

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ**

**Desarrollo de un método alternativo para la detección
de ocratoxina A mediante el uso de nanovarillas de
oro funcionalizadas con aptámeros**

Tesis para optar el Título de licenciado en Química, que presenta el bachiller:

Luis Jair Ayala Correa

ASESORA: Dra. Betty Cristina Galarreta Asian

Lima, junio del 2018

Agradecimientos

A la Dra. Betty Galarreta por su apoyo, enseñanzas, y gran paciencia en el desarrollo de esta tesis. A la Dra. Yulán Hernández por su valiosa enseñanza de la síntesis de las nanovarillas de oro y por su disposición para resolver todas mis dudas en este proceso.

A mis abuelos, padres y hermana que siempre me han apoyado en el transcurso de mi carrera a pesar de su cara de extrañeza cada vez que les contaba lo que hacía en el laboratorio.

A Angeline, Mary, Lesly, Sara, Ricardito y Aldo por el equilibrio que ustedes generan en el laboratorio.

A Erick por sus consejos y apoyo en la distancia; y por los buenos momentos que pasamos durante toda la carrera.

A Ítalo por sus consejos y por alentarme a seguir siempre adelante.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), a través de la subvención N° 132-PNICE-PIAP-2015; y a la Dirección de Gestión de la Investigación de la PUCP (DGI), a través de la subvención 2015-1-0017/180, por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta tesis.

RESUMEN

Una de las principales causas de contaminación de los alimentos se encuentra ligada a la presencia de hongos y a la producción de toxinas por parte de estos, mayormente denominadas micotoxinas. Una de las más peligrosas es la ocratoxina A (OTA), la cual debido a su alta toxicidad en el organismo ha generado que se establezcan niveles máximos permisibles de consumo por parte de instituciones internacionales.

En la actualidad, existen diversas metodologías que permiten la detección de esta toxina. Sin embargo, no es fácil acceder a ellas pues requieren de personal capacitado, equipos costosos y una alta demanda de tiempo. Este trabajo plantea el desarrollo de un biosensor a base de nanovarillas de oro y aptámeros como una alternativa en la detección de OTA, que sea más accesible que los métodos convencionales.

En primer lugar, se realizó la síntesis de las nanovarillas de oro empleando el método de semillas reportado por Ratto y colaboradores. De esta forma se obtuvo varillas de aproximadamente 54 nm x 17 nm; las cuales fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-Vis-NIR y microscopía electrónica de transmisión.

En segundo lugar, se implementó el proceso de funcionalización de las nanovarillas de oro para el desarrollo del biosensor. Se optimizó el número de centrifugaciones y la concentración del aptámero, y se utilizó como molécula de relleno al 2-mercaptoetanol. En estas etapas, se monitoreó el desplazamiento y el ancho de la banda plasmónica mediante UV-Vis-NIR y los cambios en los espectros Raman para determinar las mejores condiciones de funcionalización.

En tercer lugar, se evaluó el desempeño del sensor con diferentes concentraciones de la toxina (0, 0.25, 0.5, 2, 4 μM) por medio de espectroscopía UV-Vis-NIR y espectroscopía Raman. Con esta última, se identificó las señales vibracionales características tanto del aptámero como del 2-mercaptoetanol.

Finalmente, se empleó el método de calibración multivariante de mínimos cuadrados parciales para construir un modelo de cuantificación de OTA a partir de los espectros obtenidos. Se concluye que mediante espectroscopía Raman es posible discernir hasta 0.25 μM (100 ppb) de la toxina; mientras que por espectroscopía UV-Vis-NIR, solo es posible diferenciar a partir de 2 μM (800 ppb).

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA

TÍTULO : "Desarrollo de un método alternativo para la detección de ocratoxina A mediante el uso de nanovarillas de oro funcionalizadas con aptámeros"

ÁREA : Química Analítica

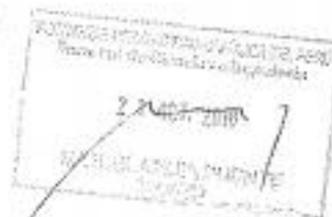
ASESORA : Dr. Betty Cristina Galarreta Asian

ALUMNO : Luis Jair Ayala Correa

CÓDIGO : 20087019.5

FECHA : 19 de octubre de 2016

NUMERO : # 244



DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

La ocratoxina A es una micotoxina, sintetizada principalmente por las especies *Aspergillus* y *Penicillium*, que prolifera en diversos cereales y alimentos de primera necesidad y cuyo consumo es frecuentemente asociado a enfermedades nefrotóxicas, inmunotóxicas y carcinogénicas. Estas nefastas consecuencias han despertado la alerta y diversas organizaciones alimentarias han empezado a monitorear y controlar los niveles máximos permitidos de OTA en alimentos.

Los métodos analíticos existentes, basados en gran medida en técnicas separativas, permiten detectar OTA en alimentos en el orden de mg/kg. Sin embargo, se requieren de laboratorios sofisticados, personal altamente especializado y equipos costosos, pocas veces accesibles a las zonas de cultivo agrícola. Alternativamente, los métodos basados en inmunoensayos, si bien son portátiles y de fácil implementación, se encuentran limitados por la fácil desnaturalización de los anticuerpos que adsorben las toxinas y el alto costo global por ensayo.

En los últimos años, se han reportado receptores moleculares de cadenas cortas de ADN/ARN, conocidos como aptámeros. Estos reúnen muchas de las bondades de los anticuerpos (afinidad, selectividad y posibilidad de enlazarse covalentemente a una superficie), son fáciles de sintetizar y modificar químicamente, se encuentran a un precio accesible y pueden ser reutilizados, convirtiéndose en atractivos candidatos para el desarrollo de nuevos sistemas de detección.

En este proyecto se busca la implementación de un método de funcionalización de nanovarillas de oro con aptámeros selectivos de OTA. Aprovechando las propiedades ópticas de estos nanomateriales en el rango visible e infrarrojo cercano, se plantea el desarrollo de un método alternativo de rápida detección de esta micotoxina, basado en cambios colorimétricos, y que puede ser corroborado mediante las modificaciones en los espectros Raman amplificados.

Máximo: 100 páginas

FIRMA DEL ASESOR:

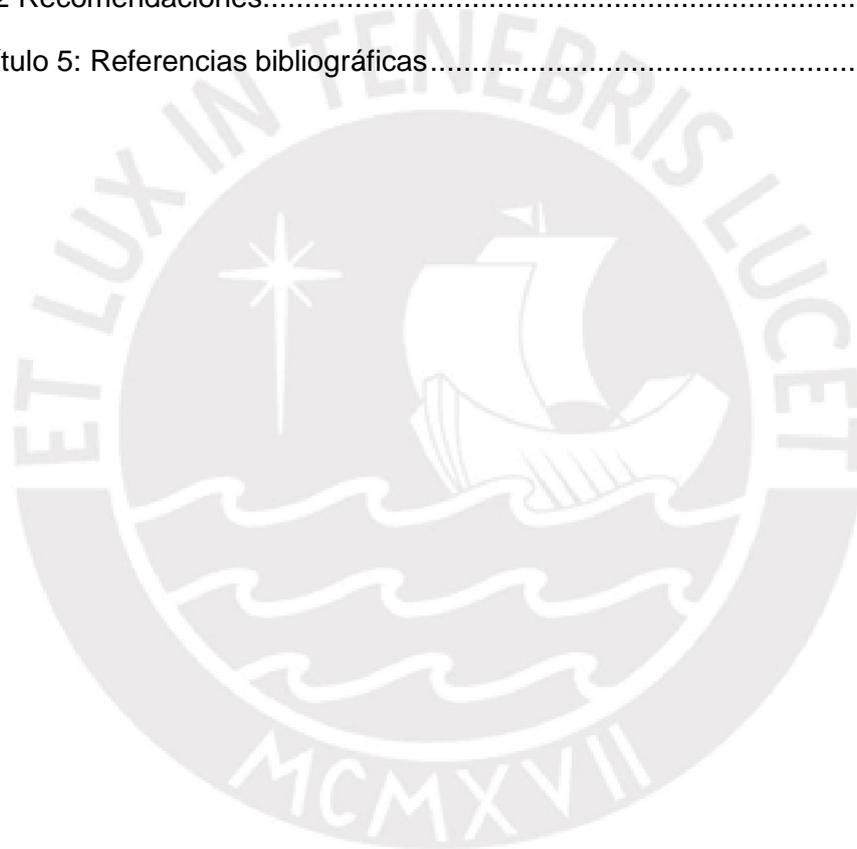
FIRMA DEL COORDINADOR:



Índice

Lista de figuras.....	iv
Lista de tablas.....	v
Lista de abreviaturas.....	vi
Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1 Micotoxinas y la ocratoxina A.....	1
1.2 Métodos convencionales para la detección de OTA.....	3
1.2.1 Cromatografía de capa delgada (TLC).....	3
1.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	4
1.2.3 Cromatografía de gases (GC).....	5
1.3 Biosensores aptaméricos como una alternativa en la detección de OTA.....	6
1.3.1 Aptámeros como elementos de reconocimiento.....	7
- Ventajas del uso de los aptámeros frente a los anticuerpos.....	11
1.4 Nanovarillas metálicas.....	13
1.4.1 Propiedades ópticas de las nanoestructuras de oro.....	13
1.4.2 Método de bioconjugación del aptámero con la nanopartícula.....	16
1.5 Calibración multivariante: regresión de mínimos cuadrados parciales.....	17
1.6 Objetivos.....	21
Capítulo 2: Materiales y métodos.....	22
2.1 Reactivos y equipos.....	22
2.2 Metodología.....	23
2.2.1 Síntesis y caracterización de las nanovarillas de oro.....	23
2.2.2 Desarrollo del sensor aptamérico para la detección de OTA.....	24
2.2.3 Análisis multivariante de los espectros UV-Vis-NIR y Raman.....	26
Capítulo 3: Resultados y discusión.....	27

3.1 Caracterización de las nanovarillas de oro	27
3.2 Desarrollo del sensor aptamérico para la detección de OTA	29
3.2.1 Optimización del sensor aptamérico	29
3.2.2 Detección de OTA mediante espectroscopía de Raman	31
3.2.3 Detección de OTA mediante espectroscopía UV-Vis-NIR	35
3.3 Calibración multivariante	36
Capítulo 4: Conclusiones y recomendaciones	43
4.1 Conclusiones.....	43
4.2 Recomendaciones.....	44
Capítulo 5: Referencias bibliográficas.....	45

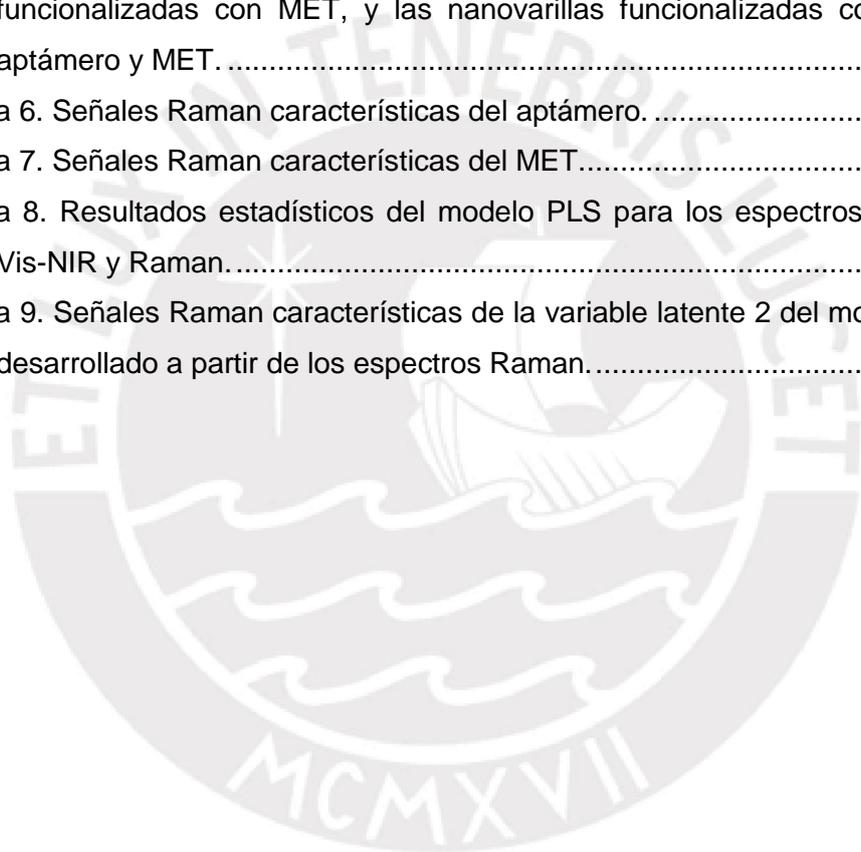


Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de cuatro de las ocratoxinas más reportadas en la literatura.	2
Figura 2. Esquema de un biosensor	7
Figura 3. Proceso SELEX	8
Figura 4. G-tétrada y G-cuádruplex	11
Figura 5. Ejemplos de los plasmones de resonancia para una variedad de morfologías de las nanoestructuras	14
Figura 6. Representación de las oscilaciones de los electrones libres de una nanovarilla y su espectro UV-Vis-NIR típico.....	14
Figura 7. Distribución del campo eléctrico alrededor de una nanovarilla.....	16
Figura 8. Procedimiento general para la fabricación del sensor aptamérico.....	24
Figura 9. Micrografías TEM de las nanovarillas de oro.	28
Figura 10. Espectro Vis-NIR de las nanovarillas funcionalizadas a diferentes concentraciones del aptámero.....	30
Figura 11. Comparación de los espectros Raman del CTAB, funcionalización sin centrifugación previa, funcionalización con centrifugación previa	31
Figura 12. Espectro Raman de la nanovarilla de oro funcionalizada con el aptámero	32
Figura 13. Espectros Raman de la interacción entre AuNR@Apt y OTA a diferentes tiempos.....	33
Figura 14. Espectro Raman del MET adsorbido en la superficie de las AuNRs.	34
Figura 15. Comparación de los espectros Raman de AuNR@Apt, AuNR@MET, y AuNR@Apt@MET	35
Figura 16. Espectros UV-Vis-NIR del sensor a diferentes concentraciones de OTA	36
Figura 17. Curvas de calibración desarrolladas utilizando los espectros UV-Vis-NIR y Raman	38
Figura 18. Variable latente 1 y 2 del modelo desarrollado y la suma de dichas variables latentes.....	39
Figura 19. Valores VIP de la media de los espectros Raman del control y del sensor antes de proceder con el preprocesamiento.	41

Lista de tablas

Tabla 1. Micotoxinas de mayor ocurrencia, principales hongos que las producen, alimentos en donde pueden ser encontradas, y efectos dañinos en el organismo.....	1
Tabla 2. Técnicas de separación y técnicas de análisis convencionales para el análisis de OTA.....	6
Tabla 3. Aptámeros desarrollados para OTA.....	10
Tabla 4. Esquema de análisis y descripción de los métodos de validación cruzada en el software Solo.....	18
Tabla 5. Dimensiones de las nanovarillas de oro, las nanovarillas de oro funcionalizadas con MET, y las nanovarillas funcionalizadas con el aptámero y MET.....	27
Tabla 6. Señales Raman características del aptámero.....	32
Tabla 7. Señales Raman características del MET.....	34
Tabla 8. Resultados estadísticos del modelo PLS para los espectros UV-Vis-NIR y Raman.....	37
Tabla 9. Señales Raman características de la variable latente 2 del modelo desarrollado a partir de los espectros Raman.....	40



Lista de abreviaturas

AuNR	Nanovarilla de oro
AuNR@Apt	Nanovarilla de oro funcionalizada con el aptámero
AuNR@Apt@MET	Nanovarilla de oro funcionalizada con el aptámero y el MET
AuNR@MET	Nanovarilla de oro funcionalizada con MET
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FWHM	Ancho de banda a media altura (<i>Full width at half maximum</i>)
HOMO	Orbital molecular ocupado más alto (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
HPTLC	Cromatografía de capa delgada de alta performance
K_d	Constante de disociación
LOD	Límite de detección (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (<i>limit of quantification</i>)
LSPR	Plasmón de resonancia de superficie localizada (<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>)
LUMO	Orbital molecular no ocupado más bajo (<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
MET	2-mercaptoetanol
MISPE	Extracción en fase sólida de impresión molecular (<i>Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction</i>)
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B

PCR	Reacción en cadena de polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales (<i>Partial least squares</i>)
R ²	Coefficiente de correlación
RMSECV	Error cuadrático medio de validación cruzada (<i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i>)
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SDS	Sodio dodecilsulfato
SELEX	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>)
SPME	Micro extracción en fase sólida (<i>Solid Phase Micro Extraction</i>)
SERS	Espectroscopía Raman de superficie amplificada (<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TLC	Cromatografía de capa delgada (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
VIP	Importancia de la variable en la proyección (<i>Variable Importance in Projection</i>)
WHO	Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)

Capítulo 1: Introducción

1.1 Micotoxinas y la ocratoxina A

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por una gran variedad de hongos las cuales poseen efectos perjudiciales tanto para los humanos como para los animales. Dichos compuestos pueden ser encontrados en diversos productos agrícolas y bajo diferentes condiciones en todo el mundo.¹ En la actualidad, se conocen alrededor de 400 diferentes micotoxinas.² En la tabla 1, se presentan las más importantes desde el punto de vista de la salud, los hongos responsables de producirlas, los alimentos en donde pueden ser encontradas, y los daños que ocasionan en el organismo.

Tabla 1. Micotoxinas de mayor ocurrencia, principales hongos que las producen, alimentos en donde pueden ser encontradas, y efectos dañinos en el organismo.³

Micotoxinas	Hongos responsables de su producción	Alimentos	Efectos dañinos
Ocratoxinas	<i>A. ochraceus, P. verrucosum</i>	Café, cereales, vino, cerveza	Agente teratogénico, afecta al riñón y al hígado
Aflatoxinas	<i>A. Flavus, A. parasiticus</i>	Arroz, maíz, maní, especias	Cáncer hepático, retraso en el crecimiento en los niños, lesiones al hígado
Fumonisinias	<i>F. proliferatum, F. verticillioides</i>	Maíz, higos	Cáncer esofágico
Zearalenona	<i>F. culmorum, F. graminearum</i>	Cebada, maíz, trigo, avena	Infertilidad, desórdenes reproductivos
Deoxinivalenol	<i>F. graminearum</i>	Cereales	Dolores de cabeza, diarrea, vómitos, gastroenteritis
Patulina	Especies de <i>Aspergillus, Penicillium, Byssochlamys, Paecilomyces.</i>	Manzanas	Desórdenes gastrointestinales y neurológicos

Dentro de este grupo destacan las ocratoxinas (ver figura 1), y entre ellas la ocratoxina A (OTA) es considerada una de las más tóxicas y que suele estar presente en alimentos altamente consumidos por los seres humanos.^{4,5}

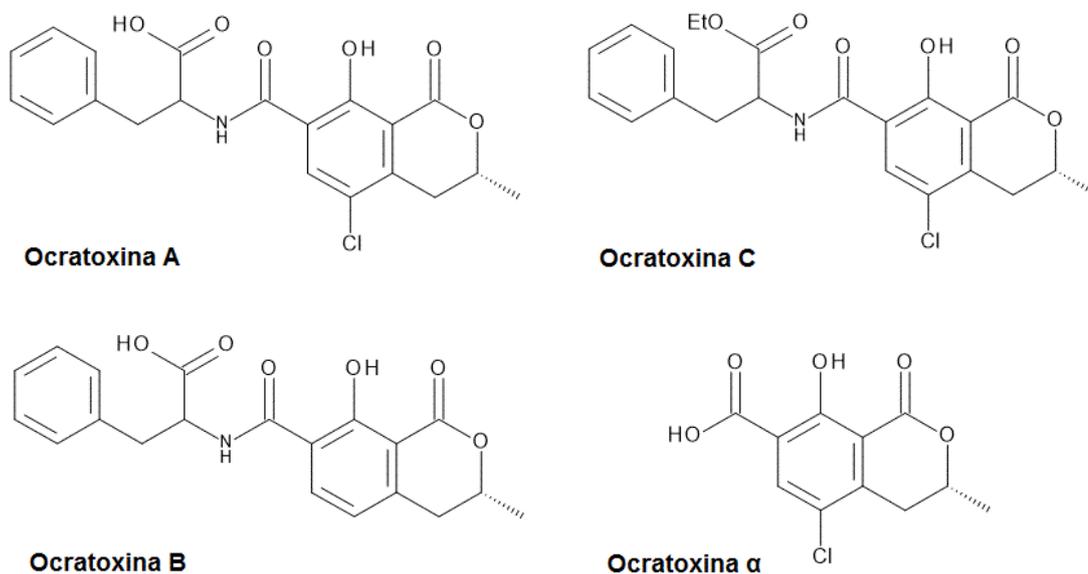


Figura 1. Estructura química de cuatro de las ocratoxinas más reportadas en la literatura.

La OTA es un metabolito producido por muchas especies de *Aspergillus* y *Penicillium verrucosum*. Además de ser considerada una toxina que afecta a los riñones e hígado, también actúa como un agente inmunosupresor, teratogénico y carcinogénico.¹

Los efectos primarios ocasionados por la ocratoxina A parecen estar relacionados con las enzimas en el metabolismo de la fenilalanina, incluyendo a la fenilalanina transferasa e hidroxilasa.¹ Los estudios indican que la presencia de la fenilalanina en la estructura de OTA ocasiona que actúe como un inhibidor directo de las enzimas antes mencionadas.

Adicionalmente, OTA inhibe competitivamente la actividad de la ATPasa, la succinato deshidrogenasa y el citocromo C oxidasa, que genera efectos similares a una lesión celular y se obtienen radicales hidroxilados por peroxidación lipídica. Este fenómeno se encuentra ligado con la inhibición del bombeo y captación de calcio a través del retículo endoplasmático del hepatocito. Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* en animales de laboratorio que la adición de OTA ocasiona un descenso en los niveles de calcio.⁶

Esta micotoxina se encuentra presente en una gran variedad de alimentos como la cebada, el trigo, el maíz, la avena, el arroz, el café, el cacao y las frutas; así como también en distintas bebidas como el vino y la cerveza.⁷ En 1996, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) indicó que el 25 % de los cultivos se encuentran contaminados con ocratoxina A, pero actualmente dicho valor es probablemente mayor.⁸

Por tales razones, varias organizaciones han establecido límites máximos permisibles de consumo de dicha micotoxina. La *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* ha determinado 100 ng/kg de peso; mientras que la *European Food Safety Authority*, 120 ng/kg de peso como consumo semanal tolerable. Por otro lado, la *European Commission* indica que OTA es principalmente ingerida a partir de granos (50 %) y vino (13 %). De esta manera, se han establecido límites del contenido para la contaminación de OTA en frutos secos (10 µg/kg), en café instantáneo y café tostado (5.0 µg/kg), en cereales (3.0 µg/kg), en vino (2.0 µg/kg), y en productos destinados exclusivamente para infantes (0.5 µg/kg).⁹

1.2 Métodos convencionales para la detección de OTA

La determinación de OTA enfrenta una serie de dificultades tanto en la detección de la micotoxina en alimentos y bebidas; como también, en otros tipos de muestras como el suero humano. Por ello, las muestras a analizar deben ser previamente tratadas para concentrar a la micotoxina y eliminar a las especies que puedan interferir en el momento de la detección,¹⁰ siendo las técnicas cromatográficas las más recurrentes.

1.2.1 Cromatografía de capa delgada (TLC)

Este método fue tradicionalmente el más usado para la detección de OTA, debido a que ofrece la posibilidad de detectar un gran número de muestras de manera económica. Una variante de este método conocida como cromatografía de capa delgada de alto rendimiento (HPTLC) aún sigue siendo empleada para análisis cualitativos y cuantitativos por el bajo costo de operación.^{10,11}

En esta técnica, se preparan estándares que son colocados cuidadosamente sobre una placa de sílica gel junto con la muestra. La TLC se desarrolla en un sistema de solventes adecuado, que generalmente tiene la siguiente composición: tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (6:3:1 v/v/v);^{7,8} luego, la placa es revelada bajo luz

ultravioleta y las intensidades de fluorescencia vistas son grabadas con una cámara CCD. Finalmente, las intensidades grabadas por la cámara son traducidas y cuantificadas con ayuda de un software especializado.¹¹ Este tipo de técnica ha llegado a detectar 10 µg/kg en muestras de café verde.¹²

A pesar de que el método es económico, no es tan fácil de aplicar y cada vez es menos usado debido a la necesidad inherente de la preparación de muestra la cual puede tomar muchos días. La preparación de la muestra implica la extracción de OTA con ayuda de solventes orgánicos que dependen de la matriz de la cual se extrae. Luego, la extracción sigue por un largo proceso de purificación con ayuda de cartuchos C₁₈, C₂, C₈, columnas cromatografías de sílica gel o incluso columnas de inmutofinidad. A este problema de demora en toma de resultados, se le añade que la técnica es poco automatizable, por lo que queda descartada como un método realmente competente.¹⁰

1.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Similar a la TLC, la detección y cuantificación se basa en la fluorescencia tomando como longitud de onda de excitación a 333 nm y la longitud de onda de emisión a 460 nm.¹³⁻¹⁷ También es necesario extraer la OTA con ayuda de varios solventes orgánicos, pero en este caso solo requiere de mini columnas de sílica gel como tratamiento previo, debido a que el sistema de separación de HPLC es muy superior al de TLC. La elección del programa de solventes para la separación se encuentra estrechamente relacionada con la matriz.

En este método, el tiempo de obtención del resultado es mínimo, de hecho es el menor de todos los métodos cromatográficos. Si a esto se le suma que el método puede ser fácilmente automatizable, entonces se tiene un método muy rápido para el análisis de varias muestras el cual puede llegar a detectar hasta 0.04 µg/kg.^{18,12}

Este método parece ser el ideal, sin embargo, se requiere de personal altamente calificado para operar correctamente el equipo de HPLC e interpretar adecuadamente los resultados. Además, el equipo y su mantenimiento son costosos, así como también es necesario contar con instalaciones adecuadas para su correcto funcionamiento. Debido a estas dos razones, este método no puede ser considerado como una solución definitiva, pero sí puede ser tenido en cuenta como una muy buena alternativa, de hecho la mejor hasta el momento.¹⁸

1.2.3 Cromatografía de gases (GC)

La detección generalmente se da por espectrometría de masas de cuadrupolo (GC-MS) debido a que se cuenta con librerías que ayudan a la rápida determinación del compuesto. Sin embargo, en algunos casos, también se utilizan detectores FID.⁹ Similar al método de HPLC, la muestra realmente no requiere un proceso de purificación debido al buen sistema de separación que ofrecen los equipos, pero sí un proceso de derivatización pues la OTA no es lo suficientemente volátil para realizar el análisis directamente. Además, el programa de temperaturas del horno varía también dependiendo de la matriz que se desea analizar.¹⁹ Sin embargo, esta derivatización toma tiempo y requiere de condiciones controladas para evitar la formación de productos secundarios, lo cual ocasiona que esta técnica no sea tan rápida como la HPLC.²⁰

De manera alternativa, es posible realizar una extracción en fase sólida (SPE), compatible con la cromatografía de gases y que implica un menor uso de solventes. Con la extracción en fase sólida, la OTA derivatizada y el resto de contaminantes de la matriz se pasan directamente por un tubo de vidrio que contiene una fibra adsorbente selectiva. La fibra depende de la matriz, aunque la de CarbowaxTM es la más empleada. La OTA derivatizada se queda atrapada en la fibra y esta es desorbida térmicamente en el GC por lo que es posible rescindir del uso de varios solventes, como en el caso de las columnas de purificación para eluir al analito y separarlo de especies contaminantes o interferentes.¹⁰ Similar al HPLC, el método es muy automatizable, pero los equipos a utilizar son muy costosos y requieren de un profesional altamente capacitado para llevar a cabo los análisis.

1.2.4 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Esta técnica es principalmente utilizada en la detección de varios tipos de micotoxinas debido a su selectividad. El paso crucial es la extracción de estas micotoxinas mediante el uso de columnas C₁₈ o solventes orgánicos;^{21,22} también existen otras alternativas de extracción como la dispersión en fase sólida de la matriz (MSPD, por sus siglas en inglés) la cual incrementa el rendimiento de la extracción.²³

A pesar de ser un método rápido, el límite de detección alcanzado no es superior comparado con las otras técnicas convencionales como se aprecia en la tabla 2.

Además, la implementación y el mantenimiento del equipo son costosos; así como también la necesidad de contar con personal calificado el cual sepa operar correctamente el equipo nos señala que se requiere otra técnica la cual no contenga dichas desventajas. En la tabla 2, se resume el uso de los distintos métodos de concentración de OTA, así como las diferentes técnicas de análisis para su determinación.

Tabla 2. Técnicas de separación y técnicas de análisis convencionales para el análisis de OTA. SPE (extracción en fase sólida), IAC (columnas de inmutofafinidad), MISPE (extracción en fase sólida de impresión molecular).

Muestra	Técnica de separación	Técnica de análisis	LOD	LOQ	Referencia
Vino	SPE	HPLC-FLD	0.01 µg/L	0.03 µg/L	21
Vino	IAC	HPLC-FLD	0.01 µg/L	0.04 µg/L	10
	SPE		0.09 µg/L	0.30 µg/L	
Vino	IAC	HPLC-FLD	0.0106 µg/L	-	11
	SPE		0.0109 µg/L	-	
	Extracción líquido - líquido		0.0136 µg/L	-	
Vino	MISPE	HPLC-FLD	0.075 ng/mL	0.225 ng/mL	12
Cereales	IAC	HPLC-FLD	0.03 ng/g	-	13
Café	IAC	HPLC-FLD	0.5 µg/kg	-	14
Suero humano	SPE	HPLC-FLD	0.1 ng/mL	-	22
Café	IAC	HPLC-FLD	0.2 µg/kg	-	17
Maíz, arroz, soya, maní	Extracción sólido - líquido	LC-MS/MS	5.0 µg/kg	-	18
Maíz, trigo	SPE	GCMS	0.1 µg/kg	-	16

1.3 Biosensores aptaméricos como una alternativa en la detección de OTA

Si bien las técnicas convencionales antes descritas nos proporcionan una vía confiable y efectiva para la determinación de esta micotoxina, en los últimos años los biosensores han aparecido como un reemplazo prometedor, no solo en el campo de la seguridad alimentaria, sino también en otras áreas como el de control de calidad o el control de procesos. Su uso en determinaciones analíticas se puede

llevar a cabo de forma rápida y con una alta especificidad y sensibilidad para la detección del analito en matrices complejas.²⁴

Un biosensor es un dispositivo analítico que incorpora de manera conjunta un elemento biológico y un transductor fisicoquímico (figura 2). Las moléculas desempeñan la labor de reconocimiento, las cuales pueden ser enzimas, anticuerpos o secuencias de ADN o ARN. Por otro lado, el elemento de transducción es el encargado de medir los cambios en la propiedad fisicoquímica (óptica, masa, electroquímica) que se desea analizar.

De esta manera, el biosensor ofrece una elevada selectividad y afinidad por parte del componente biológico como también la capacidad de transformar un cambio físico o químico a una señal que puede posteriormente ser procesada e interpretada.

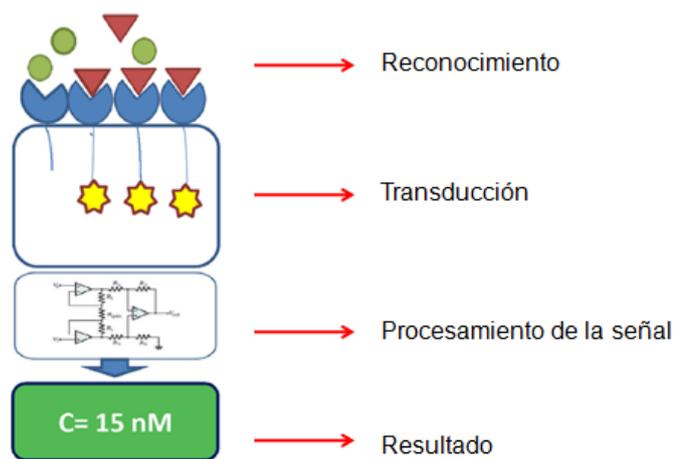


Figura 2. Esquema de un biosensor.²⁵

1.3.1 Aptámeros como elementos de reconocimiento

En la presente investigación, se empleó aptámeros como elementos de reconocimiento. Los aptámeros son cadenas cortas de ADN o ARN capaces de adoptar conformaciones tridimensionales e interactuar específicamente con una molécula en particular. Estas secuencias de oligonucleótidos poseen la capacidad de reconocer la presencia o ausencia de grupos funcionales, así como también tienen la propiedad de poder diferenciar enantiómeros.^{26,27} De esta manera, se han desarrollado aptámeros que pueden reconocer iones metálicos, drogas, aminoácidos, co-factores, antibióticos y hasta péptidos.²⁸

Para lograr esta alta especificidad y afinidad, los aptámeros son sintetizados por un proceso conocido como SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichments*) el cual se ilustra en la figura 3. En este proceso, se parte de una gran librería de alrededor de 10^{13} a 10^{15} oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos son incubados con el analito de interés. Durante esta etapa, algunas secuencias interaccionarán en mucha mayor medida que otras con el analito. Las secuencias no afines son separadas del resto luego de un lavado. A continuación, se realiza una elución para poder separar al analito de las secuencias. Luego, dichas secuencias son amplificadas por PCR si se trata de ADN o RT-PCR en el caso de ARN. Finalmente, son purificadas para poder comenzar el siguiente ciclo. El número de ciclos empleados oscila entre 8 y 15; y depende del rigor impuesto a cada ronda como también de la naturaleza del analito. Luego del proceso, las secuencias obtenidas son clonadas para luego ser caracterizadas.^{25,28}

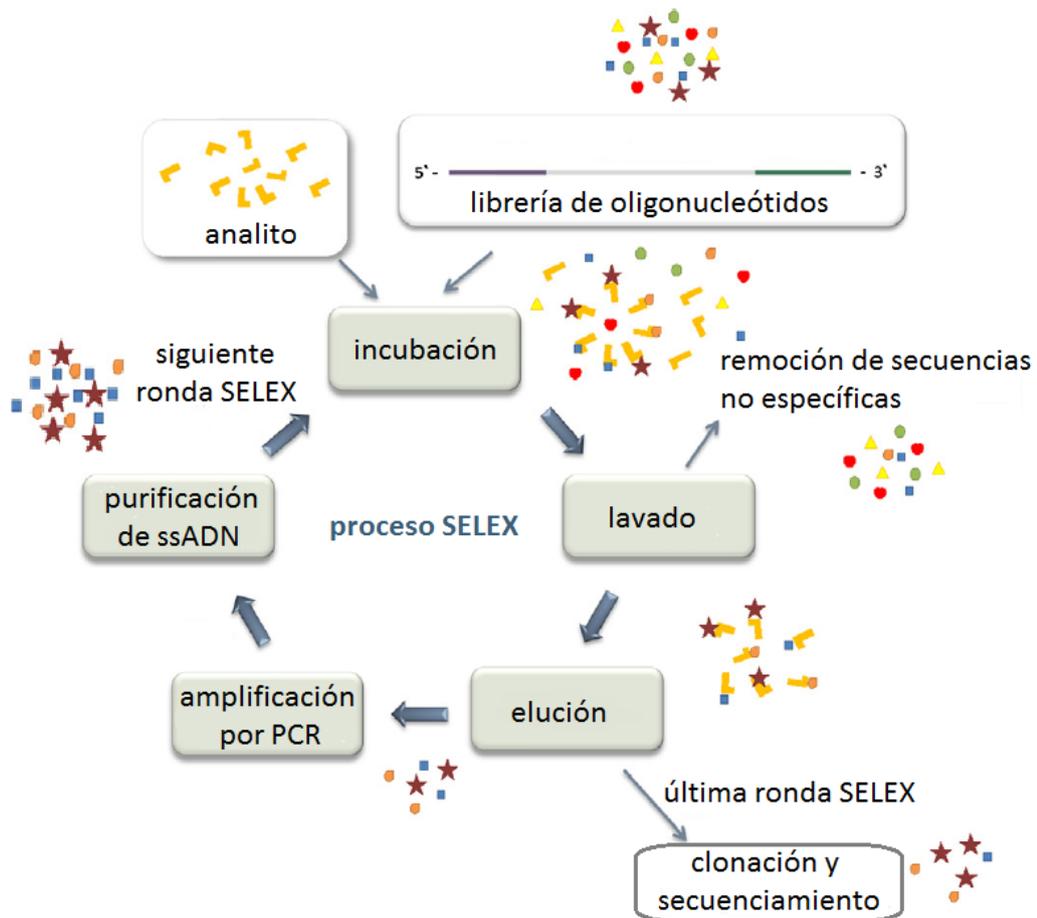


Figura 3. Proceso SELEX. Los oligonucleótidos, provenientes de una librería, entran en un ciclo donde primero es evaluada la afinidad de los oligonucleótidos con el analito. El siguiente paso es el lavado para remover las secuencias no afines; luego la elución de las secuencias que sí son afines al analito. Dichas secuencias afines son amplificadas por PCR o RT-PCR; y por último, son purificadas para volver a repetir el ciclo. Finalmente, luego de tener las secuencias más afines al analito se procede a clonarlas y caracterizarlas.²⁵

- Aptámeros específicos para OTA

Se han reportado diversas secuencias de aptámeros para esta micotoxina las cuales se encuentran resumidas en la tabla 3. El aptámero desarrollado para OTA que se utilizó en esta investigación es el número 1 de dicha tabla. Además de tener una gran afinidad por OTA, el aptámero seleccionado también exhibe un alto grado de especificidad. Se ha demostrado que con moléculas como la warfarina y la N-acetilfenilalanina, que tienen en su estructura a la fenilalanina y a un heterociclo cumarínico respectivamente, como en el caso de OTA, el aptámero no es específico a ellas. Así mismo, comparándolo con la ocratoxina B (OTB, figura 1), la cual difiere de OTA solo por el intercambio de un H por un Cl, se logra una especificidad por OTA 100 veces mayor.²⁹

Los distintos aptámeros utilizados para la determinación de OTA tienen dos segmentos en sus secuencias que son comunes entre ellos. Según L. Barthelmebs y colaboradores,³⁰ proponen que el primer segmento en común (GGGTGTGGG) estabiliza a la misma estructura del aptámero; mientras que el segundo segmento en común (AGGGAGT) es necesario para que interaccione satisfactoriamente con OTA.

El primer aptámero reportado para la detección de OTA fue desarrollado por Cruz-Aguado y Penner.²⁹ Este aptámero fue mejorado reduciendo su K_d (constante de disociación) de 0.36 μM a 0.2 μM mediante la siguiente secuencia: GAT–CGG–GTG–TGG–GTG–GCG–TAA–AGG–GAG–CAT–CGG–ACA (aptámero 1, tabla 3).²⁹ Además, se estudió los efectos que ofrecen las especies catiónicas en el medio sobre K_d . Se vio que la concentración de cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} influyen de manera favorable reduciendo la constante de disociación hasta 50 nM. Estudios previos sugieren que estos cationes interaccionan con los grupos carboxilo y 8-hidroxilo de la estructura de OTA.³¹ Es por ello, que en un medio ácido se ve un incremento en el valor de K_d debido a que dichos grupos se encuentran protonados y disminuye la posibilidad de que puedan interaccionar con dichos cationes. Por otro lado, se verifica que la presencia de cationes monovalentes como Na^+ o K^+ no tiene efecto alguno en dicha constante.

Los aptámeros al momento en que interaccionan con su analito pueden adoptar formas tridimensionales como horquillas, lazos, tricales y tétradas.²⁵ En el caso del aptámero empleado en esta investigación, este forma un complejo denominado G-

cuádruplex (figura 4)³² al interactuar con la toxina gracias a que la secuencia de reconocimiento es rica en guaninas.³³ Dichas guaninas interactúan entre sí por medio de puentes de hidrógeno para formar G-tétradas (Figura 4.A).³⁴ Los G-cuádruplex pueden ser clasificados según su topología: paralelo o antiparalelo. En el primero, las hebras se encuentran dispuestas en la misma dirección; mientras que en la segunda, se encuentran en direcciones opuestas (Figura 4.B-D).³⁵

Tabla 3. Aptámeros desarrollados para OTA

#	Secuencia	Método	LOD	Referencia
1	GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA	Fluorescencia	5 nM	26
		Fluorescencia	0.002 ng/mL	28
		Colorimétrico	20 nM	29
		Fluorescencia	---	30
		Fluorescencia	24.1 nM	31
		HPLC	0.2 ng/mL	32
		Fluorescencia	1.9 μ M	33
		Fluorescencia	0.3 μ g/kg (Harina de trigo)	34
			0.5 μ g/kg (Café)	
			0.3 μ g/kg (Cereales)	
		Fluorescencia	2 nM	35
		Quimioluminiscencia	0.3 pg/mL	36
Electroquímico	0.03 ng/mL	37		
Electroquímico	0.2 pg/mL	38		
2	AAA GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA	Electroquímico	0.004 ng/mL	36
3	CGG GTG TGG GTG CCT TGA TCC AGG GAG TCT	Colorimétrico	1 ng/mL	27
4	GAT CGG GTGCGC TAA AGG GAG CAT CGG ACA	Fluorescencia	1.9 ng/mL	41
6	TCC GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ATC GAA AAA	Electroquímico	0.4 pg/mL	42

Por otro lado, también pueden ser clasificados en estructuras intermoleculares o intramoleculares según el número de hebras que participan en la formación de la estructura. En el primero, múltiples hebras son las que participan en la formación del G-cuádruplex (figura 4.B-C); mientras que, en la segunda, la formación del G-cuádruplex depende de solo una hebra (figura 4.D).³⁷

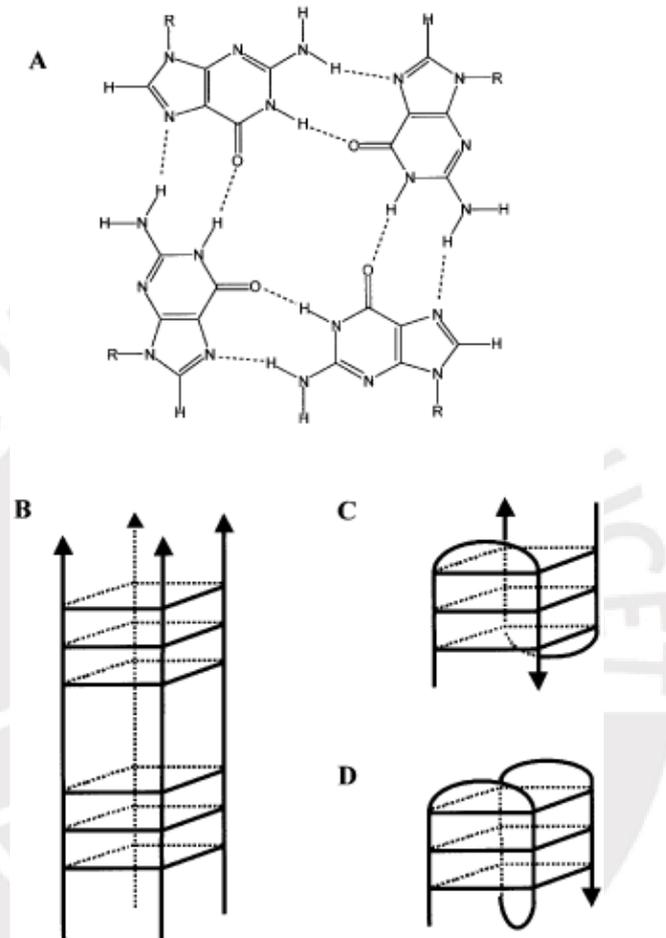


Figura 4. G-tétrada y G-cuádruplex. (A) G-tétrada, cuatro guaninas formando una estructura plana. (B) G-cuádruplex paralelo. (C) G-cuádruplex intermolecular. (D) G-cuádruplex intramolecular. Cada paralelogramo en B, C, D representa una G-tétrada.³⁸

- Ventajas del uso de los aptámeros frente a los anticuerpos

Si bien existen estrategias para la detección de toxinas empleando anticuerpos, hay ciertas limitaciones asociadas con estos:^{28, 39}

- La generación del anticuerpo por parte del organismo depende de cuán inmunogénico sea el antígeno. De esta manera, se hace más o menos complicado la producción de un anticuerpo en particular.

- El desempeño del mismo anticuerpo tiende a variar de lote en lote de producción.
- La producción de anticuerpos monoclonales resulta laboriosa y las células encargadas de la producción deben conservarse en varios sitios para superar la posible pérdida de estas células.
- Los anticuerpos solo pueden reconocer al antígeno respectivo en condiciones fisiológicas.

Por tales razones, los aptámeros ofrecen una excelente alternativa de cambio a los anticuerpos debido a las siguientes ventajas:

- Los aptámeros son sintetizados por un proceso *in vitro* y no dependen de animales y células para su producción.
- Como su producción no involucra un organismo viviente, no se encuentra restringido por condiciones *in vivo* y es posible la síntesis en condiciones diferentes a esta.
- Los aptámeros son sintetizados con una alta reproducibilidad y exactitud. Por tal razón, no hay prácticamente variaciones en su secuencia al momento de producir distintos lotes.
- Pueden ser unidos a distintas moléculas como la biotina, fluoresceína o cadenas de alcanos con grupos funcionales de interés lo cual amplía su campo de aplicación.
- Los aptámeros pueden sufrir desnaturalización, pero esta es reversible. De esta manera, es posible hacer una serie de análisis con el mismo lote. Además, son estables al almacenamiento a largo plazo y pueden ser transportados a temperatura ambiente.

1.4 Nanovarillas metálicas

Mientras que los aptámeros son los elementos de reconocimiento del biosensor que se desarrolló; las nanovarillas de oro vienen a ser el componente de transducción de nuestro sistema. Las características de estas nanoestructuras – la aparición de las bandas del plasmón de resonancia de superficie y la posible modificación o funcionalización de su gran área superficial- hacen posible su uso como sensores ópticos, transportadores de moléculas de interés dentro del cuerpo, así como agentes de imágenes celulares.⁴⁰

Es así que las nanopartículas nos permiten integrar compuestos tanto sintéticos como biológicos para diversas aplicaciones. Existe una amplia gama de materiales que son utilizados para la fabricación de dichas nanoestructuras: metales,⁴¹ óxidos metálicos⁴² y semiconductores.⁴¹ La composición resulta muy importante debido a que las características del material influyen tanto en las propiedades ópticas como en las magnéticas a nanoescala. Además, su funcionalización, solubilidad y estabilidad difieren según el material de la nanoestructura.⁴³

1.4.1 Propiedades ópticas de las nanoestructuras de oro

- Plasmones de resonancia

Dentro de los diferentes materiales empleados, las nanoestructuras de oro despliegan propiedades ópticas interesantes. Al ser irradiadas con luz de determinada longitud de onda, los electrones libres que se encuentran en la nanopartícula comienzan a oscilar en resonancia en zonas específicas de la interfase entre el material nanoestructurado y el entorno, a este efecto se le denomina plasmón de resonancia de superficie localizada (LSPR, por sus siglas en inglés). Esta banda plasmónica puede ser modulada por el material empleado, la geometría de la nanoestructura y el tamaño de la misma, pero también por el entorno que la rodea. De esta forma, nos permite verificar de algún cambio posible en la superficie de la nanopartícula debido al desplazamiento de la banda plasmónica. En la figura 5, se muestran ejemplos de la modulación de las bandas plasmónicas en resonancia en función del material y la forma de este, los cuales se encuentran a distintos rangos del espectro electromagnético.⁴⁴

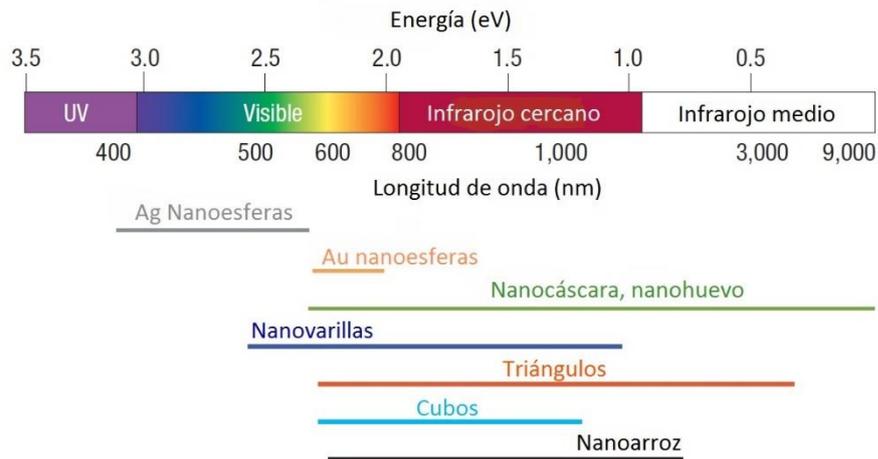


Figura 5. Ejemplos de los plasmones de resonancia para una variedad de morfologías de las nanoestructuras.⁴⁵

En el caso particular de las nanovarillas de oro, existen dos tipos de bandas plasmónicas como se observa en la figura 6. Una se encuentra asociada a un modo transversal y la otra al modo longitudinal, que en el caso de las nanovarillas de oro se encuentran a longitudes de onda alrededor de 520 nm y a longitudes de onda mayores a 600 nm, respectivamente.⁴⁶

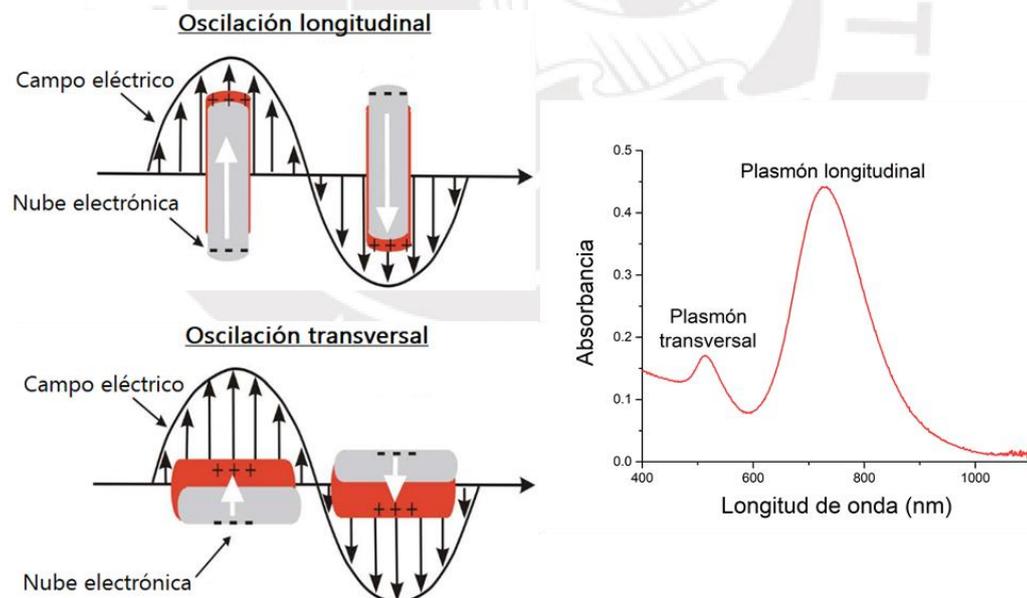


Figura 6. Izquierda: Representación de los dos tipos de oscilaciones de los electrones libres en la nanovarilla.⁴⁷ Derecha: Espectro UV-Vis-NIR típico de una solución de nanovarillas de oro.

Es el modo longitudinal el cual es altamente sensible a la proporción entre el largo y el ancho de la nanovarilla.⁴⁸ Es así que un aumento de dicha proporción se verá reflejado en un desplazamiento de la banda plasmónica hacia longitudes de onda

mayores; mientras que una disminución, en un desplazamiento hacia menores longitudes de onda.⁴⁹ De esta manera, se hace posible la modulación de la banda plasmónica correspondiente a dicho modo desde la región visible hasta el infrarrojo cercano.⁴⁸

- Capacidad de actuar como antena

Estas nanoestructuras de oro no solo permiten monitorear el desplazamiento del plasmón debido a un cambio en el entorno de la nanopartícula; sino también permiten conocer el espectro vibracional de las moléculas absorbidas a la superficie metálica gracias a una técnica conocida como espectroscopía Raman de superficie amplificada (SERS, por sus siglas en inglés). Dicha técnica proporciona una “huella dactilar” química única para cada sistema molecular. En este caso, las nanopartículas actúan como antenas resonantes de las señales espectrales y las amplifican varios órdenes de magnitud. Es así que los espectros vibracionales amplificados han encontrado aplicación en una amplia gama de análisis como por ejemplo: la detección de trazas de biomoléculas como el ADN,⁵⁰ detección de material de guerra,⁵¹ análisis no destructivos de muestras de arte⁵² o en la detección de glucosa.⁵³

Estas propiedades ópticas de amplificación han sido interpretadas en la literatura mediante dos distintos mecanismos: uno de origen químico, y otro del tipo electromagnético. El primero se debe a la transferencia de carga entre el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO) y el orbital molecular ocupado más alto (HOMO) de las moléculas próximas a la superficie metálica y el nivel Fermi de energía del metal. El factor de incremento de la señal por este mecanismo depende del tipo de analito y sustrato empleado, pero usualmente se tiene un factor de amplificación por debajo de 10^2 .⁵⁴ Por otro lado, el segundo mecanismo se asocia a la oscilación colectiva de los electrones libres del metal que originan un aumento en la intensidad del campo eléctrico cercano a la nanoestructura. En este caso, se tiene un factor de amplificación mucho mayor, que se encuentra en el rango de 10^6 a 10^8 .⁴⁴ La geometría de la nanoestructura influye también en el incremento de la señal. En el caso de la nanovarilla, es posible concentrar campos magnéticos en los extremos de la estructura como se muestra en la figura 7 donde es posible conseguir un incremento en las señales Raman.⁵⁵

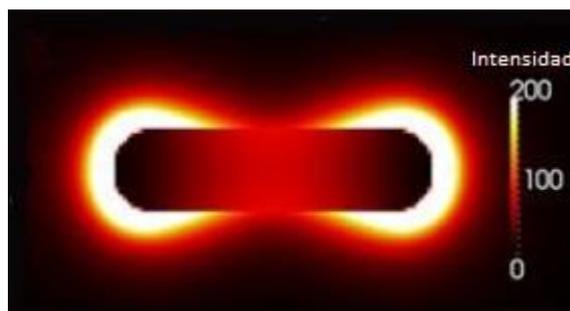


Figura 7. Distribución del campo eléctrico alrededor de la nanovarilla excitado a 720 nm.⁵⁶

1.4.2 Método de bioconjugación del aptámero con la nanopartícula

Tanto el aptámero como la nanovarilla de oro son vitales para el biosensor que se fabricó. Por un lado, el aptámero asegura la especificidad hacia la toxina; mientras que por otro, la nanovarilla de oro permite detectar dicha interacción. De esta manera, se busca que la interacción entre estos dos elementos sea óptima. Para ello, es necesario conocer qué vías existen para lograr dicho objetivo. En la literatura, aparecen diversas estrategias para lograr el sistema nanopartícula-ligando que uno necesita. Entre dichas estrategias se encuentran: la quimisorción en la cual se aprovecha, por ejemplo, la gran afinidad entre el oro y el grupo tiol; las interacciones electrostáticas, donde las cargas tanto de la nanopartícula como del elemento con el cual interacciona hacen posible dicha bioconjugación; la encapsulación, donde el bioelemento reside dentro de la nanopartícula.⁵⁷

Sin embargo, hay un obstáculo que se presenta. La nanovarilla se encuentra recubierta por una capa empaquetada de CTAB,⁵⁸ esta molécula, si bien cumple la función de estabilizante, dificulta la interacción entre la nanoestructura y el grupo tiol de la cadena aptamérica. Para ello, se necesita desorber la mayor parte posible de CTAB de la superficie para lograr una óptima interacción.

Por otro lado, la presencia de un espaciador como parte de la cadena aptamérica modificada, como una cadena alquílica o una de bases nitrogenadas, tiene el propósito de alejar la secuencia de oligonucleótidos de la nanopartícula para poder reducir el efecto estérico en el momento que tenga que interaccionar con la toxina.⁵⁹ Ya que las cadenas de los aptámeros poseen una carga negativa debido a los grupos fosfatos que la conforman, esto origina una repulsión entre las distintas cadenas y por ende un menor grado de funcionalización. Por tal motivo, en el proceso de funcionalización, la adición tanto del SDS como del NaCl favorecen la disminución de dichas repulsiones. El SDS ayuda a disminuir las repulsiones

hidrofóbicas originadas por la cadena alquílica del espaciador; mientras que el NaCl ayuda a disminuir las repulsiones hidrofílicas propias de la cadena de ADN.⁵⁹

Por último, el buffer de fosfato empleado (ver parte experimental) se ha utilizado ya en varias publicaciones donde el objetivo era lograr una óptima funcionalización.^{60,61} Por ejemplo, S. J. Hurst *et al*⁵⁹ selecciona el buffer de fosfato en lugar del de Tris debido a que el aptámero posee un menor volumen efectivo en la superficie de la nanopartícula lo cual favorece a incrementar la cantidad de aptámero que pueda enlazarse a ella.

1.5 Calibración multivariante: regresión de mínimos cuadrados parciales

El uso de la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para llevar a cabo análisis cuantitativos de diversas micotoxinas ha sido empleado en varias investigaciones.⁶²⁻⁶⁴ Este tipo de regresión es utilizado cuando es necesario predecir una variable dependiente o de respuesta a partir de un gran número de variables independientes o predictoras. En nuestro caso, predecir la concentración de la toxina a partir de los espectros analizados.

Antes de llevar a cabo el análisis por PLS, es necesario establecer tanto el preprocesamiento como la validación cruzada (*cross-validation*) de los datos que se van a analizar.

- Preprocesamiento

Es posible ejecutar acciones como por ejemplo: la línea de base, la normalización o el suavizado (*smoothing*). En este caso, las correcciones de la línea de base pueden ser realizadas de diferentes maneras, como el uso de ecuaciones polinómicas que se ajusten a puntos específicos, o la evaluación del peso de los mínimos cuadrados o mediante el método del filtro de Whittaker. Estas dos últimas son muy similares y empleadas en análisis de espectros ya que generan un algoritmo que permiten discriminar qué señales son propias de las variables y cuáles representan solo a la línea de base.⁶⁵ En el último caso, la línea de base que se utilizó fue el *Automatic Whittaker Filter* en la cual se tiene que definir los parámetros λ y p . El primer parámetro define la curvatura de la línea de base, a menor valor de λ , mayor será la curvatura de la línea de base. Por otro lado, el segundo parámetro define la asimetría de la línea de base, valores altos

permiten regiones negativas; mientras que valores bajos restringen dichas regiones.⁶⁵

Además de la línea de base, se realizó el suavizado o *smoothing*. Este suavizado fue desarrollado por Savitzki y Golay⁶⁶ en el cual el espectro es dividido en secciones iguales las cuales son determinadas por el usuario donde en cada sección se lleva a cabo un ajuste del grado polinómico que el usuario ha definido previamente.⁶⁷

- Validación cruzada o *Cross-validation*

Luego de la etapa de preprocesamiento, se procede con la etapa de la validación cruzada. Esta permite tanto conocer el desempeño del modelo para lograr una acertada predicción como también conocer el número de componentes necesarias para lograr dicho propósito. En esta etapa, se desarrolla una serie de pruebas con un porcentaje de los datos para construir con ellos el modelo (*building set*); mientras que los datos remanentes son empleados para probar dicho modelo (*test set*).

En la tabla 4, se resumen algunas de las formas de validación cruzada existentes, donde “n” es el número total de elementos y “s” es el número por el cual se encuentra dividida toda la data.^{68,69}

Ahora bien, una vez ejecutado el preprocesamiento y definido el método de validación cruzada a emplear se procede al desarrollo del modelo. Para ello, se realizan combinaciones lineales de las variables predictoras que puedan explicar la variación entre ellas, pero también la correlación entre dichas variables y las que se intentan predecir. Estas variables que se desean predecir son determinadas al principio por el usuario, y en el caso de la presente investigación, son las que indican las concentraciones de la toxina.

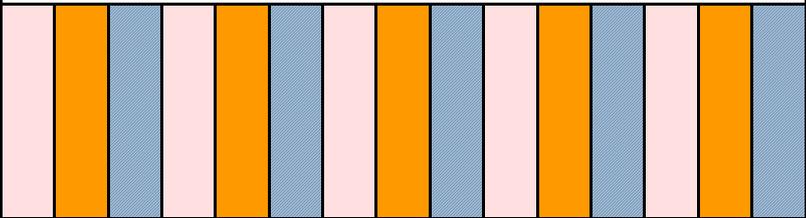
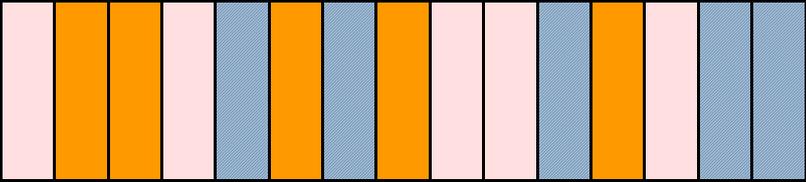
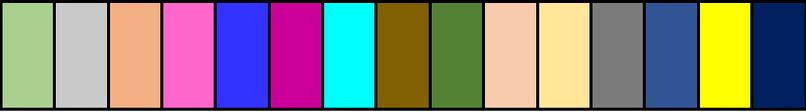
De esta manera, se obtienen nuevos componentes o variables latentes las cuales explican dichas variaciones y correlaciones según la ecuación (1):

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n \dots (1)$$

donde \hat{y} es la variable latente que se emplea para predecir la concentración de la toxina, los valores de b son los coeficientes de regresión (*loadings*) determinados por el modelo, y los valores de x son las absorbancias o intensidades (según la muestra provenga de medidas realizadas por UV-Vis o Raman respectivamente)

medidas a diferentes longitudes de onda o desplazamiento Raman correspondientes al rango espectral analizado.

Tabla 4. Esquema de análisis y descripción de los métodos de validación cruzada en el software Solo.

Esquema	Descripción
<p style="text-align: center;">Persianas venecianas</p> 	Cada <i>test set</i> está compuesto de cada <i>s</i> -avo elemento de la data total, empezando por los elementos desde el 1 al <i>s</i> .
<p style="text-align: center;">Bloques continuos</p> 	Cada <i>test set</i> está compuesto por <i>n/s</i> objetos de la data total.
<p style="text-align: center;">Aleatorio</p> 	Se tiene <i>s</i> diferentes <i>test sets</i> donde los <i>n/s</i> elementos de cada set son seleccionados al azar.
<p style="text-align: center;">Dejando uno fuera</p> 	Cada objeto de la data total es empleado como <i>test set</i> .

Dichos coeficientes de regresión o *loadings* son los que otorgan un mayor o menor peso a los distintos valores de *x* según estos posean mayor o menor efectividad en la predicción.^{67,68} De esta manera, en un *loading plot*, o gráfica de una variable latente (\hat{y}), es posible identificar cuáles son las señales responsables de la efectividad del modelo obtenido.

Otro concepto que ayuda a visualizar cuáles son las señales más importantes para el desarrollo del modelo son los valores de la importancia de la variable en la proyección (VIP, por sus siglas en inglés).^{70,71} Estos valores nos indican que las señales son importantes para el modelo si es que poseen un valor cercano a 1 o mayor a este; o son menos importantes para valores inferiores a 1.^{70,71}

Como se ha descrito, la validación cruzada ayuda a obtener el número de variables latentes necesarias para obtener el modelo óptimo. La elección del número de variables latentes se logra gracias a un parámetro definido como el error cuadrático

medio de validación cruzada (RMSECV, por sus siglas en inglés) el cual está definido por la siguiente ecuación:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{N_c - 1} \sum_{i=1}^{N_c} (\hat{c}_i - c_i)^2}$$

donde N_c es el número de espectros del *test set*, o set de entrenamiento, \hat{c}_i es la concentración predicha a partir de la validación cruzada, y c_i es la concentración de referencia. Este tipo de error proviene directamente de los resultados de la validación cruzada e indica cuán lejos se encuentra nuestro modelo de una óptima predicción. De esta manera, se selecciona el número de variables latentes que se encuentre ligado al menor valor de dicho error.

Otra manera más que nos ayuda a complementar la efectividad de la predicción del modelo es por medio de una gráfica en la cual se pueda comparar los valores de las concentraciones de referencia con los valores de las concentraciones predichas, esto es la recta de calibración. A partir de estas es posible obtener parámetros como el coeficiente de determinación (R^2) el cual nos indica la correlación que existe entre las concentraciones de referencia y las concentraciones predichas donde el valor máximo de 1 indica una perfecta correlación mientras que un valor mínimo de 0 indica que no existe correlación alguna.

1.6 Objetivos

De esta manera, el trabajo descrito en esta tesis tiene como principal objetivo establecer un método para el desarrollo de un biosensor para la cuantificación de ocratoxina A. En primer lugar, implementar una metodología para la síntesis de las nanovarillas de oro que tienen el objeto de ser el transductor. En segundo lugar, emplear el oligonucleótido (aptámero 1, tabla 3) modificado en su extremo 5' con una cadena alquílica de seis carbonos y con un extremo tiolado (C₆-SH)⁷² para el desarrollo del sensor. En tercer lugar, detectar y cuantificar soluciones estándar de OTA, en el rango de los ppb, mediante el uso de la espectroscopía UV-Vis-NIR y Raman. Por último, analizar los datos obtenidos a través de ambas técnicas por medio del análisis multivariante empleando la técnica de mínimos cuadrados parciales para llegar a establecer un modelo de cuantificación de la toxina.



Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1 Reactivos y equipos

El ácido tetracloroáurico trihidratado (HAuCl_4), el dodecilsulfato sódico (SDS), el borohidruro de sodio (NaBH_4), el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), el 2-mercaptoetanol (MET), el fosfato de potasio monobásico, el fosfato de potasio dibásico, el cloruro de potasio y la ocratoxina A de *Aspergillus ochraceus* (cat #32937) fueron obtenidos de Sigma Aldrich. El hidróxido de sodio, el cloruro de sodio, el ácido clorhídrico y el ácido nítrico se obtuvo de J.T. Baker. El EDTA fue adquirido de Riedel-de Haën; el ácido ascórbico de Formont; el nitrato de plata, el cloruro de calcio dihidratado y el Tris HCl de Merck. La secuencia de oligonucleótido tiolada de 36 bases: 5'-HS-(CH_2)₆-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-3' fue sintetizada, purificada por RP-HPLC y analizada mediante MALDI-MS por Eurogentec. Finalmente, todos los ensayos fueron realizados utilizando agua ultra pura, grado Milli Q.

Los equipos utilizados se encontraron en la sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú a menos que se indique lo contrario.

La preparación de los sensores y del proceso de detección de la toxina requirió del uso de un agitador vortex MVOR-03 de SBS, una centrifugadora Sorvall Biofuge Stratos, un pH-metro Basic 20 de Crison, un sonicador VWR modelo 97043-930.

Los espectros de extinción en el rango UV-Vis-NIR fueron adquiridos utilizando el espectrofotómetro UV-Vis modelo Genesys 10S de Thermo Scientific empleando una celda de cuarzo semi-micro con un paso óptico de 10 mm y 1 mL de volumen de Agilent. Las mediciones se realizaron en un rango de 200 nm a 1100 nm. Se utilizó el software VISIONlite™ versión 5.2.

Los espectros Raman fueron obtenidos mediante el uso de un espectrómetro i-Raman plus 785H con láser de diodos centrado a 785 nm y una potencia continua < 300 mW con conectores de fibra óptica FC/PC. Este sistema permite la detección en el rango de 175 – 2700 cm^{-1} con una resolución de 3.5 cm^{-1} a 912 nm y con un rango dinámico de 50000:1. Además, el sistema estuvo acoplado a un soporte para muestras de cubetas modelo BCR100A 9.5 mm de BWTEK el cual estuvo acoplado al espectrómetro Raman. Los espectros obtenidos fueron el resultado de 100 s de irradiación, 5 acumulaciones, y 50 % de intensidad del láser. Se utilizó el software BWSpec versión 4.10.

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) se realizaron en el Instituto Universitario de Investigación en Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza. Se empleó un microscopio con cañón termoiónico y acelerador de voltaje de hasta 200 kV, modelo Tecnai T20 de FEI. Cada una de las muestras fue homogenizada antes de tomar una alícuota que fue depositada sobre una rejilla de cobre recubierta con carbono proveniente de *Electron Microscopy Science* para proceder con el análisis.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software Solo versión 8.5.2 (2017) de *Eigenvector*.

2.2 Metodología

2.2.1 Síntesis y caracterización de las nanovarillas de oro

Todos los viales empleados en la síntesis se lavaron previamente con una solución de agua regia ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$, 1:3 v/v); luego con *Alconox®*; y finalmente, se enjuagaron con agua ultrapura. Las nanovarillas de oro se sintetizaron tomando como referencia el método empleado por Ratto⁷³ a partir de una solución de semillas y otra solución de crecimiento.

La solución que contiene a las semillas se prepara mezclando 24 μL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 50 mM, 4.7 mL de una solución de CTAB 0.1 M y 96 μL de agua ultrapura. Enseguida, se adiciona 290 μL de NaBH_4 10 mM previamente enfriada en un baño de hielo. La solución cambia de color amarillo oscuro a marrón y se coloca bajo agitación por dos horas a 25°C. Esta solución se emplea inmediatamente después de dos horas desde el inicio de su preparación.

Por otro lado, la solución de crecimiento se obtiene de la mezcla de las siguientes soluciones en el orden en el cual aparecen descritas: 192 μL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 50 mM, 768 μL de agua ultrapura, 19 mL de CTAB 0.1 M, 190 μL de AgNO_3 10 mM y 110 μL de ácido ascórbico 0.1 M. Luego de añadir cada solución, se agita suavemente. Inmediatamente después de añadir el ácido ascórbico, el color de la solución cambia de amarillo oscuro a incoloro. Por último, y en este caso sin ninguna agitación, se añade 40 μL de la solución de las semillas. Esta mezcla resultante se deja en reposo, bajo oscuridad y a 25°C durante dos días.

Una vez transcurridos esos dos días, se toman 1.6 mL de la solución de crecimiento y se adiciona 30 μL de ácido ascórbico 10 mM. Finalmente, se deja dicha solución

en reposo, bajo oscuridad y a 25°C durante dos días más. Culinado ese tiempo, se obtiene la solución matriz de las nanovarillas, las cuales se encuentran listas para ser utilizadas.

Las soluciones de nanovarillas se caracterizan mediante TEM. Para ello, se diluye cada solución matriz en agua ultrapura (dilución 1:3) y se envían las muestras al laboratorio Instituto Universitario de Investigación en Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza. Por otro lado, los análisis de caracterización en el rango UV-Vis-NIR se realizaron colectando los espectros de extinción de las suspensiones diluidas en agua ultrapura (dilución 1:10) en el rango de longitud de onda de 200 a 1100 nm.

2.2.2 Desarrollo del sensor aptamérico para la detección de OTA

El desarrollo del sensor aptamérico consta esencialmente de tres pasos los cuales se presentan en la figura 8. Los dos primeros pasos implican la modificación de la superficie de las nanovarillas con los aptámeros como agente de reconocimiento y posteriormente con MET como molécula de relleno. El último paso viene a ser el ensayo del sensor con OTA donde el aptámero interactúa específicamente con la toxina.

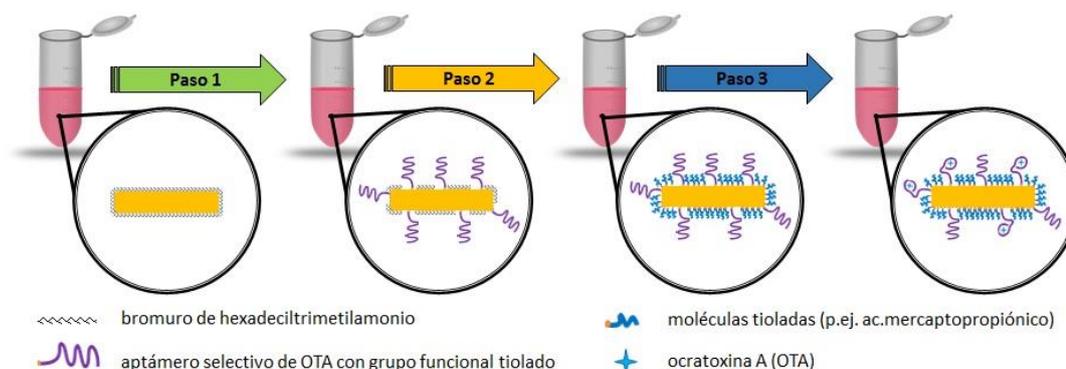


Figura 8. Procedimiento general para la fabricación del sensor aptamérico.

2.2.2.1 Optimización del sensor aptamérico

La optimización del sensor aptamérico se encuentra conformada por los pasos 1 y 2 mostrados en la figura 8. Se evalúan tres concentraciones diferentes de aptámero para determinar cuál es la concentración óptima en el desarrollo del sensor. Además, se determina si una etapa de centrifugación es necesaria en este proceso.

Por último, se incluye en el proceso de funcionalización al MET, el cual promueve la desorción del CTAB. De esta manera, disminuye así las posibles interacciones no específicas y actúa como agente de relleno que reduce el impedimento estérico al momento en el que el aptámero se acompleja con OTA.

- Paso 1: Optimización de la funcionalización de la nanovarilla de oro con el aptámero

Previo a la etapa de funcionalización, la solución de nanovarillas es centrifugada dos veces a 6000 rpm por 10 minutos. Para ello, se toman 100 μL de la solución matriz de las nanovarillas y se lleva a dilución 1:5 con agua ultrapura. Finalizada la primera ronda, se descartan 400 μL del sobrenadante y se añade el mismo volumen de agua ultrapura para proseguir con la segunda ronda. Al término de esta, se descartan nuevamente 400 μL del sobrenadante y con el volumen restante se prosigue con la etapa de funcionalización.

Para esta etapa, el orden de adición de las soluciones es el siguiente: 100 μL de nanovarillas previamente centrifugadas, 2.5 μL SDS 10%, 100 μL del buffer de fosfato 0.1 M pH 8, 50 μL NaCl 1 M, 10 μL de la solución del aptámero (50, 100, 200 μM del aptámero), y por último, se completa con agua ultrapura hasta llegar a un volumen final de 950 μL . El cloruro de sodio se añade en dos tandas: 50 μL al inicio de la funcionalización y los 50 μL restantes luego de 2 horas de agitación horizontal. Después de cada adición de la sal, se sonica la solución por un breve instante (< 5s).

La solución se deja bajo agitación horizontal hasta el día siguiente. Para remover el exceso de aptámero, la solución se centrifuga a 6000 rpm durante 10 minutos y al término se retira 900 μL del sobrenadante y se resuspende en el volumen remanente. La solución es evaluada mediante espectroscopía UV-Vis-NIR.

- Paso 2: Funcionalización con el MET

Una vez culminado el proceso de agitación de 24 h de las nanovarillas con el aptámero se añade 2 μL de una solución de MET 28.3 μM . Luego, se deja bajo agitación horizontal por 24 h adicionales. Se centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos y al término se retira 900 μL del sobrenadante y se resuspende en el volumen remanente, a fin de obtener los nanosensores aptaméricos.

2.2.2.2 Estudio de detección de OTA

La determinación del contenido de OTA en solución se realiza al mezclar una solución de esta toxina con los nanosensores aptaméricos en el buffer compuesto por: 10 mM Tris, 120 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, 5 mM KCl, pH 8.5. Todas las diluciones de OTA empleadas fueron preparadas a partir de una solución stock de 12.5 µM de esta toxina disuelta en el mismo buffer del ensayo.

- Detección de OTA mediante espectroscopía UV-Vis-NIR y espectroscopía Raman

Para detectar OTA, se toma 25 µL de la solución de las nanovarillas funcionalizadas y se mezcla con 30 µL de la solución stock de OTA a diferentes concentraciones (concentraciones finales: 0, 0.25, 0.5, 2.0, 4.0 µM). Se añade el buffer de OTA necesario dependiendo de la concentración final de OTA como también agua ultrapura hasta alcanzar un volumen final de 300 µL. La mezcla se mantiene bajo agitación durante 16 minutos a temperatura ambiente antes de proceder con la medición.

2.2.3 Análisis multivariante de los espectros UV-Vis-NIR y Raman

Los modelos de calibración para la cuantificación de ocratoxina A se obtienen aplicando la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS).

Los análisis de los espectros UV-Vis-NIR se realizan en el rango de 300 a 1100 nm; mientras que para los espectros Raman, en el rango desde 600 a 1800 cm⁻¹. Los métodos de preprocesamiento empleados para ambos análisis son los siguientes: Normalización (*normalize*) respecto a todo el espectro; suavizado (*smoothing* por Savitzky y Golay) con ancho de filtro (*filter width*) igual a 15 y orden polinomial (*polynomial order*) de 5; y línea de base (*baseline* empleando *automatic Whittaker filter*) con valor lambda igual a 100 y p igual a 0.001. El orden del preprocesamiento para los espectros UV-Vis-NIR son: (1) línea de base, (2) normalización, y (3) suavizado; mientras que para los espectros Raman fueron: (1) suavizado, (2) línea de base, y (3) normalización. Los modelos de calibración son sujetos a validación cruzada (*cross-validation*) utilizando el método de persianas venecianas y se evalúa comparando los valores de los errores de predicción (RMSECV).

Capítulo 3: Resultados y discusión

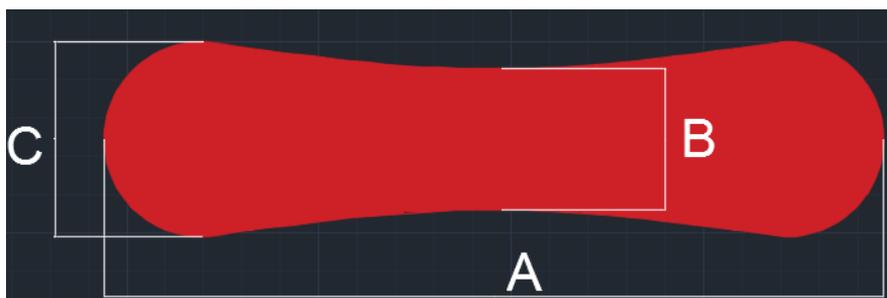
3.1 Caracterización de las nanovarillas de oro

Se caracterizaron por TEM tres tipos de muestras: (1) AuNR, (2) AuNR@MET, y (3) AuNR@Apt@MET. Las imágenes TEM y el resumen del análisis de dimensiones obtenidas para ensayos de 5 lotes distintos se muestran en la figura 9 y tabla 5. En los tres casos es posible distinguir a las nanovarillas ya que tanto el CTAB (AuNR, 2 lotes), el MET (AuNR@MET, 1 lote) y el aptámero (AuNR@Apt@MET, 2 lotes) ofrecen la protección necesaria para mantener la estabilidad que se refleja en las micrografías. Sin embargo, también es posible visualizar otros tipos de geometría: puede deberse a que la nanovarilla se esté visualizando de manera frontal o que la síntesis haya derivado en dicha forma. Además, tanto en las imágenes de AuNR y AuNR@MET se muestran partículas pequeñas, amorfas y grises las cuales indican la presencia de semillas en la muestra.

Por otro lado, los diferentes contrastes mostrados están asociados a la masa molecular y el espesor del material que se está identificando. Es así que en las áreas en las cuales se encuentran localizadas las nanovarillas de oro el contraste es más oscuro que en aquellas regiones en las cuales se encuentran el CTAB o material orgánico o las semillas de oro.⁷⁴

Tabla 5. Dimensiones de las nanovarillas de oro (AuNR, 27 varillas analizadas), las nanovarillas de oro funcionalizadas con MET (AuNR@MET, 7 varillas analizadas), y las nanovarillas funcionalizadas con el aptámero y MET (AuNR@Apt@MET, 27 varillas analizadas).

Dimensión	AuNR	AuNR@MET	AuNR@Apt@MET
A	54.2 ± 6.7	47.1 ± 3.5	48.9 ± 3.3
B	16.9 ± 3.5	14.9 ± 1.6	13.8 ± 5.2
C	20.0 ± 3.8	16.3 ± 2.1	17.8 ± 1.8



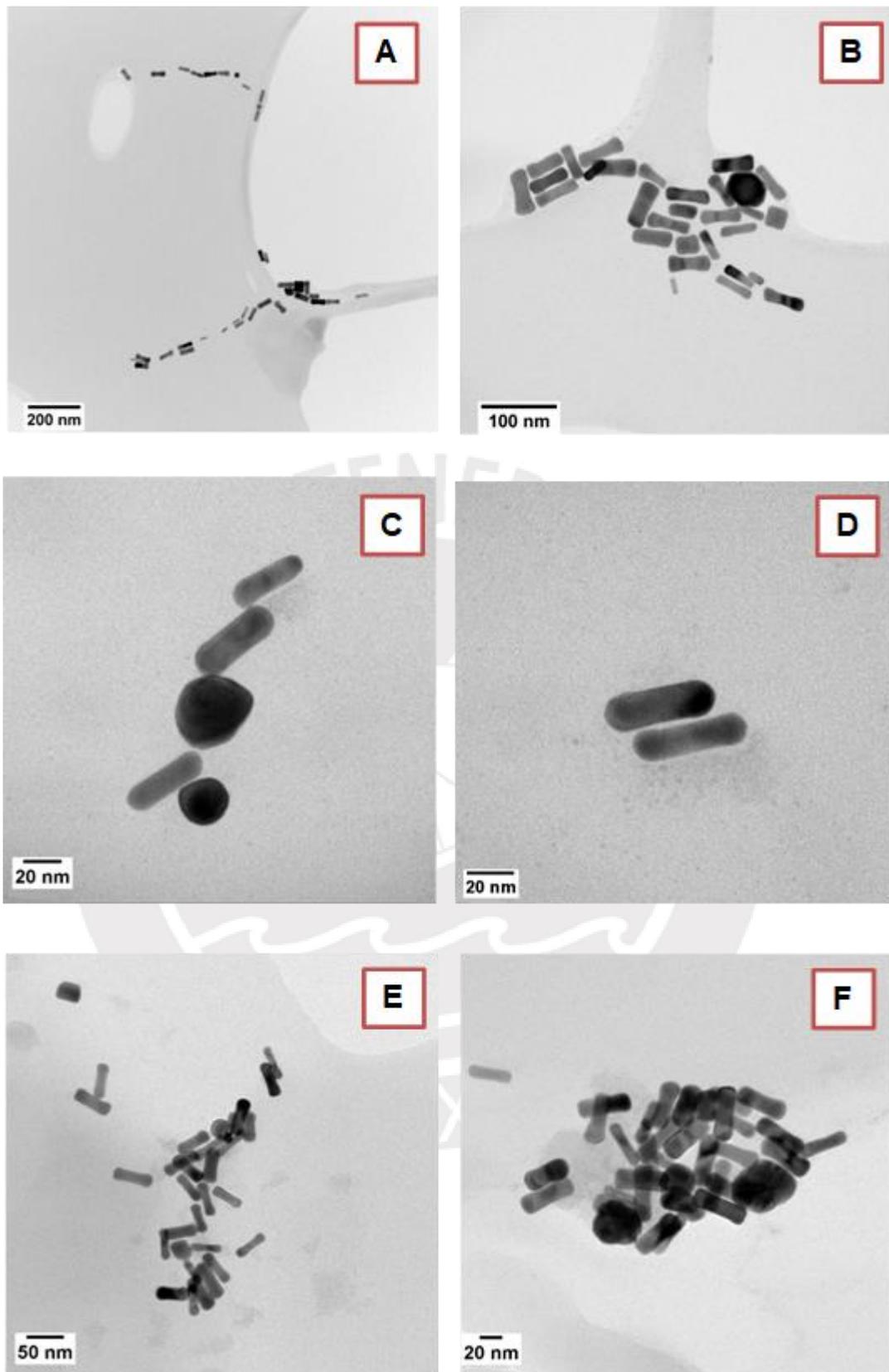


Figura 9. Micrografías TEM de AuNR (A,B); AuNR@MET (C,D); y AuNR@Apt@MET (E,F). Estos resultados corresponden a diferentes ensayos.

Es importante mencionar que la cantidad de nitrato de plata que se emplea en la síntesis de las nanovarillas es la encargada de modular la posición del plasmón longitudinal. Se piensa que el nitrato de plata posee una preferencia por la superficie lateral que por los extremos de la nanovarilla.^{75,76} Esto ocasiona un bloqueo de dicha superficie, por lo que el crecimiento se realiza únicamente a lo largo de la estructura.

3.2 Desarrollo del sensor aptamérico para la detección de OTA

El desarrollo del sensor aptamérico involucró las siguientes etapas: (1) la centrifugación de las nanovarillas para remover el exceso de CTAB, (2) la búsqueda de la concentración óptima de aptámero para la funcionalización de la nanovarilla y (3) la funcionalización con el MET como molécula de relleno. Estas etapas fueron monitoreadas mediante el análisis de los espectros UV-Vis-NIR y Raman.

3.2.1 Optimización del sensor aptamérico

En este proceso de funcionalización, los componentes de la mezcla juegan un papel importante en el claro objetivo de asegurar que el aptámero entre en contacto con la superficie de la nanoestructura. Para lograrlo, en primer lugar, se debe retirar la mayor cantidad posible de CTAB que se encuentra recubriendo la nanovarilla. Si bien dicha molécula previene la agregación de las nanovarillas en agua vía repulsión electrostática, ofrece una dificultad al momento de la funcionalización debido a su empaquetamiento.⁷⁷ Para ello, se procedió a dos centrifugaciones continuas previas a la funcionalización con el aptámero. El CTAB retirado por este método proviene principalmente de los extremos de la nanovarilla, donde la curvatura de la nanoestructura ocasiona que dichas moléculas no se encuentren tan empaquetadas en comparación con las que se encuentran localizadas en la superficie plana.⁵⁶ Sin embargo, según el análisis de las imágenes TEM (figura 9.B,E,F), se observa que en realidad la nanopartícula tiene la apariencia de un hueso. Debido a esta forma, se cree que la curvatura de los extremos favorece el reemplazo del CTAB por las moléculas tioladas de interés.

En la figura 10, se muestra los espectros Raman de las nanovarillas recubiertas solo con CTAB, aquellas incubadas con una solución 2 μM de aptámero pero sin centrifugar, y un tercer caso donde las nanovarillas han sido previamente centrifugadas dos veces consecutivas a 6000 rpm por 10 minutos y posteriormente mezcladas con una solución 2 μM de aptámero. A partir de estos espectros Raman

es posible confirmar que el proceso de centrifugación previa es necesario para poder funcionalizar las nanovarillas con el aptámero y visualizar las señales características del oligonucleótido.

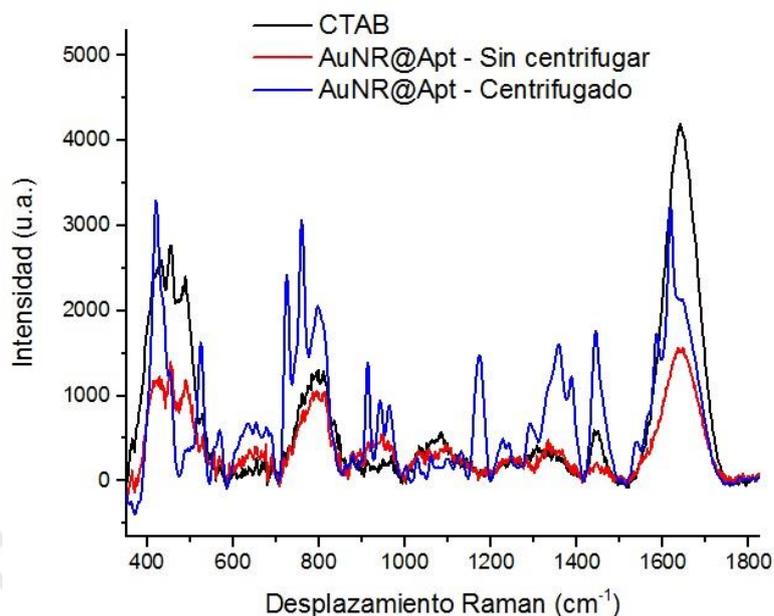


Figura 10. Comparación de los espectros Raman del CTAB (negro), funcionalización sin centrifugación previa (rojo), funcionalización con centrifugación previa (azul). Todos los espectros mostrados han sido procesados con una corrección de la línea de base

Una vez retirado el exceso de CTAB de las nanovarillas, se procedió a funcionalizar con las hebras de aptámero. Se evaluaron tres concentraciones de oligonucleótidos (0.5, 1.0, 2.0 μM) a fin de determinar la estabilidad de las nanovarillas luego de la funcionalización. A mayor concentración del aptámero, es posible adsorber una mayor cantidad de este en la superficie de la nanovarilla y mantener la estabilidad de la nanoestructura. Por otro lado, a una menor concentración, la probabilidad de agregación de las nanovarillas aumenta debido a espacios disponibles de la superficie que no han podido ser cubiertos. La agregación de nanopartículas de metales nobles puede ser detectada mediante incrementos en el valor del FWHM de las bandas plasmónicas.⁷⁸

Como se ve en la figura 11, a medida que aumenta la concentración del aptámero, el valor del FWHM del plasmón longitudinal ($\lambda \approx 785 \text{ nm}$) disminuye. Es así que se selecciona 2 μM como la concentración óptima de aptámero para llevar a cabo la funcionalización.

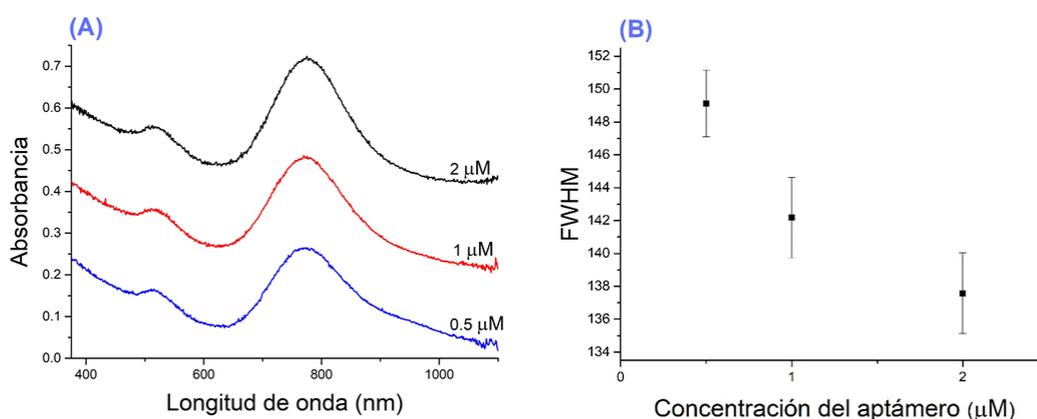


Figura 11. (A) Espectro Vis-NIR de las nanovarillas funcionalizadas a diferentes concentraciones del aptámero. (B) FWHM de la banda a $\lambda = 785$ nm según la concentración del aptámero.

La adición de NaCl se realizó en dos tandas para evitar el choque electrostático en lugar de una sola ya que haría posible la agregación de las nanoestructuras.⁷⁹ Además, esto ayuda a disminuir las repulsiones hidrofílicas propias de la cadena de ADN y facilita una mayor funcionalización de la superficie de la nanoestructura.⁵⁹ Además, luego de cada adición, se realiza una corta sonicación la cual se piensa que ayuda a romper la interacción entre la hebra y la superficie de la nanovarilla. Esto promueve el acceso de más hebras hacia la superficie.⁵⁹

3.2.2 Detección de OTA mediante espectroscopía de Raman

Previo al análisis de las muestras con OTA, se identificaron las señales vibracionales propias del aptámero. En la figura 12 y la tabla 6, se muestra el espectro Raman de los aptámeros adsorbidos en la superficie de las nanovarillas de oro previamente centrifugadas y la asignación de las señales, respectivamente.

Siendo el aptámero selectivo a OTA un oligonucleótido con 17 guaninas, no es de sorprender que la mayor parte de las señales corresponden a los modos vibracionales de dicha base nitrogenada. Resaltan también las señales de la adenina y timina, como también de los grupos fosfato característicos de la hebra de ADN.

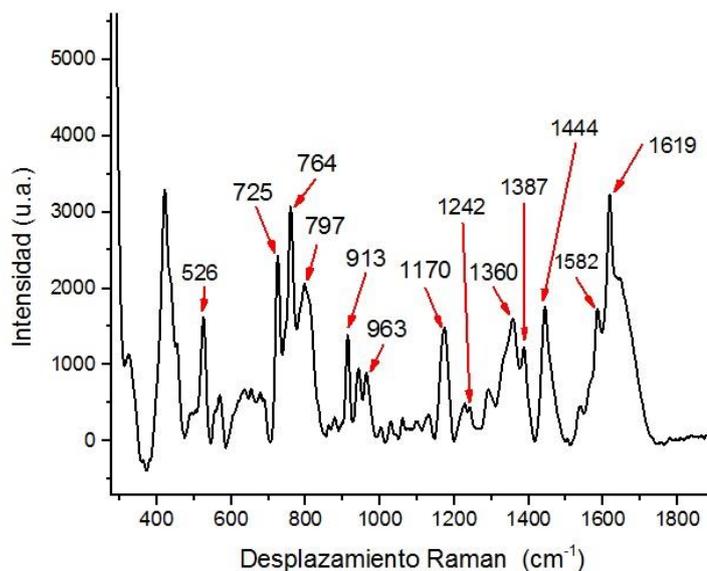


Figura 12. Espectro Raman de la nanovarilla de oro funcionalizada con el aptámero con centrifugación previa.

Tabla 6. Señales Raman características del aptámero.

Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Asignación	Referencia
497	PO ₂ ⁻ , dT	80
526	G	81
678	G	82
724	A	82
764	Estiramiento OPO	81
797	Estiramiento simétrico OPO	83
894	Vibración del azúcar	83
913	G, vibración del azúcar	81
963	Estiramiento CC y/o CO	82
1100	Estiramiento simétrico OPO	83
1170	Vibración CN	84
1242	dT, estiramiento CN	83
1360	G (N2)C2 - endo/anti	85,86
1387	Estiramiento del anillo G	87
1444	Flexión CH ₂	82
1460	Flexión CH ₂	82
1582	Estiramiento dG	83
1619	Estiramiento CO	87

Antes de continuar con el desarrollo del sensor, se deseaba saber si era posible detectar algún cambio en las señales del aptámero al encontrarse en contacto con

OTA (1 μM). Para ello, se analizó la interacción a distintos tiempos en los cuales se observan cambios en algunas señales (región sombreada) luego de por lo menos 16 minutos después de iniciada la interacción tal como se muestra en la figura 13. Se registran cambios en los siguientes rangos espectrales: 490 cm^{-1} a 515 cm^{-1} , 610 cm^{-1} a 680 cm^{-1} , 710 cm^{-1} a 735 cm^{-1} . Debido a ello, en los ensayos posteriores, entre el sensor y la toxina, se registró el espectro después de 16 minutos de estar bajo agitación.

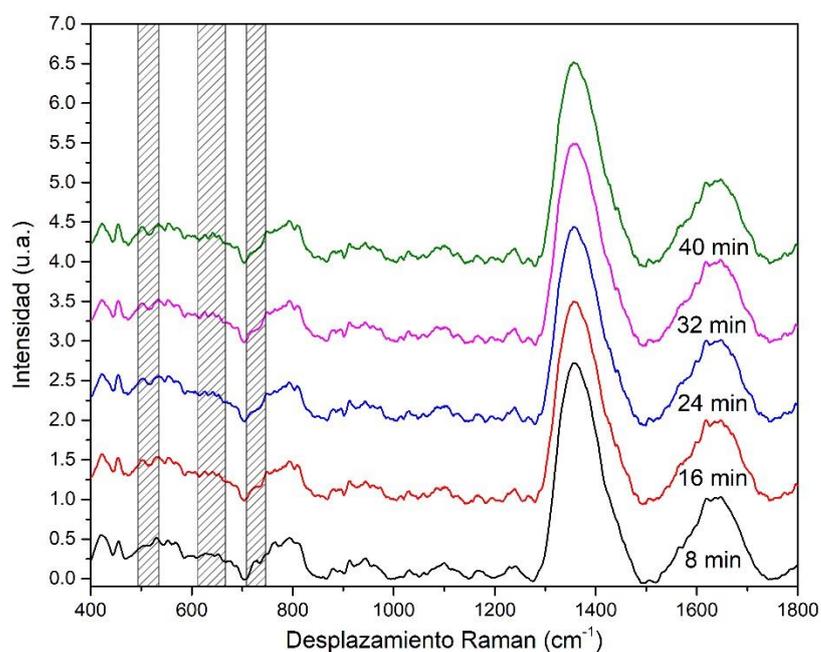


Figura 13. Espectros Raman de la interacción entre AuNR@Apt y OTA a diferentes tiempos. Los espectros se muestran desfasados en el eje Y a fin de facilitar la visualización de la variación en las señales.

Debido a que en el proceso de fabricación del sensor se involucra la funcionalización con el MET, se determinó también las señales Raman pertenecientes a dicha molécula (ver Figura 14 y tabla 7).

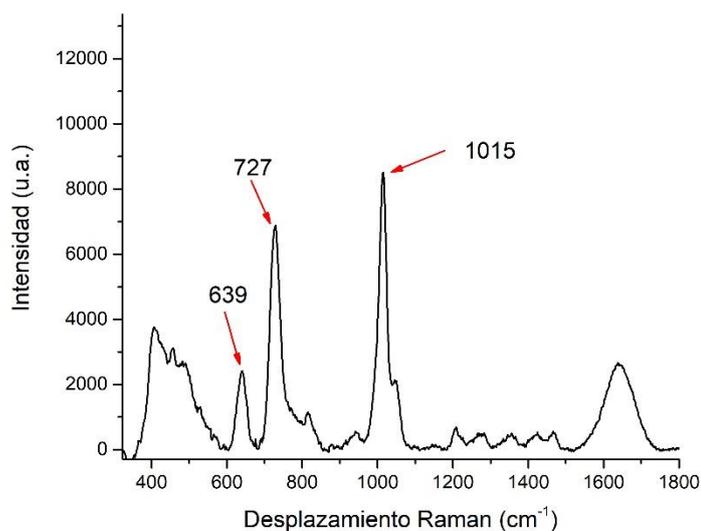


Figura 14. Espectro Raman del MET adsorbido en la superficie de las AuNRs.

Tabla 7. Señales Raman características del MET.

Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Asignación	Referencia
639	Estiramiento CS	88
727	Estiramiento CS	88
1015	Estiramiento CCO	88

En la figura 15, es posible identificar más fácilmente las diferencias espectrales entre AuNR@Apt (espectro rojo), AuNR@MET (espectro azul) y AuNR@Apt@MET (espectro negro). Se ve cómo las bandas pertenecientes al MET, indicadas por las regiones sombreadas en la figura 15, ocultan parte de las señales del aptámero.

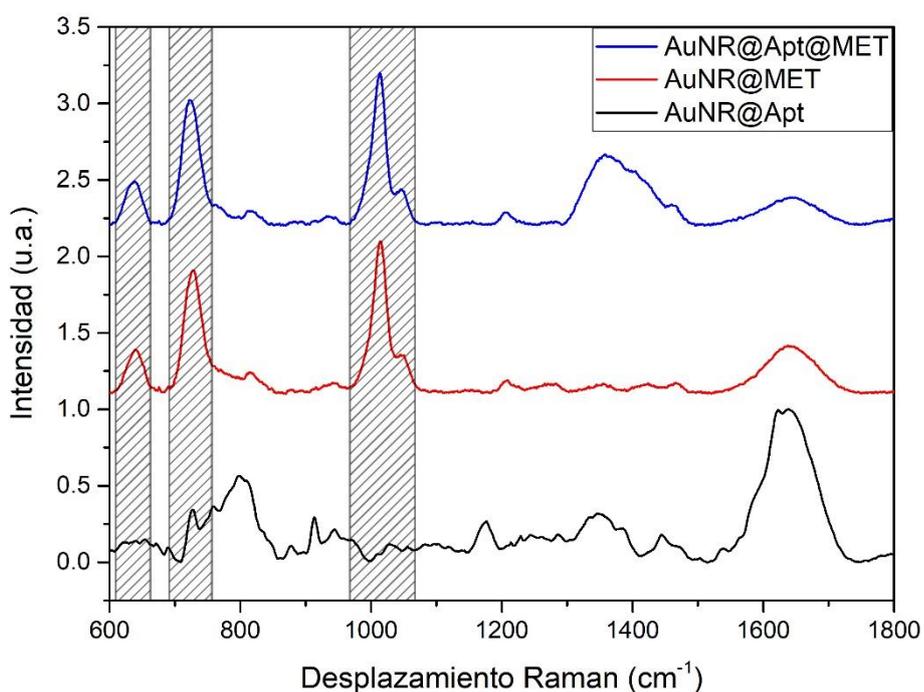


Figura 15. Comparación de los espectros Raman de AuNR@Apt, AuNR@MET, y AuNR@Apt@MET. Las regiones sombreadas corresponden a las señales del MET.

3.2.3 Detección de OTA mediante espectroscopía UV-Vis-NIR

Mediante el uso de la espectroscopía UV-Vis-NIR se visualiza un desplazamiento de la banda plasmónica longitudinal. En la figura 16, se puede apreciar una serie de experimentos realizados con OTA a diferentes concentraciones donde el cambio en la banda plasmónica no es fácil de detectar a simple vista y por lo tanto requiere de un análisis quimométrico para armar la curva de calibrado.

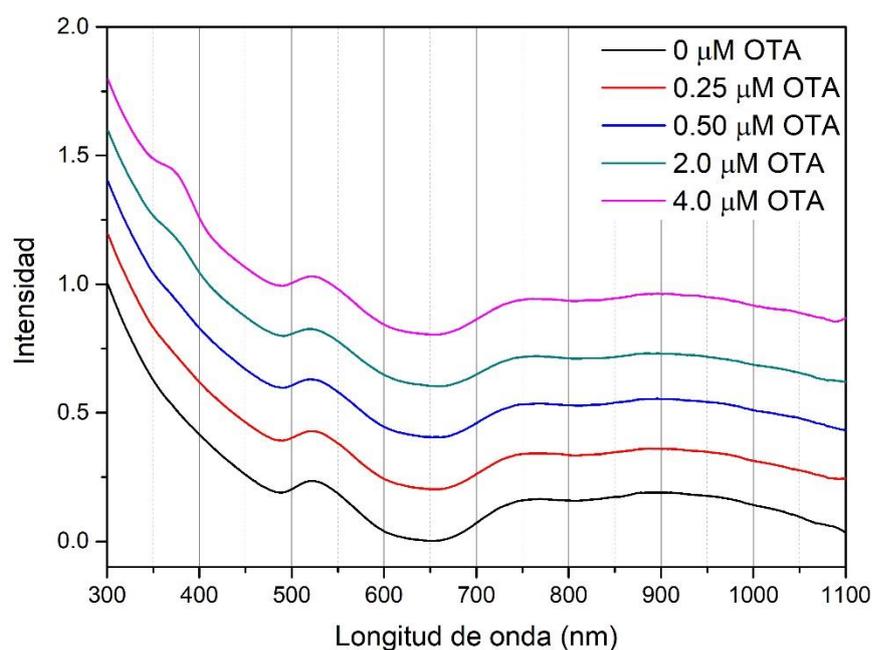


Figura 16. Espectros UV-Vis-NIR del sensor a diferentes concentraciones de OTA.

Si bien se emplearon ambas técnicas espectroscópicas para la construcción de la recta de calibración de la toxina, la información obtenida por los espectros Raman es mucho más rica que los obtenidos por UV-Vis y permite discriminar mejor las interacciones no específicas.

3.3 Calibración multivariante

Los espectros UV-Vis-NIR y Raman tanto del sensor como de los controles a diferentes concentraciones de la toxina fueron analizados por PLS. Se empleó distintos tipos de preprocesamiento para evaluar cuál resulta en un modelo con una mejor predicción. En la tabla 8, se muestran, para ambas espectroscopías, los resultados estadísticos del modelo obtenido a partir de los diferentes preprocesamientos aplicados a los espectros. El menor valor de RMSECV determina el preprocesamiento adecuado para obtener el mejor modelo y el valor del coeficiente de correlación complementa dicha elección. Para ambas técnicas espectroscópicas, el preprocesamiento seleccionado se encuentra resaltado en rojo y muestran tanto un menor valor de RMSECV y un alto coeficiente de correlación. En el caso de los controles se observa que en ninguno de los casos los modelos logran alcanzar valores de RMSECV menores de 0.65 o de R^2 mayores a 0.83. Esto último es esperado ya que los controles no se encuentran modificados con los

aptámeros y por lo tanto no debe existir correlación alguna a las diferentes concentraciones de la toxina que se ha empleado.

Tabla 8. Resultados estadísticos del modelo PLS para los espectros UV-Vis-NIR y Raman.

		Datos empleados	Preprocesamiento*	Variables latentes	RMSECV	R ²
UV-Vis-NIR	Sensor	22	1	4	0.25	0.96
			2	5	0.34	0.94
			3	7	1.50	0.01
			4	6	0.50	0.92
	Control	25	1	6	1.18	0.31
			2	4	0.65	0.83
			3	6	2.13	0.16
			4	3	1.32	0.17
Raman	Sensor	20	1	5	0.44	0.90
			2	8	1.13	0.59
			3	5	1.21	0.27
			4	5	0.79	0.73
	Control	16	5	7	1.29	0.26
			6	5	1.17	0.38
			3	7	1.84	0
			4	5	1.27	0.25

*Tipos de procesamiento: (1) baseline, normalize, smoothing; (2) mean center, normalize, smoothing; (3) derivative (2° derivada, orden 5ta polinomial), normalize; (4) baseline, normalize, autoscale; (5) smoothing, baseline, normalize; (6) mean center, baseline, normalize.

En la figura 17, se muestran los modelos de cuantificación desarrollados para ambas espectroscopías utilizando el análisis multivariante basado en PLS. Si bien tanto el control como el sensor muestran valores cercanos de R² cercanos a 1, los errores relacionados con las distintas concentraciones son mayores en los controles que en los sensores. Y en el caso particular de Raman, en el control no es posible discriminar entre las concentraciones de 0 y 0.25 µM de la toxina.

Por otro lado, se puede ver que a bajas concentraciones de la toxina (0.25 µM – 0.50 µM), hay una menor discriminación en el caso de la espectroscopía UV-Vis-NIR en comparación con la de Raman. Esto es importante, ya que, si se desea realizar un análisis exploratorio de una muestra problema, se sugeriría iniciar con un ensayo mediante espectroscopía UV-Vis-NIR ya que este análisis es más rápido en comparación con el de Raman; y además, te otorga un resultado

preliminar de la concentración de OTA de la muestra que si no resulta satisfactorio, se procedería a analizar la muestra mediante Raman.

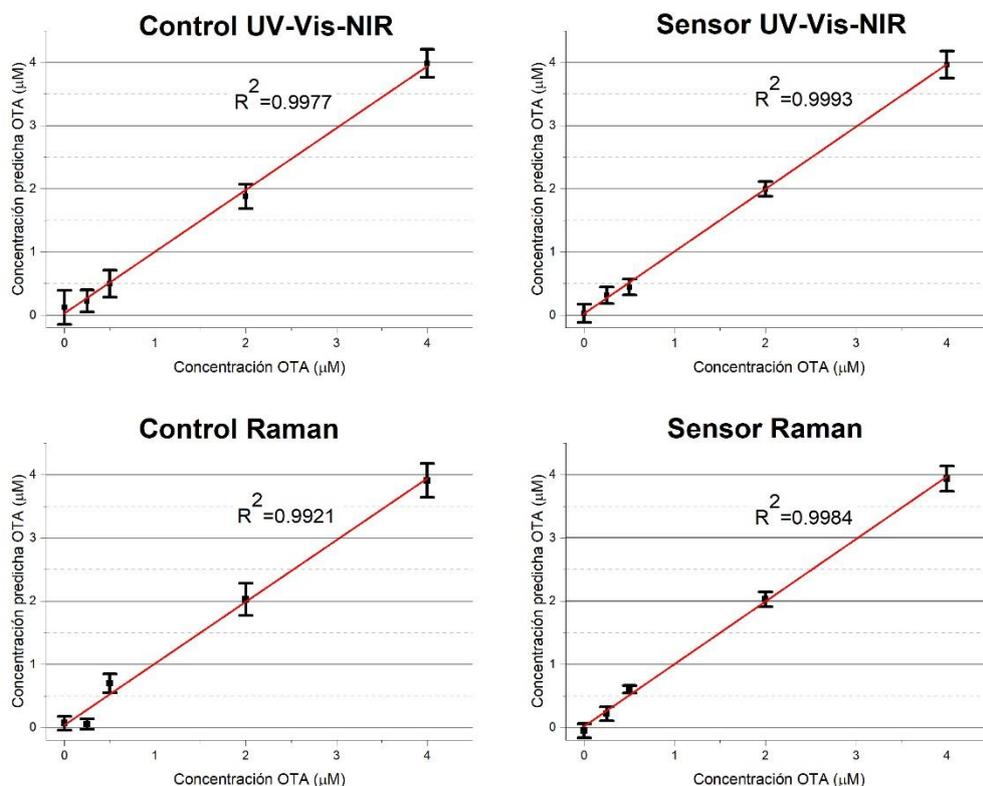


Figura 17. Modelos de cuantificación desarrollados utilizando los espectros UV-Vis-NIR y Raman.

Una de las ventajas del uso de la espectroscopía Raman es que ofrece un espectro lleno de señales vibracionales del analito en estudio. En esta investigación, las dos primeras variables latentes son responsables de explicar mejor el modelo (92.1%). Se han identificado las señales más relevantes que provienen de dicha variable (figura 18, tabla 9) que influyen en el desarrollo del modelo.

En la gráfica de las variables latentes 1 y 2 (*loading plot*) es posible identificar las señales espectrales relacionadas al modelo de cuantificación (figura 18, arriba). Los valores de los *loadings* positivos indican una relación directamente proporcional a la concentración de OTA en el modelo; y los negativos, una relación inversa. Si bien parecería que la variable latente 1 es la opuesta a la variable latente 2, la suma de ambas (figura 18, abajo) presenta algunas diferencias. En la figura 18, se han resaltado algunas de las señales Raman del aptámero y del MET por ser las que

más influyen en el desarrollo del modelo de cuantificación. La tabla 9 resume estos valores y describe los modos vibracionales responsables.

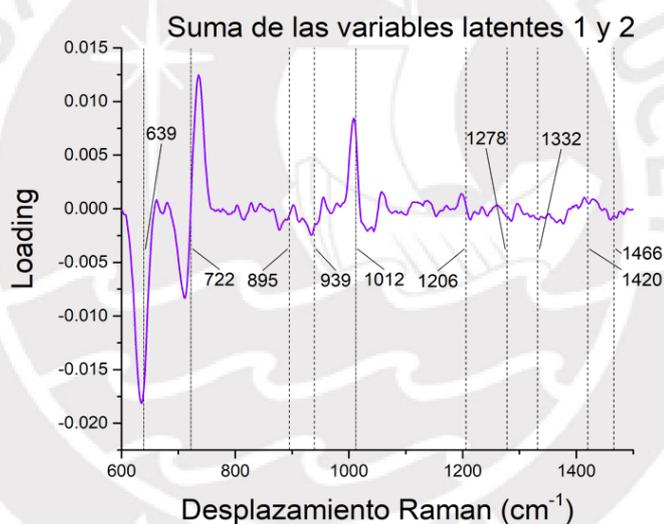
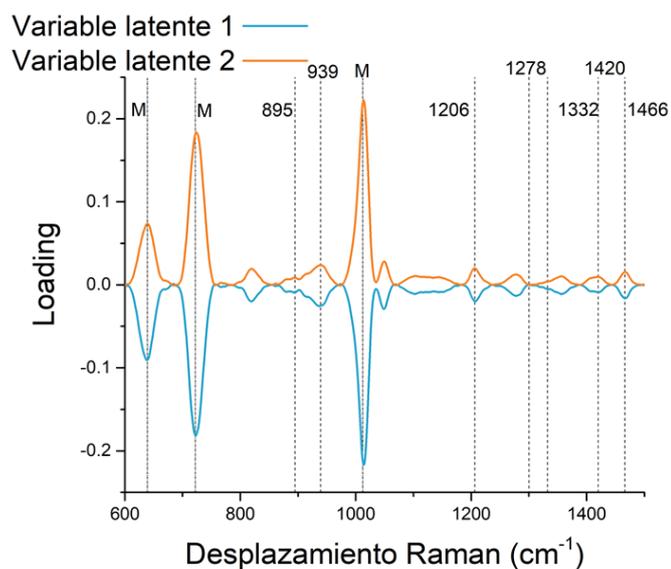
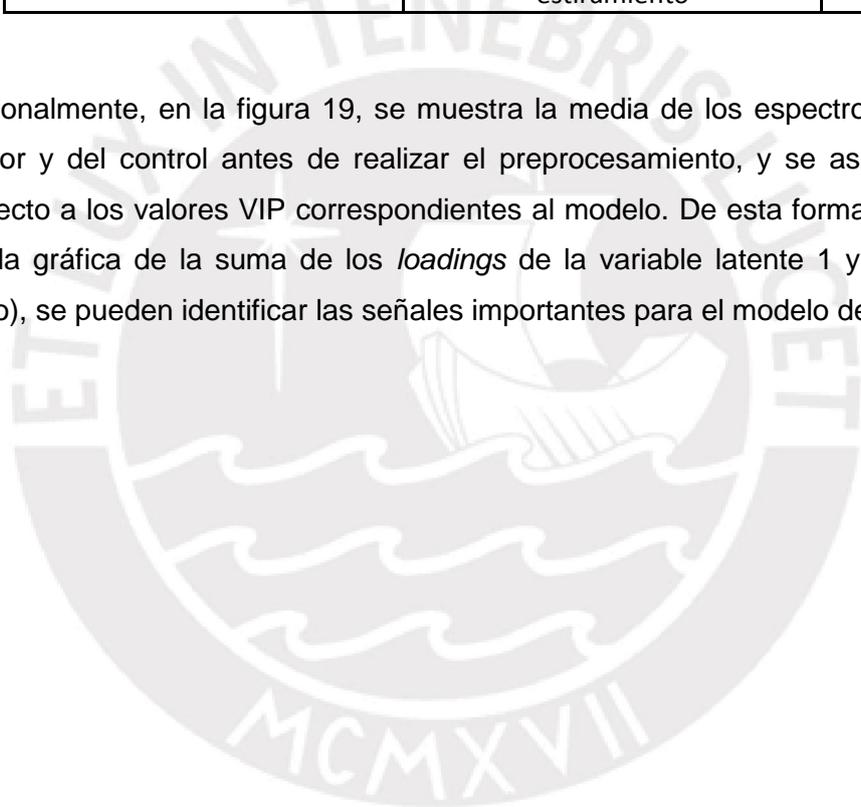


Figura 18. Arriba: dos primeras variables latentes del modelo desarrollado a partir de los espectros Raman. Las señales indicadas con «M» son las que provienen del MET. Abajo: suma de las dos primeras variables latentes.

Tabla 9. Señales Raman características de las variables latentes del modelo desarrollado a partir de los espectros Raman.

Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Asignación	Referencia
639	Estiramiento CS de MET	88
722	Estiramiento CS de MET	88
895	Vibración asimétrica del azúcar	80
939	Vibración simétrica del azúcar	80
1012	Estiramiento COO de MET	88
1206	dT (C2'-endo/anti)	80
1278	CH – deformación de la timina	83
1332	dG (C2'-endo/anti)	83
1420	C5'H2 deformación en C2' endo	83
1466	dT C4=O4 def (H-bond), C5=C6 estiramiento	80

Adicionalmente, en la figura 19, se muestra la media de los espectros Raman del sensor y del control antes de realizar el preprocesamiento, y se asigna un color respecto a los valores VIP correspondientes al modelo. De esta forma, al igual que con la gráfica de la suma de los *loadings* de la variable latente 1 y 2 (figura 18, abajo), se pueden identificar las señales importantes para el modelo desarrollado.



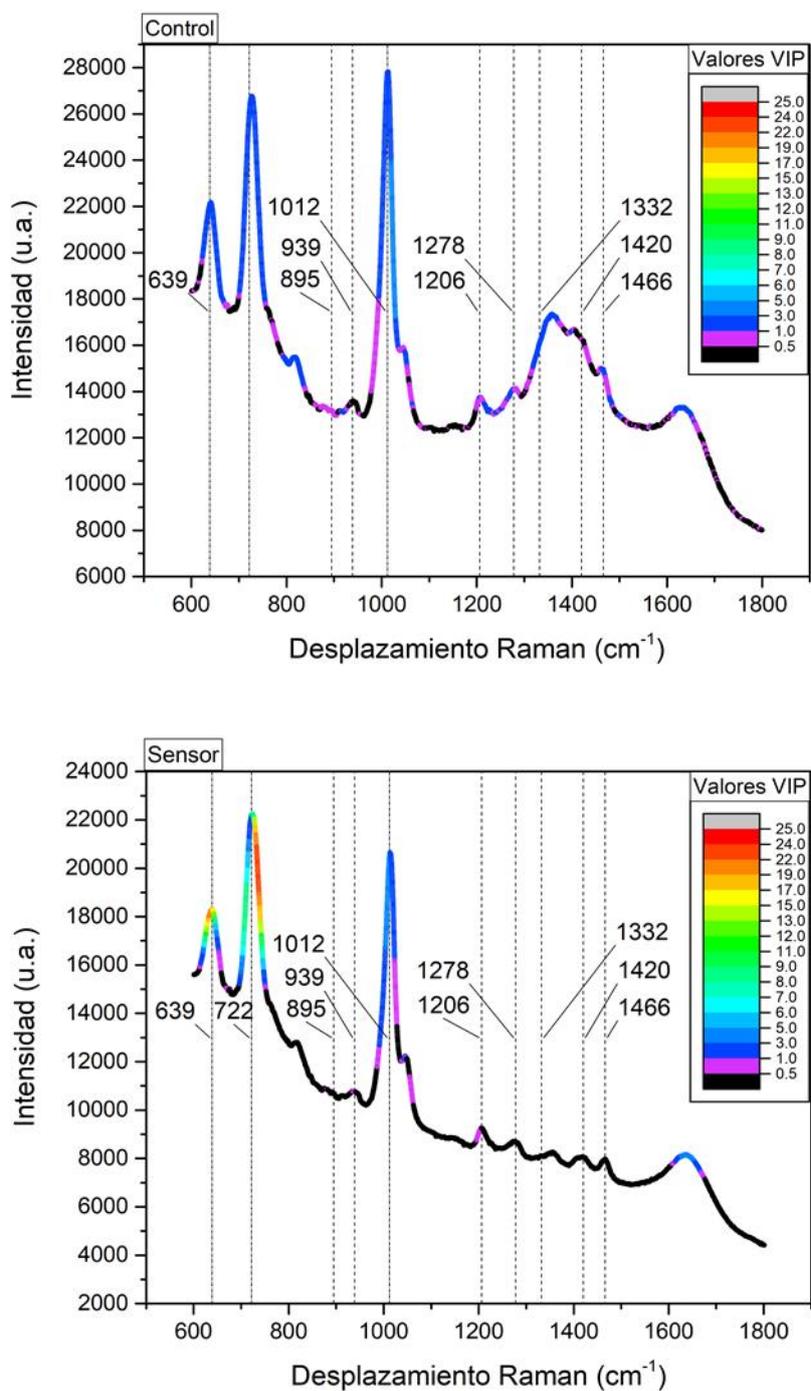


Figura 19. Valores VIP de la media de los espectros Raman del control y del sensor antes de proceder con el preprocesamiento.

Si bien las señales del MET contribuyen en el modelo de cuantificación (639, 727, 1015 cm⁻¹), su influencia es mínima en el modelo desarrollado con los espectros Raman del control (valores de VIP < 3). Además, existe un ligero ensanchamiento

de dichas señales lo cual lleva a pensar que los responsables de dichos efectos son las señales provenientes del aptámero.

Por otro lado, también es posible identificar las señales provenientes del aptámero que son importantes para el modelo. En el rango de $1195 - 1203 \text{ cm}^{-1}$ es posible asignar la señal a dT.⁸⁰ De la misma forma, en el rango de $1608 - 1676 \text{ cm}^{-1}$ es asignado a dG y dT.⁸⁰



Capítulo 4: Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Se logró sintetizar y caracterizar nanovarillas de oro de 54.2 ± 6.7 nm x 16.9 ± 3.5 nm a partir del protocolo reportado por Ratto y colaboradores.
- Se desarrolló un biosensor que permite la detección de ocratoxina A mediante la funcionalización de las nanovarillas con aptámeros selectivos de OTA. El proceso optimizado en este trabajo contempla una doble centrifugación de las nanovarillas, la incubación de estas en una solución $2 \mu\text{M}$ del aptámero, añadiendo cloruro de sodio en dos pasos y, finalmente la adsorción de 2-mercaptoetanol como agente de relleno. Mediante la espectroscopía UV-Vis-NIR y Raman se pueden monitorear todas las etapas de desarrollo del biosensor.
- El empleo del método de regresión multivariante de mínimos cuadrados parciales en el procesamiento de los datos resultó una estrategia apropiada para la construcción de un modelo de cuantificación de OTA a partir de los análisis realizados por espectroscopía UV-Vis-NIR y espectroscopía Raman. Es posible llegar a detectar hasta 100 ppb ($0.25 \mu\text{M}$) mediante la espectroscopia Raman; mientras que por la espectroscopía UV-Vis-NIR, es posible discernir a partir de los 800 ppb ($2 \mu\text{M}$).
- Se obtuvo un biosensor bimodal para la detección de ocratoxina A. Es posible realizar ensayos preliminares por medio de la espectroscopía UV-Vis-NIR, y poder confirmarlo mediante cambios en las señales vibracionales de los espectros Raman en menos de 25 minutos.

4.2 Recomendaciones

- Si bien se logró desarrollar un proceso de preparación de nanosensores aptaméricos para la detección de OTA, se recomienda evaluar si el aumento de las tandas de la adición del cloruro de sodio mejora la adsorción del aptámero en la superficie de las nanovarillas sin perder sensibilidad de detección. Del mismo modo, en cuanto al aptámero, es posible modificar la composición del espaciador o intercambiar el extremo de la secuencia de reconocimiento a la cual se encuentra ligada al espaciador. Por último, el MET podría ser reemplazado por otra molécula tiolada que desempeñe la misma función, como el ácido mercaptopropiónico, pero que no llegue a ocultar las bandas espectrales propias del aptámero.
- Contemplar otros métodos de detección de la toxina con este biosensor a fin de identificar concentraciones de OTA más bajas. Por ejemplo: aumentando la concentración del biosensor, modificando el espaciador del aptámero, o la adición de nanopartículas de oro funcionalizadas con una hebra complementaria del aptámero específico para OTA.
- Se debe evaluar el desempeño del sensor en muestras reales. Es importante mencionar que el proceso de extracción de OTA en alimentos se realiza en un medio orgánico, y que es importante el contemplar la transición a un medio acuoso para determinar el contenido de esta micotoxina mediante el uso de este tipo de biosensores.

Capítulo 5: Referencias bibliográficas

- (1) Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516.
- (2) Zinedine, A.; Mañes, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control.* **2009**, *20*, 334–344.
- (3) Ashiq, S. Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Food Sci. Technol.* **2015**, *14*, 159–175.
- (4) Lenz, C. A.; Rychlik, M. Efficient synthesis of (R)-ochratoxin alpha, the key precursor to the mycotoxin ochratoxin A. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 883–886.
- (5) Heussner, A. H.; Bingle, L. E. H. Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data. *Toxins (Basel).* **2015**, *7*, 4253–4282.
- (6) Ravelo Abreu, A.; Rubio Armendáriz, C.; Gutiérrez Fernández, A. J.; Hardisson de la Torre, A. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: Revisión. *Nutr. Hosp.* **2011**, *26*, 1215–1226.
- (7) Batista, L. R.; Chalfoun, S. M.; Silva, C. F.; Cirillo, M.; Varga, E. A.; Schwan, R. F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control.* **2009**, *20*, 784–790.
- (8) Bellver Soto, J.; Fernández-Franzón, M.; Ruiz, M. J.; Juan-García, A. Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern european countries: wine and beer. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 7643–7651.
- (9) Yuan, J.; Deng, D.; Lauren, D. R.; Aguilar, M.-I.; Wu, Y. Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages. *Anal. Chim. Acta.* **2009**, *656*, 63–71.
- (10) Turner, N. W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta.* **2009**, *632*, 168–180.
- (11) el Khoury, A. E.; Atoui, A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins (Basel).* **2010**, *2*, 461–493.
- (12) Pittet, A.; Royer, D. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 µg/kg. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 243–247.
- (13) Tessini, C.; Mardones, C.; Baer, D. Von; Vega, M.; Herlitz, E.; Saelzer, R.; Silva, J.; Torres, O. Analytica Chimica Acta Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of Ochratoxin A in red wine using fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, *660*, 119–126.
- (14) Fabiani, A.; Corzani, C.; Arfelli, G. Correlation between different clean-up methods and analytical techniques performances to detect ochratoxin A in wine. *Talanta.* **2010**, *83*, 281–285.
- (15) Giovannoli, C.; Passini, C.; Nardo, F. Di; Anfossi, L.; Baggiani, C. Determination of ochratoxin A in italian red wines by molecularly imprinted solid phase extraction and HPLC analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5220–5225.
- (16) Lee, H. J.; Ryu, D. Significance of ochratoxin A in breakfast cereals from the

United States. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9404–9409.

- (17) Studer-Rohr, I.; Dietrich, D. .; Schlatter, J.; Schlatter, C. Research section the occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 341–355.
- (18) Kaushik, A.; Arya, S. K.; Vasudev, A.; Bhansali, S. Recent advances in detection of ochratoxin-A. *J. Appl. Biosens.* **2013**, *2*, 1–11.
- (19) Jiao, Y.; Blaas, W.; Rühl, C.; Weber, R. Short communication identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1992**, *595*, 364–367.
- (20) Pittet, A.; Tornare, D.; Huggett, A.; Viani, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3564–3569.
- (21) Warth, B.; Parich, A.; Atehnkeng, J.; Bandyopadhyay, R.; Schuhmacher, R.; Sulyok, M.; Krska, R. Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9352–9363.
- (22) Han, Z.; Zhao, Z.; Shi, J.; Liao, Y.; Zhao, Z.; Zhang, D.; Wu, Y.; De Saeger, S.; Wu, A. Combinatorial approach of LC-MS/MS and LC-TOF-MS for uncovering in vivo kinetics and biotransformation of ochratoxin A in rat. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *925*, 46–53.
- (23) Rubert, J.; Soler, C.; Mañes, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC-MS/MS. *Talanta.* **2011**, *85*, 206–215.
- (24) Gago Cabezas, L.; Ruiz Galán, O.; García Iglesias, E.; González Rumayor, V. *Aplicaciones de Biosensores En La Industria Agroalimentaria*, Informe de.; Madrid, 2005.
- (25) Smuc, T.; Ahn, I.; Ulrich, H. Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensorics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *82*, 210–217.
- (26) Sassanfer, M.; Szostak, J. W. An ARN motif that binds ATP. *Nature.* **1993**, *364*, 550–553.
- (27) Geiger, A.; Burgstaller, P.; Eltz, H. Von Der; Roeder, A.; Famulok, M. RNA aptamers that bind L -arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1029–1036.
- (28) Jayasena, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628–1650.
- (29) Cruz-Aguado, J.; Penner, G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10456–10461.
- (30) Barthelmebs, L.; Jonca, J.; Hayat, A.; Prieto-Simon, B.; Marty, J. L. Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control.* **2011**, *22*, 737–743.
- (31) Duan, N.; Wu, S.; Ma, X.; Chen, X.; Huang, Y.; Wang, Z. Gold nanoparticle-based fluorescence resonance energy transfer aptasensor for ochratoxin A detection. *Anal. Lett.* **2012**, *45*, 714–723.
- (32) Murat, P.; Balasubramanian, S. Existence and consequences of G-

- quadruplex structures in DNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2014**, *25*, 22–29.
- (33) 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*, 2724–2727.
- (34) Chambers, V. S.; Marsico, G.; Boutell, J. M.; Antonio, M. Di; Smith, G. P.; Balasubramanian, S. High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 877–881.
- (35) Tucker, W. O.; Shum, K. T.; Tanner, J. A. G-quadruplex DNA aptamers and their ligands: structure, function and application article in current pharmaceutical design. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2014–2026.
- (36) Tan, Y.; Wei, X.; Zhang, Y.; Wang, P.; Qiu, B.; Guo, L.; Lin, Z.; Yang, H. H. Exonuclease-catalyzed target recycling amplification and immobilization-free electrochemical aptasensor. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11826–11831.
- (37) Xiao, S.; Zhang, J. Y.; Zheng, K. W.; Hao, Y. H.; Tan, Z. Bioinformatic analysis reveals an evolutionary selection for DNA:RNA hybrid G-quadruplex structures as putative transcription regulatory elements in warm-blooded animals. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 10379–10390.
- (38) Bearss, D. J.; Hurley, L. H.; Ho, D. D. Von. Telomere maintenance mechanisms as a target for drug development. *Oncogene.* **2000**, *19*, 6632–6641.
- (39) Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 181–202.
- (40) Sethi, M.; Joung, G.; Knecht, M. R. Stability and electrostatic assembly of Au nanorods for use in biological assays. *Langmuir.* **2009**, *25*, 317–325.
- (41) Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **2017**.
- (42) Li, L.; Hutter, T.; Finnemore, A. S.; Huang, F. M.; Baumberg, J. J.; Elliott, S. R.; Steiner, U.; Mahajan, S. Metal oxide nanoparticle mediated enhanced Raman scattering and its use in direct monitoring of interfacial chemical reactions. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 4242–4246.
- (43) Rana, S.; Yeh, Y.-C.; Rotello, V. M. Engineering the nanoparticle–protein interface: applications and possibilities. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 828–834.
- (44) Yang, X.; Yang, M.; Pang, B.; Vara, M.; Xia, Y.; States, U. Gold nanomaterials at work in biomedicine. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10410–10488.
- (45) Lal, S.; Link, S.; Halas, N. J. Nano-optics from sensing to waveguiding. *Nat. Photonics.* **2007**, *1*, 641–648.
- (46) Yu, C.; Irudayaraj, J. Multiplex biosensor using gold nanorods. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 572–579.
- (47) Jiang, Z.; Wen, G.; Luo, Y.; Zhang, X.; Liu, Q.; Liang, A. A new silver nanorod SPR probe for detection of trace benzoyl peroxide. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–7.
- (48) Verma, S. S.; Sekhon, J. S. Influence of aspect ratio and surrounding medium on localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold nanorod. *J. Opt.* **2012**, *41*, 89–93.
- (49) Seo, S. S.; Wang, X.; Murray, D. Direct monitoring of gold nanorod growth.

Ionics. **2009**, *15*, 67–71.

- (50) Bell, S. E. J.; Sirimuthu, N. M. S. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for sub-micromolar detection of DNA/RNA mononucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15580–15581.
- (51) Sylvia, J. M.; Janni, J. A.; Klein, J. D.; Spencer, K. M. Surface-enhanced Raman detection of 2,4-dinitrotoluene impurity vapor as a marker to locate landmines. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5834–5840.
- (52) Lau, D.; Livett, M.; Praver, S. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) to the analysis of natural resins in artworks. *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39*, 545–552.
- (53) Shafer-peltier, K. E.; Haynes, C. L.; Glucksberg, M. R.; Duyne, R. P. Van. Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 588–593.
- (54) Jensen, L.; Aikens, M.; Schatz, G. C. Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1061–1073.
- (55) Morton, S. M.; Silverstein, D. W.; Jensen, L. Theoretical studies of plasmonics using electronic structure methods. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3962–3994.
- (56) Abbas, A.; Tian, L.; Morrisei, J.; Kharasch, E.; Singamanemi, S. Hot spot-localized artificial antibodies for label-free plasmonic biosensing. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 1789–1797.
- (57) Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904–2074.
- (58) Smith, D. K.; Korgel, B. A. The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-mediated synthesis of gold nanorods. *Langmuir*. **2008**, *24*, 644–649.
- (59) Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8313–8318.
- (60) Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959–1964.
- (61) Xu, Q.; Lou, X.; Wang, L.; Ding, X.; Yu, H.; Xiao, Y. Rapid, surfactant-free, and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA under physiological pH and its application in molecular beacon-based biosensor. *Appl. Mater. Interfaces*. **2016**, *8*, 27298–27304.
- (62) Lee, K. M.; Herrman, T. J.; Yun, U. Application of Raman spectroscopy for qualitative and quantitative analysis of aflatoxins in ground maize samples. *J. Cereal Sci.* **2014**, *59*, 70–78.
- (63) Lee, K. M.; Herrman, T. J. Determination and prediction of fumonisin contamination in maize by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Food Bioprocess Technol.* **2016**, *9*, 588–603.
- (64) Jaiswal, P.; Jha, S. N.; Kaur, J.; Borah, A.; Ramya, H. G. Detection of aflatoxin M1 in milk using spectroscopy and multivariate analyses. *Food*

Chem. **2018**, 238, 209–214.

- (65) Advanced preprocessing: noise, offset, and baseline filtering http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Advanced_Preprocessing:_Noise,_Offset,_and_Baseline_Filtering (acceso: Feb 22, 2018).
- (66) Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 1627–1639.
- (67) Naes, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*; NIR Publications: Chichester, UK, 2004.
- (68) Using Cross-Validation http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Using_Cross-Validation (acceso: Feb 4, 2018).
- (69) Carnegie Mellon University - Statistics & Data Science Department. Evaluating Statistical Models <http://www.stat.cmu.edu/~cshalizi/402/lectures/03-evaluation/lecture-03.pdf> (acceso: Mar 11, 2018).
- (70) Pauli, E. D.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S. UV-Vis spectral fingerprinting and chemometric method applied to the evaluation of *Camellia sinensis* leaves from different harvests. *Anal. Methods.* **2016**, 8, 7537–7544.
- (71) Oussama, A.; Elabadi, F.; Platikanov, S.; Kzaiber, F.; Tauler, R. Detection of olive oil adulteration using FT-IR spectroscopy and PLS with variable importance of projection (VIP) scores. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, 89, 1807–1812.
- (72) Galarreta, B. C.; Tabatabaei, M.; Guieu, V.; Peyrin, E.; Lagugn -Labarthe, F. Microfluidic channel with embedded SERS 2D platform for the aptamer detection of ochratoxin A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 1613–1621.
- (73) Ratto, F.; Matteini, P.; Rossi, F. Size and shape control in the overgrowth of gold nanorods. *J. Nanopart. Res.* **2010**, 12, 2029–2036.
- (74) Williams, D. B.; Carter, C. B. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science.* Springer. **2009**, 372–375.
- (75) Rayavarapu, R. G.; Petersen, W.; Ungureanu, C.; Post, J. N.; Van Leeuwen, T. G.; Manohar, S. Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques. *Int. J. Biomed. Imaging.* **2007**, DOI: 10.1155/2007/29817.
- (76) Tong, W.; Walsh, M. J.; Mulvaney, P.; Etheridge, J.; Funston, A. M. Control of symmetry breaking size and aspect ratio in gold nanorods: underlying role of silver nitrate. *J. Phys. Chem. C.* **2017**, 121, 3549–3559.
- (77) Shi, D.; Song, C.; Jiang, Q.; Wang, Z.-G.; Ding, B. A facile and efficient method to modify gold nanorods with thiolated DNA at a low pH value. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2533–2535.
- (78) Oliveira, J. P.; Prado, A. R.; Keijok, W. J.; Ribeiro, M. R. N.; Pontes, M. J.; Nogueira, B. V.; Guimarães, M. C. C. A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. *Arab. J. Chem.* **2016**, DOI: 10.1016/j.arabjc.2017.04.003.
- (79) Christau, S.; Moeller, T.; Genzer, J.; Koehler, R.; Von Klitzing, R. Salt-induced aggregation of negatively charged gold nanoparticles confined in a polymer brush matrix. *Macromolecules.* **2017**, 50, 7333–7343.

- (80) Friedman, S. J.; Terentis, A. C. Analysis of G-quadruplex conformations using Raman and polarized Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **2016**, *47*, 259–268.
- (81) Nishimura, Y.; Tsuboi, M. Conformation-sensitive Raman lines of mononucleotides and their use in a structure analysis of polynucleotides: guanine and cytosine nucleotides. *J. Mol. Struct.* **1986**, *146*, 123–153.
- (82) Prescott, B.; Steinmetz, W.; Thomas, G. J. Characterization of DNA structures by laser Raman spectroscopy. *Biopolymers.* **1984**, *23*, 235–256.
- (83) Pagba, C. V.; Lane, M.; Wachsmann-hogiu, S. Raman and surface-enhanced Raman spectroscopic studies of the 15-mer DNA thrombin-binding aptamer. *J. Raman Spectrosc.* **2010**, *41*, 241–247.
- (84) Rappoport, D.; Shim, S. Simplified sum-over-states approach for predicting resonance. *Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 1254–1260.
- (85) Breuzard, G.; Millot, J.; Manfait, M. Selective interactions of ethidiums with G-quadruplex DNA revealed by surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4305–4311.
- (86) Wei, C.; Jia, G.; Yuan, J.; Feng, Z.; Li, C. A spectroscopic study on the interactions of porphyrin with G-quadruplex DNAs. *Biochemistry.* **2006**, *3*, 6681–6691.
- (87) Lafleur, L.; Rice, J.; Thomas, G. J. Raman studies of nucleic acids. VII. Poly A, poly U and poly G, poly C. *Biopolymers.* **1972**, *11*, 2423–2437.
- (88) Kudelski, A. Chemisorption of 2-mercaptoethanol on silver, copper and gold: direct Raman evidence of acid-induced changes in adsorption/desorption equilibria. *Langmuir.* **2003**, *19*, 3805–3813.