículas resultantes.⁷¹ Para solucionar este problema, en el 2009, Dong y colaboradores plantearon un método de reducción por pasos y pudieron sintetizar AgNEs de hasta 70 nm de

diámetro.⁷¹ Este consiste en la separación de la etapa de nucleación y del crecimiento de semilla producido por la alteración de pH del medio, el cual afecta a las propiedades reductoras del citrato. A pH alto, la fuerza reductora es mayor, se favorece la reducción de la plata y la formación de semillas; mientras que, a pH bajo, la fuerza reductora disminuye, y se favorece el crecimiento de partícula.⁷¹

Por otro lado, la síntesis de AuNRs fue planteada por un método de crecimiento de semilla por Jana y colaboradores en el 2001,⁶⁶ y luego fue mejorado por Nikoobakht y colaboradores en el 2003.⁷² En este método, se utiliza HAuCl_4 como la sal precursora que es reducida por NaBH_4 a oro metálico. El agente surfactante en este método es el CTAB o una mezcla de este con cloruro de bencildimetilhexadecilamonio (BDAC por sus siglas en inglés). A diferencia del citrato, el enlace entre el CTAB y la superficie metálica se da por medio de un enlace $\text{Au}-\text{Br}^--\text{CTA}^+$, el cual estabiliza la superficie.⁷² Adicionalmente, a estos reactivos se añade nitrato de plata (AgNO_3), que cumple un rol esencial en el mecanismo de crecimiento de las AuNRs activando las caras $\{110\}$ y favoreciendo un mayor crecimiento longitudinal que transversal de las AuNRs.⁷³ Con este método se han sintetizado AuNRs con una proporción entre el tamaño longitudinal y transversal entre 1.5 a 4.5 usando CTAB como surfactante y entre 4.6 a 10 usando la mezcla CTAB/BDAC.⁷² Además, se logra alcanzar una elevada pureza del nanomaterial, pues se ha reportado impurezas de AuNEs menores al 1% de la población total.⁷²

Los AuNTs representan otra clase de nanopartículas anisotrópicas empleadas en el desarrollo de biosensores. Un método de síntesis destacado para estos fue propuesto por Pelaz y colaboradores en el 2012,⁶⁴ y posteriormente modificado por Hernández en el 2018.⁷⁴ En este método, también se usa HAuCl_4 como sal precursora, y el tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) actúa tanto como agente reductor como estabilizante, favoreciendo el crecimiento transversal de las semillas de oro. Con el método de Pelaz, se han podido obtener AuNTs de 9 nm de grosor y

aristas entre 100 y 170 nm por medio de la modulación de la relación de oro/tiosulfato.⁶⁴ La modificación planteada por Hernández consiste de la adición del tiosulfato a un flujo de 9 mL.min⁻¹ a una temperatura de 18-19°C y, luego de 9 minutos de agitación, se añade 1 mL adicional de tiosulfato.⁷⁴ La importancia de este método es que evita el empleo de CTAB, el cual reduce la viabilidad celular de los nanomateriales y no se necesita de procesos de intercambio de surfactantes. Sin embargo, con este método se obtienen impurezas de AuNEs, por lo que, en caso se requiera, se tiene que recurrir a métodos de purificación.⁶⁴

El último tipo de nanopartículas son las del tipo núcleo-cascarón, entre las que destacan las nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄@Au. Esta simbología indica que el núcleo de la nanopartícula es de magnetita y está recubierto con oro. En cuanto al método de síntesis del núcleo de Fe₃O₄ (MNP, por sus siglas en inglés) destaca la síntesis solvotermal planteada por Deng y colaboradores en el 2005,⁷⁵ y modificada por Liu y colaboradores en el 2009.⁷⁶ Esta consiste en la reducción de FeCl₃ en un medio de solvente orgánico como etilenglicol o dietilenglicol, que también funciona como agente reductor, a temperaturas mayores al punto de ebullición del solvente y a altas presiones.⁷⁷ Entre los agentes estabilizantes comúnmente usados se encuentra la polivinilpirrolidona,⁷⁸ el ácido poliacrílico,⁷⁸ y el citrato;⁷⁶ este último fue propuesto en la modificación de Liu con el fin de obtener nanopartículas con menor citotoxicidad y que se puedan dispersar en agua. Con el método de Deng, se puede obtener nanopartículas magnéticas entre 200 y 800 nm de diámetro,⁷⁵ mientras que con el método de Liu, entre 80 y 410 nm.⁷⁶

La deposición del recubrimiento de oro sobre las nanopartículas magnéticas se realiza por medio de la síntesis de crecimiento de semilla planteado por Lyon y colaboradores en el 2004,⁷⁹ y modificada por Zhai y colaboradores en el 2009.⁸⁰ El método de Lyon consiste en la formación de semillas de AuNS por acción del ion citrato adsorbido sobre la superficie de la MNP; luego, estas semillas crecen producto de la adición de una solución de

hidroxilamina, NH_2OH .⁷⁹ Experimentalmente, el tamaño del recubrimiento se controla por medio del número de adiciones de la solución de HAuCl_4 . La modificación efectuada por Zhai contempla el empleo de poli(etilenimina) (PEI, por sus siglas en inglés) que ayuda a la adsorción de semillas de AuNS. Esto ocurre debido a que la PEI es un polímero de carga positiva, por lo que las AuNS que suelen tener una capa cargada negativamente se adsorben en la superficie.⁸⁰ Posteriormente, se va añadiendo HAuCl_4 y NH_2OH , como en el método anterior, para promover el crecimiento de las semillas; el análisis TEM de estas nanopartículas ha mostrado que forma una superficie irregular,⁸⁰ por lo que se les suele llamar nanoflores.⁸¹

En todos los casos, indistintamente del método de síntesis y fabricación de las nanoestructuras, los metales nobles actúan como transductores ópticos, pero solo después de funcionalizar la superficie metálica con los agentes de reconocimiento necesarios, se convierte en un sensor selectivo.

2.3. Estrategias de inmovilización de los agentes de reconocimiento en la superficie de los transductores ópticos a nanoescala

En la mayoría de los nanosensores ópticos, los anticuerpos y los aptámeros están inmovilizados sobre la superficie del metal noble a nanoescala. Indistintamente de la estrategia de conjugación, se busca no alterar la función de reconocimiento del anticuerpo o el aptámero. En el caso de los anticuerpos esto es de vital importancia, ya que la zona de enlace con el antígeno (Fab) debe quedar expuesta para reconocer el antígeno. De este modo, las estrategias de inmovilización se pueden dividir en dos grandes grupos: el entrecruzamiento químico y las interacciones físicas.

Por un lado, el entrecruzamiento químico consiste en la formación de enlaces covalentes entre la superficie y el agente de reconocimiento. Entre las distintas estrategias empleadas para este fin destacan tres:

- **La formación de enlaces oro/plata-azufre (Au/Ag-S):** Esta estrategia se basa en la alta estabilidad del enlace entre el azufre con metales blandos como la plata y el oro. Con el fin de aprovechar este enlace, algunos aptámeros son funcionalizados con un extremo tiolado (por ejemplo $-(\text{CH}_2)_6\text{-SH}$). Además de la unión directa del agente de reconocimiento, este enlace también es usado para añadir distintas funcionalidades a la superficie de la nanopartícula, especialmente, grupos carboxilato o ésteres, los cuales sirven en la siguiente estrategia de inmovilización.⁸²
- **La formación de amidas:** En esta estrategia, se aprovecha la presencia de grupos carboxilato en la superficie del nanomaterial, y de los grupos amino presentes en el agente de reconocimiento, para la formación del enlace amida. Para ello, el grupo carboxilato es activado mediante la reacción con *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS), a fin de formar un succinimidil éster. Alternativamente, también se puede enlazar succinimidil ésteres en la superficie de la nanopartícula por medio de un éster tiolado.⁸³ Luego, este éster activado reacciona con el grupo amino del agente de reconocimiento. Así, por ejemplo, se puede modificar uno de los extremos del aptámero con un grupo amino o se pueden aprovechar los grupos amino presentes en los residuos de un anticuerpo.
- **La formación de iminas:** Esta estrategia es menos recurrente y suele emplear una molécula de glutaraldehído como puente entre una superficie con grupos OH o NH_2 con un agente de reconocimiento con grupos NH_2 por lo que su aplicabilidad con respecto al agente de reconocimiento es similar que la estrategia anterior.⁸³

Por otro lado, las estrategias de interacciones físicas consisten en la inmovilización del agente de reconocimiento por medio de fuerzas no covalentes como interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y de apilamiento. Entre las estrategias más representativas destacan las siguientes:

- **La adsorción electrostática:** Este tipo de estrategia es sencilla de realizar y se basa en la interacción de una superficie cargada, como los grupos citrato en las AuNEs o AgNEs, con los grupos cargados de un anticuerpo o aptámero, en función del punto isoeléctrico del agente de reconocimiento. En este tipo de estrategia, la adsorción de anticuerpos puede presentar problemas, pues esta se puede dar sobre la zona de reconocimiento (Fab) y disminuir la sensibilidad del sensor.⁸⁴ Por otro lado, en el caso de los aptámeros, esto no representa un problema pues la formación del complejo analito–aptámero generará el desprendimiento del aptámero de la superficie del nanomaterial por lo que el proceso de reconocimiento no se ve afectado.⁸⁵
- **La interacción Biotina–Estreptavidina:** Esta estrategia aprovecha la interacción biotina–estreptavidina/avidina, la cual es conocida como una de las interacciones no covalentes más fuertes reportadas.⁸³ Para aprovechar esta interacción, se suelen agregar residuos de biotina al agente de reconocimiento y, por otro lado, se enlaza streptavidina a la superficie.
- **La interacción Proteína G–Anticuerpo:** Esta última estrategia aprovecha la alta afinidad entre la proteína G y los anticuerpos. La principal ventaja respecto de la adsorción electrostática es que la interacción entre la proteína y el anticuerpo se da en la base de este último. De este modo, la zona de reconocimiento (Fab) queda libre para el reconocimiento del analito.¹¹

La Figura 10 muestra un esquema representativo de las seis estrategias de funcionalización descritas anteriormente. Así, mediante el uso de estas se han podido desarrollar diversas clases

de plataformas que aprovechan la selectividad de los aptámeros y anticuerpos, para reconocer a los analitos de interés; y la sensibilidad óptica de los nanomateriales de metales nobles, para traducir y detectar las interacciones entre el agente de reconocimiento y las moléculas de interés, permitiendo el desarrollo de biosensores ópticos alternativos a nanoescala. A continuación, se resumen las particularidades ópticas de este tipo de biosensores ópticos a nanoescala aplicadas a la detección de micotoxinas. Además, se presentan algunos ejemplos destacados de la literatura que evidencian la posibilidad de ser empleados sin requerir laboratorios ni equipamiento sofisticado, en muchos casos pueden ser usados en el campo y que presentan una buena sensibilidad y selectividad.

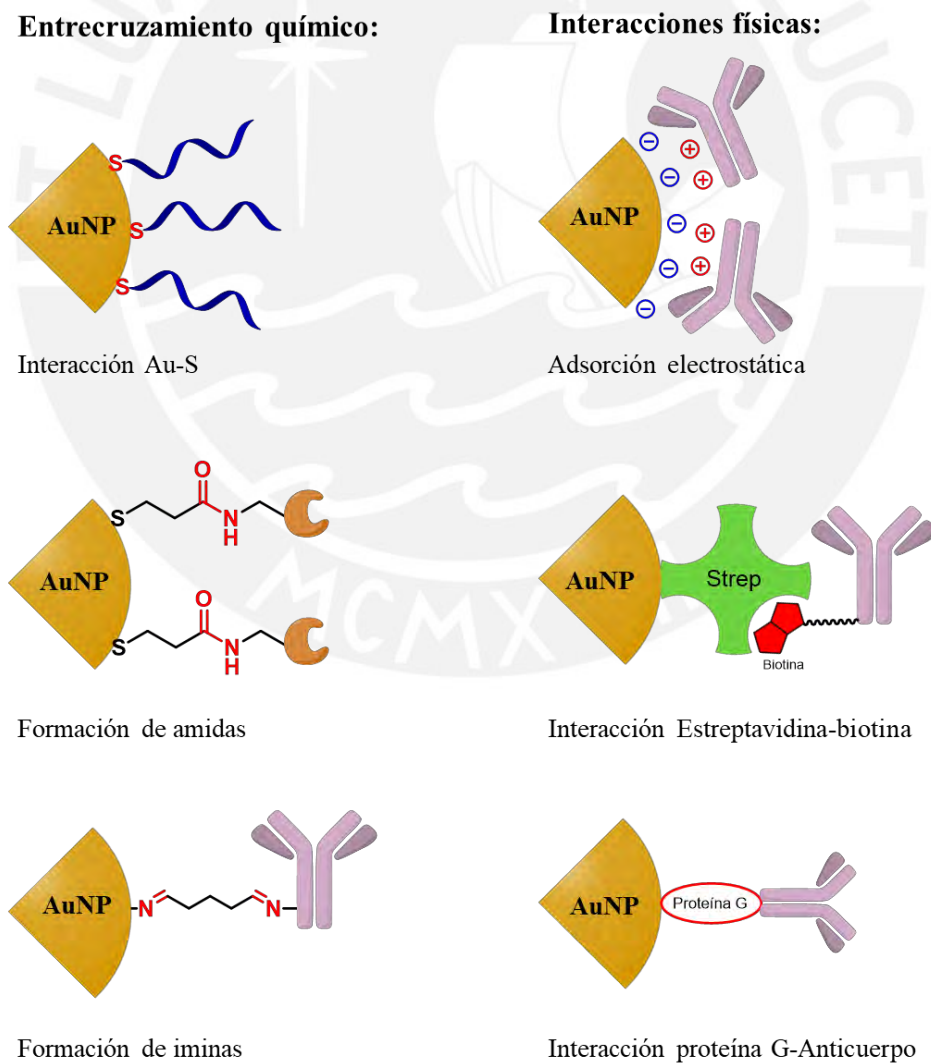


Figura 10. Principales estrategias de funcionalización de la superficie de nanomateriales.

Capítulo 3. Biosensores plasmónicos para la detección de micotoxinas

Las extraordinarias propiedades ópticas de los nanomateriales han permitido su implementación como transductores ópticos, dando consigo una nueva era de biosensores altamente sensibles, selectivos, accesibles y denominados biosensores plasmónicos. Por ello, primero se hará una descripción de los plasmones con el fin de poder comprender mejor las técnicas empleadas en esta clase de biosensores.

Un plasmón se define como una oscilación cuantizada de los electrones de conducción en un conductor causada por una perturbación de la densidad electrónica en el metal.⁸⁶ Esta genera que la densidad electrónica se concentre en una zona del conductor como la región R, por ejemplo (Figura 11). La concentración de carga negativa en R genera la repulsión entre los electrones por lo que estos se alejarán de la zona R. Este movimiento, a su vez, causa que la región R se cargue positivamente, por lo que los electrones se ven atraídos nuevamente hacia la región R, dando como resultado un movimiento oscilatorio hasta que la energía de la perturbación se disipe por calentamiento de Joule u otros procesos disipativos.⁸⁶ Esta oscilación tiene una frecuencia asociada denominada frecuencia de plasmón, ω_p , por lo que la energía asociada al plasmón tiene un valor $E = \hbar\omega_p$.

Por otro lado, un plasmón superficial es generado por una perturbación electromagnética incidente en la superficie de un metal. Esta genera ondas de luz atrapadas en la superficie que se propagan a lo largo de la interfase entre el metal y el medio dieléctrico, y un campo eléctrico evanescente perpendicular a la superficie metálica que decae exponencialmente respecto a la distancia. Debido a la naturaleza híbrida de esta interacción, también reciben el nombre de plasmón polaritón.⁸⁷

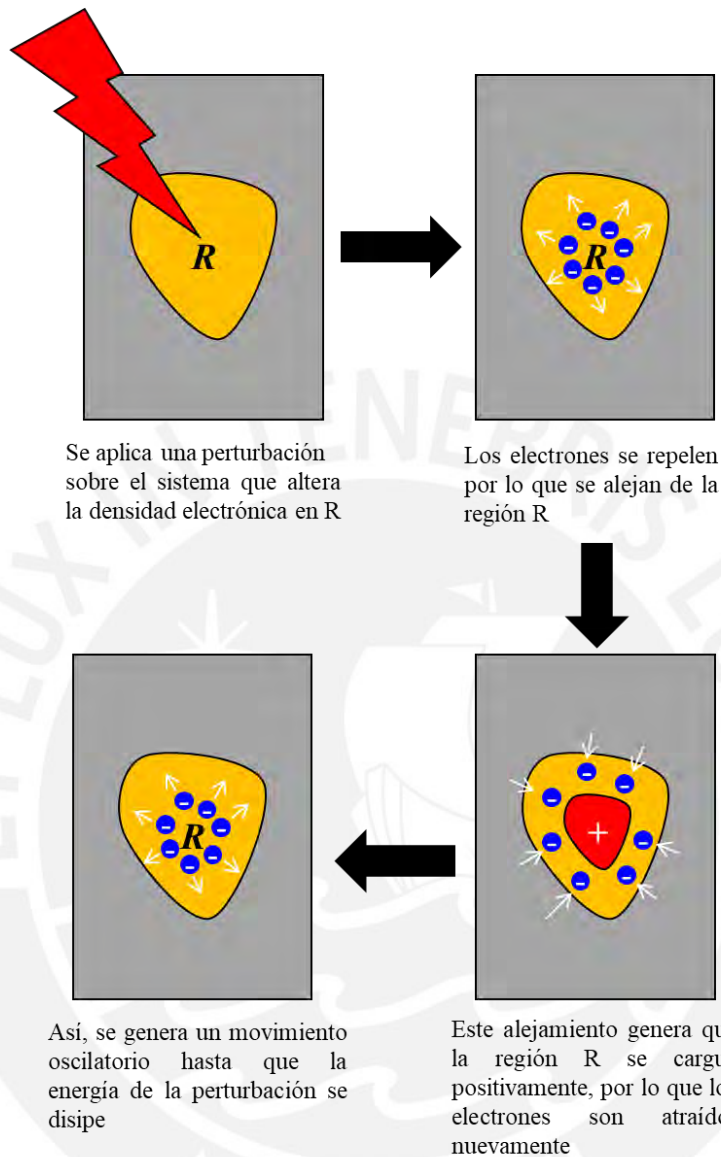


Figura 11. Representación esquemática de un plasmón.

En la Figura 12a, se muestra la distribución de cargas en la superficie metálica y, en la Figura 12b, se muestra el decaimiento del campo eléctrico evanescente en función de la distancia a la superficie metálica.

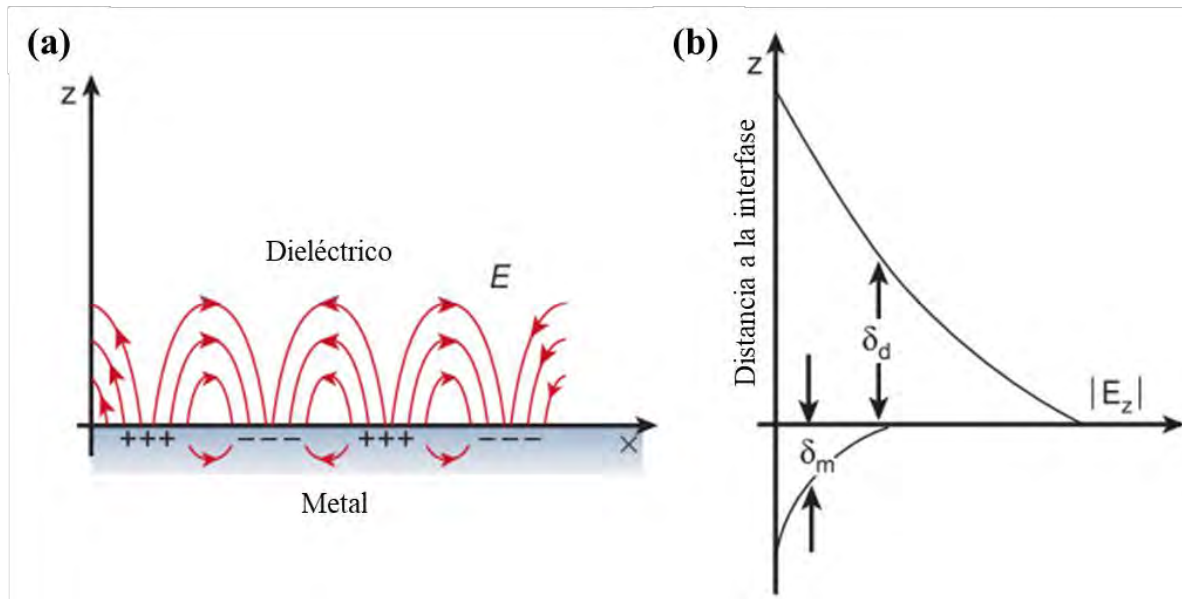


Figura 12. Esquema representativo de las propiedades de la resonancia del plasmón de superficie. (a) Distribución de cargas en la superficie metálica producido por el plasmón de superficie. (b) Decaimiento exponencial del campo eléctrico evanescente en función de la distancia a la superficie. Adaptada de Barnes y colaboradores.⁸⁷

Otro tipo de plasmón es el plasmón de superficie localizado. A diferencia de los plasmones superficiales, la perturbación incide en la superficie de una nanoestructura cuyo tamaño es menor a la longitud de onda del haz de luz incidente. Cuando se cumple dicha condición, el plasmón superficial queda atrapado en regiones localizadas en la superficie de la nanoestructura (Figura 13) y el campo eléctrico de la luz es amplificado en, aproximadamente, 8 órdenes de magnitud.^{54,88}

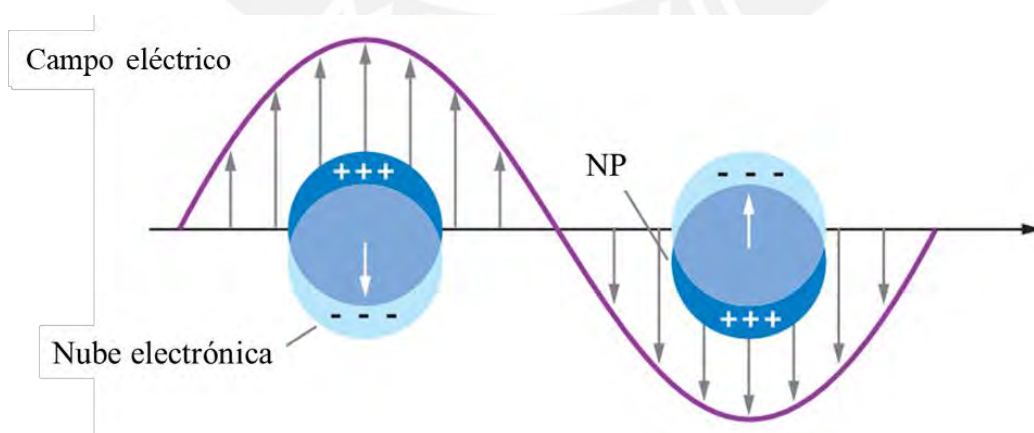


Figura 13. Representación de un plasmón superficial localizado. Adaptado de Willets y Duyne.⁸⁹

En lo que resta del capítulo se describirán los principios y particularidades de los 3 principales tipos de biosensores plasmónicos aplicados a la detección de micotoxinas, y algunos de los estudios reportados en la literatura en los que se han empleado estos tipos de biosensores plasmónicos.

3.1. Biosensores basados en la resonancia del plasmón superficial

La resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) ocurre cuando la frecuencia del haz de luz incidente coincide con el valor de la frecuencia del plasmón, ω_p . Experimentalmente, el análisis SPR se realiza mediante la configuración instrumental de Krestschmann (Figura 14a), la cual consiste en un prisma con un recubrimiento de oro (RO) a nanoescala, y el medio fluido donde se encuentra el analito. Cuando un haz de luz incide sobre el prisma con un ángulo de incidencia (θ) mayor al ángulo crítico (θ_c) se produce reflexión interna total en el prisma. Esto genera que se forme una onda evanescente en el medio fluido con una magnitud de vector onda ($k_{evan,||}$) expresado en la ecuación (1):⁹⁰

$$k_{evan,||} = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin(\theta) \quad (1)$$

La longitud de onda del haz incidente se representa como λ , mientras que n_1 corresponde al índice de refracción del prisma y θ es el ángulo de incidencia. Por otro lado, la magnitud del vector onda de un plasmón superficial (k_{SP}) se muestra en la ecuación (2).⁹⁰

$$k_{SP} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{n_2^2 n_m^2}{n_2^2 + n_m^2}} \quad (2)$$

Este vector onda se relaciona inversamente con la longitud de onda del haz incidente (λ), y depende del índice de refracción del metal (n_m) y del medio fluido (n_2). Así, los plasmones superficiales pueden ser excitados por las ondas evanescentes, cuando las magnitudes de

vectores onda se igualan ($k_{\text{evan},\parallel} = k_{\text{SP}}$), con lo cual se alcanza la resonancia del plasmón superficial, el cual es caracterizado por el ángulo SPR (θ_{SPR}), cuyo valor se muestra en la ecuación (3).⁹⁰

$$\theta_{\text{SPR}} = \text{sen}^{-1}\left(\frac{1}{n_1} \sqrt{\frac{n_2^2 n_m^2}{n_2^2 + n_m^2}}\right) \quad (3)$$

Así, el ángulo SPR es sensible al índice de refracción del medio cercano a la superficie metálica y se mide instrumentalmente por una caída de la intensidad de la reflectividad (Figura 14b). El oro y la plata son los materiales de mayor uso en esta técnica, y, entre ellos, la plata cuenta con una mayor sensibilidad. Por ejemplo, cuando un haz de 630 nm de longitud de onda incide sobre una superficie de plata, es posible detectar cambios en el medio, hasta 219 nm de distancia de la superficie, mientras que una superficie de oro solo puede detectar cambios hasta 162 nm de distancia.⁹¹ En los sensores SPR, el proceso de detección se basa en un cambio en el índice de refracción en la cercanía de la superficie metálica debido a la adsorción del analito con el agente de reconocimiento inmovilizado en la superficie metálica, dando como resultado un cambio en el ángulo SPR. En la Figura 14, se muestra el concepto de un biosensor basado en la técnica SPR con la configuración de Krestchmann, en el que un haz policromático incide sobre una película de oro a nanoescala, o recubrimiento de oro (RO), que se encuentra en un contacto con el prisma a través del cual se realiza la medición. Mientras en la otra cara de la película metálica se coloca un recubrimiento funcional (RF) y receptores biológicos que luego interactúan con el analito. Finalmente, los eventos de interacción entre los agentes de reconocimiento y el analito son monitoreados por los cambios en el ángulo SPR de manera puntual (Figura 14b) o en tiempo real (Figura 14d).

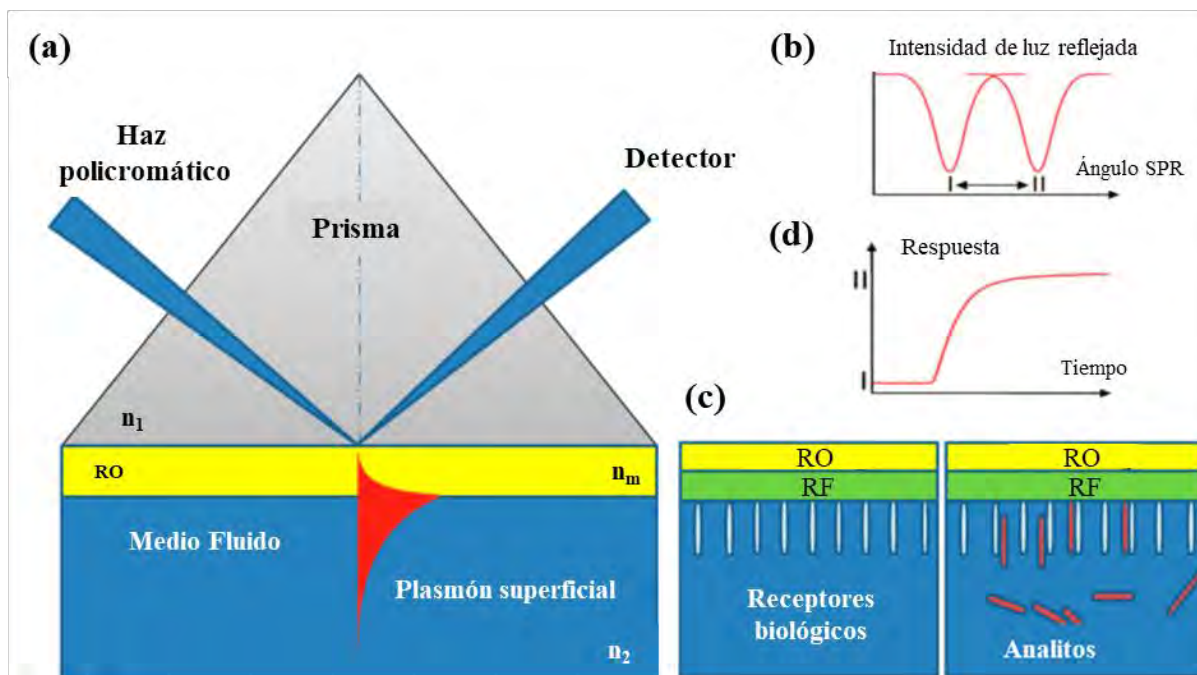


Figura 14. Concepto de un biosensor basado en la técnica SPR. (a) Configuración instrumental. (b) Espectro de luz reflejada antes y después del cambio del índice de refracción. (c) Elementos de bioreconocimiento. RO: recubrimiento de oro y RF: Recubrimiento funcional (d) Cambios en el índice de refracción causados por el evento de reconocimiento biológico. Tomado de Hiep y colaboradores.⁹¹

Joshi y colaboradores desarrollaron un sensor SPR capaz de detectar OTA, AFB1, FB1, ZEA, DON y la micotoxina T-2 (T2) simultáneamente en muestras de cebada.⁶³ En este estudio, el sensor está conformado por una superficie de oro modificada con moléculas de ovoalbúmina conjugadas a la micotoxina de interés. Luego, se hace fluir una mezcla de anticuerpos afines a las micotoxinas de interés con la muestra problema sobre el recubrimiento funcional. Esto genera una respuesta indirecta en función de los anticuerpos que no se han unido a las micotoxinas presentes en la muestra problema y que han quedado inmovilizados en la superficie del chip. En este trabajo, se logró acoplar dos sistemas que permiten la detección simultánea de tres micotoxinas (una doble detección triple, Figura 15a). Este alcanzó límites de detección de 3, 0.6, 2, 6, 26 y 0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para la OTA, la AFB1, la FB1, la ZEA, el DON y la T2, respectivamente,⁶³ y pudo ser regenerado hasta 60 veces, con lo cual representa una ventaja respecto de las pruebas ELISA. Además, el grupo también desarrolló un sistema *multiplex* (Figura 15b), denominado chip iSPR, que permitió la detección simultánea de las 6

micotoxinas, aunque con una menor sensibilidad. En este caso, el chip *multiplex* constó de un arreglo nanoestructurado producido por un proceso de deposición física de vapor, que permitió la detección de las seis micotoxinas en simultáneo con límites de detección de 160, 10, 13, 96, 64 y 26 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para la OTA, la AFB₁, la FB₁, la ZEA, el DON y la T2, respectivamente.⁶³ Aunque estos dos sistemas no presentan límites de detección adecuados para la regulación del contenido de OTA y AFB₁ en la Unión Europea, el diseño de un sistema *multiplex*, como el chip iSPR, puede ser considerado como una forma de llevar el laboratorio al campo (*lab on a chip*) y ser empleado como una prueba de descarte rápido.⁶³

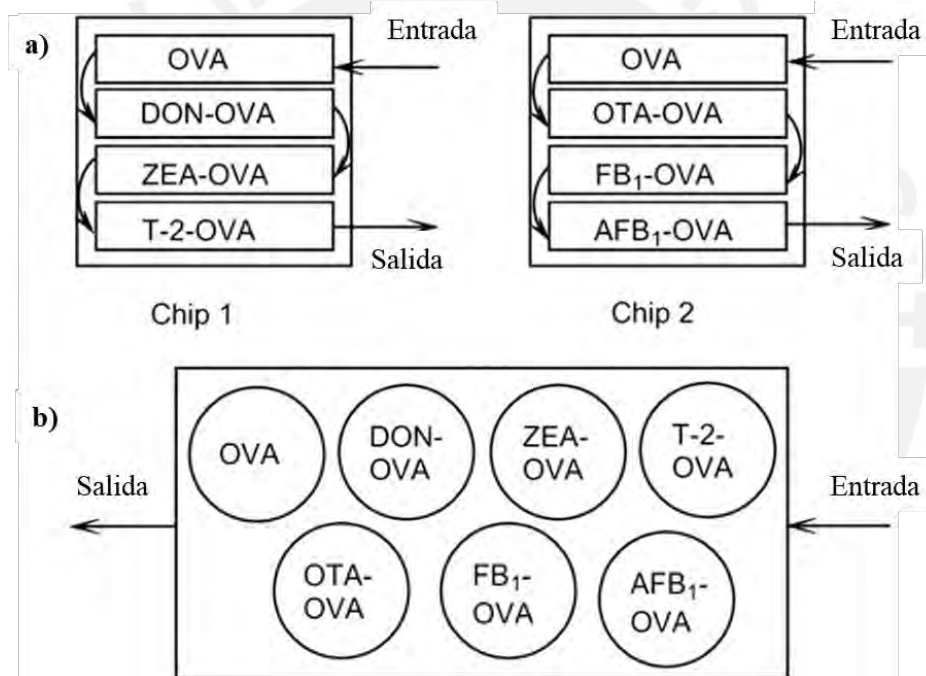


Figura 15. Representación esquemática del sensor SPR planteado por el grupo de Joshi: (a) Sistema de doble detección triple y (b) chip iSPR. Las flechas representan la dirección del flujo de la muestra. Adaptado de Joshi colaboradores.⁶³

De manera análoga, Wei y colaboradores desarrollaron un sensor SPR que detecta micotoxinas en muestras de trigo y maíz.⁹² En este estudio también se inmovilizó la micotoxina a la superficie metálica del chip; sin embargo, no se usó ovoalbúmina como puente entre la superficie y la micotoxina sino polietilenglicol (PEG) modificado, SH-PEG-COOH. El proceso de detección es idéntico al anterior sensor, pues se fluye una mezcla de anticuerpos y

la muestra problema sobre la superficie del chip (Figura 16). Por tanto, los resultados del análisis se obtienen de las señales asociadas al proceso de reconocimiento de los anticuerpos no unidos al analito. En este caso, se alcanzaron límites de detección iguales a 3.26, 7.07, 1.27 y 0.59 ng.mL⁻¹ para el DON, la ZEA, la OTA y la AFB1, respectivamente.⁹² Así, de acuerdo a los niveles máximo permitidos de los agentes reguladores, este sensor podría ser usado para la detección de DON, ZEA y AFB1, mientras que se necesitaría una mejora para la detección de OTA, pues el límite de detección es ligeramente mayor que lo recomendado por la Unión Europea (ver Tabla 1).

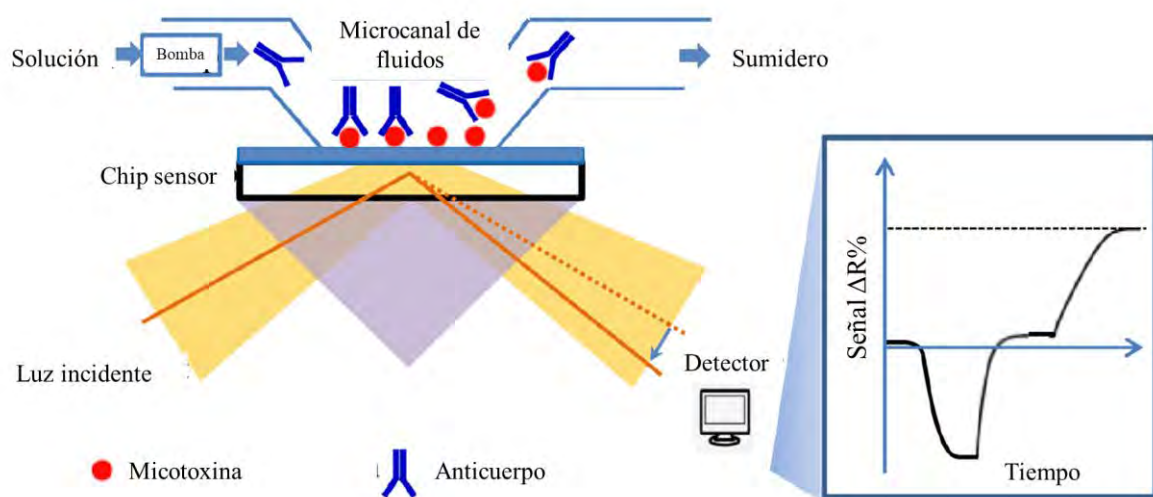


Figura 16. Representación esquemática del sensor SPR planteado por el grupo de Wei. Adaptado de Wei y colaboradores.⁹²

A pesar de que la mayoría de los sensores SPR reportados durante los últimos 25 años emplean anticuerpos como agentes de reconocimiento, también existen algunos estudios que han empleado aptámeros para tal fin. En el 2017, Sun y colaboradores reportaron un sensor SPR basado en aptámeros capaz de detectar AFB1 en muestras de vino tinto.⁴¹ La superficie del chip fue modificada con el aptámero, el cual tenía un extremo de biotina, por lo que primero se unió covalentemente estreptavidina a la superficie del chip por medio de un acoplamiento amida.⁴¹ El principio de detección se basa en la captura de la AFB1 por el aptámero, el cual

cambia el índice de refracción y desplaza el ángulo SPR (Figura 17). El límite de detección de este sensor es 0.13 ng.mL^{-1} ,⁴¹ el cual muestra una mejora a comparación de los sensores SPR basados en anticuerpos y se encuentra por debajo del nivel máximo permitido por las organizaciones reguladoras. Adicionalmente, este sensor puede ser almacenado hasta 80 días a 4°C sin ninguna alteración de su funcionalidad y también es reusable.⁴¹

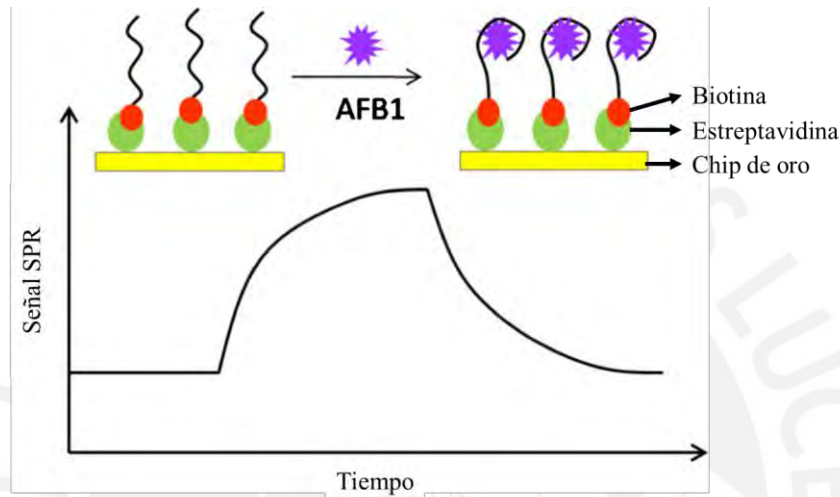


Figura 17. Diagrama representativo del proceso de detección de AFB1 con el sensor aptamérico LSPR del grupo de Sun. Adaptado de Sun y colaboradores.⁴¹

A continuación, en la Tabla 3, se muestra un resumen de los biosensores SPR más relevantes por su límite de detección reportados en la literatura.

Tabla 3. Resumen de biosensores basados en la técnica SPR.

Analitos	Agente de reconocimiento	Matriz	Sistema de extracción	Límite de detección (ng.mL⁻¹)	Ref.
AFB1	Aptámero	Vino tinto	No tiene	0.125 ng.mL ⁻¹	41
AFB1	Anticuerpo	Arroz, maní y almendras	70% (v/v) MeOH:H ₂ O	2.51 ng.mL ⁻¹	93
AFB1	Anticuerpo	No menciona	No menciona	10 ng.mL ⁻¹	94
FB1	Anticuerpo	No menciona	No menciona	50 ng.mL ⁻¹	95
DON	Anticuerpo	Trigo	10% (v/v) MeOH:H ₂ O	2.5 ng.mL ⁻¹	96
DON, ZEA, T2, OTA, FB1, AFB1	Anticuerpo	Cebada	80% (v/v) MeOH:H ₂ O	DON: 26 ng.mL ⁻¹ ZEA: 6 ng.mL ⁻¹ T-2: 0.6 ng.mL ⁻¹ OTA: 3 ng.mL ⁻¹ FB1: 2 ng.mL ⁻¹ AFB1: 0.6 ng.mL ⁻¹	63
AFB1, OTA, ZEA, DON	Anticuerpo	Maíz	20% (v/v) MeOH:H ₂ O	AFB1: 0.59 ng.mL ⁻¹ OTA: 1.27 ng.mL ⁻¹ ZEA: 7.07 ng.mL ⁻¹ DON: 3.26 ng.mL ⁻¹	92

Todos los sensores SPR mencionados, indistintamente del uso de anticuerpos o aptámeros, presentan límites de detección similares. Sin embargo, hasta ahora solo se ha informado del uso de anticuerpos como parte de un sistema de detección simultánea de múltiples micotoxinas, lo que sugiere la posibilidad de diseñar sistemas de detección que reduzcan los costos totales del análisis. A pesar de estas ventajas y desventajas que ofrecen estos sensores, las principales limitaciones para una aplicación en el campo de estos sensores es que se requiere de un instrumento especializado para poder medir la señal y se necesita que esta medición se haga bajo un control preciso de temperatura.⁵⁴

3.2. Biosensores basados en la resonancia de plasmones superficiales localizados

Un segundo tipo de biosensores ópticos a nanoescala está basado en la resonancia de plasmones superficiales localizados (LSPR por sus siglas en inglés). En este tipo de biosensores, los sustratos metálicos están conformados por nanopartículas. Experimentalmente, las frecuencias LSPR pueden ser identificadas mediante un espectro de absorbancia en el rango visible – infrarrojo cercano, en el cual el nanomaterial presenta un alto coeficiente de extinción a estas frecuencias.⁵⁴

Es importante mencionar que el valor de la frecuencia LSPR de un nanomaterial no depende solo del material metálico del que está hecho, sino también del tamaño, la forma, la distancia entre las nanopartículas y el índice de refracción del medio cercano a la superficie del metal. Las AuNEs y las AgNEs son las preferidas para estas técnicas debido a que sus valores de frecuencia LSPR se encuentran en el rango Vis-NIR, lo que permite el diseño de sensores ópticos funcionalizados con aptámeros (AuNEs@Apt), que permiten monitorear los desplazamientos de la frecuencia LSPR de manera puntual o en tiempo real (ver Figura 18a).⁸⁸ Además, se pueden utilizar en sensores que involucren la agregación de las nanopartículas (ver Figura 18b) como formas de detección del analito (AuNEs@Apt@X).

El desplazamiento de la frecuencia LSPR en nanopartículas anisotrópicas es una estrategia conocida debido a que la presencia de *hot-spots* en las puntas contribuye a mejorar la sensibilidad del sistema.⁵⁴ De este modo, en la literatura se reportan estudios que permiten la detección de micotoxinas por LSPR usando AuNRs y AuNTs.

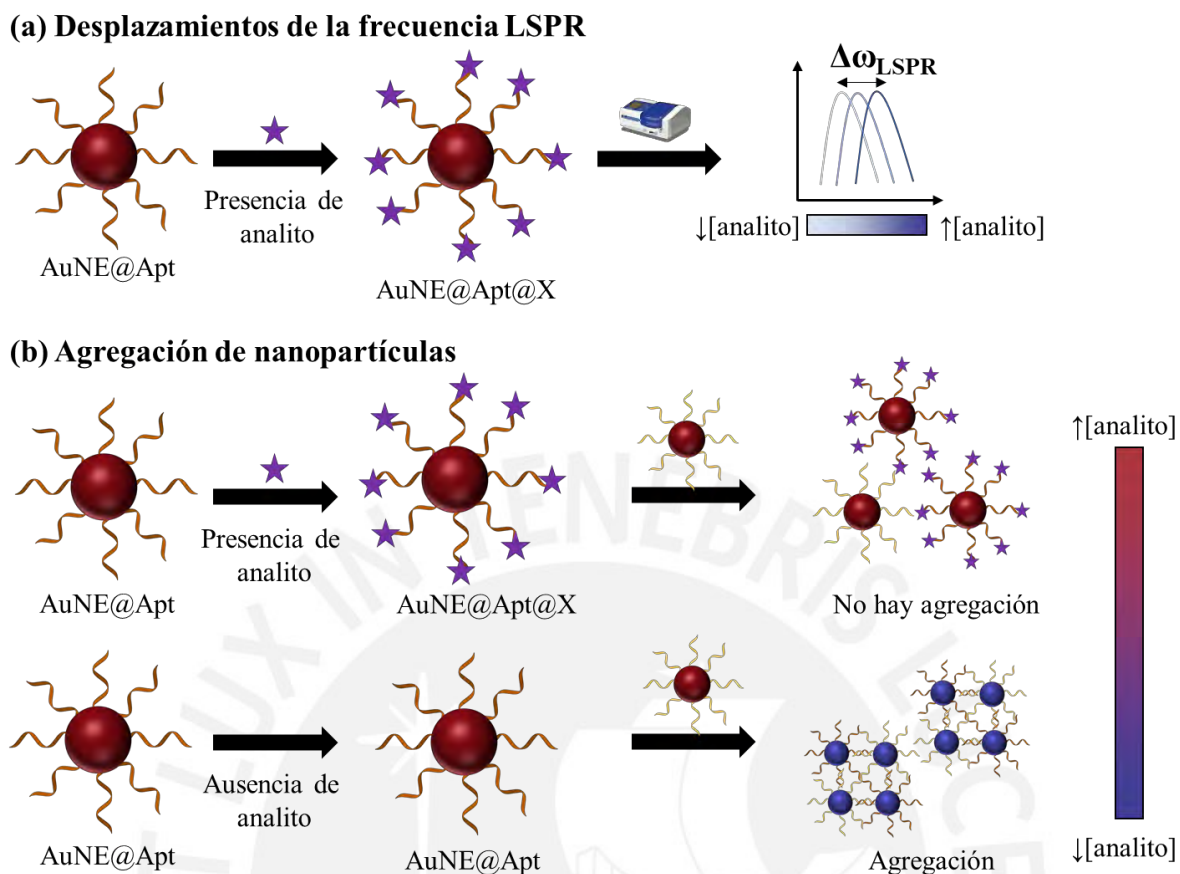


Figura 18. Esquema representativo de los dos principales mecanismos de detección de analitos por la técnica LSPR. (a) Estrategia basada en la agregación de nanopartículas. (b) Estrategia basada en los desplazamientos de la frecuencia LSPR.

Así, por ejemplo, el trabajo de Park⁴⁰ y Lee⁹⁷ consistió en el desarrollo de sensores que detectan OTA mediante el uso de AuNRs en dos tipos diferentes de sustrato, una lámina de vidrio y una fibra óptica, respectivamente. La funcionalización en ambos casos se realizó por medio de la exposición del nanomaterial a una solución del aptámero tiolado. El proceso de detección se basa en la formación del complejo aptámero-OTA (Apt@OTA), el cual genera un cambio en el índice de refracción de la superficie de las AuNRs y provoca el desplazamiento de la banda LSPR (Figura 19). El sensor de Park se obtuvo un límite de detección de $0.04 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que Lee reportó un límite de detección de $4.84 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Lo novedoso de estos sensores es que, al usar un sustrato, análogo a los sensores SPR, se tiene la posibilidad de emplearlos en el campo si se acoplan a espectrofotómetros portátiles que monitoreen los desplazamientos de la

banda plasmónica del nanomaterial. Otro aspecto importante a mencionar es que en el trabajo de Park se pudo regenerar el aptámero libre por medio de la desnaturalización del complejo Apt@OTA a 70°C, dando como resultado la reutilización del sensor hasta 7 veces.⁴⁰ Además, como el fenómeno LSPR es menos sensible a la temperatura, entonces esto representa una ventaja respecto al control de la temperatura preciso que se necesita en los sensores SPR.^{40,97}

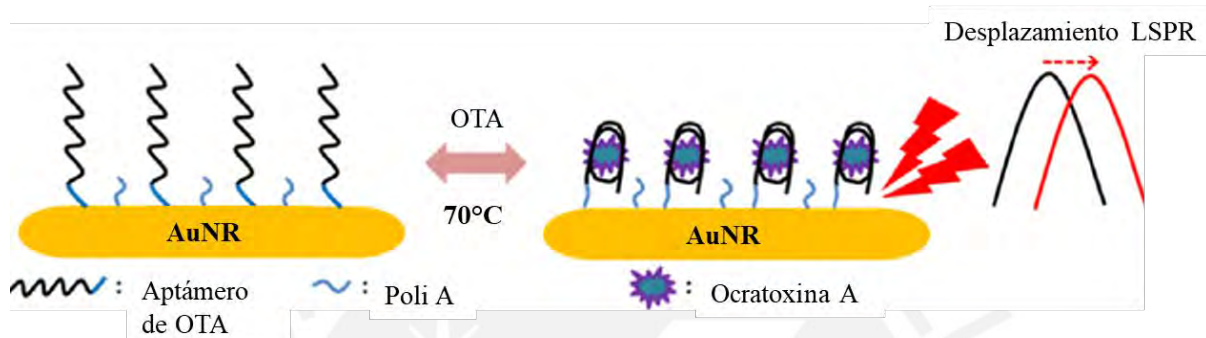


Figura 19. Esquema representativo del proceso de detección de los sensores LSPR de Park y Lee. El proceso de regeneración del aptámero solo aplica para el sensor de Park. Adaptado de Park y colaboradores.⁴⁰

Por otro lado, destaca el sensor reportado por Veliz y colaboradores para detectar AFB1 mediante el uso de AuNTs.⁹⁸ A diferencia de los sensores anteriores, este sensor no se encuentra soportado sobre un sustrato sino que el análisis se realiza en solución. La funcionalización se realizó por medio de la mezcla del aptámero tiolado con los AuNTs en un buffer de fosfato a pH = 8 y se utilizó el ácido mercaptopropiónico (MPA) como agente de relleno, dando como resultado las AuNTs@Apt@MPA.⁹⁸ El principio de detección de este sensor es el cambio en la frecuencia LSPR luego de que la AFB1 se una al aptámero y forme el complejo Apt–AFB1 (Figura 20). Este cambio fue monitoreado mediante la variación de la banda LSPR en una ventana espectral entre 500 y 1000 m de longitud de onda. Además de ser uno de los pocos sensores que emplearon AuNTs para la detección de micotoxinas, en este estudio también se destaca la mejora en el límite de detección del sensor, que pasó de 0.234 ng.mL⁻¹ a 0.022 ng.mL⁻¹ al utilizar el análisis multivariante por regresión de mínimos cuadrados (PLS, por sus siglas en inglés).

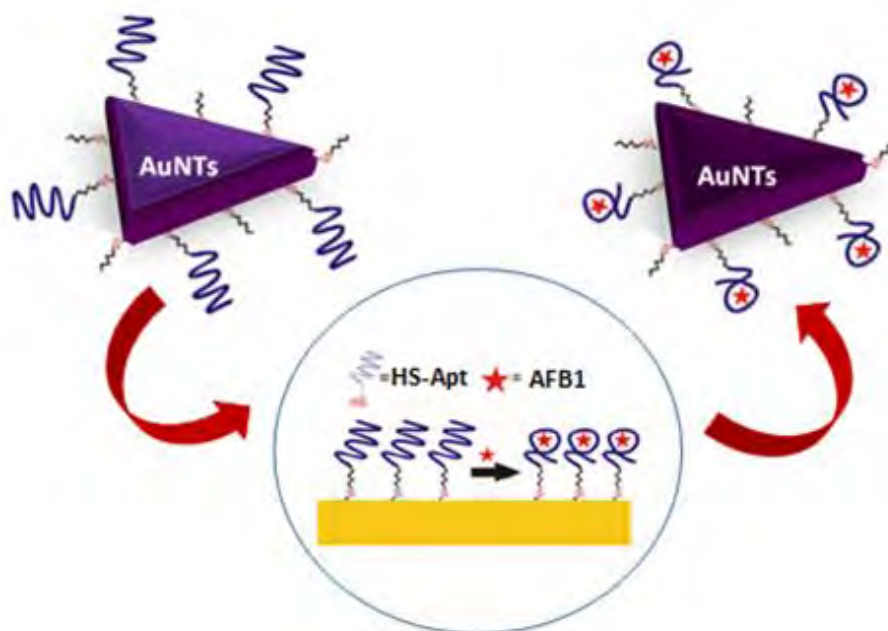


Figura 20. Esquema del proceso de detección de la AFB1 con el nanosensor LSPR AuNTs@Apt@MPA. Tomado de Véliz y colaboradores.⁹⁸

Otra estrategia conocida es la agregación de AuNEs en solución, la cual provoca un cambio mayor de la banda LSPR a diferencia del anterior grupo de sensores, dando como resultado un mayor contraste en el cambio de color de la solución coloidal de las nanopartículas que permite detectar la presencia del analito a simple vista.

Un ejemplo de este tipo de sensores colorimétricos es el desarrollado por Luan y colaboradores en el 2015 para detectar OTA.⁹⁹ En este sistema de detección se mezclan los aptámeros de OTA con la muestra problema, y los aptámeros en exceso interactúan electrostáticamente con moléculas de poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDDA, por sus siglas en inglés). El exceso de PDDA provoca la agregación de las AuNEs debido a la interacción electrostática de la superficie negativa de las AuNEs con la superficie positiva del PDDA (Figura 21). Así, a mayor concentración de OTA, ocurre una mayor agregación de AuNEs debido a que se tiene mayor PDDA libre que no interactúa con el aptámero de OTA. La agregación genera un desplazamiento de la banda LSPR desde 520 nm hasta 650 nm, lo cual da un cambio de color

de la solución coloidal de rojo a azul. Por medio del monitoreo de la caída de la absorbancia a 520 nm, se obtuvo un límite de detección de 0.009 ng.mL⁻¹.

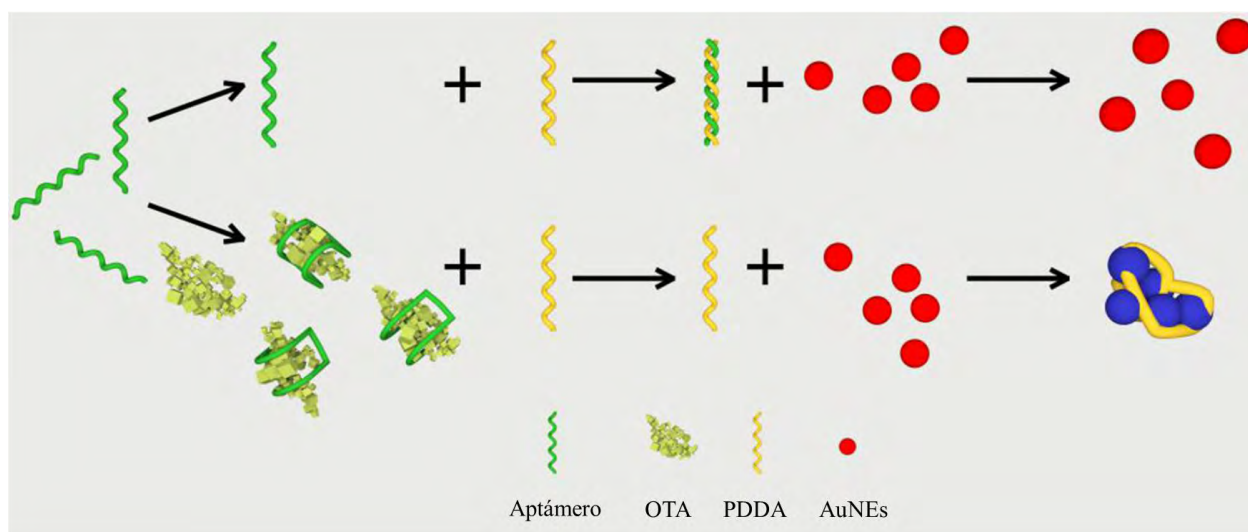


Figura 21. Esquema representativo del proceso de detección LSPR pro agregación propuesto por Luan y colaboradores. Tomado de Luan y colaboradores.⁹⁹

Entre este grupo de sensores, también destaca el sensor diseñado por Lerdsri y colaboradores para detectar AFB1.¹⁰⁰ La estrategia de detección es similar al sensor anterior; sin embargo, en lugar de usar PDDA, se usa N,N'-bis(etiltrimetilamonio)-3,4,9,10-perileno diimida, el cual se emplea como sonda catiónica de perileno (CPP) que se une al aptámero y el exceso de este, en presencia de AFB1, promueve la agregación de las AuNEs (Figura 22). Al igual que en el sensor propuesto por Luan, se observó un desplazamiento de la banda LSPR de 520 nm a 650 nm, pero la agregación fue monitoreada por la proporción de los valores de absorbancia a 650 nm y 520 nm con un espectrofotómetro o con un colorímetro casero. En este caso se obtuvo un límite de detección de 0.36 ng.mL⁻¹ y 0.18 ng.mL⁻¹, respectivamente.¹⁰⁰

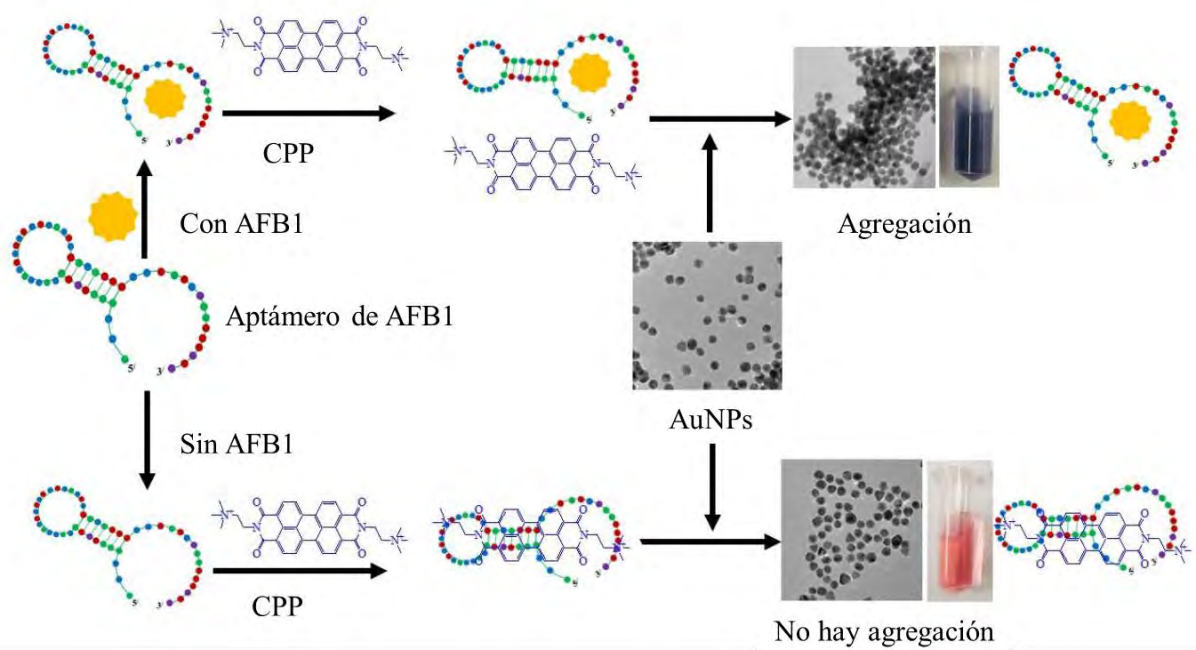


Figura 22. Esquema representativo de la estrategia de detección del sensor LSPR por agregación de Lerdsri y colaboradores. Tomado de Lerdsri y colaboradores.¹⁰⁰

A continuación, en la Tabla 4, se muestra un resumen de alguno de los biosensores LSPR más resaltantes reportados en la literatura. De acuerdo con la descripción de los sensores LSPR presentados, se puede ver cómo los aptámeros son los agentes de reconocimiento más populares, a diferencia de los sensores SPR reportados. En cuanto a los límites de detección, se puede observar que los LSPR presentan valores más pequeños que los obtenidos con los sensores SPR, y tienen la ventaja de no necesitar de un instrumento sofisticado, por lo que su aplicabilidad aumenta. Aunque aún se requieren seguir mejorando los límites de detección, en especial para poder satisfacer los requerimientos de la Unión Europea, este tipo de sensores puede representar una primera herramienta de diagnóstico rápido del cultivo. Finalmente, en contraste con los sensores SPR, los sensores LSPR reportados hasta ahora muestran una baja tendencia hacia la detección de más de 2 micotoxinas en simultáneo.

Tabla 4. Resumen de biosensores basados en la técnica LSPR.

Analitos	Nanomaterial empleado	Matriz	Sistema de extracción	Límite de detección	Ref.
OTA	AuNRs	Polvo de maíz	30% (v/v) MeOH:H ₂ O	0.040 ng.mL ⁻¹	40
OTA	AuNRs	Jugo de uvas	10% (v/v) MeOH:H ₂ O	4.84 pg.mL ⁻¹	97
OTA	AuNEs	Lícor chino	MeOH	0.009 ng.mL ⁻¹	99
OTA	AuNEs	No especifica	No especifica	0.336 ng.mL ⁻¹	101
OTA	AuNEs	Maíz	H ₂ O	0.0316 ng.mL ⁻¹	102
OTA	AuNRs	Cerveza	No especifica	4.04 ng.mL ⁻¹	103
OTA	AuNRs	Jugo de uvas	No tiene	3.63 ng.mL ⁻¹	104
OTA	AuNEs	No especifica	No especifica	8.08 ng.mL ⁻¹	105
AFB1	AuNTs	Kiwicha	70% (v/v) MeOH:H ₂ O	0.022 ng.mL ⁻¹	98
AFB1	AuNEs	Arroz y maní	80% (v/v) MeOH:H ₂ O + NaCl	0.36 ng.mL ⁻¹	100
AFB1	AuNEs	Leche	No tiene	3.12 ng.mL ⁻¹	106
AFB1	AgNEs	Maní, maíz y alimento para pollos	60% (v/v) MeOH:H ₂ O + NaCl	0.09 ng.mL ⁻¹	107
AFB1	AuNEs	No especifica	No especifica	0.025 ng.mL ⁻¹	108
AFB1	AuNEs	Arroz	80% (v/v) MeOH:H ₂ O	0.624 pg.mL ⁻¹	109
AFB2	AuNEs	Cerveza	No tiene	0.025 ng.mL ⁻¹	110
AFM1	AuNEs	Leche	No tiene	30 ng.mL ⁻¹	45
AFM1	AuNEs	Leche	MeOH	0.002 ng.mL ⁻¹	111
AFM1	AuNEs	Leche	No tiene	3.28 ng.mL ⁻¹	112
AFM1	AuNEs	Leche	MeOH	0.05 ng.mL ⁻¹	113

3.3. Biosensores basados en la espectroscopía Raman amplificada en superficie

Cuando un fotón incide sobre una muestra, este puede ser dispersado elásticamente o inelásticamente en función de si no hay un cambio de energía o sí, respectivamente. La espectroscopía Raman estudia los niveles vibracionales de energía molecular (ν_i , $i = 0, 1, 2, 3, 4$) por medio de la variación de la energía entre el fotón dispersado y el fotón incidente.¹¹⁴ La dispersión Raman ocurre cuando una fuente monocromática ($h\nu_L$), como un láser, incide sobre una muestra, excita a los electrones a un estado virtual de energía, y luego estos fotones son dispersados inelásticamente ($\nu_L - \nu_n$) y recolectados por un espectrómetro Raman (Figura 23). Aunque la espectroscopía Raman tenga una alta especificidad, su sensibilidad es baja debido a que pocos fotones incidentes son dispersados inelásticamente, por lo que la detección de bajas concentraciones es limitada.¹¹⁵

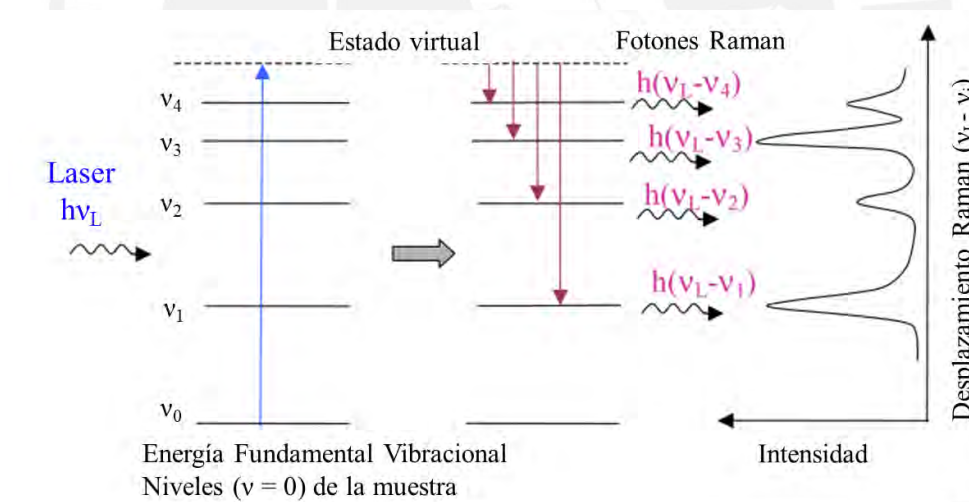


Figura 23. Esquema representativo de la dispersión Raman convencional. Adaptado de Notingher.¹¹⁴

La espectroscopía Raman amplificada en superficie (SERS) es una técnica que aprovecha el efecto amplificador de las señales Raman de un analito que se adsorbe o se sitúa cerca de la superficie de un nanomaterial, especialmente en las regiones con alta concentración del campo electromagnético conocidas como *hot-spots*. La amplificación ocurre en moléculas que se encuentran cercanas a la superficie metálica y se da por medio de dos mecanismos de

amplificación: el electromagnético y el químico. El mecanismo electromagnético está relacionado a los plasmones de superficie localizados y amplifica tanto el campo eléctrico del haz de luz incidente como los fotones Raman dispersados.¹¹⁶ Por otro lado, el mecanismo químico refiere a procesos de transferencias de carga entre la molécula a estudiar y el metal que generan un dipolo en la nanopartícula; este genera que aumente la polarizabilidad de la molécula y se amplifique aún más la señal Raman.¹¹⁷

La espectroscopía Raman emplea comúnmente una fuente de la excitación monocromática, lo que implica que la frecuencia LSPR de la nanopartícula, en las que se amplifica la intensidad del campo eléctrico, debe ser modulada según el sistema Raman disponible. Para ello, se requiere identificar el tamaño, forma y tipo de metal empleado a fin de que la frecuencia plasmónica coincida o se encuentre muy próxima a la frecuencia de la fuente de excitación monocromática y a las señales Raman del analito, y que las señales espectrales puedan verse amplificadas en varios órdenes de magnitud.¹¹⁸

En este campo de aplicación, se busca que las moléculas de interés, que pueden ser el analito o un marcador Raman, se encuentren, preferentemente, en los *hot-spots*. Se ha reportado que las puntas de geometrías anisotrópicas y las zonas intersticiales entre dos o más nanoestructuras muy próximas presentan los *hot-spots* más intensos.¹¹⁷ En la Figura 24, se muestra una representación gráfica de la diferencia entre la espectroscopía Raman convencional y la técnica SERS.

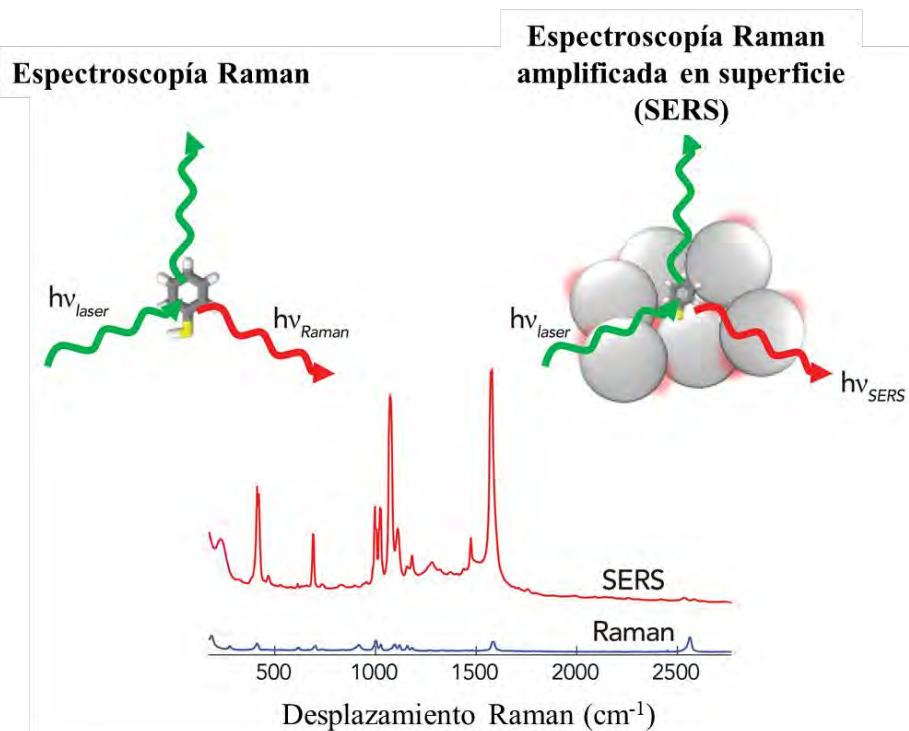


Figura 24. Representación gráfica de la diferencia entre la espectroscopía Raman y SERS. Adaptado de Schultz.¹¹⁹

Al igual que en la técnica LSPR, se aprovecha la amplificación que producen las puntas de geometrías anisotrópicas en el proceso de detección. Así, por ejemplo, destaca el sensor diseñado por Hernández y colaboradores para la detección de OTA con AuNTs libres de marcadores Raman.¹²⁰ Estos son funcionalizados con el aptámero de OTA en buffer de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) a pH = 8.5 y se utiliza MPA como agente de relleno, dando como resultado las AuNTs@Apt@MPA.¹²⁰ El principio de detección de este sensor consiste en la captura de la OTA por el aptámero, el cual induce un cambio conformacional en el oligonucleótido y genera distintos cambios en su respectivo espectro SERS (Figura 25) adquirido con una fuente de 785 nm. Debido a los cambios en la intensidad de las señales, este grupo empleó un análisis PLS en lugar de monitorear solo una banda, así este sensor alcanzó un límite de detección de $10.10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.¹²⁰

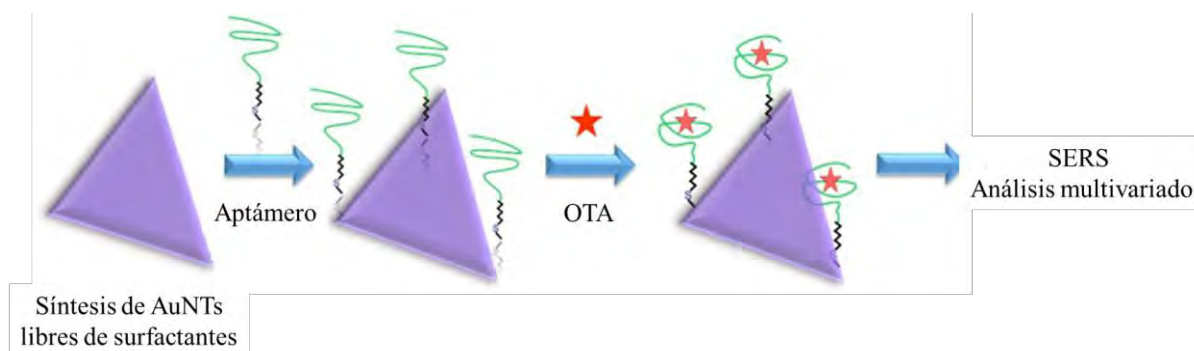


Figura 25. Esquema representativo de la estrategia de detección del sensor SERS de Hernández y colaboradores. Adaptado de Hernández y colaboradores.¹²⁰

La otra estrategia de detección consiste en la amplificación de las señales atrapando al analito o a marcadores Raman en *hot-spots*. Un ejemplo de este tipo de sensores, que emplean anticuerpos como agentes de reconocimiento, es el desarrollado por Li y colaboradores en el 2018 para detectar AFB1, OTA y ZEA en muestras de maíz, arroz y trigo.¹²¹ Este sensor consiste en un arreglo de 2 x 2 de 4 manchas circulares de oro de 2.0 mm de diámetro y 100 nm de profundidad (Figura 26); la superficie de estas manchas es modificada con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) conjugada a una de las 3 micotoxinas de interés, por medio de un acoplamiento amida. Por otro lado, se prepararon las nanosondas SERS por medio de la funcionalización de AuNes con el marcador Raman, el cual fue 5,5-ditiobis(succinimidil-2-nitrobenzoato) (DSNB, por sus siglas en inglés). Posteriormente, se unieron los anticuerpos de cada micotoxina a la superficie por medio del DSNB y se saturó la superficie con BSA, dando como resultado 3 nanosondas SERS que fueron mezcladas en la relación de volumen 2:2:1 para la anti-AFB1, la anti-ZEA y la anti-OTA.¹²¹ El principio de detección de este sensor consiste en la mezcla de las nanosondas con la muestra problema, los anticuerpos en la superficie de las nanosondas se adsorben a las micotoxinas y, por tanto, se tiene una menor cantidad de nanosondas adsorbidas sobre el chip cuando hay una mayor concentración de determinada micotoxina (Figura 26). Finalmente, la concentración del analito es cuantificada de manera indirecta mediante el monitoreo de la señal a 1334 cm^{-1} del DSNB,

de modo que la reducción en esta señal nos indica la presencia de la micotoxina de interés. De este modo, este sensor alcanzó límites de detección de 0.061–0.066 ng.g⁻¹ para la AFB1, 0.26–0.29 ng.g⁻¹ para la OTA y 0.53–0.57 ng.g⁻¹ para la ZEA.¹²¹ Lo importante de este sensor es que se aprovecha la separación espacial en zonas para poder detectar diferentes micotoxinas con el fin de tener un chip de detección *multiplex* similar a los de la técnica SPR.

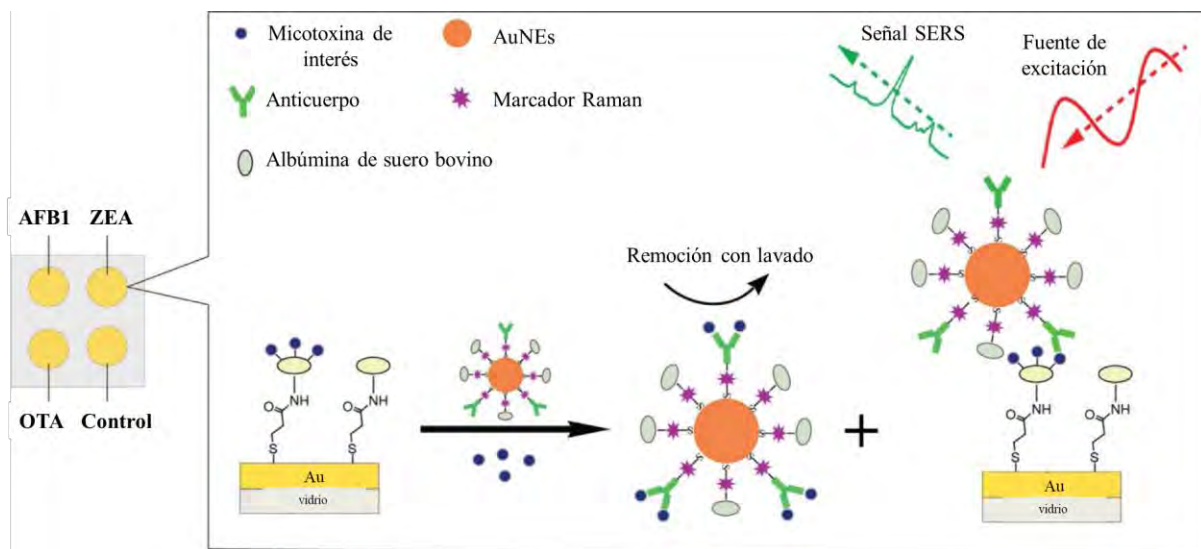


Figura 26. Esquema representativo del chip SERS y el proceso de detección del sensor diseñado por Li y colaboradores. Adaptado de Li y colaboradores.¹²¹

Un ejemplo importante de estos sensores SERS es el sensor desarrollado por Song y colaboradores en el 2022, que emplea aptámeros como agente de reconocimiento y puede detectar simultáneamente OTA y AFB1 en muestras de semillas¹²² En general, este consta de dos plataformas: una de ellas está conformada por un microarreglo de microesferas de cristal fotónico de silica (SPCM, por sus siglas en inglés) que tienen AuNEs funcionalizadas con aptámero de OTA o AFB1; y la otra consiste de nanomarcadores Raman conformados por AuNEs enlazadas con la hebra complementaria del aptámero de interés y con azul de Nilo A o 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) para la detección de OTA y AFB1, respectivamente. En el proceso de detección, la micotoxina se enlaza al aptámero de la superficie del SPCM y los sitios que queden libres se unirán a los nanomarcadores Raman (Figura 27). De este modo, se

detecta la concentración de OTA y AFB1 por la disminución de la señal a 592 cm^{-1} del azul de Nilo A y de la señal a 1331 cm^{-1} del 5,5'-ditiobis(ácido-2-nitrobenzoico), respectivamente.¹²² Este sistema alcanzó un límite de detección de $0.034\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para OTA y de $0.36\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para AFB1, siendo este uno de los nanosensores ópticos más sensibles hasta la fecha e igualando en sensibilidad a la técnica LC-MS/MS. Por otro lado, lo novedoso de esta técnica es el acoplamiento del sustrato SPCM que, por medio de simulaciones computacionales, mostró mejorar el factor de amplificación en 20 veces; adicionalmente, este estudio propone que se puede ampliar el número de micotoxinas evaluadas al aumentar el número de marcadores Raman que estarán asociados a determinada micotoxina.¹²²

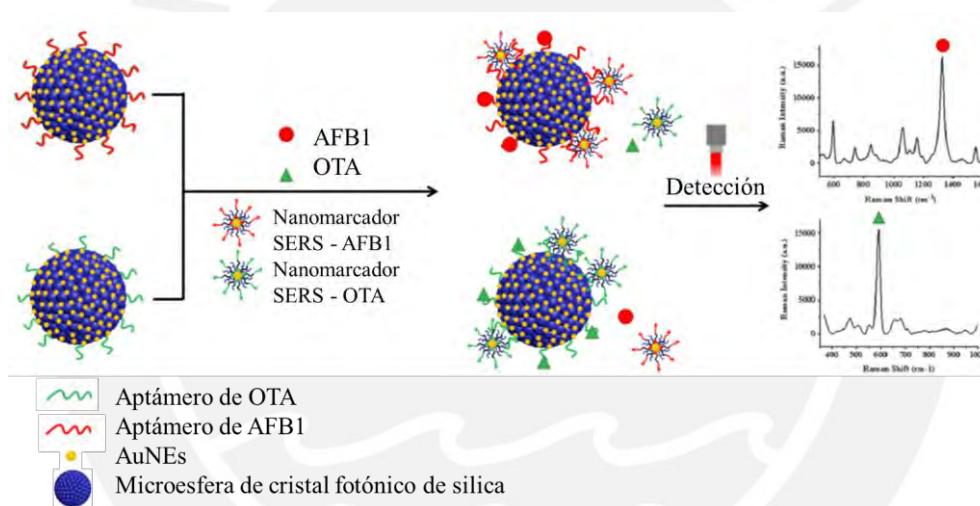


Figura 27. Esquema representativo de la estrategia de detección del sensor SERS de Song y colaboradores. Adaptado de Song y colaboradores.¹²²

Un último ejemplo destacable de estos sensores es el desarrollado por Zhao y colaboradores en el 2022, los cuales emplearon aptámeros como agente de reconocimiento para detectar DON en muestras de harina de maíz, aceite de maní y leche pura.¹²³ Este sensor también está conformado de dos plataformas: una de ellas es una sonda Raman que consiste de AgNEs recubiertas con β -ciclodextrina, que tienen unido el aptámero de DON por medio de la química *host-guest*, y 4-ácidomercaptobenzoico (4-MBA, por sus siglas en inglés) que cumple el rol de marcador Raman; y la otra consiste de MNP de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ recubierta con la hebra

complementaria (c-DNA, por sus siglas en inglés) al aptámero. En el proceso de detección, el DON se enlaza al aptámero de la superficie del nanomarcador Raman, por lo que queda una menor cantidad de aptámero libre que pueda ser capturado por la hebra complementaria unida a la MNP (Figura 28).¹²³ Así, a mayor concentración de DON, habrá una menor señal Raman proveniente del 4-MBA. Lo novedoso de este biosensor es que se emplea una MNP para efectuar una separación magnética entre el complejo nanomarcador-MNP y nanomarcador-DON, lo cual aumenta la sensibilidad del sistema. El límite de detección alcanzado por este sistema fue 0.032 pg.mL^{-1} , siendo este de los sensores más sensibles junto al anterior descrito y que muestran la sinergia que puede haber al combinar las propiedades particulares de las MNP y las nanopartículas de metales nobles.

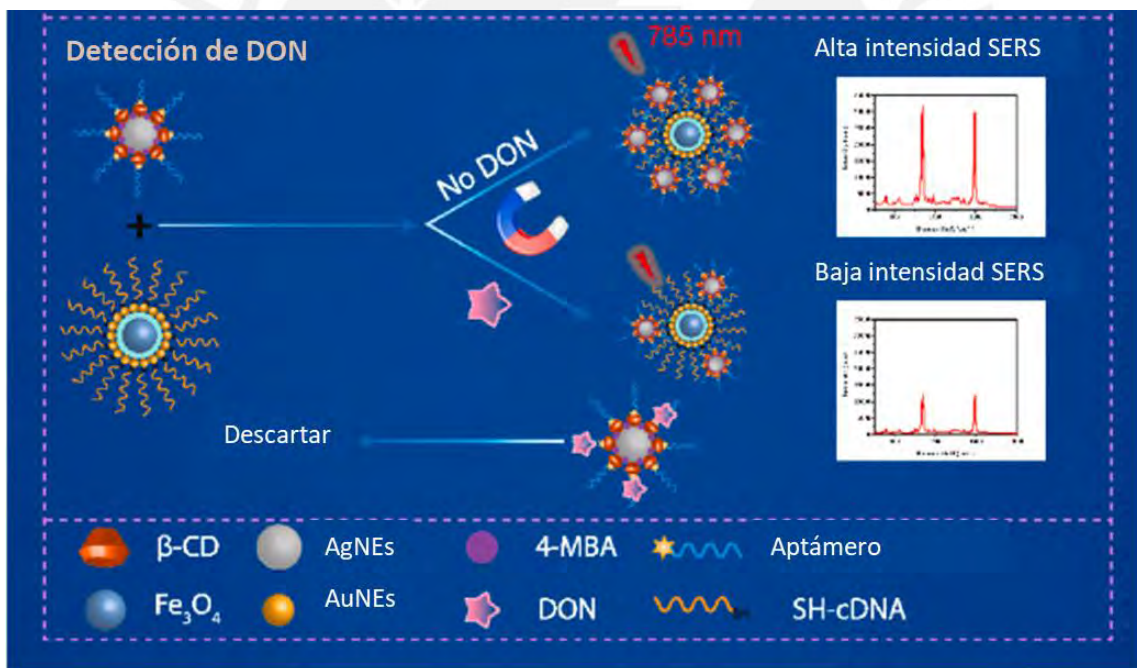


Figura 28. Esquema representativo del sensor SERS propuesto por Zhao y colaboradores. Adaptado de Zhao y colaboradores.¹²³

A continuación, en la Tabla 5, se muestra un resumen de algunos de los biosensores SERS más recientes reportados en la literatura.

Tabla 5. Tabla resumen de biosensores basados en la técnica SERS.

Analitos	Nanomaterial empleado	Agente de Reconocimiento	Matriz	Sistema de extracción	Límite de detección	Ref.
AFB1	AgNE y Fe ₃ O ₄ @Au	Aptámero	Lágrimas de Job	70% (v/v) MeOH:H ₂ O	0.006 ng.mL ⁻¹	49
AFB1	Fe ₃ O ₄ @Au	Aptámero	Trigo	60% (v/v) MeOH:H ₂ O + NaCl	1.6 pg.mL ⁻¹	50
AFB1	Fe ₃ O ₄ @Au y AuNE@4-MBA@AgNE	Aptámero	Aceite de cacahuete	80% (v/v) MeOH:H ₂ O	0.40 pg.mL ⁻¹	81
AFB1	AgNE	Aptámero	Nuez	80% (v/v) MeOH:H ₂ O	0.009 ng.mL ⁻¹	124
OTA	AuNT	Aptámero	Café y trigo	70% (v/v) MeOH:H ₂ O	10 ng. mL ⁻¹	120
OTA	Nanoerizo de oro	Aptámero	Cerveza	15% NaCl + 2% NaHCO ₃	8.6 pg.mL ⁻¹	125
OTA	Nanoestrella de oro	Aptámero	Vino	Acetato de etilo	0.25 fg.mL ⁻¹	126
ZEA	AuNE	Anticuerpo	Piensos	No tiene	1 pg.mL ⁻¹	127
FB1	AuNR	Aptámero	Maíz	20% (v/v) MeOH:H ₂ O	3 pg.mL ⁻¹	128
DON	AgNE y Fe ₃ O ₄ @Au	Aptámero	Harina de maíz, aceite de maní y leche	80% (v/v) MeOH:H ₂ O	0.032 pg.mL ⁻¹	123

(Continuación de la Tabla 5)

Analitos	Nanomaterial empleado	Agente de Reconocimiento	Matriz	Sistema de extracción	Límite de detección	Ref.
OTA, FUMs, AFB1	Nanopilares de oro	Anticuerpo	No específica	No específica	OTA: 5.09 pg.mL ⁻¹ FUMs: 5.11 pg.mL ⁻¹ AFB1: 6.07 pg.mL ⁻¹	62
AFB1, OTA, ZEA	AgNE	Anticuerpo	Maíz negro, arroz y trigo	70% (v/v) MeOH:H ₂ O	AFB1: 0.061 ng.mL ⁻¹ OTA: 0.26 ng.mL ⁻¹ ZEA: 0.53 ng.mL ⁻¹	121
AFB1, OTA	AuNE	Aptámero	Járabes medicinales	70% (v/v) MeOH:H ₂ O	AFB1: 0.36 pg.mL ⁻¹ OTA: 0.034 pg.mL ⁻¹	122
AFB1, OTA, ZEN	AuNE	Anticuerpo	Arroz, trigo y maíz	CHCl ₃	AFB1: 0.82 pg.mL ⁻¹ OTA: 1.43 pg.mL ⁻¹ ZEN: 1.00 pg.mL ⁻¹	129

De este modo, en los trabajos más recientes de nanosensores SERS aplicados a la detección de micotoxinas, se ha señalado el uso tanto de aptámeros como de anticuerpos, con especial atención en el análisis de la OTA y la AFB1. Los sensores SERS son los más sensibles reportados en el campo de los sensores nanoplasmonicos y cuentan con límites de detección del orden de las ppt, similar a los reportados por los métodos LC-MS/MS.^{61,62,122,124-126,129,130} En ese sentido, estos superan el rendimiento de análisis de las dos anteriores técnicas y también permiten análisis *multiplex*, aumentando así la posibilidad de un diagnóstico completo del producto.^{62,121,122,129-133} Durante los últimos años, los nanosensores SERS han aprovechado la implementación de espectrómetros Raman portátiles de forma que su aplicabilidad en el campo sea mayor.^{120,134} Esto representa una oportunidad de poder contar con sensores altamente sensibles y no solo se tenga que recurrir por opciones colorimétricas a simple vista.

Capítulo 4. Conclusiones y perspectivas

La presencia de micotoxinas en alimentos es un problema patente que genera problemas en la salud de la población y la economía de la sociedad. Las aflatoxinas, ocratoxinas y fumonisinas se encuentran entre las micotoxinas más relevantes. Los métodos convencionales de detección de micotoxinas están basados en LC-MS/MS y la técnica ELISA. Mientras que la técnica LC-MS/MS es muy selectivo y sensible, presenta una baja accesibilidad. Por su parte, los kits de ELISA son más accesibles, pero no suelen ser robustos y pueden tener un costo global alto. Ante esta realidad surge el interés en el desarrollo de sistemas alternativos de detección empleando biosensores ópticos basados en nanomateriales de metales nobles.

Tres aspectos clave en el diseño de un biosensor óptico son (i) el agente de reconocimiento biológico, (ii) el transductor óptico y (iii) la estrategia de inmovilización de la molécula de reconocimiento en el transductor. Este trabajo se ha enfocado en el uso de nanomateriales de metales nobles como transductores ópticos, debido a sus excelentes propiedades plasmónicas. Dentro de este grupo de sensores, destacan las nanoestructuras de oro y plata como principales agentes de transducción óptica; los anticuerpos y los aptámeros como los agentes de reconocimiento biológico para la detección de micotoxinas; y el uso de diversas estrategias físicas o químicas de inmovilización. De este modo, se han desarrollado 3 principales tipos de biosensores nanoplasmonicos: SPR, LSPR y SERS.

Los sensores SPR presentan límites de detección en el orden de los ppb que satisfacen los estándares de los organismos reguladores, permiten ensayos *multiplex* y detección en tiempo real. No obstante, su principal desventaja radica en la instrumentación especializada para efectuar sus mediciones por lo que su accesibilidad se puede ver reducida. En cuanto a los sensores LSPR, destaca el uso de AuNEs, AuNTs y AuNRs como principales nanoestructuras,

además, ostentan límites de detección similares a los SPR, son fáciles de preparar, y se pueden acoplar a espectrómetros o colorímetros sencillos, siendo unos de los más accesibles.

Con respecto a los sensores SERS destacan las AuNEs y AuNTs como principales nanoestructuras, son los que mejores límites de detección y selectividad han presentado, igualando en ciertos casos a los valores reportados por los métodos LC-MS/MS. Además, hay una marcada tendencia frente al desarrollo de sensores *multiplex*. Sin embargo, algunos sistemas tienen problemas de estabilidad o no son fáciles de preparar, y requieren de un espectrómetro Raman que no siempre es accesible. En los últimos años, esta última limitación está siendo superada gracias a los avances tecnológicos que reducen costos y permiten el diseño de sistemas portátiles.

Finalmente, los estudios presentados en este trabajo demuestran que es posible tener métodos alternativos de detección de micotoxinas accesibles y superiores a los kits de ELISA y, en algunos casos, con una sensibilidad comparable a la técnica LC-MS/MS. Los futuros trabajos en este campo de aplicación están enfocados en sistemas que sean cada vez más sensibles con límites de detección del orden de las decenas de las ppt, más selectivos, más reproducibles, más robustos y, de ser posible, que permitan una detección *multiplex* con una instrumentación cada vez más accesible. Para lograrlo, se puede diseñar un sistema que integre tanto nanopartículas de metales nobles como nanopartículas magnéticas, lo que permitiría aumentar la sensibilidad del método. Adicionalmente, se podrían emplear agentes de relleno que reduzcan las interacciones no específicas con el fin de aumentar la selectividad y se podría depositar las nanopartículas sobre un sustrato para aumentar la robustez y la reproducibilidad. Además, se podrían modificar las diferentes zonas de detección de manera selectiva con diferentes agentes de reconocimiento para permitir una detección *multiplex* de micotoxinas que asegure la calidad de los alimentos.

Referencias Bibliográficas

- (1) Smith, M. C.; Madec, S.; Coton, E.; Hymery, N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in Vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins (Basel)*. **2016**, *8* (94). <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>.
- (2) Wu, Z.; Pu, H.; Sun, D. W. Fingerprinting and Tagging Detection of Mycotoxins in Agri-Food Products by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Principles and Recent Applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *110*, 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.013>.
- (3) National Cancer Institute. Aflatoxins <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/substances/aflatoxins> (accedido Oct 10, 2022).
- (4) YAU, A. Aflatoxins in Milk https://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_pub/multimedia_pub_fsf_67_01.html (accedido Nov 5, 2022).
- (5) FDA. Mycotoxins <https://www.fda.gov/food/natural-toxins-food/mycotoxins> (accedido Oct 5, 2022).
- (6) Wang, Y.; Wang, L.; Liu, F.; Wang, Q.; Selvaraj, J. N.; Xing, F.; Zhao, Y.; Liu, Y. Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins (Basel)*. **2016**, *8* (3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>.
- (7) Reddy, L.; Bhoola, K. Ochratoxins-Food Contaminants: Impact on Human Health. *Toxins (Basel)*. **2010**, *2* (4), 771–779. <https://doi.org/10.3390/toxins2040771>.
- (8) Welke, J. E.; Hoeltz, M.; Dottori, H. A.; Noll, I. B. Patulin Accumulation in Apples during Storage by *Penicillium Expansum* and *Penicillium Griseofulvum* Strains.

- Brazilian J. Microbiol.* **2011**, *42* (1), 172–180. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100021>.
- (9) Bryden, W. L. Mycotoxin Contamination of the Feed Supply Chain: Implications for Animal Productivity and Feed Security. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, *173* (1–2), 134–158. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>.
- (10) Gil-Serna, J.; Vázquez, C.; Patiño, B. Mycotoxins | Toxicology. En *Encyclopedia of Food Microbiology*; Batt, C. A., Tortorello, M. Lou, Eds.; Academic Press, 2014; pp 887–892.
- (11) Nabok, A.; Al-Rubaye, A. G.; Al-Jawdah, A. M.; Tsargorodska, A.; Marty, J. L.; Catanante, G.; Szekacs, A.; Takacs, E. Novel Optical Biosensing Technologies for Detection of Mycotoxins. *Opt. Laser Technol.* **2019**, *109* (April 2018), 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2018.07.076>.
- (12) Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. Zearalenona <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/zearalenona/> (accedido Oct 5, 2022).
- (13) Kushiro, M. Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9* (11), 2127–2145. <https://doi.org/10.3390/ijms9112127>.
- (14) Milani J.M. Ecological Conditions Affecting Mycotoxin Production in Cereals: A Review. *Vet. Med. (Praha)*. **2013**, *58* (8), 405–411. <https://doi.org/10.17221/6979-VETMED>.
- (15) Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 118/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs.

- Off. J. Eur. Union* **2006**, 5–24.
- (16) Food and Drug Administration U.S. Search for FDA Guidance Documents <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents> (accedido Oct 5, 2022).
- (17) Food and Agriculture Organization of the United Nations. *CXS 193 - 1995. Codex Alimentarius - International Food Standards*; 2019.
- (18) European Commission. RASFF Window <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search> (accedido Oct 5, 2022).
- (19) González Rumayor, V.; García Iglesias, E.; Ruiz Galán, O.; Gago Cabezas, L. Aplicaciones de Biosensores en Agroalimentación. En *Aplicación de biosensores en la industria agroalimentaria*; Fundación para el conocimiento madrimasd: Madrid, 2005; pp 43–55.
- (20) Abia, W. A.; Warth, B.; Sulyok, M.; Krska, R.; Tchana, A. N.; Njobeh, P. B.; Dutton, M. F.; Moundipa, P. F. Determination of Multi-Mycotoxin Occurrence in Cereals, Nuts and Their Products in Cameroon by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control* **2013**, *31* (2), 438–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.006>.
- (21) Ren, Y.; Zhang, Y.; Shao, S.; Cai, Z.; Feng, L.; Pan, H.; Wang, Z. Simultaneous Determination of Multi-Component Mycotoxin Contaminants in Foods and Feeds by Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1143* (1–2), 48–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.064>.
- (22) Hornbeck, P. V. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, *110*, 2.1.1-2.1.23. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>.

- (23) Turner, N. W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A. Analytical Methods for Determination of Mycotoxins: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *632* (2), 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>.
- (24) Freitas, A.; Barros, S.; Brites, C.; Barbosa, J.; Silva, A. S. Validation of a Biochip Chemiluminescent Immunoassay for Multi-Mycotoxins Screening in Maize (*Zea Mays* L.). *Food Anal. Methods* **2019**, *12* (12), 2675–2684. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01625-1>.
- (25) Radox Food Diagnostics. Mycotoxin Biochip Arrays. *Feed & Food Analysis*. pp 10.
- (26) Terry, L. A.; White, S. F.; Tigwell, L. J. The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (5), 1309–1316. <https://doi.org/10.1021/jf040319t>.
- (27) Hidding, J. A Therapeutic Battle: Antibodies vs. Aptamers. *Nanosci. master Progr.* **2017**, 1–20.
- (28) OpenStax. Polyclonal and Monoclonal Antibody Production <https://openstax.org/books/microbiology/pages/20-1-polyclonal-and-monoclonal-antibody-production> (accedido Nov 6, 2022).
- (29) Vázquez-Gutiérrez, J. L.; Langton, M. Current Potential and Limitations of Immunolabeling in Cereal Grain Research. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *41* (2), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.10.002>.
- (30) Brody, E. N.; Willis, M. C.; Smith, J. D.; Jayasena, S.; Zichi, D.; Gold, L. The Use of Aptamers in Large Arrays for Molecular Diagnostics. *Mol. Diagnosis* **1999**, *4* (4), 381–388. [https://doi.org/10.1016/S1084-8592\(99\)80014-9](https://doi.org/10.1016/S1084-8592(99)80014-9).
- (31) Conroy, P. J.; Hearty, S.; Leonard, P.; O’Kennedy, R. J. Antibody Production, Design

- and Use for Biosensor-Based Applications. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2009**, *20* (1), 10–26.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.010>.
- (32) Tadepalli, S.; Kuang, Z.; Jiang, Q.; Liu, K. K.; Fisher, M. A.; Morrissey, J. J.; Kharasch, E. D.; Slocik, J. M.; Naik, R. R.; Singamaneni, S. Peptide Functionalized Gold Nanorods for the Sensitive Detection of a Cardiac Biomarker Using Plasmonic Paper Devices. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16206. <https://doi.org/10.1038/srep16206>.
- (33) Dhar, P.; Samarasinghe, R. M.; Shigdar, S. Antibodies, Nanobodies, or Aptamers—Which Is Best for Deciphering the Proteomes of Non-Model Species? *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (7), 2485. <https://doi.org/10.3390/ijms21072485>.
- (34) Lakhin, A. V.; Tarantul, V. Z.; Gening, L. V. Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae* **2013**, *5* (19), 34–43. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-34-43>.
- (35) Sullivan, R.; Adams, M. C.; Naik, R. R.; Milam, V. T. Analyzing Secondary Structure Patterns in DNA Aptamers Identified via CompELS. *Molecules* **2019**, *24* (8), 1572. <https://doi.org/10.3390/molecules24081572>.
- (36) Šmuc, T.; Ahn, I. Y.; Ulrich, H. Nucleic Acid Aptamers as High Affinity Ligands in Biotechnology and Biosensorics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *81–82*, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.014>.
- (37) Eurogentec. Synthesis process <https://www.eurogentec.com/en/synthesis-process> (accedido Nov 9, 2022).
- (38) Atdbio. Nucleic acids book <https://atdbio.com/nucleic-acids-book/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis> (accedido Nov 9, 2022).
- (39) Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (5),

- 1948–1998. <https://doi.org/10.1021/cr030183i>.
- (40) Park, J. H.; Byun, J. Y.; Mun, H.; Shim, W. B.; Shin, Y. B.; Li, T.; Kim, M. G. A Regeneratable, Label-Free, Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Aptasensor for the Detection of Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *59*, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.059>.
- (41) Sun, L.; Wu, L.; Zhao, Q. Aptamer Based Surface Plasmon Resonance Sensor for Aflatoxin B1. *Microchim. Acta* **2017**, *184* (8), 2605–2610. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2265-5>.
- (42) Tang, Y.; Tang, D.; Zhang, J.; Tang, D. Novel Quartz Crystal Microbalance Immunodetection of Aflatoxin B1 Coupling Cargo-Encapsulated Liposome with Indicator-Triggered Displacement Assay. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1031*, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.027>.
- (43) Shrivastava, A.; Sharma, R. K. Biosensors for the Detection of Mycotoxins. *Toxin Rev.* **2022**, *41* (2), 618–638. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1894175>.
- (44) Tang, J.; Huang, Y.; Cheng, Y.; Huang, L.; Zhuang, J.; Tang, D. Two-Dimensional MoS₂ as a Nano-Binder for SsDNA: Ultrasensitive Aptamer Based Amperometric Detection of Ochratoxin A. *Microchim. Acta* **2018**, *185* (3), 162. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2706-9>.
- (45) Jalalian, S. H.; Lavaee, P.; Ramezani, M.; Danesh, N. M.; Alibolandi, M.; Abnous, K.; Taghdisi, S. M. An Optical Aptasensor for Aflatoxin M1 Detection Based on Target-Induced Protection of Gold Nanoparticles against Salt-Induced Aggregation and Silica Nanoparticles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *246*, 119062. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119062>.

- (46) Sergeev, G. B. Survey of the Problem and Certain Definitions. En *Nanochemistry*; Elsevier: Amsterdam, 2006; pp 1–6.
- (47) Baig, N.; Kammakam, I.; Falath, W. Nanomaterials: A Review of Synthesis Methods, Properties, Recent Progress, and Challenges. *Mater. Adv.* **2021**, *2* (6), 1821–1871. <https://doi.org/10.1039/d0ma00807a>.
- (48) Ravi, P.; Ganesh, M. Quantum Dots as Biosensors in the Determination of Biochemical Parameters in Xenobiotic Exposure and Toxins. *Anal. Sci.* **2021**, *37* (5), 661–671. <https://doi.org/10.2116/analsci.20SCR03>.
- (49) Han, C.; Zhai, W.; Wang, Y.; Cao, J.; Wang, M. A SERS Aptasensor for Rapid Detection of Aflatoxin B1 in Coix Seed Using Satellite Structured Fe₃O₄@Au Nanocomposites. *Food Control* **2022**, *142*, 109228. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109228>.
- (50) Yang, Y.; Wu, D.; Liu, J.; Su, Z.; Li, L.; Wu, Y.; Li, G. High-Efficiency Enzyme-Free Catalyzed Hairpin Assembly-Mediated Homogeneous SERS and Naked-Eyes Dual-Mode Assay for Ultrasensitive and Portable Detection of Mycotoxin. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *214*, 114526. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114526>.
- (51) Wang, C.; Qian, J.; Wang, K.; Yang, X.; Liu, Q.; Hao, N.; Wang, C.; Dong, X.; Huang, X. Colorimetric Aptasensing of Ochratoxin A Using Au@Fe₃O₄ Nanoparticles as Signal Indicator and Magnetic Separator. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 1183–1191. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.004>.
- (52) Zhu, W.; Li, L.; Zhou, Z.; Yang, X.; Hao, N.; Guo, Y.; Wang, K. A Colorimetric Biosensor for Simultaneous Ochratoxin A and Aflatoxins B1 Detection in Agricultural Products. *Food Chem.* **2020**, *319*, 126544. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126544>.

- (53) Guo, L.; Shao, Y.; Duan, H.; Ma, W.; Leng, Y.; Huang, X.; Xiong, Y. Magnetic Quantum Dot Nanobead-Based Fluorescent Immunochromatographic Assay for the Highly Sensitive Detection of Aflatoxin B1 in Dark Soy Sauce. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (7), 4727–4734. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00223>.
- (54) Mayer, K. M.; Hafner, J. H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (6), 3828–3857. <https://doi.org/10.1021/cr100313v>.
- (55) Paterson, S.; De La Rica, R. Solution-Based Nanosensors for in-Field Detection with the Naked Eye. *Analyst* **2015**, *140* (10), 3308–3317. <https://doi.org/10.1039/c4an02297a>.
- (56) Nguyen, D. T.; Kim, D. J.; Kim, K. S. Controlled Synthesis and Biomolecular Probe Application of Gold Nanoparticles. *Micron* **2011**, *42* (3), 207–227. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.008>.
- (57) Habibullah, G.; Viktorova, J.; Ruml, T. Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis. *Nanoscale Res. Lett.* **2021**, *16*, 47. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03480-8>.
- (58) Pareek, V.; Bhargava, A.; Gupta, R.; Jain, N.; Panwar, J. Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. *Adv. Sci. Eng. Med.* **2017**, *9* (7), 527–544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1166/asem.2017.2027>.
- (59) Mehla, S.; Kandjani, A.; Coyle, V.; Harrison, C. J.; Low, M. X.; Kaner, R. B.; Sabri, Y.; Bhargava, S. K. Gold Sunflower Microelectrode Arrays with Dendritic Nanostructures on the Lateral Surfaces for Antireflection and Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5* (2), 1873–1890. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c03501>.
- (60) Li, J.; Yan, H.; Tan, X.; Lu, Z.; Han, H. Cauliflower-Inspired 3D SERS Substrate for

- Multiple Mycotoxins Detection. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (6), 3885–3892. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04622>.
- (61) Gillibert, R.; Triba, M. N.; Lamy De La Chapelle, M. Surface Enhanced Raman Scattering Sensor for Highly Sensitive and Selective Detection of Ochratoxin A. *Analyst* **2018**, *143* (1), 339–345. <https://doi.org/10.1039/c7an01730h>.
- (62) Wang, X.; Park, S. G.; Ko, J.; Xiao, X.; Giannini, V.; Maier, S. A.; Kim, D. H.; Choo, J. Sensitive and Reproducible Immunoassay of Multiple Mycotoxins Using Surface-Enhanced Raman Scattering Mapping on 3D Plasmonic Nanopillar Arrays. *Small* **2018**, *14* (39), 1801623. <https://doi.org/10.1002/sml.201801623>.
- (63) Joshi, S.; Segarra-Fas, A.; Peters, J.; Zuilhof, H.; Van Beek, T. A.; Nielen, M. W. F. Multiplex Surface Plasmon Resonance Biosensing and Its Transferability towards Imaging Nanoplasmonics for Detection of Mycotoxins in Barley. *Analyst* **2016**, *141* (4), 1307–1318. <https://doi.org/10.1039/c5an02512e>.
- (64) Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; Del Pino, P.; De La Fuente, J. M. Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965–8970. <https://doi.org/10.1021/la204712u>.
- (65) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- (66) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* **2001**, *13* (18), 1389–1393. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200109\)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200109)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F).

- (67) Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241* (1), 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
- (68) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
- (69) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>.
- (70) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (17), 3391–3395. <https://doi.org/10.1021/j100214a025>.
- (71) Dong, X.; Ji, X.; Wu, H.; Zhao, L.; Li, J.; Yang, W. Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (16), 6573–6576. <https://doi.org/10.1021/jp900775b>.
- (72) Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (10), 1957–1962. <https://doi.org/10.1021/cm020732l>.
- (73) Liu, M.; Guyot-Sionnest, P. Mechanism of Silver(I)-Assisted Growth of Gold Nanorods and Bipyramids. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (47), 22192–22200. <https://doi.org/10.1021/jp054808n>.
- (74) Hernández García, Y.; Sifuentes, J. R.; Saldaña, A. S.; Galarreta, B. C. Estudio de Los Factores Determinantes Para El Desarrollo de Sensores SERS Efectivos y Económicos.

- Tecnia* **2018**, 28 (2). <https://doi.org/10.21754/tecnica.v28i2.560>.
- (75) Deng, H.; Li, X.; Peng, Q.; Wang, X.; Chen, J.; Li, Y. Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, 44 (18), 2782–2785. <https://doi.org/10.1002/anie.200462551>.
- (76) Liu, J.; Sun, Z.; Deng, Y.; Zou, Y.; Li, C.; Guo, X.; Xiong, L.; Gao, Y.; Li, F.; Zhao, D. Highly Water-Dispersible Biocompatible Magnetite Particles with Low Cytotoxicity Stabilized by Citrate Groups. *Angew. Chemie* **2009**, 121 (32), 5989–5993. <https://doi.org/10.1002/ange.200901566>.
- (77) Jamkhande, P. G.; Ghule, N. W.; Bamer, A. H.; Kalaskar, M. G. Metal Nanoparticles Synthesis: An Overview on Methods of Preparation, Advantages and Disadvantages, and Applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, 53, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>.
- (78) Xuan, S.; Wang, F.; Wang, Y. X. J.; Yu, J. C.; Leung, K. C. F. Facile Synthesis of Size-Controllable Monodispersed Ferrite Nanospheres. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20 (24), 5086–5094. <https://doi.org/10.1039/c0jm00159g>.
- (79) Lyon, J. L.; Fleming, D. A.; Stone, M. B.; Schiffer, P.; Williams, M. E. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. *Nano Lett.* **2004**, 4 (4), 719–723. <https://doi.org/10.1021/nl035253f>.
- (80) Zhai, Y.; Zhai, J.; Wang, Y.; Guo, S.; Ren, W.; Dong, S. Fabrication of Iron Oxide Core/Gold Shell Submicrometer Spheres with Nanoscale Surface Roughness for Efficient Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113 (17), 7009–7014. <https://doi.org/10.1021/jp810561q>.
- (81) He, H.; Sun, D. W.; Pu, H.; Huang, L. Bridging Fe₃O₄@Au Nanoflowers and Au@Ag

- Nanospheres with Aptamer for Ultrasensitive SERS Detection of Aflatoxin B1. *Food Chem.* **2020**, *324*, 126832. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126832>.
- (82) Yüce, M.; Kurt, H. How to Make Nanobiosensors: Surface Modification and Characterisation of Nanomaterials for Biosensing Applications. *RSC Adv.* **2017**, *7* (78), 49386–49403. <https://doi.org/10.1039/c7ra10479k>.
- (83) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam, 2013; pp. 712.
- (84) Puertas, S.; Batalla, P.; Moros, M.; Polo, E.; Pino, P.; Guisán, J. M.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Taking Advantage of Unspecific Interactions to Produce Highly Active Conjugates. *ACS Nano* **2011**, *5* (6), 4521–4528. <https://doi.org/10.1021/nn200019s>
- (85) Bai, W.; Zhu, C.; Liu, J.; Yan, M.; Yang, S.; Chen, A. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Aptasensor for Rapid Detection of Six Organophosphorous Pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* **2015**, *34* (10), 2244–2249. <https://doi.org/10.1002/etc.3088>.
- (86) Mochán, W. L. Plasmons. En *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*; Elsevier, 2016; pp 1–13. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.09217-1>.
- (87) Barnes, W. L.; Dereux, A.; Ebbesen, T. W. Surface Plasmon Subwavelength Optics. *Nature* **2003**, *424* (6950), 824–830. <https://doi.org/10.1038/nature01937>.
- (88) Thamm, S.; Csàki, A.; Fritzsche, W. LSPR Detection of Nucleic Acids on Nanoparticle Monolayers. In *Methods in Molecular Biology*; Springer, 2018; Vol. 1811, pp 163–171. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8582-1_11.
- (89) Willets, K. A.; Van Duyne, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267–297.

<https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>.

- (90) Tang, Y.; Zeng, X.; Liang, J. Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique. *J. Chem. Educ.* **2010**, *87* (7), 742–746. <https://doi.org/10.1021/ed100186y>
- (91) Nguyen, H. H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors (Switzerland)* **2015**, *15* (5), 10481–10510. <https://doi.org/10.3390/s150510481>.
- (92) Wei, T.; Ren, P.; Huang, L.; Ouyang, Z.; Wang, Z.; Kong, X.; Li, T.; Yin, Y.; Wu, Y.; He, Q. Simultaneous Detection of Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Zearalenone and Deoxynivalenol in Corn and Wheat Using Surface Plasmon Resonance. *Food Chem.* **2019**, *300*, 113349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125176>.
- (93) Moon, J.; Byun, J.; Kim, H.; Lim, E. K.; Jeong, J.; Jung, J.; Kang, T. On-Site Detection of Aflatoxin B1 in Grains by a Palm-Sized Surface Plasmon Resonance Sensor. *Sensors (Switzerland)* **2018**, *18* (2), 598. <https://doi.org/10.3390/s18020598>.
- (94) Ko, S.; Kim, C. J.; Kwon, D. Y. Detection of Aflatoxin B1 by SPR Biosensor Using Fusion Proteins as a Linker. *TechConnect Briefs* **2010**, *3* (Nanotechnology 2010: Bio Sensors, Instruments, Medical, Environment and Energy), 129–132.
- (95) Mullett, W.; Lai, E. P. C.; Yeung, J. M. Immunoassay of Fumonisin by a Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Anal. Biochem.* **1998**, *258* (2), 161–167. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2616>.
- (96) Schnerr, H.; Vogel, R. F.; Niessen, L. A Biosensor-Based Immunoassay for Rapid Screening of Deoxynivalenol Contamination in Wheat. *Food Agric. Immunol.* **2002**, *14* (4), 313–321. <https://doi.org/10.1080/0954010021000096346>.

- (97) Lee, B.; Park, J. H.; Byun, J. Y.; Kim, J. H.; Kim, M. G. An Optical Fiber-Based LSPR Aptasensor for Simple and Rapid in-Situ Detection of Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 504–509. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.062>.
- (98) Veliz Portal, L.; Licuona Puma, M.; Córdova Tuppia, S.; Hernández García, Y.; Galarreta Asian, B. Desarrollo de Un Nanosensor Aptamérico Basado En Nanotriángulos de Oro Para La Detección de Aflatoxina B1 Mediante LSPR. *Tecnia* **2020**, *30* (1), 6–11. <http://dx.doi.org/10.21754/tecnica.v30i1.793>
- (99) Luan, Y.; Chen, J.; Li, C.; Xie, G.; Fu, H.; Ma, Z.; Lu, A. Highly Sensitive Colorimetric Detection of Ochratoxin a by a Label-Free Aptamer and Gold Nanoparticles. *Toxins (Basel)*. **2015**, *7* (12), 5377–5385. <https://doi.org/10.3390/toxins7124883>.
- (100) Lerd Sri, J.; Chananchana, W.; Upan, J.; Sridara, T.; Jakmune, J. Label-Free Colorimetric Aptasensor for Rapid Detection of Aflatoxin B1 by Utilizing Cationic Perylene Probe and Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles. *Sensors Actuators, B Chem.* **2020**, *320*, 128356. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128356>.
- (101) Saldaña, A.; Hernandez, Y.; Galarreta, B. Desarrollo de Un Sistema de Detección de Ocratoxina A Basado En Nanosensores Aptaméricos En Microplacas. *Rebiol* **2021**, *41* (1), 23–34. <https://doi.org/10.17268/rebiol.2021.41.01.03>.
- (102) Liu, B.; Huang, R.; Yu, Y.; Su, R.; Qi, W.; He, Z. Gold Nanoparticle-Aptamer-Based LSPR Sensing of Ochratoxin A at a Widened Detection Range by Double Calibration Curve Method. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 94. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00094>.
- (103) Yu, X.; Lin, Y.; Wang, X.; Xu, L.; Wang, Z.; Fu, F. F. Exonuclease-Assisted Multicolor Aptasensor for Visual Detection of Ochratoxin A Based on G-Quadruplex-Hemin DNAzyme-Mediated Etching of Gold Nanorod. *Microchim. Acta* **2018**, *185* (5), 259.

<https://doi.org/10.1007/s00604-018-2811-9>.

- (104) Tian, F.; Zhou, J.; Fu, R.; Cui, Y.; Zhao, Q.; Jiao, B.; He, Y. Multicolor Colorimetric Detection of Ochratoxin A via Structure-Switching Aptamer and Enzyme-Induced Metallization of Gold Nanorods. *Food Chem.* **2020**, *320*, 126607. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126607>.
- (105) Yang, C.; Wang, Y.; Marty, J. L.; Yang, X. Aptamer-Based Colorimetric Biosensing of Ochratoxin A Using Unmodified Gold Nanoparticles Indicator. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (5), 2724–2727. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.032>.
- (106) Kasoju, A.; Shrikrishna, N. S.; Shahdeo, D.; Khan, A. A.; Alanazi, A. M.; Gandhi, S. Microfluidic Paper Device for Rapid Detection of Aflatoxin B1 Using an Aptamer Based Colorimetric Assay. *RSC Adv.* **2020**, *10* (20), 11843–11850. <https://doi.org/10.1039/d0ra00062k>.
- (107) Lersdri, J.; Thunkhamrak, C.; Jakmune, J. Development of a Colorimetric Aptasensor for Aflatoxin B1 Detection Based on Silver Nanoparticle Aggregation Induced by Positively Charged Perylene Diimide. *Food Control* **2021**, *130*, 108323. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108323>.
- (108) Luan, Y.; Chen, Z.; Xie, G.; Chen, J.; Lu, A.; Li, C.; Fu, H.; Ma, Z.; Wang, J. Rapid Visual Detection of Aflatoxin B1 by Label-Free Aptasensor Using Unmodified Gold Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15* (2), 1357–1361. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9225>.
- (109) Chen, J.; Wen, J.; Zhuang, L.; Zhou, S. An Enzyme-Free Catalytic DNA Circuit for Amplified Detection of Aflatoxin B1 Using Gold Nanoparticles as Colorimetric Indicators. *Nanoscale* **2016**, *8* (18), 9791–9797. <https://doi.org/10.1039/c6nr01381c>.

- (110) Luan, Y.; Chen, J.; Xie, G.; Li, C.; Ping, H.; Ma, Z.; Lu, A. Visual and Microplate Detection of Aflatoxin B2 Based on NaCl-Induced Aggregation of Aptamer-Modified Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2015**, *182* (5–6), 995–1001. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1420-5>.
- (111) Lerdsri, J.; Soongsong, J.; Laolue, P.; Jakmunee, J. Reliable Colorimetric Aptasensor Exploiting 72-Mers SsDNA and Gold Nanoprobes for Highly Sensitive Detection of Aflatoxin M1 in Milk. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *102*, 103992. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103992>.
- (112) Kasoju, A.; Shahdeo, D.; Khan, A. A.; Shrikrishna, N. S.; Mahari, S.; Alanazi, A. M.; Bhat, M. A.; Giri, J.; Gandhi, S. Fabrication of Microfluidic Device for Aflatoxin M1 Detection in Milk Samples with Specific Aptamers. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4627. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60926-2>.
- (113) Abnous, K.; Danesh, N. M.; Ramezani, M.; Alibolandi, M.; Nameghi, M. A.; Zavvar, T. S.; Taghdisi, S. M. A Novel Colorimetric Aptasensor for Ultrasensitive Detection of Aflatoxin M1 Based on the Combination of CRISPR-Cas12a, Rolling Circle Amplification and Catalytic Activity of Gold Nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1165*, 338549. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338549>.
- (114) Notingher, I. Raman Spectroscopy Cell-Based Biosensors. *Sensors* **2007**, *7* (8), 1343–1358. <https://doi.org/10.3390/s7081343>.
- (115) Schmitt, M.; Popp, J. Raman Spectroscopy at the Beginning of the Twenty-First Century. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37* (1–3), 20–28. <https://doi.org/10.1002/jrs.1486>.
- (116) Cong, S.; Liu, X.; Jiang, Y.; Zhang, W.; Zhao, Z. Surface Enhanced Raman Scattering Revealed by Interfacial Charge-Transfer Transitions. *Innov.* **2020**, *1* (3), 100051. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100051>.

- (117) Ding, S. Y.; Yi, J.; Li, J. F.; Ren, B.; Wu, D. Y.; Panneerselvam, R.; Tian, Z. Q. Nanostructure-Based Plasmon-Enhanced Raman Spectroscopy for Surface Analysis of Materials. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *1* (6), 16021. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.21>.
- (118) McFarland, A.; Young, M.; Dieringer, J.; Duynes, R. Van. Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Resonance Raman Excitation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2005**, *109* (22), 11279–11285. <https://doi.org/10.1021/jp807837t>.
- (119) Schultz, Z. D. SERS and TERS. *Spectrosc. Suppl.* **2020**, No. 9, 7–11.
- (120) Hernández, Y.; Lagos, L. K.; Galarreta, B. C. Development of a Label-Free-SERS Gold Nanoaptasensor for the Accessible Determination of Ochratoxin A. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2020**, *28*, 100331. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2020.100331>.
- (121) Li, Y.; Chen, Q.; Xu, X.; Jin, Y.; Wang, Y.; Zhang, L.; Yang, W.; He, L.; Feng, X.; Chen, Y. Microarray Surface Enhanced Raman Scattering Based Immunosensor for Multiplexing Detection of Mycotoxin in Foodstuff. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *266* (8), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.040>.
- (122) Song, L.; Li, J.; Li, H.; Chang, Y.; Dai, S.; Xu, R.; Dou, M.; Li, Q.; Lv, G.; Zheng, T. Highly Sensitive SERS Detection for Aflatoxin B1 and Ochratoxin A Based on Aptamer-Functionalized Photonic Crystal Microsphere Array. *Sensors Actuators B Chem.* **2022**, *364*, 131778. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131778>.
- (123) Zhao, X.; Shen, H.; Huo, B.; Wang, Y.; Gao, Z. A Novel Bionic Magnetic SERS Aptasensor for the Ultrasensitive Detection of Deoxynivalenol Based on “Dual Antennae” Nano-Silver. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *211*, 114383. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114383>.

- (124) Feng, Y.; He, L.; Wang, L.; Mo, R.; Zhou, C.; Hong, P.; Li, C. Detection of Aflatoxin B1 Based on a Porous Anodized Aluminum Membrane Combined with Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. *Nanomaterials* **2020**, *10* (5), 1000. <https://doi.org/10.3390/nano10051000>.
- (125) Lin, X.; Li, C.; He, C.; Zhou, Y.; Wang, Z.; Duan, N.; Wu, S. Upconversion Nanoparticles Assembled with Gold Nanourchins as Luminescence and Surface-Enhanced Raman Scattering Dual-Mode Aptasensors for Detection of Ochratoxin A. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4* (8), 8231–8240. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c01421>.
- (126) Huang, X. Bin; Wu, S. H.; Hu, H. C.; Sun, J. J. AuNanostar@4-MBA@Au Core-Shell Nanostructure Coupled with Exonuclease III-Assisted Cycling Amplification for Ultrasensitive SERS Detection of Ochratoxin A. *ACS Sensors* **2020**, *5* (8), 2636–2643. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01162>.
- (127) Liu, J.; Hu, Y.; Zhu, G.; Zhou, X.; Jia, L.; Zhang, T. Highly Sensitive Detection of Zearalenone in Feed Samples Using Competitive Surface-Enhanced Raman Scattering Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (33), 8325–8332. <https://doi.org/10.1021/jf503191e>.
- (128) He, D.; Wu, Z.; Cui, B.; Xu, E. Aptamer and Gold Nanorod–Based Fumonisin B1 Assay Using Both Fluorometry and SERS. *Microchim. Acta* **2020**, *187* (4), 215. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4192-0>.
- (129) Sun, J.; Li, W.; Zhu, X.; Jiao, S.; Chang, Y.; Wang, S.; Dai, S.; Xu, R.; Dou, M.; Li, Q.; Li, J. A Novel Multiplex Mycotoxin Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Immunoassay Using Functional Gold Nanotags on a Silica Photonic Crystal Microsphere Biochip. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (38), 11494–11501.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03469>.

- (130) Zheng, S.; Wang, C.; Li, J.; Wang, W.; Yu, Q.; Wang, C.; Wang, S. Graphene Oxide-Based Three-Dimensional Au Nanofilm with High-Density and Controllable Hotspots: A Powerful Film-Type SERS Tag for Immunochromatographic Analysis of Multiple Mycotoxins in Complex Samples. *Chem. Eng. J.* **2022**, *448*, 137760. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137760>.
- (131) Jiao, S.; Liu, J.; Sun, J.; Chang, Y.; Wang, S.; Dai, S.; Xu, R.; Dou, M.; Li, Q.; Wang, J.; Li, J. A Highly Sensitive and Reproducible Multiplex Mycotoxin SERS Array Based on AuNPs-Loaded Inverse Opal Silica Photonic Crystal Microsphere. *Sensors Actuators B Chem.* **2022**, *355*, 131245. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131245>.
- (132) Zhang, W.; Tang, S.; Jin, Y.; Yang, C.; He, L.; Wang, J.; Chen, Y. Multiplex SERS-Based Lateral Flow Immunosensor for the Detection of Major Mycotoxins in Maize Utilizing Dual Raman Labels and Triple Test Lines. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *393*, 122348. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122348>.
- (133) Zhao, Y.; Yang, Y.; Luo, Y.; Yang, X.; Li, M.; Song, Q. Double Detection of Mycotoxins Based on SERS Labels Embedded Ag@Au Core-Shell Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (39), 21780–21786. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b07804>.
- (134) Leong, S. X.; Leong, Y. X.; Tan, E. X.; Sim, H. Y. F.; Koh, C. S. L.; Lee, Y. H.; Chong, C.; Ng, L. S.; Chen, J. R. T.; Pang, D. W. C.; Nguyen, L. B. T.; Boong, S. K.; Han, X.; Kao, Y. C.; Chua, Y. H.; Phan-Quang, G. C.; Phang, I. Y.; Lee, H. K.; Abdad, M. Y.; Tan, N. S.; Ling, X. Y. Noninvasive and Point-of-Care Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)-Based Breathalyzer for Mass Screening of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) under 5 Min. *ACS Nano* **2022**, *16* (2), 2629–2639.

<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c09371>.

