



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN
FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
SEDE CONCEPCIÓN

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE
AFLATOXINA B1 EN PIENSO PARA BOVINO LECHERO
BASADO EN UN APTA-NANOBIOSENSOR

Tesis para optar al grado de Magíster en Innovación en Biociencias y
Bioingeniería

Profesor guía: Dr. Víctor Manuel Díaz García

Profesora cotutora: Dra. Gisela Alejandra Ríos Gajardo

Estudiante: Braulio Iván Contreras Trigo

© Braulio Iván Contreras Trigo.

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Concepción, Chile

2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padres, hermanos, esposa, hijos y colegas por el apoyo en el desarrollo de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

Páginas preliminares

Resumen

Abstract

Introducción 1

Marco teórico 2

Características de las aflatoxinas 2.1

Impacto de las aflatoxinas sobre la salud humana 2.1

Impacto de las aflatoxinas sobre la salud del ganado bovino 2.3

Efecto económico de las aflatoxinas 2.4

Metodologías de detección de aflatoxina B1 2.5

Hipótesis 3

Objetivos 4

Objetivo general 4.1

Objetivos específicos 4.2

Materiales y métodos 5

Preparación de apta-nanosensor 5.1

Caracterización de nanopartículas de oro y apta-nanosensor 5.2

Tratamiento de la muestra 5.3

Extracción de aflatoxina B1 5.3

Ensayo de detección de aflatoxina B1 5.5

Análisis de resultados 5.6

Resultados 6

Caracterización del apta-nanosensor 6.1

Detección de aflatoxina B1 en muestras de alimento contaminado con la toxina 6.2

Discusión 7

Conclusiones 8

Bibliografía 9

Anexos 10

Anexo 1 (Cálculos de R^2 , LOD y LOQ) 10.1

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructuras químicas de las seis aflatoxinas más peligrosas para el humano.	10
Figura 2. Vías que relacionan el consumo de aflatoxinas y enfermedades en el ser humano.	12
Figura 3. Llegada de aflatoxinas al ser humano a través de los alimentos.....	14
Figura 4. Caracterización del tamaño y forma de AuNPs y ANS mediante fotografías TEM.	27
Figura 6. Espectrograma de absorción en agua de AuNPs y ANS.	28
Figura 7. Detección de AFB1 mediante tres ANS con diferentes proporciones AuNPs:Aptámero.	30
Figura 8. Respuesta del ANS en acetonitrilo.	32
Tabla 1: Parámetros analíticos para la cuantificación usando ANS con diferentes proporciones AuNPs:Aptámero.	30
Tabla 2: Estudios reportados que emplean extracción orgánica de AFB1 desde alimentos sólidos y detección mediante apta-nanosensores.....	35

TABLA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado
AF	Aflatoxina(s)
AFB1	Aflatoxina B1
AFM1	Aflatoxina M1
ANOVA	Análisis de varianza
ANS	Apta-nanosensor(es)
AuNPs	Nanopartículas de oro
ELISA	Enzimoinmunoanálisis de adsorción
FRET	Transmisión de energía de resonancia
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LMR	Límite máximo de residuo
LOC	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
MINSAL	Ministerio de Salud de la República de Chile
NP	Nanopartícula
OD	Densidad Óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RASFF	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos
SELEX	Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial
SRP	Plasmón de Resonancia Superficial
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TLC	Cromatografía en capa fina
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

RESUMEN

Se ha informado varios métodos para determinar aflatoxina B1 (AFB1) en alimentos sólidos utilizando apta-nanosensores (ANS). Sin embargo, queda por abordar la detección rápida in situ en la alimentación del ganado lechero para mejorar el seguimiento de esta peligrosa micotoxina que causa un grave impacto en la salud humana y animal. En el presente trabajo se describe un método simple y efectivo para la detección semicuantitativa de AFB1 en alimentos para ganado lechero, a través de un biosensor basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con un aptámero específico para este analito (apta-nanosensor) y detección colorimétrica. La extracción de AFB1 desde los alimentos fue realizada con el empleo de acetonitrilo y se detectó directamente en este solvente puro. El ANS mostró un correcto comportamiento óptico, posibilitando su detección a partir de una concentración de 5 µg/kg. Estos resultados apoyan las futuras aplicaciones de esta metodología para la detección in situ de AFB1 en alimentos para el ganado.

Palabras claves: AFB1, nanopartículas de oro, aptámero, piensos, detección de toxinas, extracción orgánica.

ABSTRACT

Several methods have been reported to determine aflatoxin B1 (AFB1) in solid feeds using apta-nanosensors (ANS). However, rapid on-site detection in dairy cattle feed remains to be addressed to improve monitoring of this hazardous mycotoxin causing a serious impact on animal and human health. This work describes a simple yet effective method for semi-quantitative detection of AFB1 in dairy cattle food through a gold-nanoparticle based biosensor functionalized with an aptamer specific to this analyte (apta-nanosensor) and colorimetric detection. AFB1 extraction from food was carried out with acetonitrile and it was directly detected in the pure solvent. The ANS showed a correct optical behavior, making possible to detect it from a concentration of 5 µg/kg. These results provide support for future applications of this methodology for on-site detection of AFB1 in cattle feed.

Keywords: AFB1, gold nanoparticles, aptamer, feed for dairy cattle, toxin-detection, organic extraction.

1. Introducción

Las micotoxinas corresponden a metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por algunos hongos saprófitos que causan efectos negativos en la salud humana y animal. Entre las micotoxinas existe un grupo formado por las aflatoxinas (AF), que pueden estar presentes en maní, maíz, trigo, arroz, leche, queso, higos y hierbas, y sus efectos nocivos para los mamíferos están relacionados con acciones mutagénicas, carcinogénicas, hepatotóxicas e inmunosupresivas (Aiko y Mehta, 2015). Se estima que estas toxinas causan cerca del 28% del total de casos de carcinoma hepatocelular a nivel mundial, es decir hasta 172.000 casos por año en los humanos (Wu, 2014). Su presencia en los alimentos genera efectos económicos negativos debido a la disminución en las cosechas y la producción animal, el alto costo de los análisis y la aplicación de sistemas regulatorios (Winter y Pereg, 2019). La aflatoxina B1 (AFB1) es la que presenta mayor toxicidad y ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer en el grupo de los compuestos más carcinogénicos para el ser humano y su metabolito, AFM1, como un posible carcinógeno (Gong, Watson y Routledge, 2016; Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, 2020). Para la detección y cuantificación de estas toxinas en alimentos, se requiere realizar una etapa de purificación o de extracción desde la matriz de la muestra que puede implicar varios pasos. Esta etapa puede ser muy compleja debido a que generalmente los alimentos están formados por varios tipos de compuestos que pueden interferir ya sea en esta etapa de selección, en la metodología analítica posterior o en ambas. Existen varias metodologías descritas para el análisis de estas toxinas, algunas de ellas requieren de instrumentación compleja, de personal muy capacitado, de altos tiempos de respuesta y generalmente implican costos altos. Por otro lado, se ha desarrollado procedimientos de cribado que utilizan sistemas más sencillos en su uso, susceptibles de ser empleados por usuarios poco capacitados, con tiempo

de respuesta cortos, más económicos e incluso de uso portátil que facilita su disponibilidad en el terreno donde se requiere el resultado a entregar, que puede ser cualitativo (presencia o ausencia), o cuantitativo (permite cuantificación segura en un rango de medición). Algunos de los sistemas de cribado se basan en nanosensores que están formados por materiales de tamaño nanométrico que reconocen a estas toxinas, generando señales que pueden ser interpretadas en un resultado.

2. Marco teórico

2.1. Características de las aflatoxinas

Las micotoxinas corresponden a metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos que generan una respuesta tóxica al presentarse en baja concentración en vertebrados superiores y otros animales (Bennett, 1987). Existen al menos 400 micotoxinas que se han descubierto desde 1960 y se clasifican en función de su estructura química y polaridad en aflatoxinas, ocratoxina A, citrina, desoxinivalenol, fumosinas, patulina, toxina T-2, zelalenona y otros grupos emergentes (Cimbalo et al., 2020). Particularmente, las aflatoxinas (AF) son compuestos generados por hongos del género *Aspergillus*, tales como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus* y *A. tamari* (Fallah, 2010), los que tienen una distribución geográfica global (Kagot et al., 2019), por lo que estas toxinas pueden estar presentes en muchos alimentos de origen vegetal en los que se pueden desarrollar estos hongos al presentarse las condiciones adecuadas. Más de veinte aflatoxinas han sido descubiertas y seis de ellas han sido clasificadas como altamente peligrosas para el ser humano: B1, B2, G1, G2, M1 y M2 (Figura 1), cuyas iniciales se relacionan con el color de fluorescencia que emiten, siendo “B” para *blue* (azul), “G” para *green* (verde), a excepción de “M” que corresponde a *milk* debido a que se encuentran en la leche (Bennett y Klich, 2003; Dors et al., 2011). Estos compuestos se clasifican como difurocumarínicos según su estructura química y se generan en rutas metabólicas de los hongos que las producen como metabolitos secundarios en respuesta adaptativa al medio para asegurar su ventaja ecológica frente a otros organismos (Kagot et al., 2019).

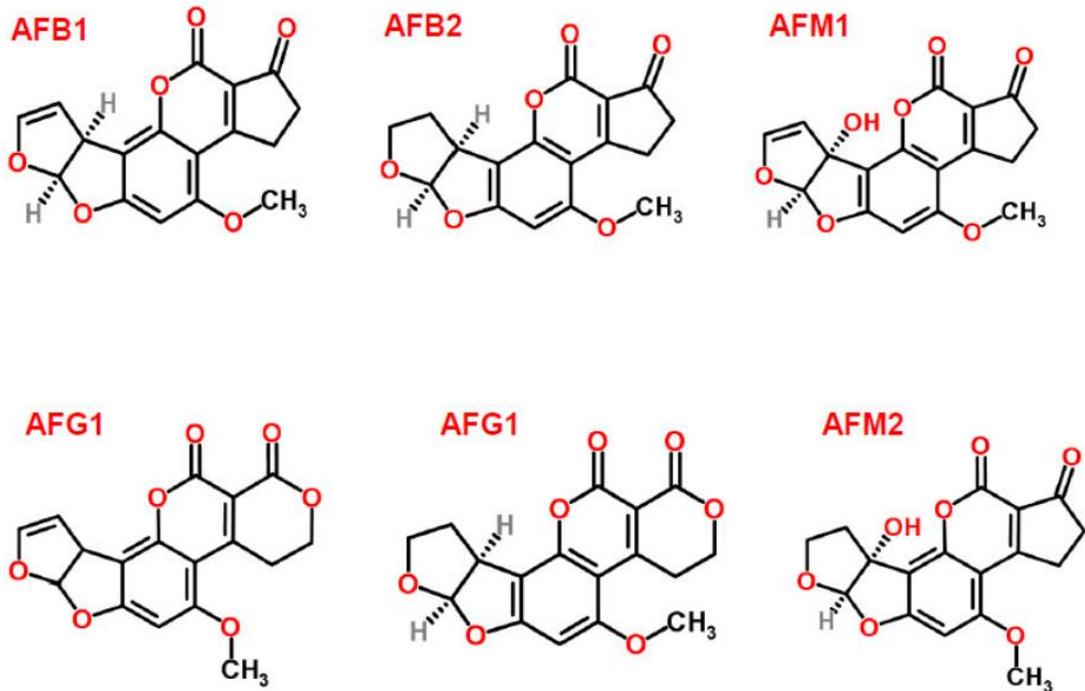


Figura 1. Estructuras químicas de las seis aflatoxinas más peligrosas para el humano. Fuente: Alshannaq y Yu, 2017.

2.2. Impacto de las aflatoxinas sobre la salud humana

La ingesta de aflatoxinas por el ser humano a través de alimentos contaminados ha sido ampliamente investigada. Para el año 2009 se estableció la existencia de una relación entre la concentración de AFB1 y el cáncer hepatocelular o cáncer hepático, a través de una investigación de 42.000 individuos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como modelo de estudio de esta patología para extrapolar al ser humano (Williams et al., 2009). Este tipo de cáncer corresponde a la tercera causa de muertes por cáncer a nivel mundial en los humanos, además de presentar una prevalencia 16 a 32 veces más alta en países en vías de desarrollo en comparación con naciones desarrolladas. El 40%

de los casos de este cáncer se asocia a consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas en países africanos, esta cifra llega a 27% en el sudeste asiático, a 20% en el pacífico del oeste, a 10% a nivel del mediterráneo y a un 3% en países latinoamericanos (Liu, Y. y Wu, F., 2010). La AFB1 es la aflatoxina más común encontrada en los alimentos y es también la más tóxica. Desde el año 1993, AFB1 está clasificada por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer en el grupo de los compuestos más carcinogénicos para el ser humano y su metabolito, AFM1 que se puede encontrar en alimentos lácteos, se ha clasificado como un posible carcinógeno (Gong, Watson y Routledge, 2016; Agencia Internacional de Investigación en cáncer, 2020). De allí la importancia de detectar la presencia de estas toxinas y de su eliminación desde los alimentos para el consumo humano. Se ha reportado que AFB1 causa edema, necrosis hemorrágica hepática y letargia elevada en el cuadro agudo, mientras que en la patología crónica cursa con depresión inmunológica y retardo de crecimientos en niños, además de la posibilidad de generación de cáncer (Chen et al., 2013; Gong et al., 2004; Jiang et al., 2008; Rushing y Selim, 2019). Las vías que explican esta toxicidad se relacionan con alteraciones de la integridad intestinal, la modulación de expresión de citoquinas y biotransformaciones hepáticas que llevan a alteraciones funcionales de proteínas y del DNA (Figura 2). Algunos factores tales como la dieta, el nivel socioeconómico y la etnia han sido reportados que influyen sobre la exposición a aflatoxinas, especialmente AFM1, en madres que amamantan en países como Nigeria (Anthony et al., 2016). A nivel latinoamericano, Díaz, G. y Sánchez, M. (2015) encontraron mayor concentración de AFM1 en la leche materna en sectores rurales de Colombia, indicando que el consumo de AFB1 es mayor al permitido durante períodos extensos por parte de madres que amamantan a sus niños, además de encontrar una relación entre menor peso de los recién nacidos con una mayor concentración de AFM1 en la leche de sus madres. Debido a que múltiples factores ejercen influencia sobre el acceso de las AF al ser humano, se sugiere planificar y desarrollar esfuerzos coordinados entre varios países e instituciones para la prevención de sus efectos (Wu, F., 2014).

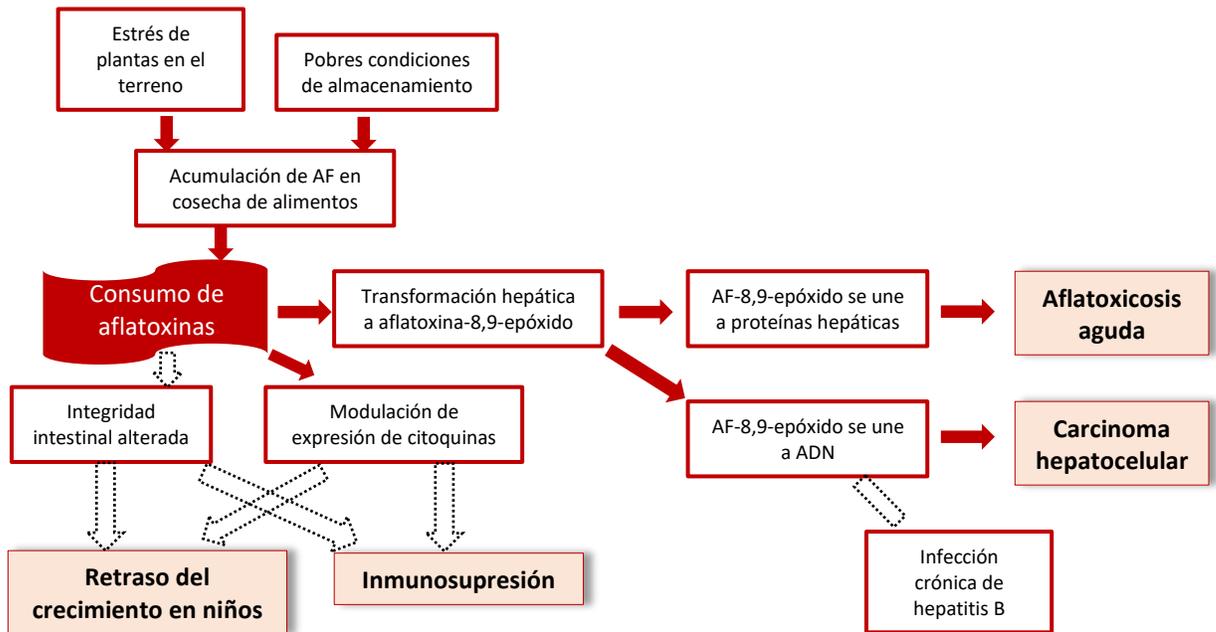


Figura 2. Vías que relacionan el consumo de aflatoxinas y enfermedades en el ser humano (adaptado de Wu, F. et al., 2011).

2.3. Impacto de las aflatoxinas sobre la salud del ganado bovino

La aflatoxicosis corresponde a la enfermedad generada por el consumo de aflatoxinas que puede presentarse tanto en humanos como animales, y se reconoce desde comienzo de la década de 1960 que genera alteraciones fisiológicas en el ganado lechero, disminuyendo su crecimiento y el ritmo de producción, además de hacerlo más susceptible a enfermedades infecciosas (Pier, 1992). Esta patología se ha reportado en varios tipos de animales y se ha establecido que afecta más a bovinos que a ovejas y caballos (Constable et al., 2017). Elgiouhy et al. (2020) informaron que encontraron alteraciones fisiológicas en 72 bovinos afectados de aflatoxicosis, reflejado a través del aumento de las transaminasas hepáticas, creatinina, catalasa y fosfatasa alcalina y la disminución de proteínas totales, magnesio y glutatión reducido en la sangre, además de hepatomegalia, aumento de la vesícula biliar y congestión intestinal y renal. El nivel de gravedad de la aflatoxicosis depende del estado nutricional, de la edad, del sexo, además de la especie de animal que se considere. Los signos y síntomas que se presentan son disfunción gastrointestinal, reducción de la reproducción, disminución de la utilización y eficiencia del alimento, anemia, letargia e ictericia, la combinación de estos efectos provoca la disminución dramática en la producción de leche en el caso del ganado bovino lechero (Sarma et al., 2017). Tanto en la toxicidad aguda como crónica el principal órgano afectado es el hígado, pero la toxicidad aguda es menos probable que la crónica, ya que el animal debe consumir una gran cantidad de aflatoxinas en pocos días. En estas condiciones, el hígado genera metabolitos que reaccionan con una serie de proteínas, generando inhibición del metabolismo de carbohidratos y lipídico, también existe disminución de la síntesis de proteínas, induciendo la infiltración lipídica en este órgano, que puede llevar a su necrosis. Entre las evidencias de autopsias realizadas a animales afectados con aflatoxicosis se ha encontrado la presencia de daño hepático en todos los casos y en algunas ocasiones con megalocitosis, necrosis con fibrosis y lesiones oclusivas venosas (Dhanasekaran et al., 2011).

La toxicidad crónica se presenta si el animal ingiere cantidades de estas toxinas menores a las letales durante varios días o semanas y en este caso se observa merma en la tasa de crecimiento, en la producción de leche, inmunosupresión, que incrementa la susceptibilidad a enfermedades que afectan al ganado, y eventualmente desarrollo de cáncer. Estos efectos dependen de ciertos factores en el caso de los rumiantes, uno de ellos es la concentración de las aflatoxinas ingeridas mediante los alimentos, ya que se considera que una concentración mayor que 100 µg/kg genera la llegada de la toxina a nivel sanguíneo del ganado. Otros factores que influyen son el tiempo de alimentación con el alimento contaminado, la condición de salud y la edad del animal demostrada en que los individuos preñados y jóvenes presentan mayor susceptibilidad a aflatoxicosis que los individuos maduros (Abidin y Khatoon, 2012; Jones et al., 1994). La aflatoxicosis crónica también puede comprometer la eficiencia en la reproducción del ganado, afectando el ciclo reproductivo y/o generando abortos, por lo que la tasa de reproducción del rebaño es menor en esta situación y en algunos casos se producen nacimientos de terneros de menor tamaño (Elgiouhy et al., 2020). También se ha reportado que la ingesta de alimentos contaminados con AFB1 por sobre 75 µg/kg puede provocar la disminución en la producción de leche en 12 días (Queiroz et al., 2012), aunque existen otros reportes que indican menor variabilidad en la producción láctea (Goncalves et al. 2018).

La conversión de AFB1 en AFM1 se realiza en forma natural en el hígado del bovino, AFM1 viaja por la sangre y se concentra en las glándulas mamarias por las que es excretada por la leche, aunque también se puede encontrar en la bilis, orina, semen y heces (Coppock, Christian y Jacobsen, 2018). Es común que la leche de ordeña sea utilizada para alimentar a terneros del corral, por lo que las nuevas generaciones se exponen a esta contaminación desde su etapa fetal y luego de nacer. Los terneros en esta situación pueden presentar anorexia, pérdida de peso, diarrea mediana a severa, disentería, fiebre, bruxismo, bradicardia, hiperventilación, conjuntivitis, ceguera, ataxia, convulsiones e incluso muerte (Kaleibar y Helan, 2013).

2.4. Efecto económico de las aflatoxinas

Es posible encontrar AFB1 y AFB2 en la alimentación del ganado lechero y una vez ingeridas, ellas son transformadas a nivel hepático en AFM1 y AFM2 respectivamente y secretadas principalmente por la leche, por lo que pueden estar presentes en los alimentos lácteos que son consumidos por los humanos (Figura 3). El consumo de estas toxinas por el ser humano a través de la leche implica gastos en salud en cuanto a diagnósticos y tratamientos. Muchos países han establecido requerimientos regulatorios con el objetivo de evitar la exposición a AFB1 y la Comisión de la Comunidad Europea definió que su límite máximo de residuo (LMR) en alimento seco para vacas lecheras y terneros es de 5 µg/kg (Unión Europea, 2002). En Chile, el Ministerio de Salud definió el año 2017 que el máximo permitido de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) es de 10 µg/kg en alimentos como cereales y sus derivados, especias y frutos secos para consumo humano (MINSAL, 2017). Por otro lado, a través de la Resolución 7885 exenta, el Ministerio de Agricultura de Chile establece un máximo de 50 µg/kg de AFB1 tanto para ingredientes de origen vegetal como para alimentos terminados y suplementos para alimentación de bovinos y específicamente 5 µg/kg de AFB1 en alimentos para ganado lechero (Ministerio de Agricultura, 2018).

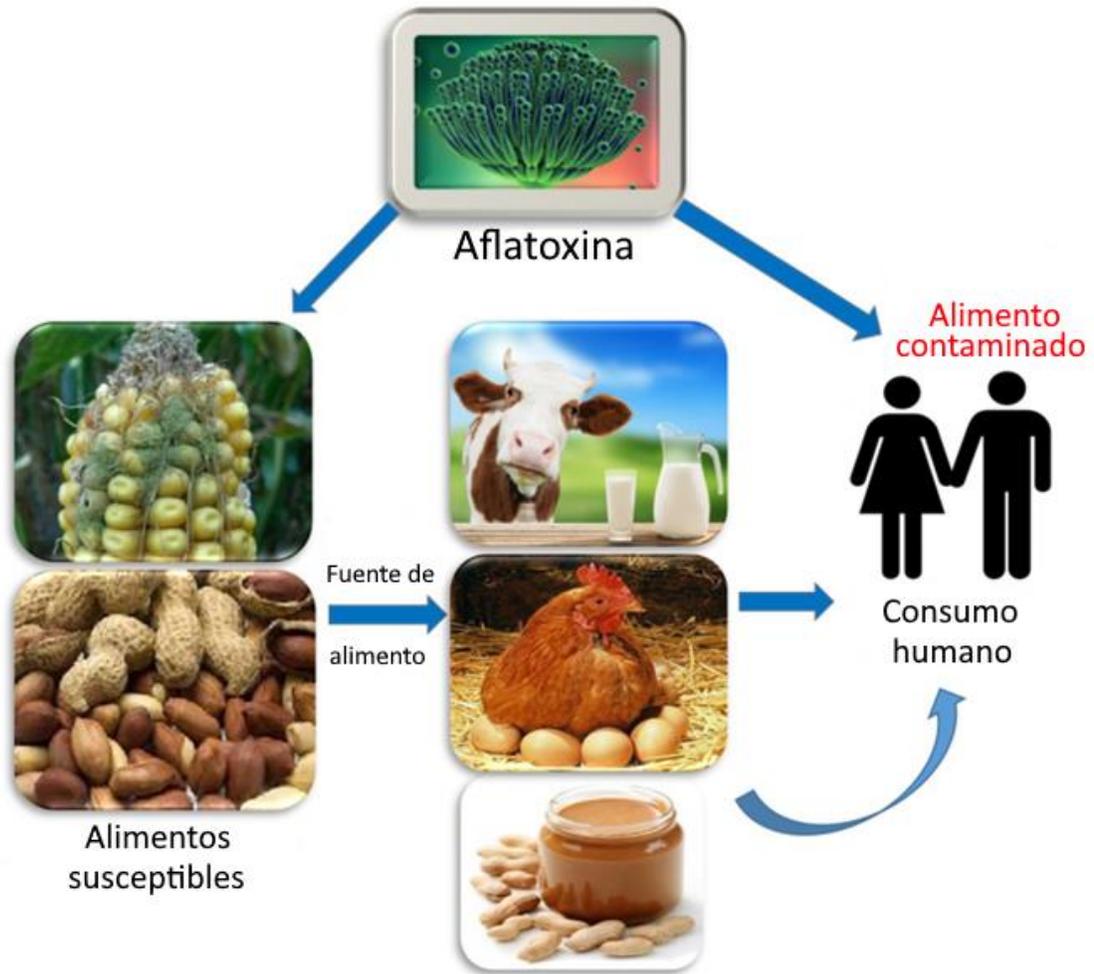


Figura 3. Llegada de aflatoxinas al ser humano a través de los alimentos. Fuente: Kumar et al., 2017.

Se estima que cerca del 25% de las cosechas a nivel mundial están contaminadas por micotoxinas, llevando a grandes pérdidas en productos industriales y agrícolas (Alshannaq y Yu, 2017; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018). Los costos económicos debido a contaminación por aflatoxinas en alimentos pueden ser muy altos debido a eliminación de estos productos y por las inspecciones respectivas. Vardon (2003) estimó que las pérdidas en las cosechas debido a presencia de aflatoxinas en Estados Unidos de América pueden involucrar USD 47 millones por año en el caso del maíz y USD 225 millones en maíz forrajero. Estas toxinas influyen en la producción de leche, ya

que en algunos sistemas de alimentación se emplea mezclas de alimentos sólidos, tales como cereales concentrados y ensilaje para generar un tipo de alimentación del ganado productor de leche que sea relativamente fácil de manejar. Aunque este sistema ha permitido la intensificación de la producción láctea, el almacenamiento del alimento puede causar la proliferación de hongos productores de aflatoxinas debido a la combinación de los efectos de tiempo de incubación, temperatura, actividad de agua y la disponibilidad de dióxido de carbono (Ren et al., 2020). Las toxinas al ser ingerirlas provocan los efectos sobre la salud del ganado y su presencia en los alimentos que son obtenidos a partir de estos animales, tales como carne y leche. Además del almacenamiento, estos microorganismos pueden estar presente al momento de la cosecha y el transporte de los alimentos que se entregan al ganado (Alonso et al., 2011). Los efectos fisiopatológicos que se generan implican pérdidas económicas significativas para los productores lecheros, por lo que es recomendable detectar AFB1 en forma rápida, en terreno y de bajo costo para reducir sus efectos y posibilitar la toma de decisión oportuna para evitar el consumo de alimentos contaminados por parte del ganado y cumplir con los requerimientos de los programas de control (Campagnollo et al., 2016; Lizárraga-Paulín et al., 2011). Esta contaminación se hace relevante desde el punto de vista económico al considerar que se proyecta que el mercado internacional de productos lácteos alcanzará USD 1.032 billones para el 2024, lo que implica un crecimiento de 53% comparado con el año 2019 (Statista, 2021).

2.5. Metodologías de detección de AFB1

Varios métodos se han desarrollado para detectar AFB1, siendo la cromatografía en capa fina (TLC) la técnica más antigua usada para este propósito. Var, Kabak y Go (2007) reportaron un límite de detección (LOD) de 1 µg/kg con esta técnica. En otros procedimientos se ha usado cromatografía de alta resolución con detección fluorescente (HPLC-FL), con LOD de 0,01 µg/kg (Yazdanpanah et al., 2013) o acoplados a espectrómetro de masas (HPLC-MS) con LOD de 0,00097 µg/kg (Rodríguez-Carrasco et al., 2018), pero estas metodologías requieren de instrumentación de alto costo, personal altamente capacitado y de procesos con alto consumo de tiempo, por lo que no son adecuadas para una detección *in situ* en granjas de animales. Los procedimientos más recientes detectan esta toxina mediante empleo de anticuerpos y enzimas (ELISA) con detección a 450 nm con la que se ha reportado un LOD de 0,24 µg/kg (Urusov et al., 2015) o a través del uso de nanopartículas funcionalizadas con aptámeros y detección con transmisión de energía de resonancia (FRET) con la que se ha logrado un LOD de 1 µg/kg (Sabet et al., 2017) o una sonda DNAzyme con detección fluorescente para lograr un LOD de 0,02 µg/kg (Wang et al., 2019). La técnica más utilizada como cribado en terreno en las granjas son aquellas basadas en la detección mediante anticuerpo, debido a que estas pruebas pueden ser realizadas en el lugar (Udomkun et al., 2017).

En la última década se han desarrollado metodologías que usan nanobiosensores (NBS) que emplean estructuras de tamaños nanométricos unidas a un elemento de reconocimiento de un analito de origen biológico. Algunos de estos elementos de detección corresponden a aptámeros y, por lo tanto, se denominan apta-nanosensores (ANS). Los aptámeros son cadenas simples y sintéticas de oligonucleótidos generadas mediante la técnica Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX). Este tipo de

molécula posee una alta afinidad y especificidad por el analito para el cual fue generada, tiene bajo costo de producción, es fácil de marcar, de modificar y de mantener. Además, al ser comparados con anticuerpos, los aptámeros presentan mejor estabilidad térmica, no son inmunogénicos, son altamente reproducibles, no se generan en animales, son fáciles de modificar químicamente y tienen un bajo costo de producción (Goud et al., 2016; Sharma et al., 2016; Wang, Yang y Wu, 2020). Se ha reportado metodologías analíticas que emplean aptámeros con detección colorimétrica, fluorescente y electroquímica (Díaz-García y Retamal-Morales, 2020; Zhang, 2018). Por otro lado, las nanopartículas de oro (AuNPs) son una clase de estructuras metálicas que han mostrado un prometedor crecimiento en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas debido a su habilidad de generar sensores, ya que ellas poseen una alta estabilidad y biocompatibilidad, y tienen una superficie que puede ser funcionalizada con varios tipos de ligandos (Saha et al., 2012; Jacobs et al., 2014; Zhang et al., 2013). Una de sus características ópticas de este tipo de nanomaterial, está relacionada a la oscilación colectiva de los electrones de conducción en la presencia de una luz incidente, un fenómeno llamado Plasmón de Resonancia Superficial (SRP), que genera una banda de absorción alrededor de 520 nm, cuyo valor puede presentar variaciones debido al tamaño de la partícula, su forma y el medio de reacción (Amendola et al. 2017; Kelly et al., 2003). Esta propiedad permite que las AuNPs sean empleadas para generar sensores colorimétricos sin marcaje para la detección de compuestos químicos y biológicos, debido a que cuando AuNPs de 15 a 20 nm están separadas entre ellas, dicha suspensión presenta un espectro de absorción característico con su máximo a 520 nm y un color rojo detectado a simple vista. Si se presenta un factor que genera la agregación de las AuNPs, su comportamiento óptico se modifica, reduciendo su SRP a 520 nm y aumentando su capacidad de absorción sobre 600 nm, provocando el cambio de color de la suspensión de rojo a púrpura azulado (Li et al., 2017; Luan et al., 2015). La combinación de nanomateriales y aptámeros permite un diseño de sistemas versátiles, sensibles, selectivos y fáciles de aplicar

para la detección de compuestos de interés en muestras de alimentos (Fengqin et al. 2019; Gutiérrez et al., 2020; Xia et al., 2020).

Una de las más grandes dificultades que se presentan en los métodos analíticos que se aplican a alimentos tiene relación con la complejidad de la matriz de la muestra, debido a la presencia de compuestos en forma natural, tales como proteínas, lípidos, pigmentos e iones, que en muchos casos pueden impedir el acceso a los compuestos que se desean analizar y/o causan alteraciones en el método analítico (Beyer y Biziuk, 2008; Bordin, Sawada y Rodrigues, 2014). Un tipo de alimentación del ganado lechero se basa en pienso, es decir un alimento seco con el que se alimenta al ganado en determinadas cantidades y horarios, que generalmente está compuesto por varios ingredientes cuya proporción depende de la necesidad nutricional de los individuos, de su edad, del estado fisiológico, del nivel de producción lechera y de las condiciones climáticas y la temporada vigente (Anrique, Molina y Alfaro, 2014; McGuffey, 2017). Esta mezcla convierte a este tipo de alimento en una muestra compleja para extraer los compuestos de interés. Por esta razón, es relevante emplear protocolos que permitan extraer el analito lo más puro posible y/o que los compuestos que lo acompañan no interfieran significativamente en las etapas posteriores del análisis. Por otro lado, la solubilidad en agua de la AFB1 es muy baja (Díaz, Cepeda y Martos, 2012), eso significa que se debe emplear un solvente orgánico o una mezcla de ellos para la extracción de la toxina desde los alimentos y luego desarrollar el análisis (Zhao, Y. et al. 2017 y Zhao, Z. et al., 2020). Sin embargo, los solventes orgánicos pueden afectar el plegamiento normal de los aptámeros, generando alteraciones en la conformación espacial por ruptura de puentes de Hidrógeno que mantienen la estructura tridimensional y así, podría evitar que pueda reconocer al analito (Rhouati et al., 2016). Debido a lo anterior, algunos autores han reportado protocolos de extracción de AFB1 desde arroz, maní y harina de trigo empleando una mezcla de metanol/agua en proporción en volumen de 80/20 o 60/40 y detección con nanobiosensor (Chen et al., 2016; Nasirian et al., 2017), mientras que otros han informado la extracción con el empleo adicional de soluciones tampones acuosas posterior a la primera

extracción orgánica, para evitar los efectos de los solventes orgánicos en la fase analítica de los protocolos (Jia et al., 2019; Xie et al., 2019). Sin embargo, la extracción de AFB1 con solventes orgánicos puros y detección mediante aptámeros y AuNPs en forma directa en el solvente puro no ha sido reportado.

En este trabajo, se propone el desarrollo de una metodología sencilla y rápida para la detección de AFB1 en alimento seco para ganado lechero, mediante una extracción de un paso con solvente orgánico y posterior detección colorimétrica/plasmónica de la toxina usando un apta-nanosensor basado en AuNPs funcionalizadas con un aptámero contra AFB1, con el objetivo de desarrollar metodologías simples que combinen la extracción segura con la correcta detección de analitos en muestras de alimentos con aplicaciones fáciles de usar.

3. Hipótesis

Es posible detectar aflatoxina B1 en pienso para bovino lechero mediante un sensor basado en nanopartículas de oro y aptámero con previa extracción orgánica de un paso.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la detección de aflatoxina B1 en pienso para bovino lechero basado en un apta-nanosensor.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Generar y evaluar analíticamente un apta-nanosensor para la detección de aflatoxina B1.
- 4.2.2. Definir el proceso pre-analítico a aplicar en muestras de pienso para bovino lechero para la detección de aflatoxina B1.

5. Materiales y métodos

5.1. Preparación de apta-nanosensor (ANS)

Las AuNPs son sintetizadas en base al método de reducción con citrato (Turkevich, Stevenson y Hillier, 1951; Frens, 1973), con ajuste de pH a 5,3 previo a la síntesis (Contreras-Trigo et al., 2018) y luego son guardadas en viales de vidrio color ámbar a 4 °C hasta su caracterización y posterior uso. La funcionalización de las AuNPs se realiza de acuerdo al protocolo descrito por Hill y Mikrin (2006) para generar el ANS. Para esto, el aptámero que reconoce AFB1 y modificado en su extremo 3' con un grupo disulfuro (GCA CTA CTC CCT AAC ATC TCA AGC GTT GGG CAC GTG TGT CTC TCT GTG TCT CGT GCC CTT CGC TAG GCCC/ 3ThioMC3-D), según Chen et al. (2016), es adquirido a la empresa Integrated DNA Technologies, Inc. (Iowa, USA). Cinco nmol de este aptámero es reducido con 100 µL de una solución de 1,4-Ditiotreitol (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania) 0,1 M en buffer de clivaje pH 8,0 (Na₂HPO₄ 0,161 M y NaH₂PO₄ 0,008 M) durante 3 horas en oscuridad y temperatura ambiente, sin agitación. Luego, la mezcla es introducida a una columna de Sephadex G-25 para purificar el aptámero con el grupo tiol y se cuantifica las fracciones mediante la medición de absorción a 260 nm en un espectrofotómetro para placas modelo Epoch (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Posteriormente la solución de AuNPs se mezcla con la solución del aptámero tiolado en tres proporciones en moles entre AuNPs y aptámero (1:10, 1:20 y 1: 40). Las mezclas son agitadas a 120 rpm por 2 días en oscuridad y a temperatura ambiente. Los ANS son guardados en viales de vidrio color ámbar a 4 °C hasta su caracterización y posterior uso.

5.2. Caracterización de AuNPs y ANS

La forma y el tamaño de AuNPs y ANS se determina mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) empleando un microscopio modelo 1200EX-II (JEOL-JEMI, Tokyo, Japón). La carga superficial se mide a través de un Zeta-potenciómetro con LASER He-Ne de 632 nm (Nano-ZS90, Malvern Instruments, Westboroug, USA). La concentración de los ANS se calcula mediante espectroscopía UV-Vis usando un espectrofotómetro para placas modelo Epoch (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) y considerando la absorción a 520 nm (banda de SPR) de acuerdo a la Ley de Beer-Lambert, con un coeficiente de extinción molar de $2,01 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Maye et al., 2003). Los tres ANS generados con proporciones diferentes entre AuNPs y aptámero son evaluados de acuerdo a la respuesta óptica a diferentes concentraciones de estándar de AFB1 (Sigma Aldrich Chemical Company, Atlanta, GA, USA) disuelto en acetonitrilo (KgaA, Darmstadt, Alemania), según la descripción del ensayo de detección.

5.3. Tratamiento de la muestra

El alimento sólido para ganado bovino lechero es suministrado por Agropecuaria Leche del Biobío (Los Ángeles, Chile). Este alimento es secado a 40 °C durante 15 horas, luego se emplea un molino de cuchillos para obtener una muestra de grano fino. Posteriormente, a 2 g de esta muestra se agrega 200 µL de solución de estándar de AFB1 en acetonitrilo para generar muestras contaminadas con 1, 2, 5 y 10 µg/kg y una muestra control con 200 µL de acetonitrilo sin AFB1. Cada una de estas muestras para el análisis se realiza en triplicado.

5.4. Extracción de AFB1

Se agrega 8 mL de acetonitrilo a 2 g de cada muestra contaminada, la mezcla se agita a 2.500 rpm durante 20 minutos a 20 °C y luego es centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos a 4 °C, posteriormente el sobrenadante es pasado por un filtro para jeringa con membrana de PVDF de 0,2 µm y finalmente guardado en un vial de vidrio ámbar a 4 °C para el análisis posterior.

5.5. Ensayo de detección de AFB1

El ANS es activado antes del análisis por temperatura a 95 °C durante 5 minutos y luego se deja enfriar a temperatura ambiente. En uno de los pocillos de una placa de multipocillos se mezcla 100 µL de ANS activado de 13 nM con 200 µL de solución estándar de AFB1 o la muestra obtenida mediante el método de extracción descrito anteriormente y se agrega 60 µL de solución de NaCl 1 M. La mezcla se incuba a 25 °C por 10 minutos y se obtiene el espectrograma entre 400 y 800 nm con el empleo de espectrofotómetro para placas modelo Epoch (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Se comparan los valores de Densidad Óptica (DO) obtenidos con diferentes concentraciones de AFB1 con aquellos obtenidos en ausencia de la toxina para la evaluación del comportamiento del ANS en presencia del solvente de extracción.

5.6. Análisis estadísticos

Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. La significancia estadística se fija al 95% y se usa el test no paramétrico de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos de datos.

Un resumen de las metodologías se muestra en la figura 4.

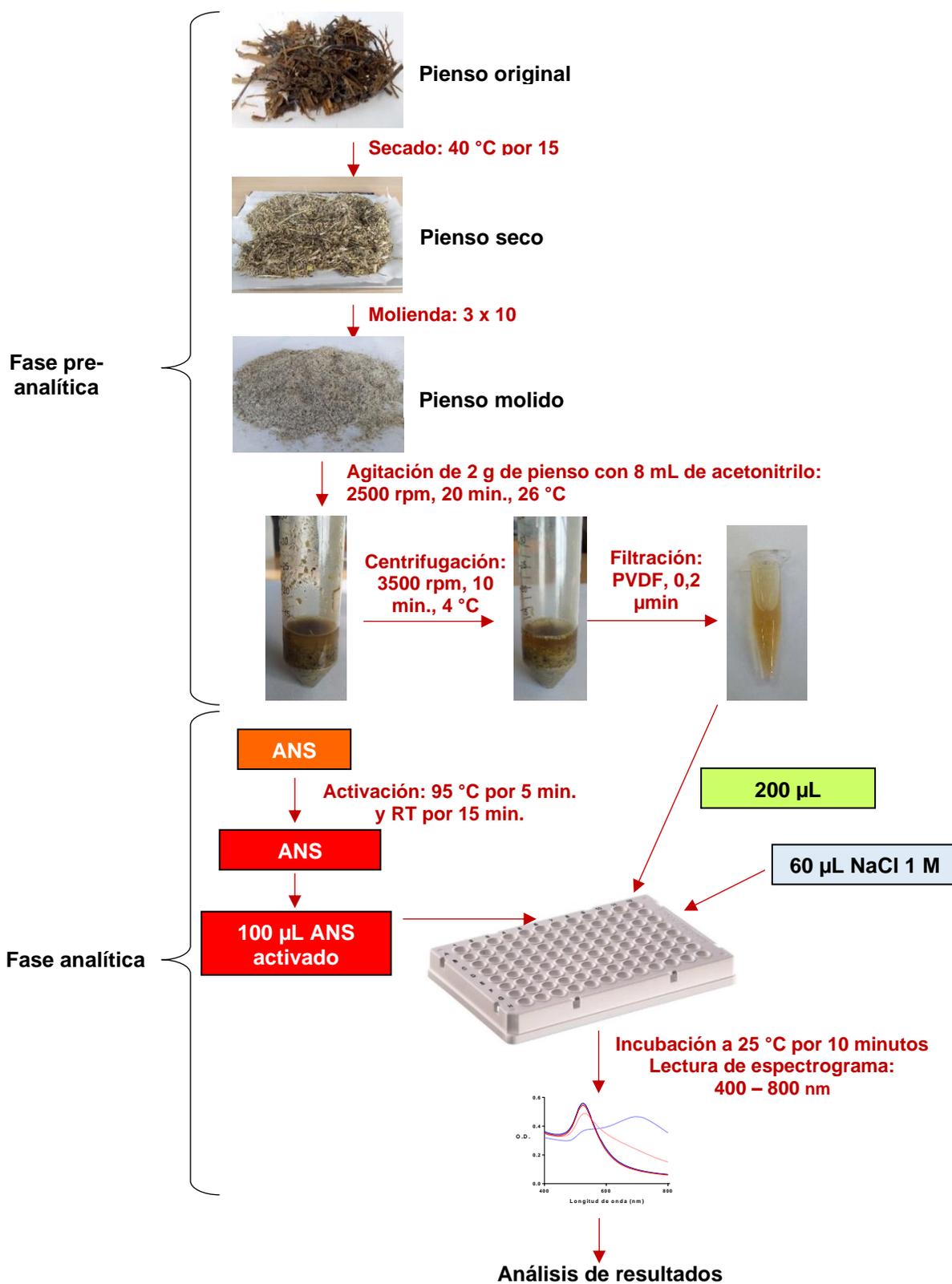


Figura 4. Resumen de las metodologías empleadas.

6. Resultados

6.1. Caracterización del ANS:

La generación del ANS involucra la cobertura de las AuNPs con moléculas de aptámero a través de su grupo tiol (Elahi, Kamali y Baghersad, 2018). La estructura resultante tiene principalmente una forma esférica, con un diámetro medio de 20 nm, el que se mantiene cuando ellas son parte del ANS, esto confirma la funcionalización de las AuNPs no modifica el núcleo del ANS (Figura 5 A y B). El potencial Zeta disminuye desde -20 a -35 mV, que confirma la presencia de moléculas de aptámero formando parte del ANS, ya que estas contribuyen con cargas negativas a la superficie de las AuNPs (Figura 6) y estabiliza al ANS (Tan et al., 2012). La concentración del ANS es de 19 nM, la que es calculada desde la OD (Optical Density) a 520 nm (Figura 7). El comportamiento óptico del ANS es muy similar al obtenido de las AuNPs sin cobertura de los aptámeros, pero este disminuye en forma similar en presencia de NaCl en el medio. El aumento de la fuerza iónica en el medio, generado por la presencia de NaCl, modifica la densidad de las cargas superficiales tanto de las AuNPs como del ANS, lo que causa la agregación entre las nanopartículas y genera el cambio de color de la suspensión desde rojo a púrpura detectable mediante espectroscopía y también a simple vista (Aldewachi et al., 2017). Este cambio en el comportamiento óptico es menos marcado en el ANS que en las AuNPs sin cobertura de los aptámeros, ya que estos previenen la interacción de los iones Na^+ con la superficie de las nanopartículas y, por lo tanto, evitan que su agregación sea tan marcada como en el caso de las AuNPs solas. Se observa un gran aumento de la OD entre 600 y 800 nm cuando las AuNPs son expuestas a NaCl comparado con el comportamiento de los ANS bajo el mismo estímulo iónico. Además, la disminución de la OD a 520 nm también es mayor cuando las AuNPs no están funcionalizadas. Esta longitud de onda corresponde a la banda

característica de SRP de las AuNPs del tamaño y forma trabajados en este estudio y junto con el incremento en la OD en el rango de 600 a 800 nm son indicadores de agregación de este tipo de nanopartículas (Pandey, Datta y Malhotra, 2008).

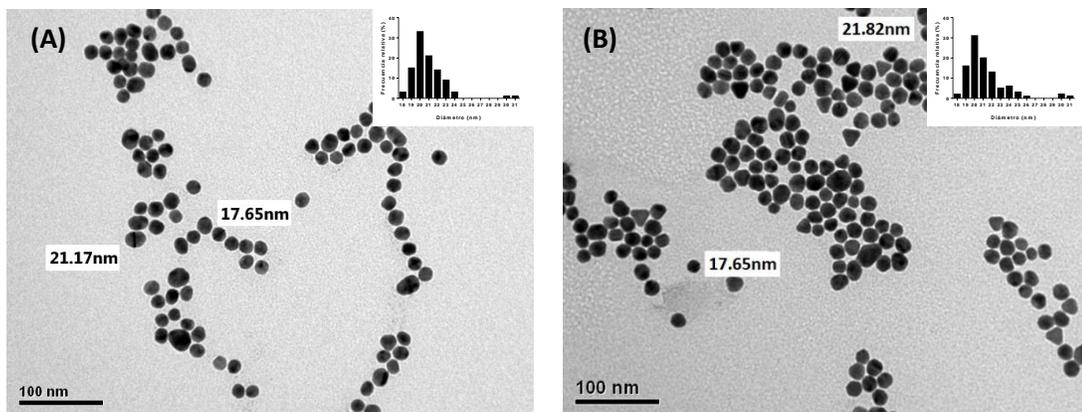


Figura 5. Caracterización del tamaño y forma de AuNPs y ANS mediante fotografías TEM. (A) AuNPs y (B) ANS. Se incluye histogramas con la distribución de tamaño de partículas.

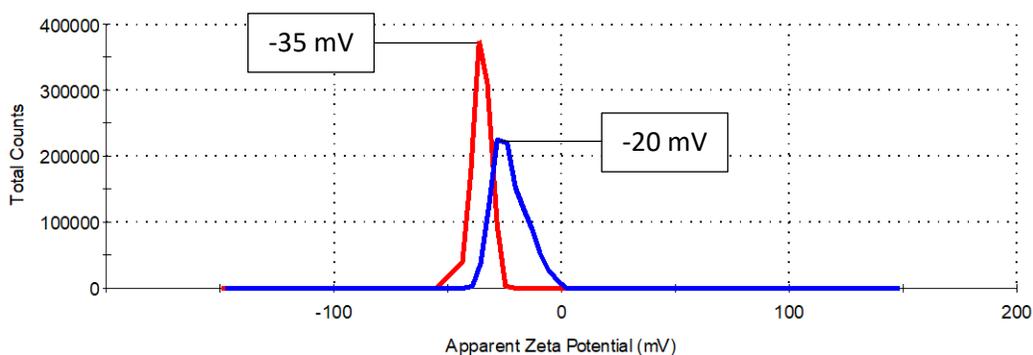


Figura 6. Distribución del Potencial Zeta de AuNPs y de ANS. AuNPs: línea de color azul y de ANS: línea de color rojo.

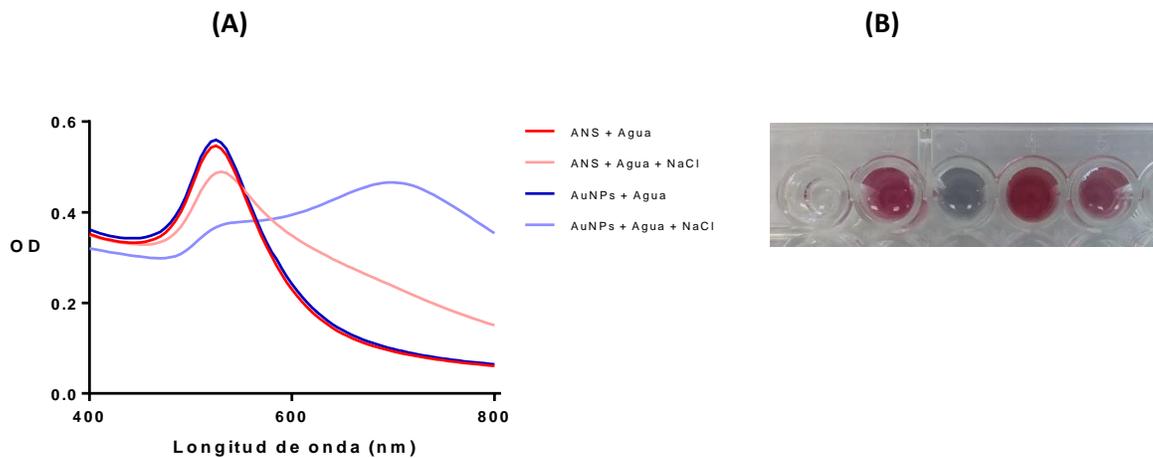


Figura 7. Respuesta del ANS frente a la presencia y ausencia de NaCl como agente estimulante de la agregación. (A) Espectrograma de absorción en agua de AuNPs y ANS. Tanto AuNPs como ANS están diluidos a la mitad y en ausencia y presencia de NaCl 1 M, 100 μ L de volumen de reacción (paso óptico: 0,3 cm). (B) Pocillos con las suspensiones para apreciar los colores en orden de izquierda a derecha: agua (blanco), AuNPs, AuNPs + NaCl, ANS y ANS + NaCl.

La figura 8 muestra la respuesta óptica a 620 nm de los tres ANS generados (con diferentes relaciones AuNPs:aptámero) con cuatro concentraciones de estándar AFB1 disuelto en acetonitrilo relativa a la ausencia de la toxina (0 μ g/L). El estándar es disuelto en acetonitrilo debido a que esta toxina es soluble en solventes orgánicos polares (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, 2020) y algunos estándares líquidos de AFB1 son comercializados en este medio (Romer Labs; Merck KGaA). A pesar de que la relación entre las OD obtenidas a 620 y 520 nm ($OD_{620}/520$) es ampliamente empleada para evaluar la agregación de sensores colorimétricos basados en AuNPs (Ma et al., 2018; Niu et al., 2014), en el presente estudio se usa la OD a 620 nm para seguir este proceso debido a que muestra mejor relación entre respuesta y concentración de AFB1. Se observa que los mejores valores para los parámetros (i) relación entre las variables (R^2), (ii) pendiente, (iii) LOD y (iv) LOQ

(Límite de Cuantificación) son obtenidos con la relación 1:10 entre AuNPs:aptámero en comparación con los otros ANS con diferentes proporciones (Tabla 1). Según lo anterior, se decide trabajar con el ANS con esta proporción para analizar las muestras contaminadas con la toxina. El LOD y LOQ no son calculados para la proporción 1:40 de ANS debido a que la correlación entre los datos no es adecuada para este análisis.

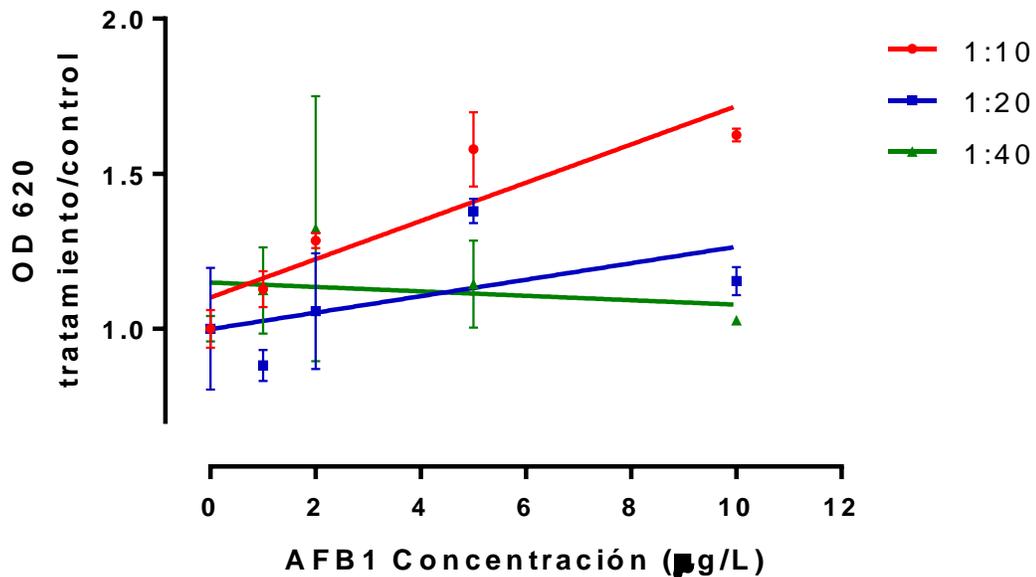


Figura 8. Curva de calibración para la detección de AFB1 mediante tres ANS con diferentes proporciones AuNPs:Aptámero. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes (n=3).

Tabla 1: Parámetros analíticos para la cuantificación usando ANS con diferentes proporciones AuNPs:Aptámero. Detalle de los cálculos en el Anexo 1.

Proporción en ANS	Ecuación de la recta	R ²	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
1:10	$Y = 0,06171 * X + 1,101$	0,8259	0,88	2,94
1:20	$Y = 0,02658 * X + 0,9989$	0,3278	9,50	31,67
1:30	$Y = - 0,007129 * X + 1,149$	0,0512	-	-

La curva de calibración obtenida para el ANS 1:10 es limitada en el rango de concentración analizado (0,88 a 10,00 µg/L) y en la correlación entre sus datos ($R^2 = 0,8259$), por lo que es relevante la evaluación de su capacidad de discriminación de la respuesta del ANS (OD) que se obtiene entre los valores de concentración de AFB1 que son considerados para generar la curva de calibración (figura 9). Es posible discriminar estadísticamente los valores de OD obtenidos entre todas las concentraciones incluidas en la curva de calibración a excepción entre los valores de 5 y 10 µg/kg.

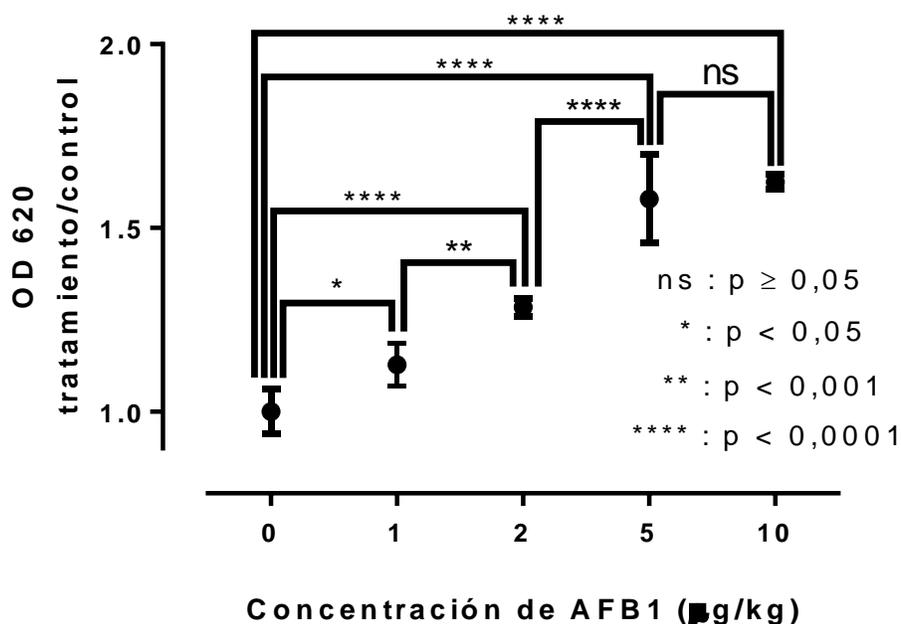


Figura 9. Diferencias en la respuesta del ANS 1:10 entre las concentraciones de AFB1 empleadas en la curva de calibración. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes (n=3). Los datos son analizados usando ANOVA de un factor. Diferencias no significativas representadas como ns.

Es necesario evaluar el comportamiento óptico del ANS frente a diferentes solventes orgánicos para verificar su capacidad de respuesta en la solución resultante de la extracción de la AFB1 desde la muestra debido a la liposolubilidad de la toxina. En la figura 10A se muestra los espectrogramas obtenidos con en ANS en presencia de NaCl 1 M para provocar su agregación en suspensiones con agua como control y algunos solventes orgánicos: etanol, isopropanol, metanol, acetona y acetonitrilo. En la figura 10B se muestra la relación de OD entre cada solvente y el control (ANS en agua con NaCl 1 M) a 620 nm, debido a que a este valor de longitud de onda se presenta las mayores variaciones para la curva de calibración (Figura 8). Esos resultados indican que acetonitrilo es el solvente orgánico que menor efecto genera sobre la agregación

del ANS en presencia de NaCl 1 M, que es la variable a detectar en el ensayo para detectar AFB1, por lo tanto, es el más adecuado para este análisis de los solventes evaluados.

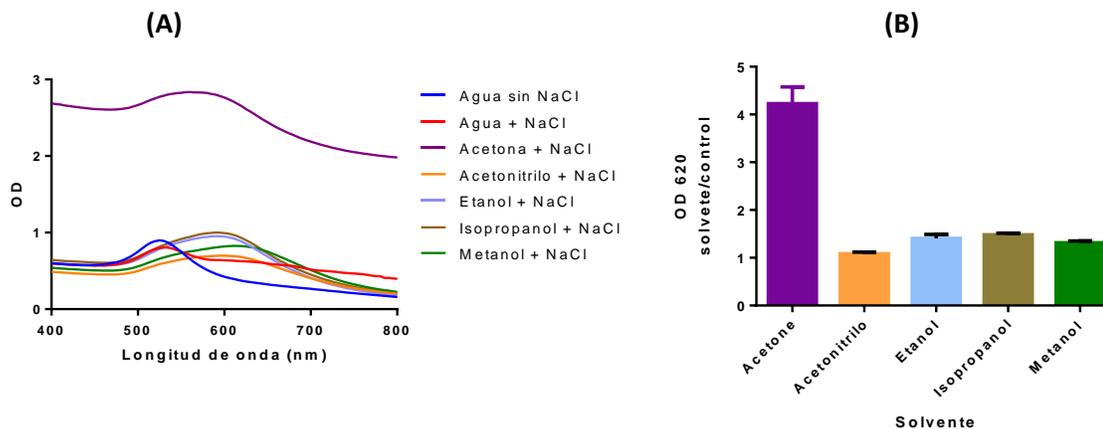


Figura 10. Comportamiento óptico del ANS en diferentes solventes. El ANS se mezcló con los solventes en ausencia de la toxina y en presencia de NaCl 1 M. Se empleó agua con solvente control. (A) Espectrogramas obtenidos. (B) Relación de valor de OD a 620 nm obtenido en cada solvente con relación al control. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes (n=3).

6.2. Detección de aflatoxina B1 en muestras de alimento contaminado con la toxina

La figura 11 muestra los resultados de la detección de AFB1 que es extraída desde alimento para ganado bovino lechero (pienso) contaminado con la toxina, mediante el uso de acetonitrilo. El espectrograma muestra la media de un triplicado de tres experimentos independientes, eso implica un total de 9 datos para cada valor. El ANS se comporta similar en el rango de longitud de onda

analizado, pero muestra diferencias en OD entre muestras de alimento artificialmente contaminado con diferentes concentraciones de AFB1, se observa un aumento de esta variable en función de la concentración de la toxina (A). Los datos se analizan usando la prueba estadística de ANOVA de un factor a varias longitudes de onda para evaluar las diferencias entre las medias calculadas a cada concentración y a 620 nm presenta las mayores diferencias entre valores de OD en función de la concentración de AFB1. Los resultados de OD presentados en la figura 11B están calculados considerando la diferencia que muestra el ANS con respecto a la ausencia de la toxina (0 µg/kg) a 620 nm. El análisis estadístico de estos valores con relación a la ausencia de AFB1 muestran que no existe diferencia significativa entre las concentraciones 0 y 1 µg/kg y entre 0 y 2 µg/kg de la toxina ($p \geq 0.05$), pero se presenta diferencia significativa entre 0 y 5 µg/kg ($0.01 < p < 0.05$) y entre 0 y 10 µg/kg, siendo mayor entre estas últimas concentraciones de AFB1 ($p < 0.0001$).

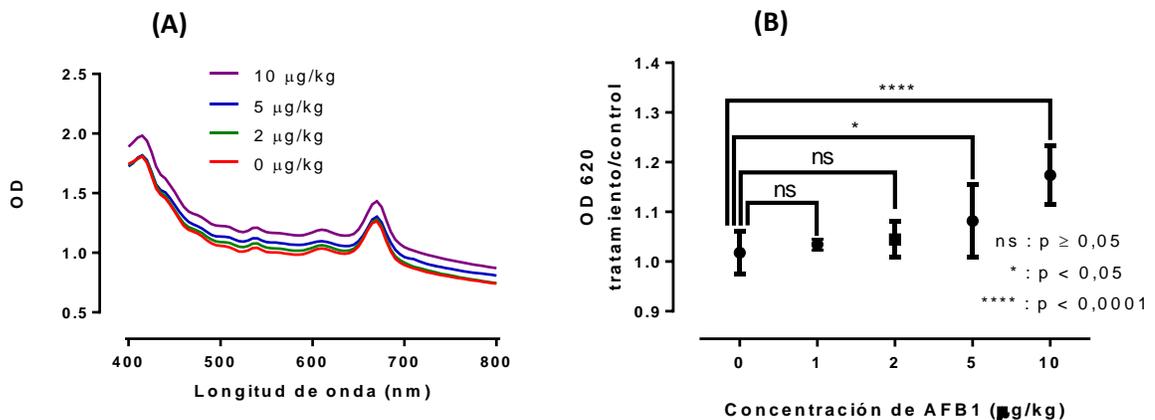


Figura 11. Respuesta del ANS en acetonitrilo. Análisis realizado en la mezcla de extracción de extracción de AFB1 desde muestras de pienso contaminado con diferentes concentraciones de la toxina y en presencia de NaCl 1 M. (A) Espectrogramas de absorción de del ANS 1:10. (B) Diferencias en la OD relativa a la ausencia de AFB1. Resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes ($n=3$). Los datos son analizados usando ANOVA de un factor. Se indican las diferencias significativas comparadas.

7. Discusión

La contaminación con AFB1 de alimentos para ganado genera alteraciones fisiológicas en los individuos afectados que implican importantes pérdidas económicas para el sector. Además, los efectos de esta toxina pueden presentarse en el ser humano produciendo también repercusiones en salud y económicas, de allí la importancia en su pesquisa oportuna y segura. Los resultados de esta investigación muestran que mediante la metodología empleada es posible detectar semi-cuantitativamente la presencia de AFB1 en alimento tipo pienso para ganado bovino lechero contaminado con la toxina desde una concentración de 5 µg/kg, que corresponde al LMR para este alimento según las regulaciones internacionales (OMS, 2018). Este tipo de alimento está compuesto por once ingredientes, tales como heno, soja, grano de maíz y melaza (Araya, M. Cooperativa Agrícola Lechera Biobío Ltda., Los Ángeles, Chile. Comunicación personal, 2019). La gran cantidad de ingredientes en el alimento analizado en este estudio implica que la matriz de este tipo de muestra es compleja y puede contener compuestos que eventualmente generan importantes interferencias en la técnica analítica (Laborda et al., 2016). Además, debido a la baja solubilidad de la AFB1 en agua, se hace necesario emplear un solvente orgánico polar en el procedimiento de extracción de esta toxina desde el alimento, pero muchos compuestos de la muestra (proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos y vitaminas) pueden solubilizarse también en este solvente y pueden estar presentes en el momento del análisis afectando este proceso. Por otro lado, el solvente empleado en la extracción puede afectar el comportamiento óptico de NBS que emplean aptámeros como elementos de reconocimiento, como el caso de este estudio, esto hace que la mayoría de los estudios en el campo de los ANS son desarrollados en medios acuosos para permitir que los aptámeros adopten y mantengan la estructura tridimensional correcta para el reconocimiento de analitos (Chaou, Vialet y Azéma, 2016; Naseri et al., 2020). La mayoría de los trabajos publicados reportan el empleo de una mezcla metanol/agua en

proporciones de 80/20 o 60/40 para la extracción de AFB1 desde alimentos sólidos y posterior detección con aptámeros y nanopartículas metálicas, incluso algunos autores mencionan el empleo de soluciones de tampones acuosos luego de la etapa de extracción con algún solvente orgánico para evitar o disminuir el efecto de este solvente sobre la fase analítica. La tabla 2 muestra algunos estudios que reportan el uso de solventes orgánicos y agitación para la extracción de AFB1 desde alimentos sólidos y detección mediante ANS. A diferencia de estos estudios, el presente trabajo emplea acetonitrilo puro para realizar la extracción de AFB1 desde una mezcla más compleja de alimento y sin dilución posterior. Además, la adición de la toxina a las muestras fue realizada antes de la fase de extracción, lo que permite que este estudio se acerque más a la realidad. Tampoco este estudio incluye etapas de concentración de la mezcla de extracción por evaporación (Nasirian et al., 2017), sino que se toma una pequeña parte de la mezcla de extracción (200 μ L de 8 mL) para realizar la detección de la toxina y, a pesar de esto, el ANS es capaz de detectar 5 μ g/kg en las muestras intencionalmente contaminadas. Esto implica que el ANS es capaz de responder adecuadamente en el medio de reacción que está formado por un 56% de un solvente orgánico, ya que este medio está formado por 200 μ L de mezcla de extracción (acetonitrilo), 100 μ L de ANS en medio acuoso y 60 μ L de solución acuosa de NaCl, a pesar de la presencia de numerosos compuestos de la muestra de alimentos que deben ser solubles en acetonitrilo bajo las condiciones de trabajo empleadas y que podrían eventualmente afectar el comportamiento óptico del ANS. Este es un antecedente no reportado en estudios previos para la detección de AFB1 en alimentos que emplean nanopartículas metálicas funcionalizadas con aptámeros. El aptámero empleado en este estudio ha sido reportado por primera vez por Chen et al. (2016) para la detección de AFB1 extraída desde arroz usando una mezcla de metanol/agua (80/20), centrifugación, filtración y dilución con un buffer acuoso, alcanzando un LOD de 2 pM (0,0006 μ g/L), mediante una amplificación en cascada de la señal colorimétrica. En el presente estudio, se emplea este mismo aptámero con una modificación de su extremo 3' con un grupo tiol y, aunque la metodología

expuesta no alcanza el mismo nivel de LOD reportado por Chen, este protocolo involucra menos etapas que la mayoría de las reportadas y es el único reportado hasta ahora que usa un ANS aplicado en un medio orgánico obtenido desde la extracción de un alimento sólido complejo, por lo que contribuye al desarrollo de sistemas rápidos, portátiles y de respuestas confiables de tipo Point of Care, cuyo interés ha aumentado en la industria de los alimentos durante los años recientes (Goud et al., 2020), más aún si se considera que el Sistema de Alerta Rápido para Alimentos y Piensos de la Comisión Europea reportó 655 casos de contaminación con micotoxinas el año 2018, convirtiéndose en la segunda causa de notificación por seguridad en alimentos y que se generó 440 rechazos fronterizos durante el 2019 debido a micotoxinas en alimentos, de los cuales el 80% corresponde a casos de aflatoxinas (RASFF, 2020), haciendo cada vez más relevante la comprensión y el manejo apropiado de la interrelación existente entre humanos, animales y ambientes como estamentos de la salud global (Ogodo y Ugbogu, 2016), por lo que el desarrollo de este tipo de sistemas de detección es muy necesario ya que son eventualmente aplicables en la pesquisa de contaminantes que afecten a los tres estamentos de la salud.

Tabla 2: Estudios reportados que emplean extracción orgánica de AFB1 desde alimentos sólidos y detección con apta-nanosensores. La extracción se realizó con agitación. Entre paréntesis se indica la concentración en µg/kg.

Solvente de extracción	Muestra	Etapa (*)	Tipo de NP	Medio para detección	Detección	LOD	LOQ	Ref.
Metanol/agua (8:2)	Arroz	Antes	AuNPs	Buffer acuoso	Colorimét.	2 pM (0.0006)	10 pM (0.003)	Chen et al., 2016
Metanol/agua (8:2)	Harina de trigo	Antes	Dots poliméricos y AgNPs	Buffer acuoso	FRET	0.3 pg/mL (0.0003)	5 pg/mL (0.005)	Nasirian et al., 2017
Metanol/agua (8:2)	Maní y maíz	Después	N,C-dots y AuNPs	Buffer acuoso	FRET	5 pg/mL (0.005)	5 pg/mL (0.005)	Wang et al., 2016
Metanol/agua (8:2)	Trigo, arroz y maíz	No indicado	AgNCs	Buffer acuoso	Fluoresc.	0.3 pg/mL (0.0003)	0.001 ng/mL (0.001)	Zhang et al., 2016
Metanol/agua (6:4)	Maní y arroz	Después	AuNPs/CdTe QDs	Agua	FRET	3.4 nM (1.06)	10 nM (3,12)	Sabet et al., 2017
Metanol/agua (6:4)	Maní	Antes	AuNPs/CdZn Te QDs	Buffer acuoso	FRET	20 pg/mL (0.02)	50 pg/mL (0.05)	Lu et al., 2019
Metanol/agua (5:5)	Harina	Después	UCNPs/Bi ₂ S ₃ Nanorods	Agua	Electroq.	7.9 pg/mL (0.0079)	10 pg/mL (0.01)	Gao et al., 2020
Metanol (100%)	Harina de trigo	Después	C QDs/ Cu ₂ O NPs	Agua	Electroq.	0.9 ag/mL (9E ⁻¹⁰)	3 ag/mL (3E ⁻⁹)	Rahimi et al., 2021
Metanol/agua (5:5)	Harina de maíz	Antes	Ag/AuNPs	Agua	SERS	0.03 ng/mL (0.03)	0.05 ng/mL (0.05)	Zhao et al., 2015

(*) Etapa de contaminación artificial de muestra: antes o después del proceso de extracción.

Colorimét.: Detección colorimétrica.

FRET.: Detección mediante transferencia de energía de resonancia.

Fluoresc.: Detección fluorescente.

Electroq.: Detección electroquímica.

Electroq.: Detección mediante espectroscopía con superficie mejorada.

8. Conclusiones

Los NBS que emplean aptámeros poseen varias ventajas sobre otras técnicas analíticas tradicionales. Sin embargo, cuando estos son empleados para la detección de analitos en muestras complejas se requiere de solventes orgánicos para su extracción que pueden presentar interacciones con el aptámero y otros compuestos disueltos en él, generando alteraciones en el comportamiento del ANS. En este trabajo se estableció un método simple que permite extraer AFB1 desde pienso para ganado bovino lechero mediante acetonitrilo puro y una detección semi-cuantitativa de la toxina usando un ANS basado en AuNPs y un aptámero específico, llegando a un límite de cuantificación de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A pesar que el medio de reacción está formado por 56% de fase orgánica (acetonitrilo), debido a la extracción de la toxina desde el alimento, el ANS responde adecuadamente para discriminar 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB1, lo que sugiere que este solvente orgánico permite la formación de la estructura apropiada del aptámero para el reconocimiento de AFB1 y no afecta significativamente la superficie de las AuNPs que son parte del ANS, demostrando la capacidad de este ANS bajo las condiciones usadas y confirmando la versatilidad de los aptámeros al ser usados en sensores.

9. Bibliografía

- Abidin, Z. y Khatoon, A. (2012). Ruminant Microflora, Mycotoxin Inactivation by Ruminant Microflora and Conditions Favouring Mycotoxicosis in Ruminants: A Review. *Inter J Vet Sci.*, 1(1): 36-43.
- Agencia Internacional de Investigación en Cáncer [IARC]. (2020). Available online: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications> (accessed on 15 12 2020).
- Aiko, V. y Mehta, A. (2015). Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. *J. Biosci.*, 40, 943–954. DOI: 10.1007/s12038-015-9569-6.
- Aldewachi, H., Chalati, T., Woodroffe, M., Bricklebank, N., Sharrack, B., y Gardiner, P. (2017). Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale*, 10, 18-33. DOI: 10.1039/C7NR06367A.
- Alonso, V., González, M., Armando, M., Dogi, C., Dalcerro, A., Rosa, C., Chiacchiera, S., y Cavaglieri, L. (2011). Silage Contribution to Aflatoxin B1 Contamination of Dairy Cattle Feed, Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. En I. Torres-Pacheco (ed.), *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control* (pp: 37-52). InTech.
- Alshannaq, A. y Yu, L.-H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14, 632; DOI: 10.3390/ijerph14060632.
- Alshannaq, A.; Yu, J.H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 14(6), 632. DOI: 10.3390/ijerph14060632.
- Amendola, V.; Pilot, R.; Frascioni, M.; Marago, O.M.; Iati, M.A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *J. Phys. Condens. Matt.*, 29, 203002. DOI: 10.1088/1361-648X/aa60f3.

- Anrique, R.; Molina, X.; Alfaro, M. (2014). *Composición de alimentos para el ganado bovino*. (4th ed.). Consorcio Tecnológico de la Leche (FIC-CS-C-2004-1-P-001).
- Anthony, M., Ojochenemi, A., Mulunda, M., Oriyomi, S., Jideofor, N., Tunde, O., Seun, E. Umuhani, Y., Robertson O., Isah, A., Halima, Y., Benedict, E., Umar, A., Ochai, O. y Aderemi, A. (2016). Aflatoxin M 1 in Breast Milk, Cow Milk and Milk Products in Minna, Nigeria and their Predisposing Factors. *Biochem Anal Biochem*, 5:4. DOI: 10.4172/2161-1009.1000303.
- Bennett, J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, 100(1), 3–5. DOI: 10.1007/bf00769561.
- Bennett, J. y Klich, M. (2003). Mycotxins. *Clin. Microb. Rev.*, 497–516. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497–516.2003.
- Beyer, A. y Biziuk, A. (2008). Methods for Determining Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Food Samples—Problems and Challenges. *Crit. Rev. in Food Sc. and Nut.*, 48(10), 888-904. DOI: 10.1080/10408390701761878.
- Bordin, K., Sawada, M., y Rodrigues, C.E.d. et al. (2014). Incidence of Aflatoxins in Oil Seeds and Possible Transfer to Oil: A Re-view. *Food Eng. Rev.*, 6, 20–28. DOI: 10.1007/s12393-014-9076-9.
- Campagnollo, F., Ganev, K., Khaneghah, A., Portela, J., Cruz, A., Granato, D., Corassin, C., Oliveira, C., y Sant'Ana, A. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*, 68, 310-329. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.04.007.
- Chaou, T., Vialet, B., y Azéma, L. (2016). DNA aptamer selection in methanolic media: Adenine-aptamer as proof-of-concept. *Methods*, 97, 11-19. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.01.002.

- Chen, J., Egner, P., Ng, D., Jacobson, L., Muñoz, A., Zhu, Y., Qian, G., Wu, F., Yuan, J., Groopman, J., y Kensler, T. (2013). Reduced Af-latoxin Exposure Presages Decline in Liver Cancer Mortality in an Endemic Region of China. *Cancer Prev. Res. (Phila).*, 6(10), 1038–1045. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0168.
- Chen, J., Wen, J., Zhuang, L., y Zhou, S. (2016). An enzyme-free catalytic DNA circuit for amplified detection of aflatoxin B1 using gold nanoparticles as colorimetric indicators. *Nanoscale*, 8, 9791. DOI: 10.1039/C6NR01381C.
- Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Font, G., y Manyes, L. (2020). Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111161. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111161
- Constable, P., Hinchcliff, K., Done, S, y Grünberg, W. (2017). *Veterinary medicine-e-book: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (11° ed.). Elsevier Health Sciences.
- Contreras-Trigo, B., Díaz-García, V., Guzmán-Gutierrez, E., Sanhueza, I., Coelho, P., Godoy, S.E., Torres, S., y Oyarzún, P. (2018). Slight pH Fluctuations in the Gold Nanoparticle Synthesis Process Influence the Performance of the Citrate Reduction Method. *Sensors*, 18, 2246. DOI: 10.3390/s18072246.
- Coppock, R., Christian, R., y Jacobsen, B. (2018). Aflatoxins en R. Gupta (ed.), *Veterinary Toxicology* (3° ed. 983-994), Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6.
- Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N., y Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. En: R. Guevara-Gonzalez (ed.), *Aflatoxins-biochemistry and molecularbiology*. (pp. 221-254). Intech. DOI: 10.5772/22717.
- Diaz, G. Cepeda, S., y Martos, P. (2012). Stability of aflatoxins in solution. *J. AOAC Int.*, 95(4), 1084-1088. DOI: 10.5740/jaoacint.11-017.

- Díaz, G. y Sánchez, M. (2015). Determination of aflatoxin M1 in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. *Food Additives & Contaminants: Part A*. DOI: 10.1080/19440049.2015.1049563.
- Díaz-García, V. y Retamal-Morales, G. (2020). Aptamer and Riboswitches: A Novel Tool for the Need of New Antimicrobial Active Compounds. En V. Kokkarachedu, V. Kanikireddy y R. Sadiku (ed.), *Antibiotic Materials in Healthcare* (pp. 231-247). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-820054-4.00013-6.
- Dors, G., Caldas, S., Feddern, V., Bemvenuti, R., Hackbart, H., Moraes, M., Oliveira, M., Garda-Buffon, J., Primel, E., y Badiale-Furlong, E. (2011). En R. Guevara-González (ed.), *Aflatoxins: Contamination, Analysis and Control. In Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 415-420). InTech.
- Elahi, N., Kamali, M., y Baghersad, M. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, 537–556. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.02.088.
- Elgiouhy, M., Elgaml, S., El-Adl, M., Hegazy, A., y Hashish, E. (2020). Aflatoxicosis in cattle: clinical findings and biochemical alterations. *Environmental Science and Pollution Research*, 27:35526–35534. DOI: 10.1007/s11356-020-09489-3.
- Fallah, A. (2010). Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chem. Toxicol.*, 48, 988–991. DOI: 10.1016/j.fct.2010.01.014
- Fengqin, L., Zhigang, Y., Xianda, H., y Lai, R. (2019). Electrochemical aptamer-based sensors for food and water analysis: A review. *Analytica Chimica Acta* 1051, 1-23. DOI: 10.1016/j.aca.2018.10.058
- Frens, G. (1973). Controlled nucleation for regulation of particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.*, 241, 20–22.

- Gao, J., Yao, X., Chen, Y., Gao, Z., y Zhang, J. (2020). Near-Infrared Light-Induced Self-Powered Aptasensing Platform for Aflatoxin B1 Based on Upconversion Nanoparticles-Doped Bi₂S₃ Nanorods. *Anal. Chem.*, *93*, (2), 677–682. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04248.
- Gonçalves, B., Gonçalves, J., Rosim, R., Cappato, L., Cruz, A., Oliveira, C., y Corassin, C. (2017). Effects of different sources of *Saccharomyces cerevisiae* biomass on milk production, composition, and aflatoxin M1 excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B1. *J. Dairy Sci.* *100*, 5701–5708. DOI: 10.3168/jds.2016-12215.
- Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P., Sutcliffe, A., Hall, A., Cardwell, K., y Wild, C. (2004). Postweaning Exposure to Aflatoxin Results in Impaired Child Growth: A Longitudinal Study in Benin, West Africa. *Env. Heal. Persp.*, *112* (13), 1334-1338.
- Gong, Y., Watson, S., Routledge, y M. (2016). Aflatoxin Exposure and Associated Human Health Effects, a Review of Epidemiological Studies. *Food Saf.*, *4* (1) 14–27. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2015026
- Goud, K., Reddy, K., Satyanarayana, M., Kummari, S., y Gobi, K. (2020). A review on recent developments in optical and elec-trochemical aptamer-based assays for mycotoxins using advanced nanomaterials. *Microchim Acta*, *187*, 29. DOI: 10.1007/s00604-019-4034-0.
- Goud, K., Sharma, A., Hayat, A., Catanante, G., Gobi, K., Gurban, A., y Marty, J. (2016). Tetramethyl-6-carboxyrhodamine quenching-based aptasensing platform for aflatoxin B1: Analytical performance comparison of two aptamers. *Anal. Biochem.*, *508*, 19–24. DOI: 10.1016/j.ab.2016.05.018.
- Gutiérrez, P., Godoy, S., Torres, S., Oyarzún, P., Sanhueza, I., Díaz-García, V., Contreras-Trigo, B., y Coelho, P. (2020). Improved An-tibiotic Detection in Raw Milk Using Machine Learning Tools over the Absorption Spectra of a Problem-Specific Nanobi-osensor. *Sensors*, *20*, 4552. DOI:10.3390/s20164552.

- Hill, H. y Mikrin, C. (2006). The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nat. Protoc.*, 1, 324-336. DOI: 10.1038/nprot.2006.51.
- Jacobs, M., Panneer, A., Craven, J., y Prasad, S. (2014). Antibody-conjugated gold nanoparticle-based immunosensor for ultra-sensitive detection of troponin - T. *J. Lab. Autom.*, 19, 546–554. DOI: 10.1177/2211068214538971.
- Jia, Y., Wu, F., Liu, P., Zhou, G., Yu, B., Lou, X., y Xia, F. (2019). A label-free fluorescent aptasensor for the detection of Aflatoxin B1 in food samples using AIEgens and graphene oxide. *Talanta*, 198, 71-77. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.078.
- Jiang, Y., Jolly, P., Preko, P., Wang, J., Ellis, W., Phillips, T., y Williams, J. (2008). Aflatoxin-Related Immune Dysfunction in Health and in Human Immunodeficiency Virus Disease. *Clin. and Dev. Imm.*, article ID 790309. DOI:10.1155/2008/790309.
- Jones, F., Genter, M., Hagler, W., Hansen, J., Mowrey, B., Poore, M., y Whitlow, L. (1994). Understanding and Coping with Effects of Mycotoxins in Livestock Feed and Forage. *North Carolina State University*, Raleigh, North Carolina.
- Kagot, V., Okoth, S., De Boevre, M., y De Saeger, S. (2019). Biocontrol of Aspergillus and Fusarium Mycotoxins in Africa: Benefits and Limitations. *Toxins*, 11(2), 109. DOI: 10.3390/toxins11020109.
- Kaleibar, M. y Helan, J. (2013). A field outbreak of aflatoxicosis with high fatality rate in feedlot calves in Iran. *Comp Clin Pathol* 22, 1155–1163. DOI: 10.1007/s00580-012-1543-1.
- Kelly, K., Coronado, E., Zhao, L., y Schatz, G. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B*, 107, 668–677. DOI: 10.1021/jp026731y.

- Kumar, P., Mahato, D., Kamle, M., Mohanta, T., y Kang, S. (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Fron. of Microbiol.*, 7, 2170. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02170.
- Laborda, F., Bolea, E., Cepria, G., Gómez, M., Jiménez, M., Pérez-Arantegui, J., y Castillo, J. (2016). Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Anal. Chim. Acta*, 904, 10-32. DOI: 10.1016/j.aca.2015.11.008.
- Li, B., Li, X., Dong, Y., Wang, B., Li, D., Shi, Y., y Wu, Y. (2017). Colorimetric sensor array based on gold nanoparticles with diverse surface charges for microorganism identification. *Anal. Chem.*, 89, 10639–10643. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b02594.
- Liu, Y. y Wu, F. (2010). Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk. *Environmental Health Perspectives*, 118, 6. DOI: 10.1289/ehp.0901388.
- Lizárraga-Paulín, E., Moreno-Martínez, E., y Miranda-Castro, S. (2011). Aflatoxins and Their Impact on Human and Animal Health: An Emerging Problem. En R. Guevara-Gonzalez (ed.), *Aflatoxins: Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 255–282). Intech.
- Lu, X., Wang, C., Qian, J., Ren, C., An, K., y Wang, K. (2019). Target-driven switch-on fluorescence aptasensor for trace aflatoxin B1 determination based on highly fluorescent ternary CdZnTe quantum dots. *Anal. Chim. Acta*, 1047, 163-171. DOI: 10.1016/j.aca.2018.10.002.
- Luan, Y., Chen, Z., Xie, G., Chen, J., Lu, A., Li, C., Fu, H., Ma, Z., y Wang, J. (2015). Rapid visual detection of aflatoxin B1 by label-free aptasensor using unmodified gold nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotech.*, 15, 1357–1361. Doi:10.1166/jnn.2015.9225.
- Ma, Q., Wang, Y., Jia, J., y Xiang, Y. (2018). Colorimetric aptasensors for determination of tobramycin in milk and chicken eggs based on DNA and

gold nanoparticles. *Food Chem.*, 30(249), 98-103. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.022.

Maye, M., Han, L., Kariuki, N., Ly, N., Chan, W., Luo, J., y Zhong, C. (2003). Gold and alloy nanoparticles in solution and thin film assembly: Spectrophotometric determination of molar absorptivity. *Anal. Chem. Acta*, 496, 17–27. DOI: 10.1021/ja0654229.

McGuffey, R. (2017). A 100-Year Review: Metabolic modifiers in dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.*, 100, 10113–10142. DOI: 10.3168/jds.2017-12987.

Merck KGaA. (s. f.). Darmstadt, Germany. Consultado el 5 de enero de 2021. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/34034?lang=es®ion=CL>

Ministerio de Agricultura. (2018). Resolución 7885 exenta que establece los límites máximos de contaminantes en insumos destinados a la alimentación animal. República de Chile.

Ministerio de Salud [MINSAL]. (2017). Reglamento Sanitario de los Alimentos. DTO. N° 977/96 modificado con Dto. 37/16, D.OF. 18.01.17. República de Chile.

Naseri, M., Mohammadniaei, M., Sun, Y., y Ashley, J. (2020). The Use of Aptamers and Molecularly Imprinted Polymers in Biosensors for Environmental Monitoring: A Tale of Two Receptors. *Chemosensors*, 8, 32. DOI: 10.3390/chemosensors8020032.

Nasirian, V., Chabok, A., Barati, A., Rafienia, M., Arabi, M., y Shamsipur, M. (2017). Ultrasensitive aflatoxin B1 assay based on FRET from aptamer labelled fluorescent polymer dots to silver nanoparticles labeled with complementary DNA. *Microchim. Acta*, 184, 4655–4662. DOI: 10.1007/s00604-017-2508-5.

- Niu, S., Lv, Z., Liu, J., Bai, W., Yang, S., y Chen, A. (2014). Colorimetric aptasensor using unmodified gold nanoparticles for homogeneous multiplex detection. *PLoS One*, 9(10), e109263. DOI: 10.1371/journal.pone.0109263.
- Ogodo, A. y Ugbogu, O. (2016). Public Health Significance of Aflatoxin in Food Industry – A Review. *European Journal of Clinical and Biomedical Sciences*, 2(5): 51-58. DOI: 10.11648/j.ejcb.20160205.14.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2018). Aflatoxins. Department of Food Safety and Zoonoses. Res No.: WHO/NHM/FOS/RAM/18.1.
- Pandey, P., Datta, M., y Malhotra, B. (2008). Prospects of Nanomaterials in Biosensors. *Anal. Letters*, 41(2), 159-209. DOI: 10.1080/00032710701792620.
- Pier, A. (1992). Major biological consequences of aflatoxicosis in animal. *J. Anim. Sci.* 70, 3964-3967.
- Queiroz, O., Han, J. Staples, C. y Adesogan, A. (2012). Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B1-contaminated diet. *J. Dairy Sci.* 95, 5901–5908. DOI: 10.3168/jds.2011-5287.
- Rahimi, F., Roshanfekar, H., y Peyman, H. (2021). Ultra-sensitive electrochemical aptasensor for label-free detection of Aflatoxin B1 in wheat flour sample using factorial design experiments. *Food Chem.*, 343, 128436. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128436.
- RASSF. (2020). Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report 2019. *Off. Eur. Un. Luxemburg.*, pp. 29-30.
- Ren, X., Zhang, Q., Zhang, W., Mao, J., y Li, P. (2020). Control of Aflatoxigenic Molds by Antagonistic Microorganisms: Inhibitory Behaviors, Bioactive Compounds, Related Mechanisms, and Influencing Factors. *Toxins*, 12, 24. DOI:10.3390/toxins12010024.

- Rhouati, R., Catanante, G., Nunes, G., Hayat, A., y Marty, J. (2016). Label-Free Aptasensors for the Detection of Mycotoxins. *Sensors*, 16, 2178. DOI: 10.3390/s16122178.
- Rodríguez-Carrasco, Y., Izzo, L., Gaspari, A., Graziani, G., Mañes, J., y Ritieni, A. (2018). Simultaneous Determination of AFB1 and AFM1 in Milk Samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spec-trometry. *Beverages*, 4, 43. DOI: 10.3390/beverages4020043.
- Romer Labs Division Holding GmbH. (s. f.). Consultado el 5 de enero de 2021. https://www.romerlabs.com/shop/inter_en/aflatoxins-in-acetonitrile/
- Rushing B., Selim M. (2019) Aflatoxin B1. A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chem. Toxicol.*, 124, 81–100. DOI: 10.1016/j.fct.2018.11.047.
- Sabet, F., Hosseini, M., Khabbaz, H., Dadmehr, M., y Ganjali, M. (2017). FRET-based aptamer biosensor for selective and sensitive detection of aflatoxin B1 in peanut and rice. *Food Chem.*, 220, 527–532. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.004.
- Saha, K., Agasti, S., Kim, C., Li, X., y Rotello, V. (2012). Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem. Rev.*, 112, 2739–2779. DOI: 10.1021/cr2001178.
- Sarma, U., Bhetaria, P., Devi, P., y Varma, A. (2017). Aflatoxins: Implications on Health. *Ind J Clin Biochem*. DOI: 10.1007/s12291-017-0649-2.
- Sharma, A., Catanante, G., Hayat, A., Istamboulie, G., Reje, I., Bhand, S., y Marty, J. (2016). Development of structures witching aptamer assay for detection of aflatoxin M1 in milk sample. *Talanta*, 158, 35–41. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.05.043.
- Statista. (s. f.). Consultado el 10 de enero de 2021. <https://www.statista.com/statistics/502280/global-dairy-market-value/>

- Tan, L., Neoh, K., Kang, E., Choe, W., y Su, X. (2012). Affinity analysis of DNA aptamer-peptide interactions using gold nanoparticles. *Anal Biochem.*, 421, 725-31. DOI: 10.1016/j.ab.2011.12.007.
- Turkevich, J., Stevenson, P., y Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. Discuss. *Faraday Soc.*, 11, 55–75.
- Udomkun, P., Wiredu, A., Nagle, M., Bandyopadhyay, R., Müller, J., y Vanlauwe, B. (2017). Mycotoxins in Sub-Saharan Africa. Present situation, socio-economic impact, awareness, and outlook. *Food Control*, 72, 110e122. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.07.039.
- Unión Europea. (2002). Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council Off. *J. Eur. Un.*, L140/16.
- Urusov, A., Zherdev, A., Petrakova, A., Sadykhov, E., Koroleva, O., y Dzantiev, B. (2015). Rapid Multiple Immunoen-zyme Assay of Mycotoxins. *Toxins*, 7, 238-254. DOI:10.3390/toxins7020238.
- Var, I., Kabak, B., y Go, F. (2007). Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC. *Food Control*, 18, 59–62. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.08.008.
- Vardon, P. (2003). Potential Economic Costs of Mycotoxins in the US. En L. Koong (ed.), *Mycotoxins - Risks in Plant, Animals and Human Systems*. (pp: 118-128). Council for Agricultural Science and Technology, USA.
- Wang, B., Chen, Y., Wu, Y., Weng, B., Liu, Y., Lu, Z., Li, C., y Yu, C. (2016). Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB1. *Biosen. and Bioelect.*, 78, 23-30. DOI: 10.1016/j.bios.2015.11.015.
- Wang, L., Zhu, F., Chen, M., Zhu, Y., Xiao, J., Yang, H., y Chen, X. (2019). Rapid and visual detection of aflatoxin B1 in foodstuffs using aptamer/Gquadruplex

- DNAzyme probe with low background noise. *Food Chem.*, 271, 581–587. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.08.007.
- Wang, Q., Yang, Q., y Wu, W. (2020). Progress on Structured Biosensors for Monitoring Aflatoxin B1 from Biofilms: A Review. *Front. Microbiol.*, 11, 408. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00408.
- Williams, D., Orner, G., Willard, K., Tilton, S., Hendricks, J., Pereira, C., Benninghoff, A., y Bailey, G. (2009). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and ultra-low dose cancer studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 175–181. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.12.002.
- Winter, G. y Pereg, L. (2019). A review on the relation between soil and mycotoxins. Effect of aflatoxin on field, food and finance. *Eur. J. Soil. Sci.*, 70, 882–897. DOI: 10.1111/ejss.12813.
- Wu, F. (2014). Perspective: Time to face the fungal threat. *Nature*, 516, S7. DOI: 10.1038/516S7a.
- Wu, F., Narrod, C., Tiongco, M., y Liu, Y. (2011). *The health economics of aflatoxin: Global burden of disease*. International Food Policy Research Institute. USA.
- Xia, X., He, Q., Dong, Y., Deng, R., y Li, J. (2020). Aptamer-based homogeneous analysis for food control. *Current Analytical Chemistry*, 14(16), 1, 4-13. DOI: 10.2174/1573411014666180810125737.
- Xie, Y., Ning, M., Ban, J., y Li, Q. (2019). Novel Enzyme-Linked Aptamer Assay for the Determination of Aflatoxin B1 in Peanuts. *Anal. Letters*, 52(18), 2961-2973. DOI: 10.1080/00032719.2019.1632337.
- Yazdanpanah, H., Zarghi, A., Shafaati, A., Foroutan, S., Aboul-Fathi, F., Khoddam, A., Nazari, F., y Shaki, F. (2013). Analysis of aflatoxin b1 in Iranian foods using HPLC and a monolithic column and estimation of its dietary intake. *Iranian J. of Pharm. Res.*, 12, 83–89.

- Zhang, C., Dou, X., Zhang, L., Sun, M., Zhao, M., OuYang, Z., Kong, D., Antonio, F., y Yang, M. (2018). A Rapid Label-Free Fluorescent Aptasensor PicoGreen-Based Strategy for Aflatoxin B₁ Detection in Traditional Chinese Medicines. *Toxins (Basel)*, 10(3), 101. DOI: 10.3390/toxins10030101.
- Zhang, J., Liu, B., Liu, H., Zhang, X., y Tan, W. (2013). Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. *Nanomedicine*, 8, 983–993. DOI: 10.2217/nnm.13.80.
- Zhang, J., Xia, J., Chen, M., Wu, D., Cai, S., Liu, M., He, W., y Chen, J. (2016). A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver nanoclusters coupling with Zn(II)-ion signal-enhancement for simultaneous detection of OTA and AFB₁. *Sen. and Act. B: Chem.*, 235, 79-85. DOI: 10.1016/j.snb.2016.05.061.
- Zhao, Y., Huang, J., Ma, L., y Wang, F. (2017). Development and validation of a simple and fast method for simultaneous determination of aflatoxin B₁ and sterigmatocystin in grains. *Food Chem.*, 221, 11–17. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.036.
- Zhao, Y., Yaxin, Y., Yaodong, L., Xuan, Y., Manli, L., y Qijun, S. (2015). Double Detection of Mycotoxins Based on SERS Labels Embedded Ag@Au Core-Shell Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interf.*, 7, 39, 21780–21786. DOI: 10.1021/acsami.5b07804.
- Zhao, Z., Wang, H., Zhai, W., Feng, X., Fan, X., Chen, A., y Wang, M. (2020). A Lateral Flow Strip Based on a Truncated Aptamer-Complementary Strand for Detection of Type-B Aflatoxins in Nuts and Dried Figs. *Toxins*, 12, 136. DOI: 10.3390/toxins12020136.

Anexo 1: Cálculos de R², LOD y LOQ para cada curva de calibración de los ANS generados.

Fórmulas empleadas:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

LOD = YB + 3SB

LOC = YB + 10SB

R²:

Conc. (µg/kg)	Proporción AuNPs:Aptámero		
	1:10	1:20	1:40
0	1,00	1,00	1,00
1	1,128	0,882	1,124
2	1,284	1,057	1,323
5	1,579	1,38	1,144
10	1,625	1,154	1,027
R²:	0,8259	0,3278	0,0511

LOD y LOQ:

Parámetro	Proporción AuNPs:Aptámero		
	1:10	1:20	1:40
YB	1,579	1,380	1,144
SB	0,018	0,084	0,019
Ecuación:	Y = 0,06171*X + 1,101	Y = 0,02658*X + 0,9989	Y = -0,007129*X + 1,149
m	0,06171	0,02658	-0,007129
n	1,101	0,9989	1,149
Y LOD	1,155	1,251	1,206
Y LOQ	1,282	1,841	1,341
LOD	0,88	9,50	-8,06
LOQ	2,94	31,67	-26,87