

Susana Hernández Agoiz

Nuevos inmunosensores  
magnéticos de transducción  
espectrofotométrica y  
electroquímica para la  
determinación de deoxinivalenol  
en cereales

Departamento  
Química Analítica

Director/es

Castillo Suárez, Juan Ramón  
Vidal Ibáñez, Juan Carlos  
Bonel Sanmartín, Laura

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

NUEVOS INMUNOSENSORES MAGNÉTICOS DE  
TRANSDUCCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y  
ELECTROQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE  
DEOXINIVALENOL EN CEREALES

Autor

Susana Hernández Agoiz

Director/es

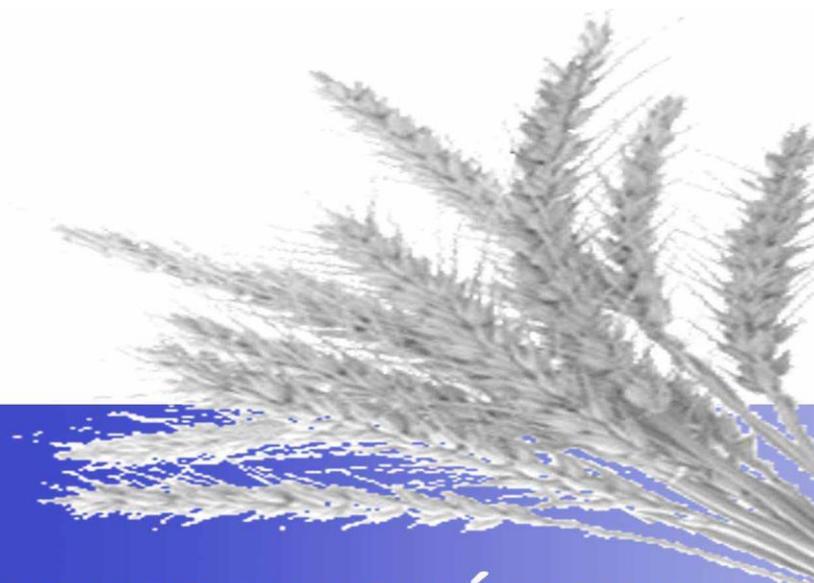
Castillo Suárez, Juan Ramón  
Vidal Ibáñez, Juan Carlos  
Bonel Sanmartín, Laura

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Química Analítica

2014





# NUEVOS INMUNOSENSORES MAGNÉTICOS DE TRANSDUCCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y ELECTROQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN CEREALES



**Universidad**  
Zaragoza

**SUSANA HERNÁNDEZ AGOIZ**  
**TESIS DOCTORAL 2014**



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS**  
**AMBIENTALES DE ARAGÓN**



**NUEVOS INMUNOSENSORES MAGNÉTICOS DE  
TRANSDUCCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y  
ELECTROQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN  
DE DEOXINIVALENOL EN CEREALES**

**SUSANA HERNÁNDEZ AGOIZ**

**TESIS DOCTORAL 2014**





Instituto Universitario de Investigación  
en Ciencias Ambientales  
de Aragón  
Universidad Zaragoza



Departamento de  
Química Analítica  
Universidad Zaragoza



# NUEVOS INMUNOSENSORES MAGNÉTICOS DE TRANSDUCCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y ELECTROQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN CEREALES

Memoria presentada en la Facultad de Ciencias  
de la Universidad de Zaragoza por **Dña. Susana  
Hernández Agoiz** para optar al grado de Doctora  
por la Universidad de Zaragoza





Instituto Universitario de Investigación  
en Ciencias Ambientales  
de Aragón  
Universidad Zaragoza



Universidad  
Zaragoza

D. Juan Ramón Castillo Suárez, Catedrático de la Universidad de Zaragoza, D. Juan Carlos Vidal Ibáñez, Profesor Titular de la Universidad de Zaragoza, y Dña. Laura Bonel Sanmartín, investigadora contratada por la empresa Capher IDI S.L.,

**CERTIFICAN:**

Que la presente Memoria:

“NUEVOS INMUNOSENSORES MAGNÉTICOS DE TRANSDUCCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y ELECTROQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN CEREALES”,

correspondiente al Proyecto de Tesis aprobado por la Comisión Académica del Programa de Doctorado “Ciencia Analítica en Química” el 10 de Marzo de 2014, y autorizado por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Zaragoza el día 27 de Marzo de 2014, ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. Susana Hernández Agoiz en el Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón, Departamento de Química Analítica, y en la empresa Capher IDI S.L. en base al convenio suscrito el 10/Diciembre/2010 entre la Universidad de Zaragoza y la mencionada empresa, para optar al título de Doctora por la Universidad de Zaragoza.

Y así mismo, AUTORIZAN la presentación de dicha Memoria para que sea defendida ante el Tribunal correspondiente.

Zaragoza, a 28 de Abril de 2014

Juan R. Castillo

Juan C. Vidal

Laura Bonel



Este trabajo ha sido financiado por la empresa Capher IDI S.L., el Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto IPT-2011-1766-010000 (INNPACTO 2011), y por la Universidad de Zaragoza con el proyecto UZ-2011-CIE-07



“Actúa en vez de suplicar. Sacrificate sin esperanza de gloria  
ni recompensa. Si quieres conocer los milagros, hazlos tú antes.

Sólo así podrá cumplirse tu peculiar destino”

*Ludwig van Beethoven*



## ***Agradecimientos***

En primer lugar quiero agradecer al profesor D. Juan Ramón Castillo la confianza puesta en mí para el desarrollo de este trabajo de investigación, quién me dio la posibilidad de comenzar una carrera investigadora y de conseguir retos que nunca habría imaginado.

También al profesor D. Juan Carlos Vidal, quién me ayudo y me guió en mis dudas, intentando que el camino recorrido en estos años fuera mucho más sencillo y agradable.

Para la Doctora Laura Bonel, quiero tener un agradecimiento especial, por el tiempo invertido en mi tesis, la ayuda ofrecida en los momentos difíciles en los que vimos todo negro, y la alegría mostrada en mis triunfos.

A mis compañeros de laboratorio y ya amigos, de los cuales he extraído grandes valores profesionales y sobre todo personales. Gracias a mis chicas, por vuestro apoyo y por vuestros consejos; sabéis que no ha sido fácil pero todo se consigue con confianza y esfuerzo. Positivismo ante todo. Me llevo esos momentos del laboratorio, y también de fuera de él (comidas diarias, sobremesas, celebraciones...).

A mis amigos y amigas de toda la vida, quienes han estado conmigo a lo largo de este camino, y que pese a no entender a penas el tema de mi tesis me han animado a seguir adelante, mostrando gran curiosidad por cada paso que daba. Aquí tenéis el resultado para cuando lo queráis leer.

Una mención especial se merecen mis padres y mi hermano Ángel. Sin ellos la conclusión de esta tesis no habría sido posible dadas las dificultades del momento. Gracias por animarme a seguir adelante, aguantar mis cambios de humor, valorarme, y acompañarme en los momentos bajos y gracias por vuestro interés diario, vuestra alegría constante y el orgullo mostrado por cada cosa que hago.

Gracias a Jorge, por su compañía, paciencia, por entender mis agobios y saber estar a mi lado en cada momento durante todos estos años. Gracias por cambiar fines de semana de salidas o viajes por días aburridos en casa esperando que yo acabara de estudiar, redactar la tesis o quién sabe qué. Gracias por tu confianza en mí y por tu apoyo.

Y un agradecimiento general a todos los miembros del Departamento de Química Analítica. Hemos pasado muchos momentos juntos que siempre recordaré.

Gracias de verdad



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>Páginas</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. MICOTOXINAS	1
1.1.1 Técnicas analíticas para la determinación de micotoxinas	3
1.2 DEOXINIVALENOL	7
1.2.1 Toxicidad del deoxinivalenol	11
1.2.2 Legislación	13
1.2.3 Determinación de deoxinivalenol mediante inmunoensayo	15
1.2.4 Determinación de deoxinivalenol mediante técnicas cromatográficas	30
1.3 ANTICUERPOS COMO ELEMENTOS DE BIORRECONOCIMIENTO	33
1.3.1. Producción de anticuerpos selectivos a deoxinivalenol: inmunógenos	33
1.3.2. Anticuerpos selectivos al deoxinivalenol: inmunoensayos	37
1.4 PARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMO SUPERFICIE SÓLIDA DE INMOVILIZACIÓN EN EL INMUNOENSAYO	39
1.4.1. Uso de partículas magnéticas como superficie de un inmunosensor	39
1.4.2. Uso de partículas magnéticas en inmunosensores para micotoxinas	43
1.5 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO	44
1.5.1. Producción de electrodos serigrafiados (SPEs)	46
1.5.2. Uso de electrodos serigrafiados de carbono en biosensores electroquímicos para micotoxinas	50
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>63</b>
3.1 MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN	63

3.2 REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS	70
3.2.1 Reactivos de uso general	70
3.2.2 Reactivos de inmunoensayo	71
3.2.3 Materiales de referencia certificados y muestras de cereales	71
3.3 DISOLUCIONES TAMPÓN	73
3.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	74
3.4.1 Síntesis del conjugado enzimático DON-HRP	74
3.4.2 Resonancia de Plasmón Superficial	76
3.4.3 Inmovilización del anticuerpo sobre las partículas magnéticas	77
3.4.4 ELISA espectrofotométrico	83
3.4.5 Inmunosensor electroquímico con electrodos serigrafiados SPCEs individuales	86
3.4.6 Inmunosensor electroquímico con electrodos múltiples	88
3.4.7. Inmunosensor competitivo para la determinación de Fumonisina B1	90
3.4.8 Extracción de micotoxinas en muestras de harina de cereales	91
3.4.9 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	95
3.4.10 Procedimiento de inmunoensayo con el <i>kit</i> comercial de Europroxima(5121DON)	96
3.5 MODELO MATEMÁTICO DE AJUSTE DE LOS CALIBRADOS COMPETITIVOS: MODELO 4PL	99
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO ENZIMÁTICO DEOXINIVALENOL- PEROXIDASA (DON-HRP)	105
4.2 ESTUDIO DE LA AFINIDAD DE ANTICUERPOS POLICLONAL Y MONOCLONAL DE DEOXINIVALENOL	109
4.2.1 Anticuerpo policlonal	110
4.2.2 Anticuerpo monoclonal	136

4.3 OPTIMIZACIÓN Y DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR DIRECTO COMPETITIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL	143
4.3.1 mELISA utilizando partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G	144
4.3.2 Inmunosensor electroquímico utilizando electrodos serigrafiados (SPCEs) individuales	161
4.3.3 Inmunosensor electroquímico utilizando electrodos SPCEs múltiples (CH8): <i>Multistep Amperometric</i>	164
4.3.4. Inmunosensor electroquímico utilizando electrodos SPCEs múltiples (CH8): <i>Amperometric Detection</i>	183
4.4 INTERFERENCIAS Y REACTIVIDAD CRUZADA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL (mAbDON) CON OTRAS MICOTOXINAS	199
4.4.1 Interferencias producidas por disolventes orgánicos	199
4.4.2 Interferencias de otras micotoxinas en la muestra: reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales del DON y la FB1	207
4.5 TIEMPO DE VIDA DEL INMUNOSENSOR	210
4.6 DETERMINACIÓN DE DON EN MUESTRAS DE ORIGEN CEREAL	212
4.6.1 Determinación de DON en muestras de cereales	214
4.6.2 Comparativa de resultados obtenidos por mELISA y AD-a	225
4.6.3 Estudio de la reproducibilidad entre determinaciones realizadas sobre diferentes extractos del CRM TR-D100.	230
4.7 VALIDACIÓN DEL INMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE DON	234
4.7.1 Comparación de resultados con un <i>kit</i> ELISA comercial (Europroxima)	235
4.7.2 Validación de resultados por HPLC-UV-Vis	238
4.7.3 Comparación estadística de los resultados frente a HPLC-UV-Vis y frente al <i>kit</i> comercial ELISA (Europroxima)	246

4.8 DETERMINACIÓN CONJUNTA DE DON Y FB1 EN UNA MUESTRA DE HARINA DE CEREALES	250
4.8.1 Extracción conjunta de DON y FB1 de las muestras	250
4.8.2 Determinación simultánea de DON y FB1 en los CRMs	252
4.8.3 Validación de resultados por HPLC-UV-Vis	260
4.8.4 Determinación de DON y FB1 por mELISA en una muestra conjunta de harina de maíz y de trigo (TR-F100 + TR-D100)	265

**CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....279**

**CAPÍTULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....287**

**ANEXOS**





## ABREVIATURAS

<b>Ab</b>	Anticuerpo
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AC</b>	Tampón acetato
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AD</b>	<i>Amperometric Detection</i>
<b>AD-a</b>	<i>Amperometric Detection</i> modo alternado
<b>AD-c</b>	<i>Amperometric Detection</i> modo consecutivo
<b>AF</b>	Aflatoxina
<b>AFB1</b>	Aflatoxina B1
<b>AFM1</b>	Aflatoxina M1
<b>AFB1-BSA</b>	Conjugado AFB1 con albúmina sérica bovina
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AOAC</b>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
<b>AuNPs</b>	Nanopartículas de oro
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina
<b>CB</b>	Tampón carbonatos
<b>CDI</b>	1,1,-carbodiimidazol
<b>CIT</b>	Citrulina
<b>CH8</b>	Electrodos serigrafados de carbono múltiples
<b>CMEs</b>	Electrodos Químicamente Modificados
<b>CRA</b>	Cronoamperometría
<b>CRM</b>	Patrón de referencia certificada
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DON</b>	Deoxinivalenol
<b>DON-BSA</b>	Conjugado Deoxinivalenol con albúmina sérica bovina
<b>DON-HRP</b>	Conjugado Deoxinivalenol con peroxidasa
<b>DON-HSA</b>	Conjugado Deoxinivalenol con albúmina sérica humana
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPV</b>	Voltametría de pulsos diferenciales
<b>DSR</b>	Desviación estándar relativa
<b>eaHRP</b>	Peroxidasa funcionalizada con estreptavidina
<b>EAM-UV-Vis</b>	Espectrometría de absorción molecular UV-visible
<b>EC<sub>50</sub></b>	Mitad de la máxima concentración efectiva (toxicidad)
<b>EDC</b>	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
<b>EIS</b>	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>ELIME</b>	<i>Enzyme-Linked-ImmunoMagnetic-Electrochemical Assay</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>EA</b>	Electrodo auxiliar
<b>ER</b>	Electrodo de referencia
<b>ET</b>	Electrodo de trabajo

<b>FAO</b>	<i>Food and Agricultural Organization</i>
<b>FB1</b>	Fumonisin B1
<b>FB1-HRP</b>	Conjugado Fumonisin B1 con peroxidasa
<b>FB2</b>	Fumonisin B2
<b>GAP</b>	Buenas prácticas agrícolas ( <i>Good Agricultural Practices</i> )
<b>GC-ECD</b>	Cromatografía de Gases/Detección por captura de electrones
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases/ Espectrometría de masas
<b>GMP</b>	Buenas prácticas de manipulación ( <i>Good Manufacturing Practices</i> )
<b>HBS-EP</b>	Tampón compuesto de HEPES, NaCl, EDTA y Polisorbato
<b>HPLC-FD</b>	Cromatografía líquida de alta resolución/Detección fluorescente
<b>HPLC-MS</b>	Cromatografía líquida de alta resolución/Espectrometría de masas
<b>HPLC-UV-Vis</b>	Cromatografía líquida de alta resolución/Ultravioleta- Visible
<b>HQ</b>	Hidroquinona
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>HSA</b>	Albúmina sérica humana
<b>i</b>	Intensidad
<b>IAC</b>	Columnas de Inmunofinidad
<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
<b>J</b>	Jumpers (J1, J2, J3, J4, ...)
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida/Espectrometría de masas
<b>LOD</b>	Límite de detección ( <i>Limit Of Detection</i> )
<b>MA</b>	<i>Multistep Amperometric</i>
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>mAbDON</b>	Anticuerpo monoclonal selectivo al DON
<b>mAbFB1</b>	Anticuerpo monoclonal selectivo a la FB1
<b>MALDI</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
<b>MBs</b>	Partículas magnéticas
<b>MBs-<i>algG</i></b>	Partículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo tipo IgG
<b>MBs-COOH</b>	Partículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilo
<b>MBs-NH<sub>2</sub></b>	Partículas magnéticas funcionalizadas con grupos amino
<b>MBs-prA</b>	Partículas magnéticas funcionalizadas con proteína A
<b>MBs-prG</b>	Partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G
<b>MBs-To</b>	Partículas magnéticas funcionalizadas con el grupo tosilo
<b>mELISA</b>	ELISA utilizando MBs como superficie de inmovilización
<b>MES</b>	Tampón de ácido 2-(N-morfolino etano sulfónico)
<b>MIPs</b>	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
<b>Modelo 3PL</b>	Modelo de ajuste de los 3 parámetros logísticos
<b>Modelo 4PL</b>	Modelo de ajuste de los 4 parámetros logísticos
<b>NHS</b>	N-Hidroxisuccinimida
<b>NIV</b>	Nivalenol
<b>NOAEL</b>	<i>Non Observed Adverse Effects Level</i>
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>OEPM</b>	Oficina Española de Patentes y Marcas
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>OTA-BSA</b>	Conjugado OTA con albúmina sérica bovina

<b>OTA-HRP</b>	Conjugado OTA con peroxidasa
<b>OTB</b>	Ocratoxina B
<b>OWLM</b>	<i>Optical Waveguide Light Mode</i>
<b>pAb</b>	Anticuerpo policlonal
<b>pAbDON</b>	Anticuerpo policlonal selectivo al DON
<b>PAT</b>	Patulina
<b>pBQ</b>	p-Benzoquinona
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBST</b>	Tampón fosfato salino con Tween20
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PMPI</b>	p-maleimidofenil isocianato
<b>PTFE</b>	Microfiltro de teflón
<b>QCM</b>	Microbalanza de cristal de cuarzo
<b>R</b>	Coeficiente de regresión
<b>rAb</b>	Anticuerpo recombinante
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RU</b>	Unidades de respuesta
<b>s</b>	Desviación estándar
<b>SATA</b>	N-succinimidil S-acetiltioacetato
<b>SCFV</b>	<i>Single Chain Fragment Variable</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>SELEX</b>	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
<b>SFC</b>	Cromatografía De Fluidos Supercríticos
<b>SPCE</b>	Electrodo serigrafiado de base carbono ( <i>screen-printed carbon electrode</i> )
<b>SPE</b>	Electrodo serigrafiado ( <i>screen-printed electrode</i> )
<b>SPR</b>	Resonancia de Plasmón Superficial
<b>TBS</b>	Tampón Tris salino
<b>TDI</b>	Ingesta Diaria Tolerable
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>TMB</b>	3, 3',5, 5'- tetrametilbencidina
<b>TOF</b>	Detector de iones por tiempo de vuelo (Time Of Fly)
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible
<b>VC</b>	Voltametría cíclica
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>ZEA</b>	Zearalenona
<b>ZEA-HRP</b>	Conjugado ZEA con peroxidasa



---

# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

---



# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. MICOTOXINAS

La gran diversidad del reino de los hongos está asociada con la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios generados por ciertos hongos filamentosos como son además de las micotoxinas y las fitotoxinas, algunas especies de interés para los humanos, como los antibióticos o ciertos productos utilizados en la actualidad como fármacos. La producción de un metabolito secundario en particular es a menudo específica de una especie o cepa determinada, y es normalmente sensible a condiciones ambientales y nutricionales [1].

Las **micotoxinas** son un grupo grande y variado de metabolitos secundarios producidos por diferentes hongos filamentosos y que tienen efectos tóxicos contra los vertebrados y contra otros organismos [2], y las más importantes proceden de las especies de hongos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* [3]. Las micotoxinas han existido desde siempre, pero el reconocimiento de su naturaleza química no se produjo hasta hace relativamente poco tiempo. Se han descrito más de 300 micotoxinas diferentes, con moléculas heterocíclicas muy diversas, que afectan a una amplia gama de productos agrícolas como cereales, alimentos a base de cereales, frutos secos, vino, leche, granos de café, cacao, pan o productos cárnicos, los cuales son la base de la economía de muchos países en desarrollo [4].

La contaminación de los alimentos por micotoxinas se ha convertido en un asunto de gran preocupación especialmente en la última década, ya que son responsables de muchas enfermedades graves [5]. La determinación analítica de las micotoxinas en los alimentos es realmente importante debido a su alta toxicidad en los seres humanos y los animales, y muchos países de todo el mundo han establecido controles muy estrictos de aquellos alimentos que puedan estar contaminados durante la cosecha o el almacenamiento. En los últimos años, con el aumento de la globalización y el comercio mundial, el problema de las micotoxinas está creciendo significativamente [2].

La primera micotoxina descrita como tal fue la aflatoxina B1 (AFB1) (procedente de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*) por primera vez en la década de los 60. Se trata de un potente carcinógeno humano y el principal responsable de cáncer de hígado en animales [6].

Las micotoxinas pueden clasificarse atendiendo al tipo de hongo que las produce (Tabla 1):

HONGO	MICOTOXINAS	ALIMENTOS DONDE APARECEN
<b><i>Aspergillus</i></b>	Aflatoxinas (AF)	Maíz, arroz, trigo, olivo, pimienta, almendro, higo
	Ocratoxinas (OTA y OTB)	Uva, trigo, cebada, café, frutos secos
<b><i>Penicillium</i></b>	Citrinina (CIT)	Arroz, trigo, cebada, maíz, cacahuete, centeno, avena
	Patulina (PAT)	Manzana, albaricoque, uva, melocotón, pera, aceitunas y cereales
<b><i>Fusarium</i></b>	Tricotecenos A: Toxinas T-2 y HT-2	Cebada, avena, trigo, maíz, habas
	Tricotecenos B : Deoxinivalenol (DON) y Nivalenol (NIV)	Trigo, maíz, cebada, avena
	Fumonisinias (FB1, FB2)	Maíz, arroz, espárragos, cerveza, ajo
	Zearalenonas (ZEA)	Maíz, trigo, sorgo
<b><i>Alternaria</i></b>	Altertoxinas	Trigo, maíz, cebada, girasol
	Alternariol	Trigo, maíz, cebada, girasol
	Ácido ternuazoico	Trigo, maíz, cebada, girasol

**Tabla 1: Clasificación de las micotoxinas más importantes según el hongo que la produce y los alimentos que contamina**

La importancia en el control y la determinación de las micotoxinas se resume en tres apartados relacionados entre sí:

- Metabolismo y toxicología
- Salud y productividad
- Valor económico

La **toxicidad** de una micotoxina, tras la exposición por ingesta, inhalación o contacto con la piel, está determinada por fenómenos relacionados con el metabolismo, que comprenden la administración, absorción, transformación, farmacocinética, interacciones moleculares, distribución y excreción de la toxina y sus metabolitos. A su vez, la toxicidad de una micotoxina afecta en mayor o menor medida según sus efectos sobre la salud de las personas y los animales y la productividad de los cultivos, y por consiguiente estos efectos influirán en el valor económico de las actividades humanas y los productos agrícolas y pecuarios [7].

Dada su importancia, las micotoxinas fueron reguladas en países de todo el mundo, aunque que las regulaciones en un principio variaban de un país a otro según el tipo de micotoxina, la matriz (tipo de alimento o pienso), así como el nivel máximo de concentración permitido. Como resultado de la creación de la Unión Europea (UE) y más especialmente desde mediados de la década de los 2000, alrededor de 100 países (aproximadamente el 85% de los habitantes del mundo) tenían regulaciones específicas o directrices detalladas para la presencia de micotoxinas en alimentos [8]. Con el fin de beneficiar y coordinar el mercado común en la UE, se han elaborado normativas relativas a determinados contaminantes comunes en todos los países miembros de la Comunidad Europea [9], fijando unos límites máximos permitidos que dependen no sólo de la toxicidad, sino también del tipo de alimento y de su nivel de procesado previo a la ingesta. El objetivo principal de los reglamentos comunes en la UE es la **protección de la salud del consumidor**, junto a la descripción de los procedimientos para la disminución de las cantidades de micotoxina en productos alimenticios [2].

Una de las directivas más importantes en este aspecto es la Comisión Reguladora 1881/2006 del 19 de Diciembre de 2006 [10] que establece los niveles máximos de ciertos contaminantes en productos alimenticios, entre los que se encuentran las micotoxinas. Además el Reglamento de la UE 401/2006 del 23 de septiembre de 2006 [11], que establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en productos alimentarios. Los métodos de muestreo según el Reglamento 401/2006 se realizan en función de la micotoxina, del tipo de alimento (cereal, fruta, frutos secos, especias, leche, café...), de las toneladas de producto, del tipo de lotes, etc. Además se exponen las características analíticas de las determinaciones tales como porcentaje de desviación estándar relativa (%DSR), porcentaje de recuperación, etc. en función del tipo de micotoxina y de la cantidad de muestra ensayada [11].

La detección temprana de las micotoxinas o de los hongos que las producen, es un factor crucial para los países donde se produce principalmente la contaminación, con el fin de cumplir con los requisitos comerciales y para tener un control fiable y rentable, así como para implantar estrategias de prevención en el lugar de la contaminación [9].

### **1.1.1 Técnicas analíticas para la determinación de micotoxinas**

La presencia de micotoxinas en alimentos y en piensos es un riesgo para la salud de los animales y los seres humanos. Se pueden encontrar en una amplia gama de alimentos y piensos contaminados por el deterioro invisible en el campo durante el crecimiento

de las plantas, por la cosecha, el almacenamiento o el procesado. Varios estudios anteriores reportan que alrededor del 25% de los productos alimenticios (principalmente de origen vegetal) están contaminados por micotoxinas en el mundo [9]. Entre estos, las aflatoxinas representan la principal amenaza en todo el mundo, debido a su enorme toxicidad y amplia presencia.

Debido a la peligrosidad que entraña ingerir alimentos contaminados por las diferentes micotoxinas en concentraciones muy pequeñas (en algunos casos por debajo de los ppb's) se hace necesario buscar técnicas analíticas que permitan la determinación cuantitativa de estos compuestos en las matrices de alimentos. Además, dadas estas concentraciones tan pequeñas, es necesario utilizar **métodos analíticos muy sensibles** y selectivos [12]. Los métodos analíticos convencionales se basan principalmente en técnicas de separación instrumentales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con diferentes tipos de detección (principalmente UV-Vis, fluorescencia molecular o espectrometría de masas) y los inmunoensayos enzimáticos por su gran selectividad como los ensayos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) [13].

Las técnicas analíticas más utilizadas actualmente en los métodos oficiales son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columnas de fase reversa, utilizando detectores de fluorescencia molecular [14], de absorción UV-Vis [15] o detectores de espectrometría de masas [16], proporcionando límites de detección en un intervalo entre 0,01 y 5 ng ml<sup>-1</sup>. Estos métodos implican generalmente procedimientos previos de preconcentración y limpieza para la eliminación de la matriz y de las interferencias, por ejemplo usando columnas de inmunoafinidad (IAC) que contienen anticuerpos anti-micotoxinas, o columnas de extracción en fase sólida (SPE) utilizando disolventes orgánicos. En ocasiones, es necesario realizar una derivatización previa de la micotoxinas para su detección óptica, en el caso de que no sea activa ópticamente, como en el caso de la FB1 (detección fluorescente, HPLC-FD) [17; 18].

La determinación por ELISA espectrofotométrico se ha convertido en una de las herramientas más útiles para un rápido control de las micotoxinas, consiguiendo en ocasiones límites de detección tan bajos como 0,1 ng g<sup>-1</sup> [19]. La tecnología se basa en la capacidad de los anticuerpos específicos para distinguir la estructura tridimensional de una micotoxina durante la incubación competitiva en tiempos aproximados de una hora. A pesar de la alta dependencia de la matriz, las grandes ventajas del ELISA son la velocidad de obtención de resultados, la facilidad de operación, la sensibilidad y la gran cantidad de muestras que se pueden determinar a la vez [20]. Otra de las técnicas más rápidas y sencillas basadas en los inmunoensayos son los dispositivos de flujo lateral, que se presentan en general en un formato de una tira inmunocromatográfica, pero que sólo ofrecen información cualitativa generalmente relacionada con la concentración de corte legislada [21].

Debido al control de la seguridad alimentaria y la gran demanda de métodos rápidos y precisos para detectar micotoxinas, el desarrollo de biosensores es crucial, y se ha incrementado significativamente en los últimos 20 años, y actualmente es una de las áreas más activas de la investigación analítica gracias a su sensibilidad, precisión, bajo coste, eficacia y simplicidad, no sólo de la construcción, sino también de la etapa de pretratamiento de la muestra y la etapa de medida [22]. Los biosensores implican que el elemento de reconocimiento biológico esté en contacto con un transductor [2]. Además son unas de las herramientas más prometedoras para la detección de micotoxinas en los alimentos ya que disminuyen el tiempo de análisis y la exactitud se mejora al eliminar interferencias de las matrices[2; 23].

Un **biosensor** es un dispositivo en el que materiales de origen biológico, como enzimas, tejidos animales o vegetales, antígenos, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc. son usados como elementos de biorreconocimiento para dotar al dispositivo de la selectividad y especificidad requeridas para la determinación de analitos de origen muy variado en el ámbito clínico, toxicológico, medioambiental, agroalimentario, etc [24]. El mayor avance en los biosensores para la determinación de micotoxinas en matrices alimentarias ha sido el uso de inmunosensores, que aprovechan las reacciones de afinidad entre un anticuerpo selectivo y el antígeno o analito (micotoxina en este caso) correspondiente y basándose en el mismo procedimiento de inmunoensayo de un ensayo ELISA permiten la determinación cuantitativa de la concentración de micotoxina, en órdenes de magnitud de ppb.

Particularmente, los **inmunosensores electroquímicos** para la detección de micotoxinas son cada vez más utilizados como métodos cuantitativos de análisis de alimentos debido a su sensibilidad (pueden medirse corrientes eléctricas muy pequeñas), selectividad, bajo coste, simplicidad, y en algunos casos la posibilidad de miniaturización, la portabilidad y la integración en dispositivos automatizados [25; 26; 27].

Uno de los campos más interesantes para la mejora de los biosensores para la detección y determinación de micotoxinas, es el desarrollo y síntesis de nuevos ligandos de afinidad. Sin lugar a dudas, los nuevos anticuerpos recombinantes y la síntesis de nuevos aptámeros inexistentes hoy en día ampliarán estas oportunidades.

Los aptámeros son secuencias cortas de oligonucleótidos de cadena sencilla, que tienen una gran capacidad de reconocimiento selectivo hacia moléculas para las que se han seleccionado por un procedimiento denominado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). Los cambios conformacionales de los aptámeros marcados para su unión específica con la micotoxina pueden usarse para modular la

distancia de las etiquetas electroactivas al electrodo, alterando de este modo las corrientes redox en el diseño de nuevos aptasensores [28].

En el campo de las micotoxinas, hasta el momento se ha seleccionado un único aptámero de OTA en el año 2008 [29], y posteriormente para FB1 [30] y para ZEA [31]. Debido al selectivo reconocimiento que producen los aptámeros se han desarrollado aptasensores, biosensores que utilizan aptámeros para el reconocimiento selectivo de la micotoxina. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado uno de los primeros aptasensores electroquímicos competitivos para la determinación de ocratoxina A, utilizando un aptámero ssDNA biotinilado muy selectivo, con 36 oligonucleótidos que se inmovilizó sobre partículas paramagnéticas funcionalizadas con estreptavidina, y realizando la etapa competitiva por la unión al aptámero entre OTA y OTA-HRP. El aptasensor presenta límites de detección de  $0,07 \pm 0,01 \text{ ng ml}^{-1}$  de OTA (muy inferior a los LODs habituales de inmunosensores de OTA) y posee un intervalo de trabajo entre  $0,78$  y  $8,74 \text{ ng ml}^{-1}$ . El aptámero utilizado presentó una baja reactividad cruzada con OTB (micotoxina muy similar a OTA), obteniéndose una reactividad de la OTB 100 veces inferior que para el caso de la OTA. El aptasensor de OTA se aplicó en muestras de trigo contaminadas realizando medidas con gran reproducibilidad ( $\text{DSR} < 8 \%$ ) [2; 32]. Además en nuestro grupo de investigación se ha caracterizado un aptasensor electroquímico de FB1, utilizando un aptámero compuesto por una secuencia de 39 oligonucleótidos y partículas magnéticas funcionalizadas con el grupo tosilo como soporte de inmovilización y de incubación del aptasensor. Se realizaron estudios previos de afinidad y competitividad para el desarrollo futuro de un aptasensor [33]. Por el contrario, en la actualidad no existen aptámeros diseñados para el reconocimiento del DON. Los aptámeros y aptasensores de DON no se mencionan en las bases de datos mundiales como *The Aptamer Database* [34] ni en trabajos publicados, hasta donde llega nuestro conocimiento.

Si bien se han desarrollado biosensores enzimáticos de inhibición, basados en la inhibición de la actividad de un enzima producida por las micotoxinas, este tipo de biosensores catalíticos carecen de la selectividad necesaria (otras moléculas podrían inhibir igualmente a enzimas)[35; 36]. Por ésta razón, lo habitual es utilizar biosensores con ligandos de afinidad, sobre todo con anticuerpos (inmunosensores) [23] y recientemente también con aptámeros [28; 32].

En la actualidad se han desarrollado ligandos artificiales para su uso como elementos de reconocimiento de micotoxinas, los llamados polímeros de impronta molecular (MIPs, *Molecularly Imprinted Polymers*) obtenidos por síntesis combinatoria. Los MIPs son polímeros sintéticos funcionales hechos en presencia de la micotoxina de interés. Después de su polimerización térmica o bajo luz UV, se elimina la molécula de analito utilizada como “*plantilla*”, formando así una cavidad complementaria a la molécula

diana en la que sólo el analito de interés se puede introducir de forma muy selectiva, actuando de un modo similar a los anticuerpos sintéticos [2; 37]. Sin embargo, a pesar de algunas aplicaciones en analitos fluorescentes [38; 39], los MIPs sólo han sido aplicados a la extracción selectiva para la OTA [40; 41] y para la extracción conjunta de ZEA + DON [42], o en columnas de fase sólida [43], donde el problema principal es la selectividad de micotoxinas en una matriz alimentaria compleja. En este tipo de materiales se puede incluir además de los MIPs otros nanomateriales y estructuras de membrana, aptámeros [32; 44; 45], proteínas de unión y péptidos sintéticos, así como algunos óxidos metálicos [46; 47; 48], aunque en términos generales los elementos de biorreconocimiento más utilizados son los anticuerpos [49].

Los biosensores utilizados para la determinación de micotoxinas, en cuanto al tipo de transducción, pueden clasificarse en cuatro grandes grupos:

- Sensores luminiscentes/colorimétricos [27]
- Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) [21]
- Sensores piezoeléctricos (QCM) [50]
- Sensores electroquímicos [28; 51; 52]

Los **biosensores electroquímicos para la determinación de micotoxinas** ocupan un lugar destacado debido a su sensibilidad, selectividad, bajo coste, simplicidad, y en algunos casos la miniaturización, portabilidad e integración en dispositivos automatizados. Para transformar la interacción de la toxina en una señal analítica, se han utilizado una gran variedad de técnicas electroquímicas (amperométrica, potenciométrica, conductimétrica, impedancia electroquímica) [51; 53; 54]. De entre todas ellas, destacan la transducción amperométrica y de espectroscopía de impedancia electroquímica por su gran sensibilidad.

## 1.2 DEOXINIVALENOL

Los tricotecenos son un grupo de micotoxinas de gran importancia agrícola, que se generan principalmente por especies de hongos pertenecientes al género ***Fusarium*** (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium crookwellense* y *Fusarium poae*) [55].

Los **tricotecenos** se dividen en cuatro grupos (tipos A-D), de acuerdo con sus grupos funcionales característicos (tipo A grupo funcional distinto de una cetona en el carbono 8; tipo B grupo carbonilo en el carbono 8; tipo C grupo epóxido en carbonos 7,

8 o carbonos 9, 10; tipo D sistema de anillos macrocíclicos entre carbonos 4 y 15 con dos enlaces éster)[56]. En el tipo A se encuentran las toxinas T-2 y HT-2, y en el tipo B que es el más frecuente contiene el deoxinivalenol (DON), 3-acetil-DON, 15-acetil DON, nivalenol y fusarenon [55; 57].

En la tabla siguiente (Tabla 2) se han representado los tricotecenos más importantes del tipo A y B según los grupos funcionales de cada uno [58]:

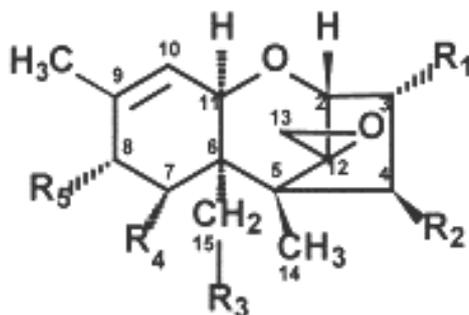


Figura 1: Estructuras químicas de los tricotecenos A y B

TRICOTECENOS TIPO A						
NOMBRE	P.M.	R1	R2	R3	R4	R5
Neosolaniol	382	OH	OAc	OAc	H	OH
Toxina HT2	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Toxina T2	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
15-Monoacetoxiscirpenol	324	OH	OH	OAc	H	H
4,15-Diacetoxiscirpenol	366	OH	OAc	OAc	H	H

Tabla 2: Estructuras químicas de los tricotecenos tipo A

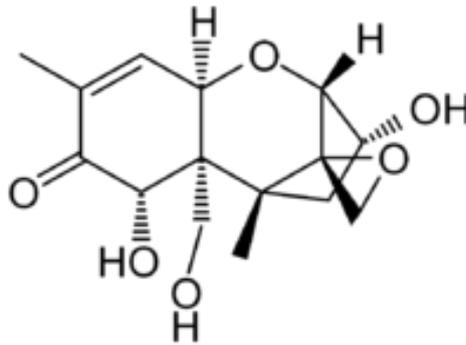
TRICOTECENOS TIPO B						
NOMBRE	P.M.	R1	R2	R3	R4	
Deoxinivalenol	296	OH	H	OH	OH	
3-AcetilDON	338	OAc	H	OH	OH	
15-AcetilDON	338	OH	H	OAc	OH	
Nivalenol	312	OH	OH	OH	OH	
3-Acetilnivalenol	354	OH	OAc	OH	OH	

Tabla 3: Estructuras químicas de los tricotecenos tipo B

El **deoxinivalenol (DON)** pertenece a la familia de los tricotecenos de tipo B (posee un grupo carbonilo en el carbono 8). El DON se produce a través del metabolismo secundario del hongo *Fusarium graminearum* que suele desarrollarse en los suelos, preferentemente en temperaturas ambientales templadas, de entre 24 y 26 °C, y que contamina especialmente cereales como el trigo y el maíz, y otros como la cebada, la

avena, y el centeno. Además puede aparecer en sus granos procesados como la malta, la cerveza o el pan [59].

La fórmula empírica del DON o 4-Deoxinivalenol es  $C_{15}H_{20}O_6$  (12,13-epoxi-3,4,15-trihidroxitricotec-9-en-8-ona), y su peso molecular es 296,32 Da. La estructura química se representa en la Figura 2:



**Figura 2: Estructura química del deoxinivalenol (DON)**

El DON es altamente estable a 120 °C, moderadamente estable a 180 °C y parcialmente estable a 210 °C. Además posee gran estabilidad bajo condiciones débilmente ácidas, pero aparece inestabilidad en medios altamente alcalinos [60]. Se trata de un compuesto muy estable tanto en el almacenaje y la molienda como durante su procesamiento o su cocinado, lo que afecta a su poder contaminante y por lo que se han encontrado intoxicaciones de personas y de animales ocurridas después del consumo de alimentos contaminados con tricotecenos aun después de su procesado [2].

El DON aparece especialmente en cereales cultivados en regiones templadas de Europa, América y Asia [2]. Las infecciones de cereales y la contaminación con deoxinivalenol puede deberse a varios factores como el clima, la rotación de cultivos, las variedades de cereal, los suelos, la manipulación de los cultivos y las aplicaciones de fungicidas. Incluso con buenas prácticas no se pueden controlar todos estos factores, como las condiciones meteorológicas de cada época del año o de cada región [6]. A pesar de realizar unas “buenas prácticas agrícolas” (GAP) que constituyen la primera línea de defensa para el control de la contaminación de los cereales, seguido de la aplicación de “buenas prácticas de fabricación” (GMP) durante la manipulación, almacenamiento, elaboración y distribución de cereales para alimentación humana y animal, es necesaria la **detección y prevención temprana del DON** en los productos agrícolas dado que sigue siendo posible su contaminación [61].

Los métodos analíticos disponibles para la determinación de DON y sus derivados se basan principalmente en los principios de inmunoensayo, cromatografía, y espectrometría de masas, con los que se obtienen resultados tanto cualitativos como cuantitativos [62]. Los métodos tradicionalmente más utilizados incluyen la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y la cromatografía en capa fina (TLC), los cuales implican preparación de la muestra, largos tiempos de análisis y conocimientos técnicos [63; 64; 65]. Existen también numerosos métodos de análisis para las micotoxinas del grupo *Fusarium* rápidos, sencillos y de bajo coste, que permiten obtener de modo semicuantitativo la presencia o ausencia de los niveles máximos permitidos (legislados) de la micotoxina en diversos tipos de alimentos (métodos de *screening*)[66].

Además de los métodos semicuantitativos, para la determinación de la concentración de deoxinivalenol se utilizan diversos métodos analíticos cuantitativos basados en separaciones cromatográficas (GC-ECD, HPLC-UV, LC-MS/MS) [61; 67] y en métodos inmunoquímicos por sus buenas prestaciones analíticas (alta sensibilidad y especificidad) [68] o en nuevas tecnologías como los inmunoensayos de fluorescencia de polarización, el uso de polímeros de impronta molecular (MIPs) [42], la espectroscopía UV [15] o infrarroja [69] o los sensores ópticos como la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) [70].

El método de referencia según la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para la determinación de DON es la cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV-Vis) ya que el DON carece de propiedades fluorescentes (propiedades fluorescentes limitadas) [71], y por ser un método robusto y exacto. Por contra, el HPLC-UV-Vis necesita largos tiempos de análisis, y es un método poco económico y ecológico debido al elevado consumo de reactivos y disolventes orgánicos que se precisan [72], necesita instrumentación sofisticada y poco económica, así como una alta cualificación del personal técnico en las operaciones analíticas y en el manejo de la instrumentación [73].

Por las razones anteriores, los métodos alternativos más comunes y con mayores ventajas para la determinación de DON y de otras micotoxinas son los basados en inmunoensayos, [74; 75] sobre todo los ensayos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) convencionales que utilizan un anticuerpo (monoclonal o policlonal) selectivo al deoxinivalenol como elemento de biorreconocimiento y llevan a cabo una detección espectrofotométrica. Además aprovechando las reacciones de afinidad entre un anticuerpo y un antígeno y basándose en el procedimiento que ocurre en un ensayo ELISA, actualmente se están desarrollando diferentes inmunosensores electroquímicos y ópticos.

Los inmunosensores para la determinación de DON no han sido muy desarrollados hasta el momento, a diferencia de los muy diversos y numerosos ensayos ELISA. Se han desarrollado diferentes sensores que utilizan técnicas electroquímicas, como la voltametría cíclica (VC) [76] o la cronoamperometría (CRA) [77] para llevar a cabo las determinaciones de DON y otros inmunosensores basados en una detección óptica que aprovecha las propiedades de absorción de la etiqueta que se conjuga con el DON para obtener la señal analítica, los cuáles se describen más adelante.

Los resultados obtenidos con los sensores electroquímicos existentes, en muestras de alimentos (maíz, trigo o alimentos preparados de origen cereal) demuestran que son unas potentes y novedosas herramientas analíticas para la determinación de DON, manteniendo una alta correlación con los resultados obtenidos con la metodología oficial (HPLC-UV-Vis). Debido a los buenos resultados observados en los inmunosensores encontrados y a los escasos dispositivos desarrollados se decidió comenzar la optimización de un inmunosensor directo para la determinación de DON para su aplicación sobre muestras de cereales. El inmunosensor desarrollado en el trabajo de esta memoria tiene como principal objetivo disponer de un **dispositivo pionero en la determinación cuantitativa y sensible de DON** en muestras contaminadas de cereales y con las mejores propiedades analíticas, además de proporcionar sencillez y portabilidad. Su desarrollo se ha plasmado finalmente en una patente (Anexo I) que actualmente se encuentra en tramitación en la OEPM (Oficina Española de Patentes y Marcas).

### 1.2.1 Toxicidad del deoxinivalenol

Como sucede con el resto de las micotoxinas, es muy importante tener en cuenta los efectos adversos que el DON puede tener sobre la salud humana y animal. Los peligros asociados con tricotecenos fueron reconocidos por primera vez en intoxicaciones producidas sobre el ganado, causadas por la ingestión de alimentos contaminados. Por lo tanto se comenzaron con estudios en animales vivos y con estudios *in vitro*, a través de los cuales han identificado posteriormente otros nuevos efectos tóxicos de este grupo de micotoxinas [6]. La ingestión de DON ha ocasionado brotes de micotoxicosis agudas en la población de la India, China y zonas rurales de Japón. Un grave brote surgió en China entre los años 1984-1985 debido al consumo de maíz y trigo mohosos provocó que en un plazo de entre cinco y treinta minutos aparecieran entre otros síntomas no conocidos como náuseas y vómitos, de ahí que al DON se le conozca vulgarmente con el nombre de **vomitoxina**. Además aparecieron dolores abdominales, diarrea, mareos y cefaleas [78; 79].

La toxicidad que presenta el DON (y en general del resto de tricotecenos) en alta dosis se caracteriza por efectos tales como toxicidad hematológica, toxicidad cardiovascular y toxicidad gástrica produciendo diferentes efectos como diarreas, vómitos, leucocitosis, apoptosis, hemorragias, e incluso la muerte, mientras que la toxicidad aparecida en dosis bajas se caracteriza por la disminución del apetito llegando incluso a producir anorexia, reducción de la ganancia de peso, disminución de la eficiencia nutricional, cambios neuroendocrinos y efectos perjudiciales sobre el sistema inmunológico [6; 80].

Básicamente, los tricotecenos se unen a los ribosomas eucariotas e inhiben la síntesis de DNA y RNA y de proteínas ribosómicas mediante el bloqueo de la traducción y la inhibición de la elongación de las cadenas peptídicas, además de la aparición de un efecto hemolítico en los eritrocitos. El efecto de los tricotecenos sobre el sistema inmune, paradójicamente puede ser a la vez estimulante y supresor. La hematotoxicidad es un síntoma importante común que se observa en los seres humanos después del consumo de alimentos contaminados con tricotecenos, que se ha observado para las toxinas T-2 y HT-2, pero que no aparece tras el consumo de alimentos contaminados por DON [81]. Del mismo modo puede descartarse la actividad carcinogénica y genotóxica del DON según los datos de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) [82]. El DON no ha mostrado efectos teratogénicos con las pruebas realizadas sobre ratones, ratas y conejos, pero si se ha observado que dependiendo de la concentración administrada produce descensos en la fertilidad.

Por todos los efectos detallados y con los datos de los que se dispone, se ha estimado la toxicidad en humanos en un valor NOAEL (*Non Observed Adverse Effects Level*) de  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso corporal por día [80; 81].

Los productos alimenticios infectados por hongos en el campo o durante la cosecha o el almacenamiento pueden contener de forma concomitante otros grupos de micotoxinas (no sólo tricotecenos) [83]. Esta co-existencia de micotoxinas puede ser el resultado de la producción de varias micotoxinas por una especie de hongo en particular o incluso resultar de varias especies de hongos productores de micotoxinas diferentes que crecen al mismo tiempo o con posterioridad uno del otro. En un estudio sobre la inducción potencial de una enfermedad renal se probó si un consumo combinado de diferentes micotoxinas podría representar un posible riesgo mayor que la ingesta de una única micotoxina. Se ha demostrado que distintos factores que actúan juntos a través de mecanismos similares o diferentes podrían contribuir teóricamente al desarrollo de la enfermedad. Los factores mencionados fueron las micotoxinas (DON, fumonisinas, ocratoxina A), además de otros agentes infecciosos, endotoxinas y estrés oxidativo [6].

### 1.2.2 Legislación

El trigo junto con los productos derivados del trigo es seguramente el cereal más consumido en el mundo y ocupa el segundo lugar en la producción total de cereales de cultivo detrás del maíz. Estudios realizados sobre 35.000 muestras para evaluar la presencia de las toxinas de la familia de los tricotecenos en alimentos de todo el mundo pusieron de manifiesto la presencia de DON en el 57% de las muestras analizadas y principalmente en los cereales como el trigo [84] de las cuales el 6% del producto era superior a  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y el 7% de cereales y harinas fueron superiores a  $750 \mu\text{g Kg}^{-1}$  [6].

Debido a la gran importancia de las micotoxinas en la contaminación de alimentos, y a los efectos tóxicos intrínsecos del deoxinivalenol en este caso, la legislación española y europea, han establecido límites muy estrictos para las concentraciones máximas permitidas de DON en diversos productos alimentarios [10; 85; 86], tanto para la producción propia de cada país como de alimentos importados desde otros países.

La FAO/WHO (*Food and Agricultural Organization/World Health Organization*) sugiere instalar las normas recopiladas en los APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) en lo relativo a la evaluación del origen de la contaminación, así como establecer acciones preventivas y correctivas para el control de las micotoxinas *Fusarium* en los alimentos [7; 87]. En lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium*, la Comisión Reguladora 1881/2006, de 19 de Diciembre de 2006, que fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, establece una **ingesta diaria tolerable (TDI) de  $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso corporal** [10]. Además el Reglamento 1126/2007 de 28 de Septiembre de 2007 fija el contenido máximo de contaminantes en los alimentos para las toxinas *Fusarium* en maíz y en productos de maíz entre 50 y  $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$  [85].

Las concentraciones máximas permitidas de deoxinivalenol en el Reglamento de la UE 1126/2007 de 28 de Septiembre de 2007 para diferentes alimentos, oscilan entre 200 y  $1750 \mu\text{g kg}^{-1}$  dependiendo del tipo de producto (cereal o alimento procesado) [85].

En la Tabla 3 se han recogido las concentraciones de DON permitidas según el tipo de cereal y su nivel de procesado:

PRODUCTOS	[DON] $\mu\text{g kg}^{-1}$
Cereales no elaborados (excepto trigo, maíz y avena)	1250
Trigo y avena no elaborados	1750
Maíz no elaborado	1750
Harina y pasta seca	750
Pan, cereales desayuno, galletas...	500
Alimentos para lactantes y niños	200

**Tabla 4: Resumen Reglamento 1126/2007, de 28 de Septiembre de 2007 [85]**

La normativa aplicable a DON (y micotoxinas en general) incluye el Reglamento 401/2006, de 23 Febrero de 2006 [11] que sustituye a la Directiva 2005/38/CE, de 6 Junio de 2005 [88] por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimentarios, incluyendo el DON en los productos cereales y sus derivados.

Además de las normativas mencionadas, el deoxinivalenol y el resto de tricotecenos se regulan para los alimentos destinados a animales con la Comisión Reguladora 2006/576/EC de 17 Agosto de 2006 [89].

Las concentraciones de DON permitidas para la alimentación animal se recogen en la Tabla 5:

PRODUCTOS	[DON] $\mu\text{g kg}^{-1}$
Cereales y productos de origen cereal (excepto maíz)	8000
Subproductos de maíz	12000
Piensos complementarios	5000
Piensos complementarios para cerdos	900
Piensos complementarios para terneros, corderos...	2000

**Tabla 5: Comisión reguladora 2006/576/EC de 17 Agosto de 2006 [89]**

Puede observarse que las concentraciones máximas permitidas para animales (entre 900 y 12000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) son mucho mayores que las permitidas en humanos (entre 200 y 1750  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

El creciente número de micotoxinas que la legislación europea, basada en los informes de comités científicos como la EFSA (*European Food Safety Authority*), obliga a controlar y el hecho de que los límites permitidos sean cada vez más estrictos, requiere la aparición de nuevos métodos analíticos cada vez más sensibles para la evaluación de riesgos [90], la gestión de alimentos y piensos y para la protección y prevención de fraudes en la industria alimentaria [13]. Para la detección de las

micotoxinas conocidas y legisladas, los métodos de análisis están bastante avanzados lo que permite detectar directamente las propias toxinas en base a sus características físicas, o indirectamente a través de los inmunoensayos [91].

Si bien los métodos analíticos actuales se basan en técnicas instrumentales muy sensibles, cada vez hay una mayor demanda de procedimientos más simplificados y rápidos, que resuelvan retos y nuevos problemas, y en este sentido los biosensores tienen un papel preponderante. Algunos de los nuevos problemas que se detectan actualmente es el de las micotoxinas enmascaradas, que en la UE se les define como aquellas que escapan a la metodología analítica utilizada [2].

Otras micotoxinas se incluyen dentro de la legislación comentada, por ejemplo H2 y HT-2, debido a su alta toxicidad, aunque todavía no se dan en esta legislación concentraciones límite permitidas a la espera de metodología analítica capaz de dar respuesta adecuada para su determinación en niveles de concentración muy pequeños [10; 92].

### 1.2.3 Determinación de deoxinivalenol mediante inmunoensayo

La detección cuantitativa y eficiente de patógenos biológicos y químicos, así como de diferentes contaminantes y otros analitos importantes desempeña un papel crucial en la prevención de la propagación de enfermedades, infecciones y patologías [93]. Con el fin de garantizar determinaciones rápidas y apropiadas en caso de contaminación y para mejorar el control de los alimentos, se necesita desarrollar con urgencia herramientas simples, de bajo coste, y cuantitativas para la detección de estos contaminantes como es el caso de los inmunoensayos [94].

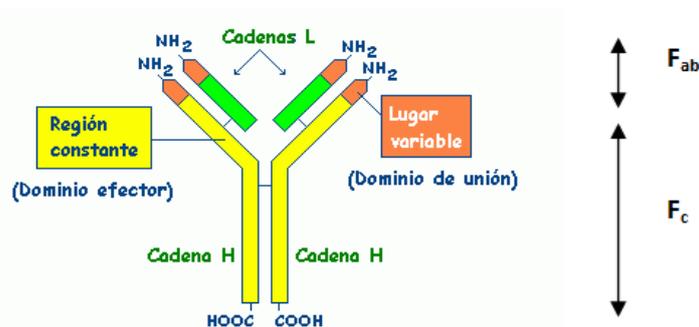
Como resultado de los efectos nocivos del DON sobre la salud humana y animal, y por consiguiente, el aumento de la rigurosidad en la determinación de los niveles de contaminación de los alimentos, muchos investigadores han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos dispositivos para la detección de estos compuestos [23].

A pesar de la alta sensibilidad y fiabilidad de los métodos tradicionales de detección tales como las técnicas cromatográficas, debido al alto coste de la instrumentación y los protocolos largos y laboriosos, no son demasiado útiles para los **análisis de rutina**, por lo que desde hace ya algunos años se busca el modo de diseñar nuevos métodos de análisis sencillos y rentables capaces de evaluar de forma cuantitativa y fiable la presencia de micotoxinas tanto individuales como múltiples (con el problema adicional de los efectos sinérgicos), acortando el tiempo de análisis [23].

Los biosensores son los dispositivos más demandados en la actualidad para determinaciones rápidas y exactas de DON, evitando los inconvenientes de las técnicas oficiales. El requisito más importante de un inmunoensayo es la especificidad del anticuerpo por el antígeno correspondiente [66]. Los avances en la obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales ha provocado inmunosensores mucho más eficientes, de mayor sensibilidad (afinidad del anticuerpo) y especificidad [20]. Existen numerosas referencias de trabajos científicos que describen el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para el DON pero generalmente existe reactividad cruzada con moléculas de estructura química similar que el anticuerpo es capaz de reconocer, lo que generalmente conduce a errores por exceso o falsos positivos, y alta incertidumbre en la determinación [59; 95]. En el caso del DON puede aparecer una fuerte reactividad cruzada con dos derivados: **3-acetildeoxinivalenol** y **15-acetildeoxinivalenol** (Figura 1) dada la similitud de sus estructuras químicas y similares epítomos [96].

La dificultad inicial de los procedimientos de inmunoensayo, es la de la inmovilización de los anticuerpos, que realizada de forma incorrecta o no adecuada puede hacer disminuir enormemente su afinidad hacia el antígeno o los antígenos etiquetados. Los procedimientos de inmovilización no deben de modificar la estructura terciaria del anticuerpo (o lo mínimo posible) que provocaría su desnaturalización, no deben de hacer variar su afinidad y en lo posible debería de controlarse la mejor orientación de la parte  $F_{ab}$  de reconocimiento expuesto hacia el antígeno.

Por estos motivos, es necesario inmovilizar los anticuerpos en su forma biológicamente activa y preferiblemente en una única orientación sobre la región  $F_c$ , dejando la región  $F_{ab}$  (donde tiene lugar el biorreconocimiento del antígeno) libre y alejada de la superficie de inmovilización para facilitar la unión de los antígenos.



**Figura 3: Representación gráfica de un anticuerpo [97]**

Los inmunoensayos ya sean mediante ensayos tipo ELISA [75; 98] o con detección electroquímica [25] u óptica [99] son los procedimientos más adecuados para la

determinación de micotoxinas (moléculas de bajo peso molecular) en muestras de alimentos [20], por su especificidad y sensibilidad.

### 1.2.3.1 Determinación de DON mediante métodos ELISA

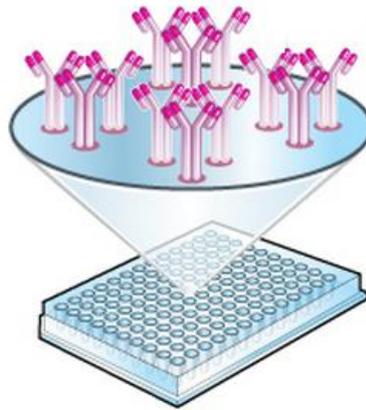
Desde su introducción hace más de 30 años, los métodos ELISA se han convertido en la técnica de inmunoensayo más utilizada por la disponibilidad de anticuerpos dirigidos potencialmente hacia moléculas antigénicas, por su alta sensibilidad y por la facilidad de uso. Por otra parte, el formato de placa de 96 pocillos utilizado se ha estandarizado de forma universal en todo lo relacionado con inmunoensayo [100].

Debido a la toxicidad de las micotoxinas combinado con su prevalencia en alimentos, se han utilizado varios métodos para su detección incluyendo PCR, GC, GC-MS, HPLC y cromatografía en capa fina sin embargo, estos métodos consumen mucho tiempo y requieren altos conocimientos técnicos. Por estos inconvenientes, los métodos ELISA surgen como la mejor alternativa para los análisis de rutina frente a los métodos analíticos tradicionales [101; 102] que suponen un mayor gasto en instrumentación y en personal especializado y entrenado así como una mayor dificultad de manipulación junto con largos tiempos de análisis [27; 103]. Los ELISAs descritos para la determinación de micotoxinas en muestras de alimentos, muestran una gran correlación con los obtenidos por los métodos oficiales HPLC o GC incrementando así el desarrollo de nuevos inmunoensayos basados en los métodos ELISA dadas sus ventajas [20; 104].

Los métodos ELISA espectrofotométricos se utilizan sobre todo como un método de *screening* o de cribado aunque también son útiles como método de optimización de condiciones previas al desarrollo de un inmunosensor que siempre deberán ser validadas por el método oficial de determinación de cada micotoxina (generalmente HPLC o GC). Los ELISAs proporcionan **diagnósticos rápidos y generales en la detección de micotoxinas**, por su sensibilidad, sencillez, facilidad de operación incluso para personal no especializado, y especialmente por la rápida interpretación de los resultados, obteniendo límites de detección en el rango de los ppb y el rango de concentraciones para la cuantificación por lo general es superior a dos escalas logarítmicas, por lo que permite la detección sensible de la toxina en muestras diluidas y extractos no purificados [102; 105]. Los métodos ELISA se utilizan tanto para la determinación de antígenos (proteínas o moléculas de pequeño tamaño como las micotoxinas) como para la determinación de anticuerpos [100] siendo el único requisito inicial la disponibilidad de anticuerpos específicos, que posean la suficiente afinidad y escasa reactividad cruzada, que se obtienen mediante la inmunización de animales (con conjugados de las micotoxinas con otras proteínas, debido al pequeño

tamaño molecular y escaso efecto inmunogénico de las micotoxinas) y por los procedimientos correspondientes a anticuerpos policlonales o mediante hibridomas para la obtención de anticuerpos monoclonales [59; 106].

El esquema competitivo directo es el más utilizado frente a los ensayos indirectos (inmovilización del antígeno) o los ensayos tipo *sándwich* (utilizando anticuerpos secundarios etiquetados para la obtención de la señal analítica) estos últimos muy escasos para micotoxinas debidos a la escasez (a veces uno sólo) de epítomos por su pequeño peso molecular y los pocos grupos funcionales disponibles [107].



**Figura 4: Inmovilización eficiente de los anticuerpos sobre los pocillos de poliestireno (ensayo directo) [108]**

Casi la totalidad de ensayos ELISA utilizados para la determinación cuantitativa de DON se basan en una reacción de competición directa entre el antígeno conjugado con un enzima capaz de provocar la señal espectrofotométrica (por sí misma o tras una reacción, generalmente enzimática) para su detección, con el analito libre por la unión de ambos a un anticuerpo específico inmovilizado sobre la superficie de los pocillos de la placa, por lo tanto, la medida final de la **absorbancia está inversamente relacionada con la concentración** de analito diana en la muestra (ensayo competitivo) [68].

Para el caso del DON es importante la comprobación de la reactividad cruzada que un anticuerpo posee en relación a otras micotoxinas de estructura similar, por ejemplo los derivados acetilados del DON (3-Acetil-DON y el 15-Acetil-DON) o el Nivalenol (NIV) antes de comenzar con la determinación del DON [109; 110]. En algunos casos, la especificidad de un anticuerpo policlonal selectivo al 15-acetil-DON fue verificada en función de las señales para el 50% de inhibición. La reactividad cruzada encontrada para 15-AcDON, diacetil-DON, triacetil-DON, 3-AcDON y DON fue del 100%, 602%, 0,85%, 0,18%, y 0,01%, respectivamente [110]. Por ello, en la actualidad los mayores esfuerzos antes del desarrollo de un inmunoensayo se centran en la obtención de

anticuerpos selectivos a un solo analito, con bajas reactividades cruzadas con productos de naturaleza semejantes [111; 112].

Por todas las características descritas, los métodos ELISA espectrofotométricos aparecen como la principal alternativa a los métodos de determinación de DON oficiales como el HPLC-UV-Vis por sus ventajas en los análisis rutinarios, lo que hace que numerosas casas comerciales hayan desarrollado diferentes *kits* ELISA que permiten la determinación cuantitativa de la concentración de DON en muestras contaminadas con diferentes prestaciones analíticas [113]. La mayoría de ELISAs utilizan medidas de absorción molecular de productos generados tras la reacción enzimática realizada por la etiqueta (en muchos casos HRP o alcalino-fosfatasa), aunque también es posible medidas de fluorescencia molecular [114; 115].

Los primeros ELISAs espectrofotométricos de DON se describen en el año 1988, utilizando calibrados competitivos directos e indirectos sobre un anticuerpo monoclonal entre la micotoxina libre y la marcada con albúmina sérica humana (DON-HSA). Se obtuvo un mayor rango de concentraciones de trabajo con el inmunosensor directo (0,2 a 5,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) que con el inmunosensor indirecto (0,2 a 2,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) [116]. Otros de los primeros ensayos ELISA para la determinación de DON fueron descritos en los años 1990 [117] y en 1991 [74] basados en ambos casos en inmunoensayos competitivos de DON y DON marcado con albúmina sérica bovina (BSA) y con peroxidasa (HRP) respectivamente, utilizando como elemento de biorreconocimiento un anticuerpo policlonal [74; 117].

Una de las principales dificultades en el inmunoensayo del DON es la forma de realizar la unión de la micotoxina al enzima u otra proteína para sintetizar conjugados competitivos, y también en esta unión para crear moléculas de gran tamaño inmunogénicas capaces de crear anticuerpos en el organismo animal correspondiente. Igualmente, esta conjugación puede modificar las propiedades químicas de la micotoxina, modificar la afinidad de los anticuerpos utilizados, o incluso hacer desaparecer su capacidad de biorreconocimiento, si por ejemplo un grupo funcional de la molécula es el grupo reactivo de enlace covalente y a la vez constituye un epítipo reconocido por el anticuerpo, por lo que ha de haber una coincidencia de grupos funcionales utilizados en la síntesis del inmunógeno y en el conjugado competitivo utilizado en el inmunoensayo [105].

La reacción más utilizada para la formación de conjugados micotoxina-proteína es la **reacción de la carbodiimida**, pero se trata de una reacción no selectiva y que puede producir la unión a través de uno o más de los hidroxilos de los carbonos 3, 7 y 15 aunque el hidroxilo del carbono 7 es poco reactivo por la presencia del carbonilo en el carbono 8 (Ver figura 1). Por lo tanto con la reacción de carbodiimida se obtiene una

mezcla de conjugados de DON unidos en el extremo C-3, C-15, o ambos, lo que modifica arbitrariamente su reconocimiento por el anticuerpo [95]. En la actualidad, aunque muchos de los grupos de investigación continúan sintetizando sus propios conjugados [59; 101] se tiende al uso de conjugados ya sintetizados y purificados, y perfectamente caracterizados (relación molar y pureza) generalmente por GC/MS o por MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* con detector de iones de tiempo de vuelo) donde la ausencia de DON libre en el conjugado y su presencia en el producto de hidrólisis confirma la unión covalente del DON en la proteína [111].

En la bibliografía científica se describen procedimientos competitivos muy semejantes entre sí, en los que se utilizan diferentes marcadores para el DON como son la albúmina sérica humana (HSA) [74], albúmina sérica bovina (BSA) [117; 118], ovoalbúmina (OV), peroxidasa de rábano picante (HRP) [68] y otras proteínas de gran tamaño que permiten en la preparación del conjugado y su purificación por cromatografía de exclusión molecular después de su síntesis, en lugar utilizar diálisis, que es mucho menos selectiva y especialmente lenta (tiempos próximos a 3 días) [111].

Varias casas comerciales han desarrollado *kits* ELISA para el DON con diferentes prestaciones analíticas y que suponen un avance importante en el control de micotoxinas en alimentos [16].

Algunos de estos ***kits* ELISA comerciales** se recogen en la siguiente tabla (Tabla 6):

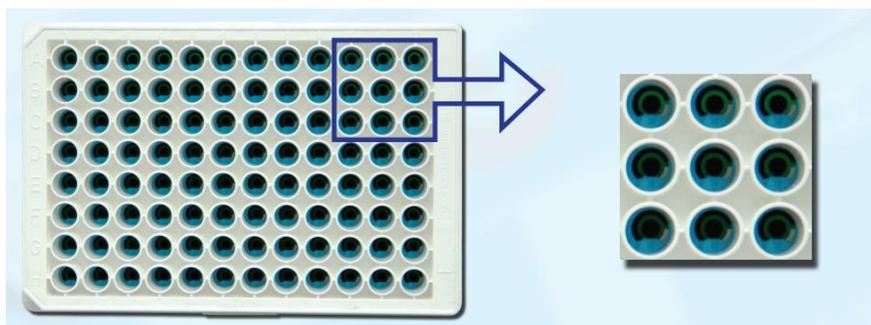
CASA COMERCIAL	Pocillos	Tipo	LOD ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Rango lineal ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Recuperación
ROMER	96	Directo	200	250-5000	-
AGRAQUANT	48	Directo	200	250-5000	-
RISDASCREEN	96	Directo	3,7	3,7-100	85-110%
RISDASCREEN FAST	96	Directo	200	200-6000	-
ZEU INMUNOTECH	96	Directo	1,5	0,313-10	80-110%
NEUROGEN VERATOX HS	48	Directo	LOQ = 25	0-250	-
NEUROGEN VERATOX DON 5/5	48	Directo	100	0-2000	-
HELICA	96	Directo	0,15	0-200	-
ANTIBODIES ONLINE	96	Directo	<200	0-400	>80%

**Tabla 6: Métodos de inmunoensayo ELISA comerciales para la determinación de DON**

Los *kits* ELISA comerciales para la determinación de DON ofrecen numerosas ventajas mencionadas anteriormente, pero también presentan limitaciones. El principal inconveniente de estos *kits* está en el hecho de que son de uso individual lo que puede

aumentar el coste económico así como posibles falsos positivos y falsos negativos que pueden aparecer, además de la necesidad de etiquetado del analito [9]. Otros inconvenientes de los ensayos ELISA están relacionados con la alta dependencia de la matriz que puede originar importantes interferencias (efecto matriz) y la reactividad cruzada de los anticuerpos que debe estudiarse y considerarse en el análisis cuantitativo [119].

Otra posibilidad muy novedosa, de reciente aparición son los métodos ELISA electroquímicos realizados sobre placas dotadas de 96 pocillos estándar con sus correspondientes electrodos serigraviados, constituyendo cada uno de ellos una celda electroquímica completa (figura 5), incluidos en microplacas de 96 pocillos [23]. A este novedosa técnica se le conoce con el acrónimo de **ELIME (Enzyme-Linked-Immunochemical-Electrochemical assay)** y de momento hay muy escasas aplicaciones en micotoxinas y para el DON, aunque se trata de una posibilidad futura muy interesante [120].



**Figura 5:** Placa con array de 96 SPCEs colocados en el fondo de una placa de 96 pocillos [121]

El uso del ELIME viene dado por las ventajas que aportan las medidas electroquímicas sobre las espectrofotométricas, entre las que se incluyen la posibilidad de aumento de la velocidad, la miniaturización, la multiplexación, el bajo coste de la instrumentación, la posibilidad de realizar análisis *in situ* y la insensibilidad a las muestras turbias se encuentran entre las otras ventajas de esta técnica [77; 122]. Las sensibilidades son similares o incluso superiores con respecto a los ELISAs ópticos convencionales [122; 123].

La adaptación de un ensayo ELISA a un enfoque electroquímico no es un proceso sencillo. De hecho, a pesar de que el formato de ensayo y los pasos generales de análisis son semejantes, varios factores deben tenerse en cuenta para lograr resultados comparables o incluso mejores que los del método ELISA. Por ejemplo, la selección y optimización de la superficie del electrodo que se utiliza como soporte para la inmovilización del elemento de biorreconocimiento (anticuerpo o antígeno), la elección del sustrato enzimático que debe conducir a un producto electroactivo, la

selección de los métodos electroquímicos más apropiadas (frente a la medida de la absorbancia) y del instrumento adecuado son algunos de los factores más importantes a considerar en la adaptación de un ELISA óptico en una plataforma electroquímica [100]. Como contraprestación, la transducción electroquímica aporta ventajas que ya se han comentado.

Los protocolos de trabajo basados en el ELIME utilizan partículas magnéticas funcionalizadas como superficie de inmovilización para la cadena inmunoquímica, y electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs) como transductores electroquímicos [122]. Existe un inmunoensayo ELIME para la determinación de DON (y del resto de tricotecenos) rápido y sensible en muestras de trigo. En este último caso, el procedimiento es demasiado complicado aunque sensible ( $LOD = 1,1 \mu\text{g g}^{-1}$  DON), pues se requiere de la hidrólisis del DON con microondas para su transformación en una molécula electroactiva y posterior detección voltamétrica sobre los electrodos serigrafiados [124].

### **1.2.3.2 Determinación de DON mediante inmunosensores:**

Los inmunosensores para la determinación de DON en alimentos no son muy comunes. Pese a los numerosos *kits* ELISA convencionales que hay disponibles para el DON, se han descrito en la bibliografía científica muy escasos trabajos que hayan desarrollado inmunosensores para esta micotoxina, al contrario de lo que ocurre con otras micotoxinas como por ejemplo las aflatoxinas y la ocratoxina A [125].

Entre los inmunosensores más importantes utilizados para la determinación de DON además de los sistemas ELISA cabe destacar la técnica de Resonancia de Plasmón Superficial (inmunosensor óptico) y los inmunosensores electroquímicos basados en una reacción competitiva [70; 76; 77; 99]

Los ensayos basados en la detección por Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) al igual que los biosensores basados en la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), producen la señal analítica a través de los cambios de masa depositada sobre la superficie del sensor (variación en el índice de refracción producidos por cambios de masa), ofreciendo así la posibilidad de proporcionar estrategias libres de etiquetado para la obtención de la señal analítica [23].

Además se han registrado dos inmunosensores para la determinación DON basados en técnicas ópticas como la interferometría bicapa (BLI) y la espectroscopia de onda óptica *LightMode* (OWLS) [126; 127]. El inmunosensor basado en la detección por BLI utiliza un conjugado de un anticuerpo con oro y se produce una amplificación de señal

debida a las AuNPs que permite el desarrollo de ensayos cualitativos y cuantitativos rápidos. El límite de detección del método fue  $0,09 \text{ mg kg}^{-1}$  y unos porcentajes de recuperación en trigo en el intervalo de 0,2 a  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ . Los resultados obtenidos, sugieren que la técnica BLI se puede utilizar para medir DON en el trigo rápidamente [126]. El inmunosensor basado en la espectroscopia “*Optical Waveguide Light Mode*” (OWLS) consiste en una técnica libre de etiqueta para la detección de DON utilizando anticuerpos policlonales específicos. Después de la inmovilización del anticuerpo (ensayo directo) o del conjugado de DON (ensayo indirecto), se utilizó un sistema de análisis de inyección de flujo [127].

#### **- Inmunosensores de DON basados en resonancia de plasmón superficial (SPR)**

En el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se ha utilizado la técnica de espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (SPR) para la caracterización de los anticuerpos de DON, por lo que se describe brevemente su fundamento y aplicaciones en inmunosensores de DON.

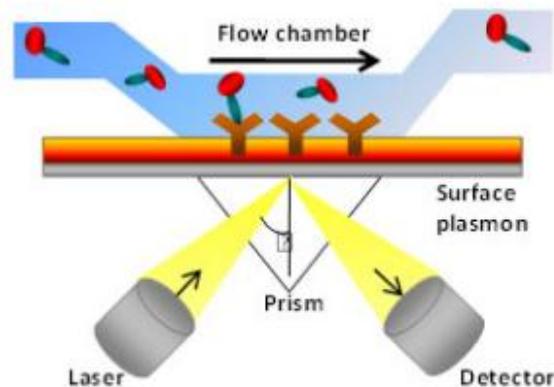
La espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (SPR) se basa en la interacción de radiación electromagnética polarizada con la interfase entre un metal (normalmente oro) y un dieléctrico (un prisma). Bajo ciertas condiciones, y para un cierto ángulo de incidencia (ángulo de resonancia), se produce una onda evanescente cuya energía puede ser absorbida por las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción del metal (denominado plasmón superficial) [70]. Este ángulo de resonancia es particularmente sensible al índice de refracción en las proximidades de la interfase, de tal manera que cambios debidos a interacciones macromoleculares sobre esta interfase (por ejemplo la unión de antígenos sobre una monocapa de anticuerpos inmovilizados sobre el metal [99]) pueden seguirse cinéticamente y permiten cuantificar las cantidades de micotoxinas de una muestra [105].

La alta popularidad de esta técnica en el desarrollo de nuevos inmunosensores de DON (y de otras micotoxinas) es debido a su alta sensibilidad (permite determinar concentraciones del orden de picomolar, con límites de detección del orden de 200 Da), ser capaz de medir las interacciones de los anticuerpos en tiempo real y sin necesidad de etiquetado, y al cálculo de constantes de afinidad en estudios de caracterización de estos inmunosensore [128].

Los dispositivos SPR presentan una ventaja frente a otros inmunosensores como es la facilidad de regeneración del chip para la reutilización en múltiples mediciones. Otra de sus principales ventajas es que **no necesita etiquetado para la obtención de la señal**, al medir directamente índices de refracción relacionados con cambios de masa.

Sus principales desventajas son el elevado coste de la instrumentación y la dificultad de manejo.

El SPR se considera una valiosa herramienta con la que obtener resultados en poco tiempo (aproximadamente 9 minutos cada muestra) y con la que es relativamente fácil realizar determinaciones sobre muestras de maíz o trigo para la determinación de DON con DSR < 10% y recuperaciones entre 92 y 115% para todas las matrices [129]. No obstante, la sensibilidad del SPR es relativamente baja en comparación con los inmunoensayos enzimáticos e inmunosensores, ya que generalmente no existe ninguna mejora ni amplificación de la señal [105]. En nuestro trabajo el uso del sensor SPR ha resultado una técnica muy útil para la caracterización de la afinidad de los biorreactivos que hemos utilizado en el inmunosensor y para el estudio de posibles uniones inespecíficas de anticuerpos, conjugados, DON y HRP.



**Figura 6: Esquema de la etapa de interacción antígeno-anticuerpo y su transducción SPR [108]**

Los inmunoensayos basados en SPR han sido desarrollados para algunas micotoxinas como fumonisinas [130], aflatoxina B1 [131] y deoxinivalenol [129] aunque solamente para el DON se ha aplicado en muestras de cereales [70; 87].

Nuestro grupo de investigación GEAS tiene una gran experiencia en el desarrollo de nuevos detectores basados en la resonancia de plasmón superficial [132; 133], y su uso como alternativa a detectores de índice de refracción en HPLC [133; 134].

Otros grupos de investigación han centrado su trabajo en el desarrollo de instrumentos de SPR de fabricación casera con el fin de reducir el alto coste de los equipos comerciales, superando así una de las principales razones de su uso limitado [23]. Este es el caso del dispositivo desarrollado por Nabok [135] para la detección de la toxina T-2, aunque presenta muy baja sensibilidad. El instrumento desarrollado por Mullett [130] para la FB1 tuvo una alta sensibilidad ( $LOD = 50 \text{ ng ml}^{-1}$ ) en un ensayo

directo mediante la acumulación de la toxina en la superficie del chip. Cabe destacar también el dispositivo SPR pequeño y portátil desarrollado por Van der Gaag [36] con el beneficio adicional del procedimiento descrito para la detección simultánea de varias micotoxinas (DON, AFB1, FB1 y ZEA) en cuatro celdas de flujo conectadas en serie, donde se llevaron a cabo los ensayos competitivos.

Los ensayos SPR se seleccionan dependiendo de las características del analito, del tipo de muestra y de la sensibilidad del instrumento. La detección mediante ensayos directos es sólo útil para **moléculas con alto peso molecular superior a 10 kDa**. Sin embargo, el DON es un compuesto químico pequeño (296,32 Da), con masa insuficiente para provocar un cambio grande en el índice de refracción, por lo que debido a la dificultad para detectar directamente se han desarrollado nuevas estrategias, como la inmovilización de la micotoxina sobre la superficie del chip (superficie sensora) dando ensayos indirectos o la realización de ensayos directos trabajando con el DON conjugado a una molécula de alto peso molecular, por ejemplo una proteína [23; 70; 136].

La inmovilización directa del conjugado DON–proteína sobre la superficie del chip en ensayos indirectos, proporciona una superficie sensora muy estable en comparación con la inmovilización directa de anticuerpos, los cuales además son susceptibles de desnaturalización y degradación con el tiempo [87].

Para la determinación de DON se han descrito ensayos indirectos utilizando el SPR, mediante la inmovilización de DON-BSA [99], DON-Biotina [87], DON-Caseína [70] o diferentes conjugados DON-proteína [129] sobre la superficie del chip, realizando en todos los casos una activación inicial de la superficie del chip con EDC + NHS, previa a la inyección del conjugado de DON en un pH próximo a 5 (tampón de acetatos). A continuación se procedió a la inyección del anticuerpo (policlonal o monoclonal) obteniéndose las uniones antígeno-anticuerpo correspondientes en cada caso. En los resultados obtenidos, la sensibilidad ha sido suficiente ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) para la determinación en muestras contaminadas [87]. Es también habitual una etapa de bloqueo con etanolamina con el objetivo de cubrir los huecos reactivos libres sobre el chip después de la inmovilización del anticuerpo [87; 99]. En general, deben ser considerados y controlados los mismos aspectos críticos que en otros inmunoensayos, aunque para los ensayos basados en SPR los efectos de la matriz de la muestra y la reactividad cruzada de los anticuerpos son más importantes que en otras técnicas.

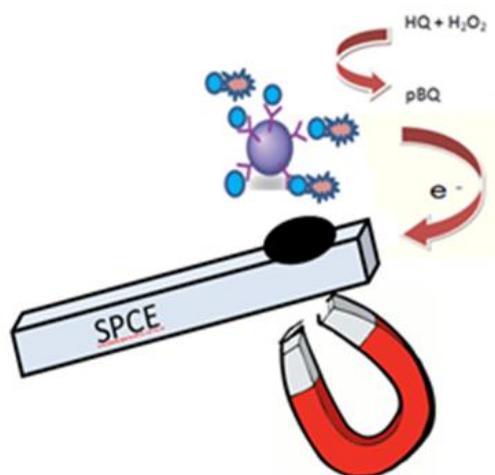
Se han registrado también ensayos basados en el SPR para la determinación simultánea de ZEA y DON mediante un inmunoensayo competitivo, entre las micotoxinas libres y las marcadas enzimáticamente de un modo similar a los ensayos ELISA competitivos, mostrando límites de detección muy bajos (ZEA  $16 \text{ ng ml}^{-1}$  y DON

10 ng ml<sup>-1</sup>) y una buena correlación de los resultados comparando con HPLC-MS [137]. Además se tiene constancia de la existencia un inmunosensor que utiliza MIPs para el reconocimiento del DON y cuya detección se lleva a cabo con un instrumento SPR. El polímero de impronta molecular, junto con el DON fueron inmovilizados sobre la superficie del chip de oro y se obtuvo un LOD de 1 ng ml<sup>-1</sup> [138].

### - Inmunosensores electroquímicos de DON

Los biosensores (inmunosensores, aptasensores) electroquímicos aportan numerosas ventajas sobre los métodos de detección óptica, sobre todo en relación a su sensibilidad, sencillez e instrumentación pequeña y de fácil portabilidad. La posibilidad de miniaturizar los electrodos (soporte de la transducción), la capacidad de multiplexación y su adecuación para volúmenes muy pequeños (del orden de 5-50 µl o incluso nanolitros), o la posibilidad de producción de electrodos serigrafados económicos y en gran escala son otras ventajas que hacen el enfoque electroquímico atractivo para abordar el desarrollo de nuevos inmunosensores.

En la mayoría de los casos los anticuerpos y antígenos son incapaces de reaccionar con un par redox por sí mismos, por lo que es necesario incluir en el ensayo un **marcado enzimático** a alguno de los componentes. En nuestro caso se utilizó un conjugado de DON marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) dando una reacción competitiva por su unión a un anticuerpo específico. Dado que las interferencias electroactivas son relativamente escasas, la detección electroquímica para interacciones de tipo antígeno-anticuerpo, pueden ser de gran utilidad en los análisis de alimentos dada la complejidad de sus matrices [66].



**Figura 7: Esquema de la etapa de detección en un inmunosensor electroquímico competitivo**

También es importante tener en cuenta que existen diferentes formatos posibles que pueden ser utilizados para desarrollar un inmunosensor electroquímico de modo semejante a los formatos en los ELISA. Los esquemas de inmunoensayo utilizados son los formatos competitivos, tanto directos (inmovilización de anticuerpo) como indirectos (inmovilización del antígeno o el antígeno marcado), como ensayos tipo sándwich (utilizando 2 anticuerpos que se unen al antígeno, solo utilizados con moléculas grandes o que poseen varios epítomos). Generalmente, los formatos más utilizados son los **ensayos competitivos directos**.

Del mismo modo que los ELISA competitivos, los inmunosensores electroquímicos competitivos están basados en la competición del anticuerpo por el analito presente en la muestra y el analito marcado generalmente con un enzima, que es capaz de transformar un sustrato en un producto con propiedades electroquímicas [74]. La etiqueta (enzima) cataliza la transformación de un sustrato, por lo que la detección electroquímica de los productos de la reacción enzimática **genera una señal amplificada**.

De esta forma, en un ensayo competitivo cuanto mayor es la concentración de analito en la muestra, menor unión se va a producir entre el anticuerpo y el analito marcado enzimáticamente, y en consecuencia se obtendrá una menor señal analítica. En este tipo de inmunosensores, a diferencia que en un esquema tipo sándwich, **la señal es inversamente proporcional a la concentración del analito**. La principal ventaja que presentan es su elevada sensibilidad para concentraciones de analito muy bajas y cercanas al límite de detección [139].

Para transformar la interacción de la toxina en una señal analítica, se han utilizado una gran variedad de técnicas electroquímicas (amperométrica, potenciométrica, conductimétrica, impedimétrica) [51; 53; 54]. A pesar de la alta sensibilidad de las técnicas electroquímicas tradicionales mencionadas, el desarrollo de dispositivos electroquímicos para la detección de micotoxinas ha sido a menudo limitada por la necesidad de utilizar etiquetas electroactivas sobre el analito [140]. En consecuencia, algunos investigadores han enfocado sus trabajos en técnicas electroquímicas libres de etiquetas alternativas, tales como conductimetría o con Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) [23].

La amperometría y voltametría en general son, sin duda, los modos de transducción electroquímica más adecuadas debido a su alta sensibilidad y la respuesta de trabajo en un amplio intervalo de concentraciones de micotoxina. La amperometría es ampliamente utilizada y se basa en la medición de una corriente frente a un potencial fijo o variable [2]. Se han desarrollado una gran variedad de inmunosensores electroquímicos para micotoxinas con LOD que se encuentran en intervalos de 0,5 - 20

ng ml<sup>-1</sup> y que son válidos para rangos de concentraciones que abarcan desde 1 a 100 ng ml<sup>-1</sup> [4]. Sin embargo para el DON la existencia de biosensores electroquímicos es limitada pese a sus múltiples ventajas, lo que abre una posibilidad de desarrollo de novedosos dispositivos sensores eficaces y selectivos.

Por otro lado, la Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) es una técnica poderosa, muy sensible y no destructiva que permite estudiar las propiedades eléctricas que ocurren en la interfase del dispositivo de detección y así realizar el seguimiento de las reacciones que se producen en el mismo [51; 141]. Es una técnica en la que se modelizan los cambios producidos en la resistencia de transferencia de electrones sobre la superficie del electrodo de trabajo resultante de la complejación de las micotoxinas en el rango de concentraciones de 1 - 20 ng ml<sup>-1</sup>, obteniéndose límites de detección de aproximadamente 0,5 ng ml<sup>-1</sup>. Una de las principales ventajas de los inmunosensores EIS es que no necesitan el etiquetado del analito para producir la señal electroquímica [54]. Esto implica la dificultad añadida de modificación de la superficie del electrodo. Las reacciones antígeno-anticuerpo provocan cambios en la impedancia electroquímica sobre el electrodo de trabajo, medidas habitualmente con un indicador electroquímico (frecuentemente el sistema redox ferro/ferri-cianuro), que se ajustan a un modelo teórico y se relaciona con las concentraciones implicadas.

Para el caso concreto del DON, en la actualidad no hay descritos muchos inmunosensores electroquímicos, a diferencia de para otras micotoxinas como la OTA o las aflatoxinas, por lo que los avances obtenidos en esta Tesis Doctoral abren un importante camino para la determinación de DON mediante inmunosensores con detección electroquímica, buscando una mejora en los escasos dispositivos existentes en la actualidad.

Otros inmunosensores electroquímicos descritos en la bibliografía son los inmunosensores potenciométricos [142] y conductimétricos [140] para el DON, aunque son mucho menos utilizados debido a la baja relación señal/ruido que producen y pequeña sensibilidad [143]. Los dispositivos potenciométricos (electrodos selectivos) detectan cambios en el potencial trabajando a corriente cero, mientras que los dispositivos conductimétricos detectan cambios en la conductividad entre los dos electrodos. También se ha desarrollado un importante subgrupo de los biosensores potenciométricos, como son los transistores de efecto de campo químicamente sensibilizados (CHEMFET) que han sido utilizado en algunas ocasiones para la detección de DON, aunque para concentraciones altas [143].

Se han desarrollado otros biosensores para la determinación de DON en cereales con técnicas electroquímicas, como la voltametría cíclica (VC) [76] o la cronoamperometría (CRA) [77]. El primero de ellos consiste en un inmunosensor directo que se realiza por

inmovilización de un anticuerpo selectivo al DON sobre la superficie de un electrodo de carbono vítreo modificado con un compuesto de fullereno (C<sub>60</sub>), ferroceno y el líquido iónico. La detección se realizó por voltametría cíclica y por EIS, obteniendo una buena repetibilidad (%DSR = 1,2%), selectividad, y una respuesta impedimétrica a DON en un intervalo entre 1 pg ml<sup>-1</sup> y 0,3 ng ml<sup>-1</sup>, además de un límite de detección de 0,3 pg ml<sup>-1</sup> (límite de detección menor que con GC, HPLC, GC-MS, HPLC-MS y LC-MS-MS) [76]. El inmunosensor descrito ha generado buenos resultados pero se desarrolla por inmovilización directa del anticuerpo sobre la superficie del electrodo, dificultando la manipulación y aumentando el tiempo de medida frente a una inmovilización realizada sobre otra superficie sólida como las MBs.

Otro de los inmunosensores descritos para el DON se ha utilizado en cereales y alimentos de base de cereales (trigo, cereales de desayuno y alimentos para bebés). Se trata de un inmunosensor que utiliza un fragmento F<sub>ab</sub> anti-DON inmovilizado sobre partículas magnéticas (MBs) y se realiza la transducción electroquímica sobre baterías de ocho electrodos serigrafados. Con este biosensor se midieron concentraciones de 100 a 4500 ng ml<sup>-1</sup> de DON y se obtuvo un factor EC<sub>50</sub> = 380 ng ml<sup>-1</sup>. Se obtuvo una precisión de 9-24 % para cereales de desayuno y 10-33 % en alimentos para bebés con origen cereal, y recuperaciones de muestras dopadas de 82-110 % en los cereales de desayuno y 97-108 % en alimentos para bebés [77]. En este caso se observa que la sensibilidad del inmunosensor de DON representado por su valor EC<sub>50</sub> es limitada, ya que en este tipo de inmunosensores se busca disminuir el valor de EC<sub>50</sub> consiguiendo así la interpolación de muestras con concentraciones inferiores.

Otro problema actual lo constituyen las llamadas **micotoxinas enmascaradas**, es decir de aquéllas que no se detectan con una determinada metodología analítica. En algunas ocasiones, el problema viene derivado no la propia técnica o instrumentación, sino de la forma de obtención de la micotoxina proveniente de la muestra de alimento y de complicaciones en su extracción. Este aspecto lo hemos comentado con mayor detalle en un *review* que hemos publicado recientemente sobre biosensores electroquímicos en la determinación de micotoxinas [2], y puede afectar al caso del DON cuya extracción puede realizarse simplemente con un tampón acuoso (debido a su polaridad), aunque no es el caso de otras micotoxinas de comportamiento opuesto.

En un futuro próximo, además de continuar con la mejora del inmunosensor desarrollado, por ejemplo con la modificación de los sustratos enzimáticos que mejoren la estabilidad o buscando un aumento en la vida útil, prevemos una tendencia hacia la construcción de biochips para la detección múltiple de varias micotoxinas en la misma muestra, posiblemente integrados en dispositivos de microfluídica, y evolucionando desde los inmunosensores individuales hasta múltiples en determinaciones simultáneas de varias micotoxinas [27; 144] y en la detección de

efectos sinérgicos que van más allá de la determinación individual de cada micotoxina [2; 145].

#### 1.2.4 Determinación de deoxinivalenol mediante técnicas cromatográficas

El riesgo de contaminación de algunos alimentos con las toxinas de *Fusarium* y la constante aparición de nuevas normativas que regulan las máximas concentraciones permitidas, ha provocado durante los últimos años el desarrollo de metodología analítica eficiente y sensible para el análisis cualitativo y para la cuantificación de metabolitos fúngicos en la alimentación. Los métodos de análisis cuantitativo para la mayoría de las toxinas de *Fusarium* usan columnas de inmovilización (IACs) seguidas de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC) en combinación con una variedad de detectores dependiendo de las características del analito. Han sido los **métodos más utilizados para la determinación de DON durante décadas** ya que son por lo general muy sensibles, selectivos, precisos y exactos.

El método cromatográfico de referencia según la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para la determinación de DON es la cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV-Vis) ya que el DON tiene propiedades fluorescentes limitadas [71]. La detección con este método precisa de tiempos de análisis prolongados, es un método caro debido al elevado coste de la instrumentación, de su mantenimiento y el consumo de reactivos y disolventes orgánicos necesarios [72], y es necesaria una alta cualificación del personal técnico en las operaciones analíticas y en el manejo de la instrumentación [73].

Para la preparación de las muestras se debe considerar las características del DON y de la matriz con la que se trabaja. En cada caso es necesaria la optimización del disolvente de extracción y de las técnicas físicas utilizadas en esta etapa (agitadores o mezcladores) para producir una extracción eficiente y completa. En la etapa previa de limpieza se utilizan generalmente columnas de inmovilización (IAC) que incluyen anticuerpos selectivos de DON para su separación del resto de compuestos del extracto, consiguiendo, además de la purificación, su preconcentración. También se utilizan frecuentemente columnas de extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) consistentes en una fase estacionaria adsorbente de partículas gruesas donde el DON se retiene a la vez que se eluyen los componentes de la matriz, y donde también puede realizarse su preconcentración [146; 147].

Otras técnicas cromatográficas utilizadas para el DON son la cromatografía en capa fina (TLC) [148]. Los primeros métodos desarrollados para la determinación de tricotecenos en grano se basaron en la cromatografía en capa fina (TLC) en el año 1986, con diferentes reactivos para la visualización de los analitos, siendo el más

habitual el cloruro de aluminio [149; 150]. También se ha descrito cromatografía de gases con captura de electrones (GC-ECD) o detección por espectrometría de masa (GC-MS), además de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) [58].

En la Tabla 7 se resumen procedimientos analíticos de cromatografía líquida que se han descrito para la determinación del DON, indicando la técnica cromatográfica y tipo de detección, pre-tratamiento, tipo de muestra y sensibilidad:

TÉCNICA	PRE-TRATAMIENTO	MUESTRA	LOD	%Recup.	REF.
HPLC-UV	Columna inmunoafinidad	Trigo para animales	200 ng g <sup>-1</sup>	90%	[146]
HPLC-UV	Inmunofiltración	Maíz	74 ng g <sup>-1</sup>	93%	[151]
HPLC-FD	Derivatización	Cereales para animales	14 ng g <sup>-1</sup>	89-101%	[18]
RP-HPLC-FD	Columna inmunoafinidad	Maíz	62 ng g <sup>-1</sup>	72-111 %	[152]
GC-MS	Columna inmunoafinidad y derivatización	Cebada	0.31-3.87 ng g <sup>-1</sup>	92-101,9%	[153]
GC-MS	Columna extracción fase sólida (SPE)	Orina humana	0,06 - 0,30 ng ml <sup>-1</sup>	73	[147]
GC-MS	Sin etapa de limpieza	Trigo	-	-	[154]
LC-ESI-MS/MS	Columna extracción fase sólida (SPE)	Plasma y bilis de animales	0,01-0,63 ng ml <sup>-1</sup>	-	[155]
LC-MS/MS	Sin etapa de limpieza	Cereales	0,01-20 ng g <sup>-1</sup>	76,8 % - 108,4 %	[156]
LC-MS/MS	Sin etapa de limpieza	Harina de maíz y de arroz	-	-	[157]
HPLC-MS/MS	Sin etapa de limpieza	Carne de cerdo	0,02 ng g <sup>-1</sup>	-	[158]
HPLC-MS/MS	Cartuchos de limpieza caseros	Varias matrices	0,29-0,99 ng g <sup>-1</sup>	88,5 - 119,5 %	[159]
LC-MS/MS	Cartuchos con diferentes adsorbentes	Pimentón	14 ng g <sup>-1</sup>	86,8 %.	[160]
HPLC-MS/MS	Columna extracción fase sólida (SPE) poliméricos	Harina de trigo, de cebada y en pan crujiente	0,5 a 3,4 ng g <sup>-1</sup>	>74%	[161]

**Tabla 7: Ejemplos de referencias bibliográficas para la determinación de DON por cromatografía líquida**

La cromatografía líquida suele conllevar procedimientos previos de tratamiento de las muestras, con etapas de extracción y de lavado, por ejemplo extracción con disolventes orgánicos y limpieza de las matrices de las muestras sobre columnas de inmunoafinidad, lo que supone un inconveniente [162]. Para evaluar la efectividad de una cromatografía de líquida (LC) realizando una etapa previa de limpieza con una IACs en la determinación de deoxinivalenol tanto en cereales y productos de cereales se realizó un estudio entre laboratorios que llevó a cabo la Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido. En este estudio, la muestra de ensayo se extrajo con agua y posteriormente se filtró y se hizo pasar por una columna de inmunoafinidad (IACs). Después, el DON retenido en la columna se eluyó con acetonitrilo o con metanol. El DON se cuantificó por HPLC en fase reversa con un detector UV. Con este método de determinación se obtuvo un promedio de recuperaciones entre 78 y 87 %. Basándose en los resultados de 6 muestras contaminadas artificialmente (duplicados ciegos) se concluyó que el método mostró una aceptable precisión (%DSR < 26%) [71].

La determinación por HPLC del DON generalmente se lleva a cabo con detectores UV-Visible por las propias características de la micotoxina que es capaz de **absorber fuertemente a 218 nm** por los anillos aromáticos de su estructura, aunque en otras ocasiones, se ha realizado una derivatización previa para que el DON adquiera propiedades fluorescentes (DON de forma natural es muy poco fluorescente) [18; 65].

El proceso de derivatización propuesto se basa en una síntesis de Hantzsch modificada en el que se lleva a cabo una reacción del DON (u otros tricotecenos tipo B) con NaOH, acetoacetato de metilo y acetato de amonio. A continuación se calienta bajo la influencia de un álcali, que provoca que el DON se divida en varios subproductos acompañados por la liberación de formaldehído que se hace reaccionar con acetoacetato de metilo y de amonio para formar un derivado de dihidropiridina fluorescente ( $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ ) con el cual determinar el DON de modo sensible [18; 163].

También es frecuente la determinación de DON en alimentos contaminados con un detector de masas (MS), o incluso con MS/MS, especialmente si el análisis es multi-micotoxina. Las ventajas de la combinación de las IACs y técnica HPLC-MS/MS son la eliminación eficaz de interferencias de la matriz, alta selectividad, límites de detección bajos y la separación de una amplia gama de moléculas con diferentes propiedades físico-químicas en una única determinación. Con un HPLC-MS/MS, se obtuvieron recuperaciones de entre 60 y 100 % y límites de detección de  $60 \mu\text{g kg}^{-1}$  para el DON y de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para ZEA, T-2 y HT-2 [164].

Dada la similitud entre los diferentes tricotecenos (tricotecenos tipo A son compuestos menos polares y tricotecenos tipo B más polares) son necesarias diferentes etapas de

limpieza y extracción que permitan la separación de cada compuesto así como su diferenciación durante la detección [165] o la determinación multi-micotoxina [162], lo que requiere un cuidadoso diseño de su extracción conjunta, evitando la principal fuente de las “micotoxinas enmascaradas”, que en muchos casos se dan por una ineficiente extracción [2; 65; 166].

### **1.3 ANTICUERPOS COMO ELEMENTOS DE BIORRECONOCIMIENTO**

Tal como se ha comentado en apartados anteriores, los procedimientos de inmunoensayo y los inmunosensores se basan en el uso de anticuerpos (monoclonales y policlonales) como ligandos de biorreconocimiento que presentan una alta afinidad y especificidad hacia las micotoxinas consideradas como antígenos. Consideramos conveniente en este apartado resumir los avances en el desarrollo de anticuerpos para la micotoxina DON y las dificultades asociadas a esta molécula para la creación de estos anticuerpos.

#### **1.3.1. Producción de anticuerpos selectivos a deoxinivalenol: inmunógenos.**

Para el desarrollo de biosensores para la determinación de micotoxinas, se han utilizado diferentes ligandos de biorreconocimiento, como fragmentos de DNA [167], aptámeros [32; 45], receptores artificiales como MIPs [39; 43], o anticuerpos (o fragmentos de ellos modificados genéticamente) [77; 168]. En el caso de las micotoxinas en general, tanto si los elementos de biorreconocimiento son naturales (anticuerpos, ADN) como si son artificiales (anticuerpos realizados por ingeniería, fragmentos de anticuerpos, aptámeros o receptores como los polímeros de impronta molecular) son en la actualidad muy utilizados para la unión selectiva de las micotoxinas [77; 169]. En general, para la determinación de micotoxinas utilizando sensores de afinidad, es más común el uso de anticuerpos específicos pese a la existencia de anticuerpos recombinantes y fragmentos de anticuerpo, porque proporciona la especificidad y la sensibilidad necesaria para detectar niveles bajos de toxinas [49] debido a las características inherentes de los anticuerpos (especificidad y afinidad) [41; 170].

Según su modo de producción, consideramos tres tipos de anticuerpos:

- Policlonales (pAb),
- Monoclonales (mAb)
- Recombinantes (rAb)

Los **anticuerpos policlonales (pAb)** se obtienen tras la purificación a partir de la sangre de los animales inmunizados por inyección de la toxina conjugada a una proteína para la producción natural e *in vivo* de los anticuerpos. Tienen las ventajas de bajo coste y de fácil desarrollo, sin embargo, es muy importante una purificación cuidadosa del conjugado para incrementar la selectividad y, como se ha comentado, puede existir reactividad cruzada con la proteína utilizada en este conjugado [2]. Por el contrario, los **anticuerpos monoclonales (mAb)** se producen a partir de hibridomas positivos mediante la fusión de células de mieloma murino y células de bazo de ratones inmunizados. Su principal característica es la uniformidad de las propiedades analíticas en todos los mAbs creados [59].

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) tienen un importante ventaja sobre los anticuerpos policlonales (pAbs) en inmunoensayos ya que ofrecen un suministro ilimitado de anticuerpos monoespecíficos. Sin embargo, a menudo los anticuerpos monoclonales son más difíciles de mantener y suelen ser más caros que los anticuerpos policlonales, o incluso pueden llegar a tener menores constantes de afinidad que los correspondientes anticuerpos policlonales en función del clon escogido [49].

La creación de anticuerpos también tienen ciertas desventajas, como es la necesidad de utilizar animales vivos para su producción inicial, además de la susceptibilidad a la desnaturalización y la degradación, y el requisito de que la exposición del sistema inmune del animal al antígeno tiene que ocurrir dentro del animal *in vivo* y por lo tanto, en la fase acuosa. Los dos últimos factores pueden dar lugar a anticuerpos con excelente afinidades en disoluciones acuosas, pero con la susceptibilidad de desnaturalización en presencia de los disolventes orgánicos comúnmente utilizados para extraer las micotoxinas de los alimentos [171].

La tercera generación en la tecnología de Ab son **anticuerpos recombinantes (rAb)**, que no requiere el trabajo sobre animales vivos. El gen funcional de algunos Ab se clona y se transmite a organismos procariotas o eucariotas modificados genéticamente desde un hibridoma positivo o células de bazo con o sin vacunación [172].

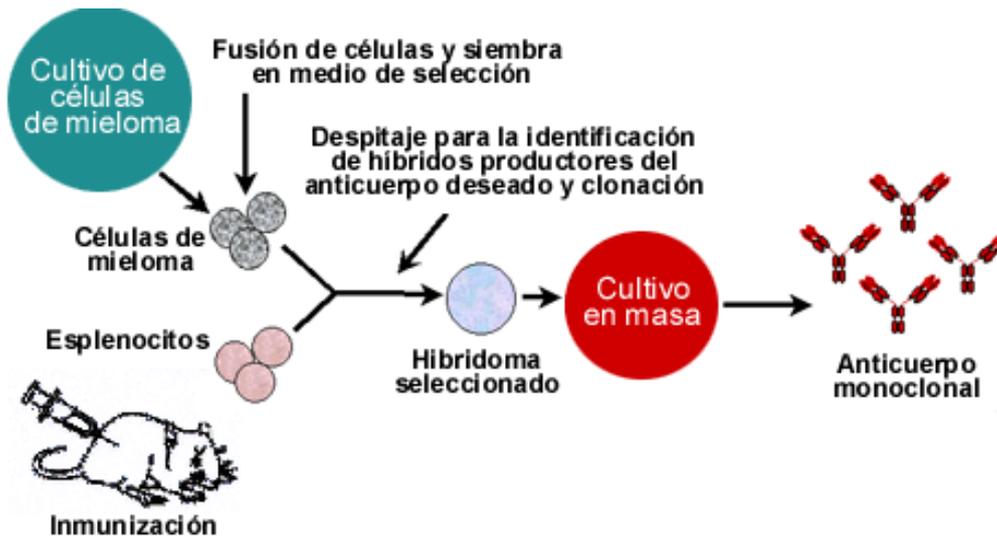
Otro tipo de elementos de biorreconocimiento son las fracciones activas de anticuerpos, por ejemplo un **fragmento de anticuerpo de cadena única (Single Chain Fragment Variable, scFv)** que consiste en un pequeño anticuerpo modificado, en el que la cadena pesada variable ( $V_H$ ) y la cadena ligera ( $V_L$ ) de la molécula de anticuerpo están conectadas por un enlazador polipéptido corto y flexible que consigue que el fragmento scFv conserve el sitio de unión al antígeno original, lo que le permite mantener su afinidad específica por el antígeno, y con la ventaja de que se pueden

producir en gran escala a partir de células de *Escherichia coli* a bajo coste, surgiendo como una alternativa eficaz a los anticuerpo monoclonales [101].

Desde la primera descripción de anticuerpos para micotoxinas por el grupo de F.S Chu en la década de 1970, cientos de artículos publicados describen anticuerpos anti-micotoxina y su uso para analizar alimentos, piensos y otros materiales y para su uso en inmunoensayos [173]. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales han sido producidos para la mayoría de las micotoxinas, aunque sus propiedades varían ampliamente.

Los primeros anticuerpos selectivos al DON se describen en el año 1988. Mediante un procedimiento para la derivatización selectiva del OH del carbono 3 de DON con ácido succínico, dando 3-O-hemisuccinyldeoxynivalenol, que se conjugó a albúmina de suero bovino (BSA) a través de su carboxilo libre grupo. Este conjugado DON-BSA se utilizó luego como un inmunógeno en la etapa de inmunización *in vivo* del ratón. El anticuerpo monoclonal resultante reaccionó bien con DON y 3-acetil-DON y algo menos con otros tricotecenos, incluyendo 15-acetil DON [116].

La investigadora más relevante en cuanto a producción y caracterización de anticuerpos anti-DON es Chris M. Maragos, (*Mycotoxin Research Unit, National Centre for Agricultural Utilization Research (USDA/ARS) San Pretoria, IL-USA*) [59; 95; 174], quien gran parte de su trabajo se ha basado en el desarrollo y producción de nuevos anticuerpos monoclonales para el DON, que mejoraran la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos policlonales ya existentes, a través de la síntesis de nuevos inmunógenos. En este sentido, la molécula de DON ofrece varias posibilidades de conjugación con varios grupos funcionales disponibles. Por ejemplo, mediante la reacción de la carbodiimida entre los grupos hidroxilo del DON y los grupos amino en las proteínas portadoras (enlace carbamato) [74; 175]. Para la producción de mAbDON, diez hembras de ratón fueron inicialmente inmunizadas mediante la inyección de 95 µg de DON-OVA por animal, seguidas de hasta 4 dosis repartidas en un espacio de aproximadamente 3 meses. Uno de los mAbs resultantes (derivado del clon #22) se utilizó en un ELISA sensible para DON y 3-AcDON en el trigo por su alta especificidad y sensibilidad [59; 95].



**Figura 8: Etapas para la producción de anticuerpos monoclonales por inmunización de ratones. Figura extraída de la referencia [176]**

Los anticuerpos anti-DON generados, en algunas ocasiones fueron tratados con agentes reductores o enzimas proteolíticas para generar fragmentos que retienen la región de unión al antígeno ( $F_{ab}$ ) y pueden producir un aumento de la afinidad y especificidad por su menor tamaño [171; 174]. Además es posible con las tecnologías recombinantes aislar las porciones variables de la inmunoglobulina que están involucrados principalmente con la unión de la toxina. Los fragmentos  $F_{ab}$  se muestran como una alternativa a los anticuerpos completos, y su tamaño más pequeño contribuye a la minimización de la unión no específica debido a las interacciones a través del fragmento  $F_c$  y a la disminución del impedimento estérico en esquemas heterogéneos [77].

Para el procesos de inmunización y producción de anticuerpos selectivos, es necesario que el DON se una a proteínas portadoras adecuadas ya que el DON es una molécula no inmunogénica pequeña (haptenos) y por si solas no son capaces de inducir la respuesta inmune adecuada en el organismo de un animal vivo [117]. Esto implica la posibilidad de aparición de algún tipo de afinidad para la proteína portadora, por ejemplo, de BSA [177].

Debe tenerse en cuenta el conjugado de DON utilizado y el carbono por el que se produce la unión con la proteína portadora (los carbonos más activos de la molécula de DON son C3 y C15), porque la probabilidad de que el anticuerpo tenga reactividad cruzada por un derivado de DON será mayor para los análogos que tienen un grupo o-acetilo en el carbono a través del cual se preparó el conjugado [59]. De la inmunización realizada con los derivados acetilados, podría esperarse anticuerpos que reconocen principalmente al 3-Acetil-DON, 15-Acetil-DON, y 3,15-Diacetil-DON, pero que además

podrían tener una reacción cruzada con DON [111; 116; 178]. Por ejemplo, cuando la unión de la proteína portadora al DON se realiza a través del hidroxilo del carbono 3, la actividad observada para el 3-Acetil-DON fue mayor que para el DON [116].

En segundo lugar, si los derivados acetilados de DON (3-Acetil-DON y 15-Acetil-DON) se utilizan como inmunógenos con la proteína portadora en el carbono no acetilado, la actividad del anticuerpo será con toda seguridad mayor para el compuesto de DON acetilado utilizado para preparar el conjugado, y menor hacia el derivado de DON acetilado en el mismo sitio que el sitio de la conjugación de la proteína portadora. Es decir, cuando 3-Acetil-DON se utilizó para preparar un inmunógeno mediante la unión de la proteína a través del carbono 15 de la resultante anticuerpos eran más específicos para la 3-Acetil-DON que para 15-Acetil-DON [110].

De todo lo anterior se extrae que los grupos acetilo, así como su posición son importantes para provocar la respuesta inmune del animal y en último término, para el reconocimiento del DON en su aplicación posterior de inmunoensayo.

Cuando un grupo acetilo está presente, los anticuerpos que resultan son altamente específicos para su detección. Alternativamente, si no hay grupos acetilo la mejor respuesta del anticuerpo se produce en la región a través de la cual se hizo la conexión. Con lo cual se sugiere una estrategia para preparar el inmunógeno mediante un enlace en sitios distintos de la hidroxilos (C3 y C15), tales como en el carbonilo del carbono 8 o en el epóxido de los carbonos 12,13 **para obtención satisfactoria de anticuerpos que no desarrollen reactividad cruzada con los derivados acetilados** del DON, los cuales tienen una presencia natural en cereales (y capacidad contaminante) similar a la del DON [59].

Un enfoque indirecto, pero genérico y muy sensible para detectar el DON y sus derivados acetilados es el uso de anticuerpos que poseen una reactividad cruzada con 3-acetilDON o con triacetilDON y realizar una detección de "DON total" después de la acetilación total de estas toxinas en los extracto de la muestra, dada la dificultad de producir anticuerpos selectivos a DON y donde no se aprecie reactividad cruzada con dichos productos acetilados, pero en este caso no podría conocerse la cantidad exacta de DON ni el riesgo toxicológico individual que puede producir [179; 180].

### **1.3.2. Anticuerpos selectivos al deoxinivalenol: inmunoensayos.**

Se han descrito anticuerpos específicos para todos los derivados del DON, excepto para el nivalenol (NIV), aunque se han realizado varios intentos hacia este último, o se ha determinado con anticuerpos selectivos al DON con alta reactividad cruzada con el

NIV. Esto demuestra que las pequeñas diferencias existentes en las estructuras moleculares, por ejemplo entre el DON y el NIV que se diferencian únicamente en un grupo OH (Tabla 2) pueden alterar fuertemente las propiedades inmunoquímicas de biorreconocimiento hacia esta micotoxina y su toxicidad (toxicidad del NIV es muy inferior a la del DON) [105].

La **síntesis de anticuerpos específicos para el DON**, comentada en el apartado anterior, ha permitido el desarrollo de una gran variedad de inmunoensayos basados en el reconocimiento de cualquier epítipo libre en la molécula de DON. Por lo general, los anticuerpos con alta selectividad y alta afinidad frente al DON, se pueden producir de forma relativamente barata, y por esta razón se han incorporado a un gran número de formatos y dispositivos de ensayo, facilitando así la determinación de DON en ensayos de rutina [181]. En general, los formatos diseñados que contienen anticuerpos se dividen en dos grupos: en los que se utiliza el anticuerpo para aislar y purificar las toxinas, como por ejemplo en las columnas de inmovilización (IAC), y en los que la interacción entre el anticuerpo y la toxina es la base para la detección (inmunoensayos) [171].

El principal inconveniente de los anticuerpos de DON es la **reactividad cruzada** que puede existir con otras micotoxinas o derivados por la similitud en sus estructuras químicas. En el caso de DON y tal como se ha indicado anteriormente, puede aparecer reactividad cruzada con el NIV, los compuestos acetilados del DON (3-AcetilDON y 15-AcetilDON), provocando que los resultados analíticos obtenidos se puedan interpretar erróneamente. La reactividad cruzada excesiva no permite comprobar el cumplimiento de las normas legales, pero permite una evaluación general de riesgos para los consumidores [96]. Un ejemplo es la producción del anticuerpo a través de un conjugado DON-BSA unido por la posición 15 del DON (reacción de unión de la BSA con el derivado 15-AcetilDON), que posteriormente mostró alta especificidad tanto para el DON como para el 15-AcetilDON [111] o por el contrario, realizar la inmunización a través de un derivado del compuesto 3-AcetilDON y que por lo tanto el anticuerpo generado lo reconozca selectivamente [181].

Existe una amplia variedad de anticuerpos de DON monoclonales [59; 111; 116; 178] y policlonales utilizados en inmunoensayo, [67; 74; 175; 182], que se diferencian especialmente en su modo de producción durante la inmunización del animal y por lo tanto en la reactividad cruzada desarrollada por moléculas de estructura similar al DON. Estos anticuerpos, son también la base de numerosos *kits* comerciales.

## 1.4 PARTICULAS MAGNÉTICAS COMO SUPERFICIE SÓLIDA DE INMOVILIZACIÓN EN EL INMUNOENSAYO

En los últimos años han surgido grandes avances científicos sobre los biosensores convencionales de micotoxinas y en la mejora de sus propiedades analíticas. Una de las áreas más activas es el uso de nanomateriales y su nanoestructuración [28; 183], por ejemplo utilizando nanopartículas de oro [25] o nanotubos de carbono [28; 49; 169]. La nanoestructuración aportan ventajas en los biosensores electroquímicos como una mayor área superficial y un incremento en las corrientes obtenidas [49].

Otro de los avances recientes es el uso de **partículas magnéticas (MBs) como soporte sólido para la inmovilización** del anticuerpo o del antígeno y las reacciones propias del inmunoensayo. Estas partículas magnéticas son atraídas por un campo magnético externo, pero no presentan agregación o atracciones propias en ausencia del mismo (paramagnetismo), por lo que pueden ser manipuladas fácilmente con rendimientos de eficiencia y de separaciones próximos al 100% [169]. Dado que nuestros inmunosensores se basan en estas partículas magnéticas, en este apartado se describe su uso en inmunosensores (micotoxinas, DON) y se comentan sus ventajas.

Las MBs se encuentran recubiertas con diferentes grupos de funcionales, tales como estreptavidina, grupos tosilo, grupos amino, grupos carboxilo, anti-anticuerpos genéricos (algG) o una variedad de proteínas para la inmovilización rápida y específica del elemento de reconocimiento. Existen partículas magnéticas comerciales provenientes de empresas como Invitrogen, Pierce, Millipore o Promega entre otras [184; 185; 186; 187] y su coste económico depende tanto de su tamaño como del tipo de funcionalización [100]. Es importante seleccionar las MBs óptimas y comprobar la afinidad de cada tipo de MBs por el anticuerpo según su procedencia animal, y seguir las pautas y los procedimientos de inmovilización que se recomiendan según la capacidad de unión teórica y las características de cada una de ellas [41].

### 1.4.1. Uso de partículas magnéticas como superficie sólida de un inmunosensor

Debido al tamaño y la geometría esférica de las MBs, un gran número de biomoléculas (anticuerpos o fragmentos de ácidos nucleicos, por ejemplo) se puede inmovilizar sobre la superficie de cada MB lo que lleva a una mejora de la sensibilidad del inmunoensayo y permite reducir los tiempos de reacción y utilizar volúmenes más pequeños de disolución en las etapas de incubación al encontrarse estos ligandos en dispersión [100].

Las MBs son partículas esféricas con diámetros habitualmente comprendidos entre 1 y 3  $\mu\text{m}$ , fabricadas con una dispersión de material magnético (núcleo compuesto de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y recubiertas con una capa delgada de poliestireno que sirve para definir el área de superficie para la adsorción o acoplamiento de una gran variedad de moléculas funcionalizadas, para su posterior conjugación con micotoxinas, proteínas, anticuerpos, aptámeros, etc. Los diversos tipos de funcionalización, pueden clasificarse en dos grupos según la unión posterior sea: por unión covalente o por afinidad [188].

Si bien los usos de las MBs son múltiples (por ejemplo separaciones selectivas de proteínas), una de las aplicaciones más interesantes se encuentra en los procedimientos de inmunoensayo [26] por la **posibilidad de funcionalización de las partículas magnéticas, así como por su capacidad de separación** utilizando un campo magnético externo, que provoca una mejora sustancial del rendimiento de los inmunosensores clásicos y facilita enormemente el modo de trabajo [51].

En nuestro laboratorio hemos demostrado que el uso de las MBs mejora el rendimiento de la reacción inmunológica de micotoxinas como la ocratoxina A, debido a un aumento en el área superficial y de la cinética de la reacción provocada por su estado de dispersión en comparación con una superficie sólida de inmovilización del anticuerpo (el analito difunde más fácilmente hacia el anticuerpo) [32; 41; 189]. Su fácil separación bajo la acción de un campo magnético externo mejora enormemente su manipulación en las etapas de separación y de lavado y evita problemas como la influencia de matrices en las reacciones del inmunoensayo [190]. La fácil unión de las MBs a anticuerpos (normalmente por afinidad o por reacciones de unión covalente), en algunos casos de pocos minutos, y su almacenamiento posterior sin pérdida de su capacidad de reconocimiento (hemos llegado a unos 25 días con almacenamiento a 4 °C sin pérdida de capacidad del mAbDON), facilita mucho los procedimientos de inmunoensayo sobre estas MBs [41].

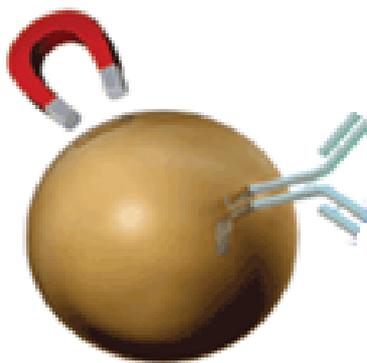
Las MBs han jugado un papel importante en las 3 fases de los inmunosensores de este trabajo:

- 1) Inmovilización del anticuerpo sobre las MBs. En el caso de reacciones de afinidad, este proceso puede realizarse con incubaciones de tan sólo 10 minutos (por ejemplo con MBs funcionalizadas con proteína G o proteína A).
- 2) Ensayos competitivos directos sobre las MBs unidas al anticuerpo en sus diversas etapas de incubación, separaciones y lavados [191; 192].

- 3) Transducción sobre los electrodos de trabajo (SPCEs) de forma localizada, con la ayuda de un campo magnético externo, para realizar finalmente la detección electroquímica de los productos de la reacción enzimática [41].

Una ventaja adicional del uso de MBs es que la inmovilización del elemento de reconocimiento se puede realizar en grandes cantidades en un solo paso y posteriormente, las MBs recubiertas se puede almacenar durante varias semanas sin pérdida de la actividad del anticuerpo almacenado a 4 °C (debe de estudiarse en cada caso), hecho muy importante cuando se espera el análisis de gran número de muestras al reducir el tiempo dedicado. Otra ventaja importante es su confinamiento controlado en la superficie de transducción, por ejemplo sobre el electrodo de trabajo en el caso de transducción electroquímica [2; 41]. Las partículas son paramagnéticas, por lo que en ausencia del campo magnético externo no se produce su agregación.

En la bibliografía se describen algunos inconvenientes que en nuestro caso no se han presentado. Por ejemplo, la posibilidad de pasivación del electrodo de trabajo y la aparición de nuevos interferente electroquímicos. En nuestro laboratorio hemos comprobado, que con el tipo de electrodos utilizados, hasta 50 µg de MBs confinadas sobre el electrodo de trabajo no disminuye la transferencia de carga de la detección voltamétrica de la p-benzoquinona [41]. El elemento de biorreconocimiento (anticuerpo), no está en contacto directo con la superficie del electrodo, lo que puede hacer pensar que disminuiría la sensibilidad, pero por el contrario, el uso de superficies magnetizadas en los electrodos ya sea a través de la inclusión en el material de electrodo [193; 194], de partículas magnéticas [41; 195] o a través de la colocación de pequeños imanes debajo de la superficie del electrodo de trabajo [77; 122; 196; 197] permite concentrar y confinar las MBs sobre la superficie del electrodo para la etapa de detección electroquímica [100], consiguiendo que la totalidad de las MBs (que contienen la cadena inmunológica inmovilizada sobre su superficie) se encuentren sobre el electrodo de trabajo, consiguiendo una mayor sensibilidad y una mejora en la reproducibilidad de las medidas electroquímicas.



**Figura 9: Partícula magnética utilizada como superficie sólida de inmovilización del elemento de biorreconocimiento [184]**

En la tabla 7 se recogen ejemplos de uso de MBs en inmunosensores electroquímicos para diferentes analitos como micotoxinas [77; 122], hormonas (prolactina, testosterona, cortisol) [198; 199; 200], residuos de antibióticos [194] y otros compuestos como hidrocarburos policíclicos aromáticos [201], sulfonamidas [202], etc., para ilustrar la amplia variedad de inmunoensayos posibles debido a las ventajas de su uso.

MATERIAL	TIPO DE FUNCIONALIZACIÓN	REFERENCIAS
<b>PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MBs)</b>	Grupos amino	[203]
	Grupos carboxilo	[204; 205]
	Enlace avidina/estreptavidina	[193; 198; 206]
	Proteína A/Proteína G	[199; 200; 202; 207]
	Grupos tosilo activados	[73; 77; 122; 194; 206]
	Anticuerpos	[120; 201]

**Tabla 8: Ejemplos de biosensores electroquímicos que utilizan MBs funcionalizadas como superficie de inmovilización**

Siguiendo esquemas similares de inmovilización de biorreactivos sobre las diferentes MBs, se han desarrollado **inmunoensayos basados en ELISA espectrofotométricos**, realizando en la mayoría de los casos una reacción enzimática final para la detección óptica del ensayo especialmente, aunque no para el caso del DON que se describen por primera vez en este trabajo [208; 209].

En los últimos años se han descrito inmunoensayos que utilizan MBs como superficie de inmovilización con detección óptica basadas en la fluorescencia molecular [210; 211], en la absorción molecular [212; 213] o en la quimiluminiscencia [209], obteniendo una buena correlación entre un ELISA y un biosensor electroquímico.

### 1.4.2. Uso de partículas magnéticas en inmunosensores para micotoxinas

El uso de **MBs funcionalizadas** para la determinación de DON no está muy extendido. Por este motivo, en este apartado se ilustran aplicaciones en general para otras micotoxinas, como ejemplo de futuras aplicaciones que podrían desarrollarse para el DON.

Los primeros usos de MBs con micotoxinas se dieron con la OTA hace unos 10 años [214; 215]. Las MBs se han utilizado sobre todo en inmunosensores para esta micotoxina [41; 214; 216] aunque también se han desarrollado aptasensores [32; 217], con ensayos directos e indirectos [45]. Dentro de nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un inmunosensor directo electroquímico para la determinación de OTA en vinos tintos realizando la inmovilización del anticuerpo monoclonal de OTA sobre MBs funcionalizadas con estreptavidina, obteniendo unos bajos límites de detección  $0,11 \pm 0,01 \text{ ng ml}^{-1}$ . Con el inmunosensor desarrollado se determinaron los niveles de OTA en dos vinos tintos de la denominación "Campo de Borja" que oscilaron entre  $0,027$  y  $0,033 \text{ ng ml}^{-1}$  de OTA [41]. También de forma satisfactoria hemos desarrollado un aptasensor basado en la inmovilización de un aptámero selectivo a la OTA sobre partículas magnéticas funcionalizadas con nanopartículas de oro, para determinar la concentración de esta micotoxina en trigo a través de una reacción competitiva entre la OTA libre y el conjugado enzimático OTA-HRP, con un límite de detección de  $0,07 \pm 0,01 \text{ ng ml}^{-1}$  [32].

Para el caso de la ZEA hay numerosos estudios, especialmente para la determinación de dicha micotoxina en alimentos infantiles, para los que se requiere una gran sensibilidad en el método desarrollado dado las bajas concentraciones de ZEA permitidas (inferiores a 20 ppb) en la legislación vigente [190; 218; 219; 220]. Con el inmunosensor electroquímico con MBs y electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs) se determinó la ZEA de un CRM con matriz semejante a la comida para bebés, obteniendo un límite de detección muy bajo ( $0,007 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y una excelente precisión, con una tasa de recuperación de 101-111 %, así como un error sistemático sobre la concentración certificada en el CRM inferior al 4 % y una excelente reproducibilidad (DSR = 6 %). Por lo tanto se observó **que el uso de MBs aumenta las ventajas analíticas de los inmunosensores** [219].

La ZEA también se ha determinado en piensos de alimentación animal siguiendo un esquema semejante basado en un inmunoensayo competitivo directo (entre ZEA y ZEA-HRP) que utiliza un anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre MBs funcionalizadas con el grupo 3-aminopropil y sobre un electrodo de oro. El primero de ellos mostró mayor sensibilidad y límites de detección inferiores que el método

estándar, lo que muestra la mejora obtenida por el hecho de inmovilizar los anticuerpos sobre las MBs [221].

Basados en ensayos competitivos semejantes se han desarrollado inmunosensores electroquímicos de aflatoxinas (concretamente aflatoxina M1, AFM1) en matrices de leche en los que se inmoviliza el anticuerpo selectivo a AF sobre MBs funcionalizadas con proteína G [195; 222]. Los ensayos desarrollados son directos, en los que se encontró que el límite de detección es  $37,7 \text{ ng l}^{-1}$  de AFM en solución tampón y  $27,5 \text{ ng l}^{-1}$  de AFM en muestras de leche. Este método también se puede extender fácilmente a la rápida detección de otras micotoxinas y las especies biológicas, tal y como se ha visto en los últimos años [222].

Para las toxinas HT-2 y T-2, se ha desarrollado un inmunosensor electroquímico competitivo realizando la inmovilización directa sobre MBs de un anticuerpo con una reactividad cruzada de 100% hacia HT-2 y T-2 que permite detectar simultáneamente ambas toxinas con una sensibilidad similar, con el objetivo de determinar la cantidad total de las toxinas HT-2 y T-2 en la muestra. Después de las reacciones inmunoquímicas, el producto enzimático se detectó con voltamperometría de pulsos diferencial (DPV) [122].

El uso de MBs no se ha llevado a cabo sobre tricotecenos ni sobre DON. Por lo que puede decirse que este trabajo es un gran avance analítico en el desarrollo de dicha metodología para inmunosensores de DON. Únicamente se ha publicado un procedimiento de inmovilización de un anticuerpo monoclonal específico y selectivo para DON, sobre MBs funcionalizadas con grupos amino (reacción de la carbodiimida), teniendo como utilidad la extracción de DON de piensos animales, pero no son usadas como superficie sólida de inmovilización, sino como modo de extracción. Los autores comentan que este sistema de extracción podría ser una herramienta útil para detectar la contaminación por micotoxinas en piensos y en diferentes alimentos [223].

## 1.5 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO

Nuestro trabajo se ha basado en el uso de electrodos serigrafiados como transductores de la señal electroquímica, por lo que también consideramos conveniente describir su uso en inmunosensores electroquímicos (micotoxinas y DON). No obstante, ya se ha comentado la escasez de trabajos previos sobre inmunosensores para la micotoxina DON, por lo que también se ilustran ejemplos de otras micotoxinas en forma de trabajos que podrían ser similares para el DON. También se comenta la importancia del material y tipos de electrodos en transducción electroquímica.

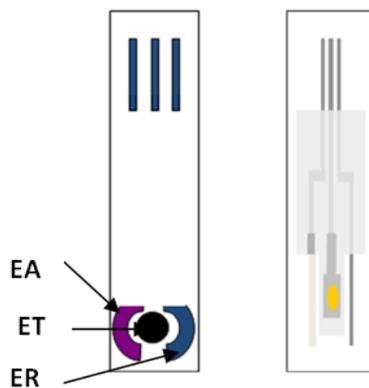
Uno de los principales desafíos para la química analítica es el desarrollo de métodos que den una respuesta rápida “*in situ*”. En los últimos años, muchos de los métodos desarrollados con este fin se han basado en el uso de técnicas electroquímicas, debido a su alta sensibilidad y selectividad, pequeño tamaño de la instrumentación y bajo coste [41; 224]

La elección del electrodo para un inmunosensor electroquímico es crucial por varios aspectos, incluyendo sensibilidad, velocidad de transferencia de carga, coste económico y la posibilidad de inmovilización o de adsorciones inespecíficas en algunos casos. Los electrodos más utilizados en inmunosensores electroquímicos están fabricados de metales inertes, como el platino [225], el oro [226; 227; 228; 229; 230] y varias formas químicas de carbono, como la fibra de carbono [231], el epoxi grafito [73; 194; 232], el grafeno [233] o el carbón vítreo [201].

Los electrodos convencionales son de un solo uso y a menudo, antes de cada experiencia se deberán de regenerar, un procedimiento que es por lo general largo y tedioso. Además, aunque se comportan muy bien desde el punto de vista electroquímico, estos sensores son por lo general bastante caros (desde 60 a 300 €). Otro inconveniente adicional, es la necesidad de un gran volumen de disolución para disponer además de otros dos electrodos (referencia y auxiliar), lo que requiere una disolución de trabajo de al menos 1 ml [100].

En los últimos años el uso de electrodos convencionales está siendo muy limitado, y han dado paso a células electroquímicas completas de pequeño tamaño, como son los **electrodos serigrafiados** (SPE), que pueden ser desechables por su bajo coste de fabricación [22; 54]. Los SPEs se consideran como células electroquímicas, donde se coloca un pequeño volumen de la disolución a medir (típicamente 20-100  $\mu$ l) [224]. Tienen gran interés analítico por su eficiencia del transporte de masa, por una menor resistencia óhmica debida a la disolución (al medir corrientes muy pequeñas) en comparación con los electrodos habituales, y por su alta precisión y resolución espacial y temporal [234]. Debido a su producción automatizada en masa, suelen ser bastante reproducibles entre diferentes lotes.

Desde principios de los años 90 la tecnología de serigrafiado (*screen-printing technology*) ha sido muy utilizada en la industria microelectrónica para aplicaciones electroquímicas [235]. Los electrodos serigrafiados (SPEs), son el equivalente miniaturizado de una célula electroquímica tradicional que incluye tres electrodos: electrodo de trabajo (ET), electrodo de referencia (ER) y electrodo auxiliar (EA), como se ilustra en la figura 10.

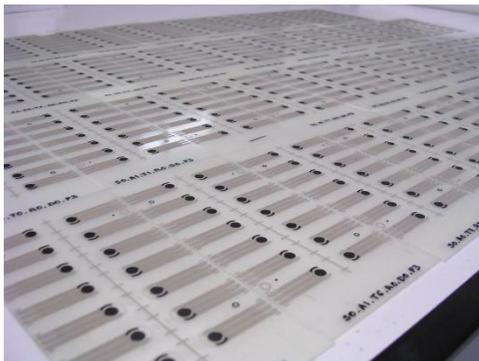


**Figura 10: Esquema de un electrodo serigrafiado (SPEs)**

### 1.5.1. Producción de electrodos serigrafiados (SPEs)

La tecnología de impresión por serigrafía (de capa gruesa, *thick-film technology*) utilizada para la fabricación de los SPEs consiste en la impresión y curado de varias tintas sobre soportes planos [236; 237] utilizando una máquina de serigrafía que permite la producción de un gran número de electrodos al mismo tiempo con un bajo coste [100; 234].

Los SPEs utilizan sustratos plásticos o cerámicos sobre los que se disponen las capas de tintas conductoras (carbono, grafito, tintas metalizadas entre otras) y de tintas aislantes (dieléctrico) con un espesor controlado, estas últimas para delimitar la superficie de trabajo [224]. La composición de las tintas determina las propiedades de los SPEs [224]. En la mayoría de los casos el material del electrodo de trabajo (ET) proviene de tintas de base de carbono (grafito), por sus excelentes propiedades electroquímicas, aunque también se utilizan tintas que contienen partículas metálicas de oro, plata o platino en función de las necesidades electroquímicas (ventana de electroactividad, electrocatálisis, velocidad de transferencia de electrones de las sustancias electroactivas en función del material y su estado superficial, etc). Si la tinta utilizada para el electrodo de trabajo es de base carbono se les suele denominar **Screen-Printed Carbon Electrodes (SPCEs)** [234].



**Figura 11: Lote de SPCEs (Universidad de Florencia) fabricados en masa**

Mediante la máquina de impresión por serigrafía (generalmente de las casas comerciales DEK o Unitech) se van añadiendo capas sucesivas de las tintas a través de un dibujo de malla, las cuales se imprimen en una película flexible de poliéster o sobre una capa cerámica aplicando presión y temperatura adecuadas. En primer lugar se dibujan las tintas de plata y de carbón grafito para obtener las pistas conductoras y sobre ella se coloca la tinta dieléctrica para definir el área de trabajo. Posteriormente los electrodos se curan en un horno a una temperatura adecuada [234]. Las tintas comerciales más utilizadas para la serigrafía de SPEs son de las casas comerciales Acheson (U.S.A.), Gwent (U.K.), Dupont (U.S.A.) y Ercon (U.S.A.) [202; 238].

La composición de las tintas se compone básicamente de un material de alta conductividad inerte como grafito, un polímero aglutinante como el acetato de celulosa y un disolvente volátil como la ciclohexanona o la acetona. Además de las propiedades electroquímicas, las tintas deben de tener unas características específicas, como una viscosidad adecuada para el proceso de serigrafía, utilizar un disolvente de volatilidad adecuada, y conseguir una adherencia sobre la superficie para la fijación efectiva, buen grado de flexibilidad para evitar la presencia de grietas en la superficie del electrodo y obtener una resistividad eléctrica muy baja [239].

De forma genérica, el procedimiento de serigrafiado de los electrodos es el siguiente (figura 12) [25; 240]:

1. Se serigrafían tres patrones colocados en paralelo sobre el sustrato sólido con la tinta de plata comercial, produciendo una superficie conductora efectiva pasando la tinta a través de una rejilla con el trazado final. El curado se realiza durante 15 minutos a 90 °C. La pista de la izquierda se utilizó como electrodo auxiliar

2. El electrodo de referencia se serigrafía con una tinta de cloruro de plata/plata en la base de la pista de plata de la derecha y a continuación, se cura durante 15 min a 90 °C (a través de su rejilla correspondiente al dibujo final).
3. Los electrodos de trabajo y auxiliar se forman por la serigrafía de una capa de grafito sobre el patrón de la pista de plata del centro y de la izquierda con tinta de grafito comercial y luego se cura durante 15 min a 90 °C
4. Finalmente, una capa de aislante se imprime sobre la totalidad de la tira del sensor a excepción de las tres superficies de los electrodos y la conexión eléctrica en el extremo inverso de la tira del sensor. Posteriormente se cura bajo radiación UV.



**Figura 12: Esquema de los pasos necesarios para producir un SPCE**

En ocasiones se utiliza el dibujo del electrodo de referencia tinta de plata, que a través de la composición iónica de la disolución de medida (presencia de iones cloruro) actúa como electrodo de pseudo-referencia. Las tintas metálicas de plata tienen un precio mayor que las de base carbono (alrededor de 500-600 €/kg), mientras que los costes de tinta de grafito cuestan menos de 50 €/kg y la tinta dieléctrica utilizada para delimitar el área de superficie del electrodo de trabajo se puede encontrar por menos de 20 €/kg. Con 1 kg de tinta se pueden imprimir un gran número de electrodos (unos 100.000 electrodos) [100; 202].

Alternativamente, y realizando la producción en masa de un modo similar al desarrollado para los SPCEs, están disponibles comercialmente una amplia variedad de dispositivos de este tipo, con el electrodo de trabajo de oro, de plata [230; 241; 242], y de grafito [32; 198; 199; 208] siendo el coste de cada uno entre 2-4 €.

El uso de SPCEs permite la producción de electrodos en masa de forma más económica y reproducible, además debido a su pequeño tamaño, las determinaciones electroanalíticas requieren microvolúmenes (del orden de 20-100  $\mu$ l) para cubrir completamente la superficie de los tres electrodos, lo que reduce el consumo de

reactivos, del orden de 5-10 veces comparado con los métodos ELISA, permitiendo así la miniaturización de la celda electroquímica y del propio sensor [77].

La versatilidad de electrodos serigrafiados aumenta con las posibles modificaciones de su superficie. De hecho, la composición de las tintas utilizadas en el proceso de impresión se puede modificar mediante la adición de sustancias de una naturaleza muy diferente, como por ejemplo metales, enzimas, polímeros, agentes formadores de complejos, etc [240]. Comúnmente los bioelementos se inmovilizan después de su fabricación debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante la etapa de curado, con el fin de mantener las propiedades del biorreactivo inmovilizado [243].

Dada la importancia de los SPEs en el desarrollo de los biosensores y la creciente demanda, numerosas casas comerciales han diseñado electrodos serigrafiados con diferentes materiales, y con diversas superficies modificadas para ofrecer las mejores prestaciones. El diseño de los SPEs permite adaptar los electrodos a los requisitos de cada cliente, encontrando en el mercado electrodos con diferencias en los materiales, en las tintas o incluso en el tamaño de los mismos.

Recientemente se han desarrollado baterías de 8 electrodos serigrafiados en serie (*arrays*) que facilitan el trabajo y producen una disminución en el tiempo de medida, mejorando la reproducibilidad entre medidas consecutivas (Figura 13) [202; 244].



**Figura 13: Modo de trabajo con pipeta multicanal sobre los electrodos múltiples CH8 [202]**

En nuestro caso, el uso de *arrays* de varios SPCEs (normalmente 8 electrodos completos en la misma placa serigrafiada) ha disminuido sustancialmente el tiempo de la medida electroquímica, mejorado la reproducibilidad de los resultados, además de proporcionar una mejora en la estabilidad de los sustratos enzimáticos (hidroquinona muy inestable en disolución) producidos por la reducción del tiempo de medida.

Otro de los avances realizados en los últimos años en el diseño de los SPCEs con el objetivo de disminuir el tiempo de medida y de miniaturizar los sensores, ha sido el

desarrollo *arrays* con 96 SPCEs situados en el fondo de los pocillos de un placa de poliestireno similar a las que se utilizan para los ensayos convencionales tipo ELISA (Figura 5) tal y como se ha comentado anteriormente con los dispositivos ELIME [122; 197].

### **1.5.2. Uso de electrodos serigrafiados de carbono en biosensores electroquímicos para micotoxinas**

A continuación se mencionan aplicaciones con SPCEs nanoestructurados que se han utilizado en inmunosensores electroquímicos de micotoxinas, para ilustrar su uso junto a las escasas aplicaciones para el DON.

El uso de SPCEs y su nanoestructuración tiene un gran impacto en los biosensores (inmunosensores y aptasensores) para la determinación de micotoxinas. Sin embargo, con los avances en nanotecnología y su impacto sobre el desarrollo de nuevos dispositivos de análisis de micotoxinas en la actualidad se están utilizando para el desarrollo de sensores [49]. En la bibliografía aparecen varios inmunosensores electroquímicos en los que se utilizan los SPCEs para la determinación de aflatoxinas [245; 246], zearalenona [219; 247] u ocratoxina [25; 41]) pero muy pocos para el DON que se describen con detalle a continuación.

Especialmente para las aflatoxinas existe el mayor número de inmunosensores sobre SPCEs, en muchos casos llevando a cabo la inmovilización del anticuerpo directamente sobre la superficie de los propios electrodos serigrafiados. Por ejemplo, con la aflatoxina B1 (AFB1) adsorbida sobre la superficie de los SPCEs (superficie del SPCE modificada) se lleva a cabo la competición con el conjugado AFB1-Biotina y revelado con estreptavidina-alcalinofosfatasa (AP). La detección del enzima con el sustrato 1-naftil-fosfato que da lugar a 1-naftol, que se oxida sobre la superficie del SPE. En la determinación de AFB1 (0,15 a 2,5 ng ml<sup>-1</sup>) se obtuvo un límite de detección de 0,15 ng ml<sup>-1</sup> [245]. Otros de los métodos descritos para la determinación de AFB1 en cebada, implica el uso de electrodos SPCEs modificados con AFB1-BSA y con los que se desarrolló un inmunosensor competitivo entre AFB1 y un anticuerpo monoclonal. En los calibrados realizados, se encontró un límite de detección de 90 pg ml<sup>-1</sup> y un rango lineal de entre 0,1-10 ng ml<sup>-1</sup>. Las recuperaciones obtenidas estuvieron comprendidas entre 100 % y 125 % [246].

También se han desarrollado inmunosensores ELIME (*Enzyme Linked Immunomagnetic Electrochemical assay*) para AFB1, en los que se utiliza el dispositivo electroquímico de 96 pocillos para disminuir sustancialmente el tiempo de la etapa de detección. En este ensayo se realizó la determinación de AFB1 en maíz mediante un esquema indirecto

(inmovilización de la AFB1-BSA sobre la superficie de cada SPCE) con el que se obtuvo un límite de detección de  $30 \text{ pg ml}^{-1}$  y un rango lineal de entre  $0,05$  y  $2 \text{ ng ml}^{-1}$  [197].

Para la OTA se han descrito varios aptasensores electroquímicos basado en transductores desechables (SPCEs) [32; 248; 249], además de inmunosensores electroquímicos competitivos descritos para la determinación de la micotoxina ocratoxina A (OTA) con SPCEs. En nuestro grupo de investigación han sido desarrollados varios inmunosensores electroquímicos competitivos para la OTA [32], que se basan en la adsorción física de la OTA-BSA sobre la superficie del SPCE, realizando una reacción competitiva con la OTA libre y un anticuerpo policlonal. Por otro lado, con el mismo esquema indirecto de trabajo, estudiamos la diferencia de la inclusión de nanopartículas de oro (AuNPs) sobre las que se inmovilizó la OTA-BSA [25]. En ambos casos, después de la etapa de competición, llevamos a cabo la detección mediante el uso de un anticuerpo tipo IgG secundario marcado con fosfatasa alcalina y usando alfa-fosfato-naftil como sustrato, y se midieron las señales por voltametría de pulsos diferencial. El rango de trabajo lineal de los biosensores descritos varió entre  $0,9$  y  $9,0 \text{ ng ml}^{-1}$  para el inmunosensor con la OTA-BSA inmovilizada sobre la superficie del SPCE, y entre  $0,3$  y  $8,5 \text{ ng ml}^{-1}$  para el inmunosensor nanoestructurado con nanopartículas de oro, con un límite de detección (LOD) igual a  $0,86 \text{ ng ml}^{-1}$  (DSR = 10,6%) y  $0,20 \text{ ng ml}^{-1}$  (DSR = 8,0%) de OTA, respectivamente [25; 32].

Otro inmunosensor electroquímico competitivo para la determinación de OTA en muestras de trigo y cebada utilizando SPCEs se realizó mediante un ensayo directo y uno indirecto utilizando en ambos casos un anticuerpo monoclonal selectivo a la OTA. Se realizó la competición entre OTA y OTA-BSA obteniendo un límite de detección de  $60 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  para el ensayo directo, y de  $100 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  para el indirecto. Se observó una buena correlación ( $R = 0,9992$ ) en un análisis comparativo de muestras de trigo contaminadas de forma natural utilizando este ensayo y un método de detección por HPLC [250; 251].

Para la micotoxina DON, se utilizó la **fracción F<sub>ab</sub> de un anticuerpo anti-DON** sobre una placa típica de un ELISA con detección electroquímica sobre SPCEs (placa de 96x SPCEs) en un sistema ELIME. Con un esquema indirecto se llevó a cabo la inmovilización de un conjugado de DON con albúmina sérica humana (DON-HSA) sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo, con el que se determinaron concentraciones de DON en muestras de trigo y de alimentos de origen cereal. Este inmunosensor se aplicó en muestras de cereales y de alimentos de base de cereales (trigo, cereales para el desayuno y alimentos para bebés). La precisión fue de entre 9 y 24% en cereales y entre 10 y 33 % en alimentos para bebés. Las recuperaciones estuvieron comprendidas entre el 82 y el 110 % [77]. Tal y como se observa, la

imprecisión obtenida con el inmunosensor indirecto desarrollado es muy superior a la registrada con otros inmunosensores desarrollados para otras micotoxinas. Una DSR superior al 24% debe ser controlada para evitar resultados irreproducibles en la determinación de muestras contaminadas.

En un segundo inmunosensor de DON, se describe la determinación electroquímica sobre una placa de 96 pocillos para la detección de DON y NIV en muestras de trigo, proporcionando un límite de detección ( $LOD = 1,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y un intervalo de trabajo de entre 2 y  $20 \mu\text{g g}^{-1}$  para la determinación de deoxinivalenol en cereales de consumo y con un dispositivo ELIME [124].

Debido al escaso trabajo en inmunosensores electroquímicos de DON, el trabajo de esta Tesis Doctoral pretende contribuir a un mayor desarrollo de los mismos. Para ello nos basamos en nuestra experiencia previa con las herramientas metodológicas descritas en esta introducción (MBs, SPCEs, ELISA espectrofotométrico, transducción electroquímica).

Por lo tanto, en el trabajo correspondiente a esta Memoria de Tesis Doctoral, el objetivo inicial ha sido **aportar nuevos inmunosensores** para la determinación analítica de esta micotoxina, con el punto de partida de la casi inexistencia de inmunosensores electroquímicos, que sean capaces de la determinación rápida de DON en muestras de alimentos y para concentraciones que se encuentren por debajo de la legislación Europea. Para ello aportamos nuestra amplia experiencia en el desarrollo de inmunosensores y de aptasensores de casi 10 años de trabajo sobre el tema. El trabajo implica la puesta a punto de procedimientos de extracción y de tratamiento de las muestras que han de ser acordes con el procedimiento de inmunoensayo y respetuosa con el funcionamiento de enzimas y de anticuerpos.

Los resultados experimentales de esta Tesis Doctoral han dado lugar a conclusiones y resultados que se encuentran actualmente registrados en la OEPM (Oficina Española de Patentes y Marcas) para su última tramitación y plasmación en forma de patente de procedimiento y de prototipo de inmunosensores para esta micotoxina (Anexo I) cuyo título es "Inmunosensor electroquímico para la determinación de la micotoxina deoxinivalenol (DON)" (número de registro en la OEPM ES1510.105b)





---

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

---



## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo y optimización de inmunosensores electroquímicos para la determinación cuantitativa de la micotoxina deoxinivalenol (DON), basados en esquemas de inmunoensayo directo competitivo con anticuerpos específicos como elementos de biorreconocimiento. Estos inmunosensores deberán de tener la suficiente selectividad (frente a otras micotoxinas), especificidad y sensibilidad (el biosensor deberá ser capaz de determinar concentraciones por debajo de la legislación europea sobre esta micotoxina), para su aplicación en muestras de cereales.

El trabajo experimental se completará con el desarrollo de nuevos esquemas de inmunoensayo magnético (mELISA), se utilizarán herramientas analíticas para estudiar la reacción de afinidad de los anticuerpos utilizados (ELISA, SPR, HPLC), y se validarán estos inmunosensores mediante el uso de materiales de referencia certificados (CRMs) y métodos oficiales de análisis (HPLC-UV-Vis). Otro aspecto importante es la aplicabilidad de estos inmunosensores, que habrán de responder a los retos analíticos planteados y su disponibilidad comercial.

Teniendo en cuenta este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la reacción de afinidad entre el deoxinivalenol y dos anticuerpos, un anticuerpo policlonal y otro monoclonal (pAbDON y mAbDON respectivamente). Comparación de la reacción de afinidad de los anticuerpos con conjugados DON-HRP utilizando el enzima peroxidasa (HRP) como etiquetado del inmunoensayo. Estudio de la selectividad de estos dos anticuerpos.
2. Optimización de las etapas del inmunoensayo sobre las que se basarán estos inmunosensores electroquímicos, utilizando diferentes funcionalizaciones de partículas magnéticas (MBs) como superficie sólida, que permiten mejorar las separaciones y lavados, la eliminación de interferencias de matriz y la localización precisa sobre el transductor electroquímico (electrodo de trabajo).
3. Optimización de la etapa de transducción electroquímica utilizando electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs) como elemento transductor y técnicas amperométricas para medir la extensión de un inmunoensayo competitivo utilizando el enzima peroxidasa (HRP) como generador de la señal analítica.

4. Desarrollo complementario de nuevos procedimientos ELISA basados en la utilización de partículas magnéticas (mELISA), con medida espectrofotométrica de absorción molecular, que permita optimizar, evaluar y comparar analíticamente un mismo esquema de inmunoensayo utilizando dos tipos de transducción diferentes (óptico y electroquímico).
5. Aplicación de los inmunosensores desarrollados en muestras de cereales. Validación estadística de estos inmunosensores utilizando materiales de referencia certificados de esta micotoxina y comparación con métodos oficiales de análisis (HPLC) y procedimientos ELISA comerciales.
6. Extracción múltiple de micotoxinas provenientes de hongos *Fusarium* (FB1 y DON) en harinas de cereales de maíz y de trigo, para su determinación con inmunosensores electroquímicos. Influencia del tipo de matriz y del rendimiento de diferentes procedimientos para su extracción múltiple, teniendo en cuenta sus diferentes propiedades químicas.
7. Aplicabilidad comercial de los inmunosensores que se han desarrollado para el DON, que aporten facilidad y rapidez en el control de esta micotoxina como herramienta de análisis por debajo de los límites de concentración exigidos por la legislación alimentaria de micotoxinas.





---

## **CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL**

---



## CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

Se lista a continuación el material fungible más común y la instrumentación utilizados durante el desarrollo de este trabajo experimental. Su uso se describe en los procedimientos experimentales que se detallan en apartados posteriores.

### 3.1 MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

- Micropipetas 0,1-2  $\mu$ l, 1-10  $\mu$ l 5-50  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l y 200-1000  $\mu$ l (Crison, Barcelona, España)
- Micropipeta provista de un émbolo interior 20-300  $\mu$ l (para medir suspensiones de MBs), Rainin Positive, Modelo 17008576 MR-25 (Mettler Toledo, Barcelona, España)
- Viales tipo *ependorf* (500 y 1500  $\mu$ l)
- Tubos tipo Falcon (50 ml), (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Alemania)
- Tubos tipo Falcon cónicos (15 ml), (Deltalab, Barcelona, España)
- Placas ELISA de poliestireno 96 pocillos, con fondo liso (IWAKI, Japón)
- Microfiltros de teflón con diámetro de poro de 0,22  $\mu$ m Chromafil Xtra PTFE (Panreac, Barcelona, España)
- Separadores magnéticos:
  - Separador magnético Z5342 para tubos *ependorf* (Promega, Madison, USA)



**Figura 14: Separador magnético para 12 viales *ependorf* [187]**

- Separador magnético para placas estándar ELISA (Life Technologies, Oslo, Noruega)



**Figura 15: Separador magnético para placas ELISA convencionales de 96 pocillos [184]**

- Balanza analítica GH-200, precisión  $\pm 0,1$  mg (A&D, Tokio, Japón)
- Balanza analítica de doble rango AG245 precisión  $\pm 0,1$  mg y  $\pm 0,01$  mg (Mettler Toledo, Barcelona, España)
- Balanza analítica PL2001-L precisión  $\pm 0,1$  mg (Mettler Toledo, Barcelona, España)
- Agitadores para las etapas de inmunoensayo:
  - Agitador tipo Vórtex (Reax-control Heidolph Schwabach, Alemania):  
homogeneización de disoluciones y dispersiones



**Figura 16: Agitador tipo vórtex para homogenización de disoluciones y dispersiones [252]**

- Agitador Thermomixer Compact, para 24 viales *eppendorf* (Eppendorf Ibérica, Madrid, España): conjugación de partículas magnéticas



**Figura 17: Agitador para la conjugación de partículas magnéticas**

- Agitador Heidolph Rotamax 120 (Heidolph, Schwabach, Alemania): etapas de incubación antígeno-anticuerpo



**Figura 18: Agitador orbital para incubación de reacciones en placas ELISA**

- Agitador Heidolph Reax 2 (Heidolph, Schwabach, Alemania): extracción sólido-líquido de las muestras de cereales.



**Figura 19: Agitador por volteo para las etapas de extracción sólido-líquido [252]**

- Instrumentación Resonancia de Plasmón Superficial:

Biacore T200 (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, Inglaterra)



**Figura 20: Instrumento SPR Biacore T200 [253]**

Chip para Biacore Serie S CM5 (superficie de oro recubierta de dextrano)



**Figura 21: Chip de inmovilización de reactivos para SPR Biacore T200 [253]**

- Lector de placas espectrofotométrico para ELISA (Biorad microplat reader, Modelo 680)



**Figura 22: Espectrofotómetro de absorción molecular para placas ELISA**

- Potenciostatos:

Potenciostato Autolab PGSTAT12, N° serie AUT71572, (Ecochemie, Utrecht, Holanda)



**Figura 23: Potenciostato Autolab PGSTAT12**

Las características técnicas del potenciostato PGSTAT12, son una corriente máxima de medida de 250 mA con un voltaje de 2 V y una corriente mínima de 10 nA.

En combinación con el software GPES se pueden realizar un gran número de técnicas electroquímicas como de voltametría cíclica, voltametría de onda cuadrada, potenciometría, cronoamperometría, etc.

Potenciostato Palmsens (PSTrace) con conector múltiple MUX8 para placas de 8 electrodos (Palmsens, Holanda)



**Figura 24: Potenciostato Palmsens (PSTrace) con conector múltiple MUX8 para placas de 8 electrodos [254]**

Con el instrumento de Palmsens utilizado se puede realizar una gran variedad de técnicas electroquímicas (voltametría de barrido lineal, voltametría de onda cuadrada, voltametría cíclica, potenciometría, *multistep amperometric* (MA), *amperometric detection* (AD), amperometría de pulso múltiple, etc). Su pequeño tamaño permite una fácil portabilidad. Las características técnicas más importantes del instrumento son: rango de corrientes de 100 pA a 10 mA (9 rangos), la corriente máxima es de  $\pm 30$  mA, la resolución en la corriente es de 0,01 % y la precisión depende de las corrientes utilizadas ( $\leq 1$  % en 1 nA, 5% en 100 pA,  $\leq 0.5$  % entre 10 nA y 10 mA y  $\leq 0.2$  % desde 100 nA a 1 mA). La velocidad de adquisición de datos máxima es de 200.000 puntos/s.

El conector MUX8 es un dispositivo de multiplexado que permite trabajar con hasta ocho electrodos sensores. Con el cable de conexión correspondiente es posible trabajar con detección amperométrica en el llamado modo consecutivo una medida después de la otra (en los 8 sensores, cada uno de ellos con los 3 electrodos ET, ER y EA), o bien en el llamado modo alternado, en donde se toman medidas de los 8 sensores de forma multiplexada cada 0,24 s (es decir 0,03 s cada sensor, el resto del tiempo se encuentran los sensores en circuito abierto) aunque en la práctica se considera que la medida de los 8 electrodos es simultánea.

- Electrodo serigrafiados de carbono (ItalSens-Universidad de Florencia):



**Figura 25: SPCEs individuales con ET de carbono (ItalSens-Universidad de Florencia) [254]**

Electrodos serigrafiados individuales de carbono SPCEs (Universidad de Florencia): electrodo de trabajo y electrodo auxiliar están compuestos por pasta carbono (grafito) y electrodo de referencia de plata (pseudo-referencia), serigrafiados sobre una superficie de poliéster flexible. Una tinta aislante (dieléctrica) se utiliza para definir la superficie del electrodo de trabajo ( $\varnothing = 3$  mm) junto al ER (electrodo de referencia) y EA (electrodo auxiliar).

Placas de 8 electrodos serigrafiados de carbono, CH8 (ItalSens-Universidad de Florencia)



**Figura 26: SPCEs múltiples con ET de carbono (SPCEs de ItalSens-Universidad de Florencia)**

Se trata de un array de ocho electrodos serigrafiados sobre una película flexible de poliéster. Cada uno de los electrodos tiene un electrodo de trabajo de pasta de carbono grafito ( $\varnothing = 2$  mm), un electrodo de pseudo-referencia de plata y un electrodo auxiliar de grafito. De cada electrodo derivan 3 pins de contacto (24 pines en total) que permiten conectarlos al potenciostato a través de la interfase de conexión y multiplexado diseñado para estos electrodos.

Para facilitar la adición de los reactivos se suministran con una placa de metacrilato con ocho agujeros (14 mm x 84 mm x 5 mm) que coinciden con los ocho electrodos serigrafiados, lo que permite producir una serie electroquímica con 8 celdas completas y confinar un volumen de disolución máximo de aproximadamente 250  $\mu$ l.

- Espectrofotómetro de absorción molecular, diode Array (Hewlett Packard, USA)
- Espectrofotómetro de fluorescencia (Perkin Elmer, USA)
- Instrumentación Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Waters 2796 (Waters, Hertfordshire, Reino Unido)



**Figura 27: Instrumento HPLC Waters 2796**

Se utilizó un detector UV-Visible (Waters 996).

- Centrífuga Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fischer, Waltham, Massachusetts, USA)
- Estufa de laboratorio (T max 300 °C) con precisión de  $\pm 1$  °C (Mettler, Schwabach, Alemania)

## 3.2 REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS

### 3.2.1 Reactivos de uso general:

- N-succinimil S-acetiltioacetato, SATA (Sigma-Aldrich): introducción de un grupo sulfhidrilo en el enzima HRP, para posteriormente reaccionar con los grupos  $\text{NH}_2$  de la HRP a través de su grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) en la síntesis del DON-HRP
- p-maleimidofenil isocianato, PMPI (Sigma-Aldrich): conjugación de los grupos hidroxilo del DON con moléculas que contengan grupos sulfhidrilo en la síntesis del DON-HRP
- Dimetilformamida, DMF (Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma-Aldrich)
- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC): para la activación de ácidos carboxílicos formando un intermedio tipo éster (Sigma-Aldrich)
- N-hidroxisuccinimida (NHS): reacción con grupos éster para introducir un grupo  $\text{NH}_2$  (Sigma-Aldrich)
- Etanolamina (Sigma-Aldrich)
- Caseinato de sodio (Sigma-Aldrich)
- Albúmina sérica bovina (BSA) EC N° 232-936-2 (Sigma-Aldrich)
- 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina, TMB (Sigma-Aldrich)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  95-97% (Merck, Madrid, España)
- Tween-20 P1379 (Sigma-Aldrich)
- Polietilenglicol 8000, PEG8000 (Sigma-Aldrich)
- Hidroquinona (HQ), (Sigma-Aldrich)
- $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (Sigma-Aldrich)
- Tampón *Superblock Blocking* (Thermo Fischer, Rockford, USA)
- Tampón *Protein Free Blocking* (Thermo Fischer, Rockford, USA)
- Acetonitrilo, grado HPLC (Fischer, Waltham, Massachusetts, USA)
- Metanol, grado HPLC (Scharlau, Sentmenat, Barcelona, España)
- Sales iónicas para la preparación de tampones
- Agua MilliQ

### 3.2.2 Reactivos de inmunoensayo:

- Anticuerpo policlonal selectivo a DON (tipo IgG1 procedente de conejo), 1000 mg l<sup>-1</sup> D01F-1 lote 1, (Antiprot, Aachen, Alemania), pAbDON
- Anticuerpo monoclonal selectivo a DON IB12 (tipo IgG1 procedente de ratón), 5500 mg l<sup>-1</sup> (R-Biopharm, Darmstadt, Alemania), mAbDON
- Anticuerpo monoclonal selectivo a FB1 IC9 (tipo IgG1 procedente de ratón), 2748 mg l<sup>-1</sup> (R-Biopharm, Darmstadt, Alemania), mAbFB1
- Deoxinivalenol, >98 % (Sigma-Aldrich, referencia D0156)
- Fumonisina B1, >98 % (Sigma-Aldrich, referencia F1147)
- Conjugado DON-HRP, 5121DONCO/NN6994 (Europroxima, Holanda)
- Conjugado FB1-HRP, 5121FUMCO/NN5666 (Europroxima, Holanda)
- Enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). EC N° 1.11.1.7 (Sigma-Aldrich)
- Conjugado DON-HRP (sintetizado en nuestro laboratorio)
- Micropartículas magnéticas Dynabeads Protein A, MBs-prA (30 mg ml<sup>-1</sup>, Ø=2,8 µm) (Invitrogen, Oslo, Noruega)
- Micropartículas magnéticas Dynabeads Tosylactivated, MBs-To (30 mg ml<sup>-1</sup>, Ø=2,8 µm) (Invitrogen)
- Micropartículas magnéticas Dynabeads M-280 Sheep anti-rabbit IgG, MBs-algG (10 mg ml<sup>-1</sup>, Ø=2,8 µm) (Invitrogen, Oslo, Noruega)
- Micropartículas magnéticas Dynabeads MyOne Carboxylic Acid, MBs-COOH (10 mg ml<sup>-1</sup>, Ø=1 µm) (Invitrogen, Oslo, Noruega)
- Micropartículas magnéticas Dynabeads Protein G, MBs-prG (30 mg ml<sup>-1</sup>, Ø=2,8 µm) (Invitrogen, Oslo, Noruega)
- Columnas de inmunoensayo DONTtest HPLC (Vicam, Móstoles, Madrid)

### 3.2.3 Materiales de referencia certificados y muestras de cereales

- Patrón de referencia certificada TR-D100 (Lote D-W-158) DON certificado: 1400 ± 200 µg kg<sup>-1</sup>, (Trilogy, Washington, USA) (Anexo II)
- Patrón de referencia certificada TR-F100, (Lote F-C-433) FB1 certificado: 1500 ± 400 µg kg<sup>-1</sup>, (Trilogy, Washington, USA) (Anexo III)

- Harina comercial de maíz Haricaman (Harinas de Castilla la Mancha, Toledo, España)
- Harina comercial de trigo Super para Haricaman (Harinas de Castilla la Mancha, Toledo, España)

### 3.3 DISOLUCIONES TAMPÓN

En cada uno de los estudios realizados para la caracterización de la afinidad entre los anticuerpos con la micotoxina, así como en las etapas del inmunoensayo, que requieren un valor de pH muy preciso, se utilizaron las disoluciones tampón que se indican en la Tabla 9 para mantener el pH óptimo en cada caso, indicando su uso concreto.

NOMBRE	DENOMINACIÓN	COMPOSICIÓN	USO
<b>Tampón A</b>	Tampón fosfato salino + EDTA	$K_3PO_4$ (50 mM), NaCl (150 mM) y EDTA (1mM) (se preparó a pH 7,8 y a pH 6,8)	Reacción de conjugación del DON-HRP sintetizado
<b>HBS-EP</b>	<i>Running Buffer</i>	HEPES (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (3 mM), Polysorbate20 (0.005%), pH 7,4	<i>Running buffer</i> en el SPR
<b>AC</b>	Tampón acetato	$CH_3COO^-$ (0,1 M) pH 4	Tampón de inmovilización del anticuerpo sobre el chip del SPR
<b>CB</b>	Tampón carbonatos	$HCO_3^-/CO_3^{2-}$ (0,05 M) pH= 9,6	Inmovilización anticuerpo sobre placa poliestireno ELISA
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino	$HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4	Fases de incubación, diluciones, disoluciones, almacenamiento
<b>PBST</b>	Tampón fosfato salino + tween20	$HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4 + tween20	Fases de lavado
<b>PBS-BSA</b>	Tampón fosfato salino + BSA	$HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4 + BSA (0,1% m/v)	Tampón de almacén y bloqueo de MBs-To
<b>PBS-MBs-algG</b>	Tampón fosfato salino para MBs-algG	$HPO_4^{2-}$ (6,9 mM), $H_2PO_4^-$ (1,16 mM) y NaCl (0,138 M) pH=7,4	Fase inicial de lavado de MBs-algG
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico	MES (15 mM, pH 6)	Fase inicial de lavado de MBs-COOH y reacción con EDC
<b>PBS (MBs-COOH)</b>	Tampón fosfato salino para MBs-COOH	$HPO_4^{2-}$ (8 mM), $H_2PO_4^-$ (1,88 mM) y NaCl (0,15M) pH=7,4	Fases de lavados en las reacciones con MBs-COOH

**Tabla 9: Disoluciones tampón utilizadas para el inmunosensor de DON**

### 3.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Para el desarrollo de los inmunosensores electroquímicos, conjugaciones, procedimientos analíticos y tratamiento de las muestras se llevaron a cabo una serie de procedimientos experimentales optimizados que se recopilan a continuación.

#### 3.4.1 Síntesis del conjugado enzimático DON-HRP

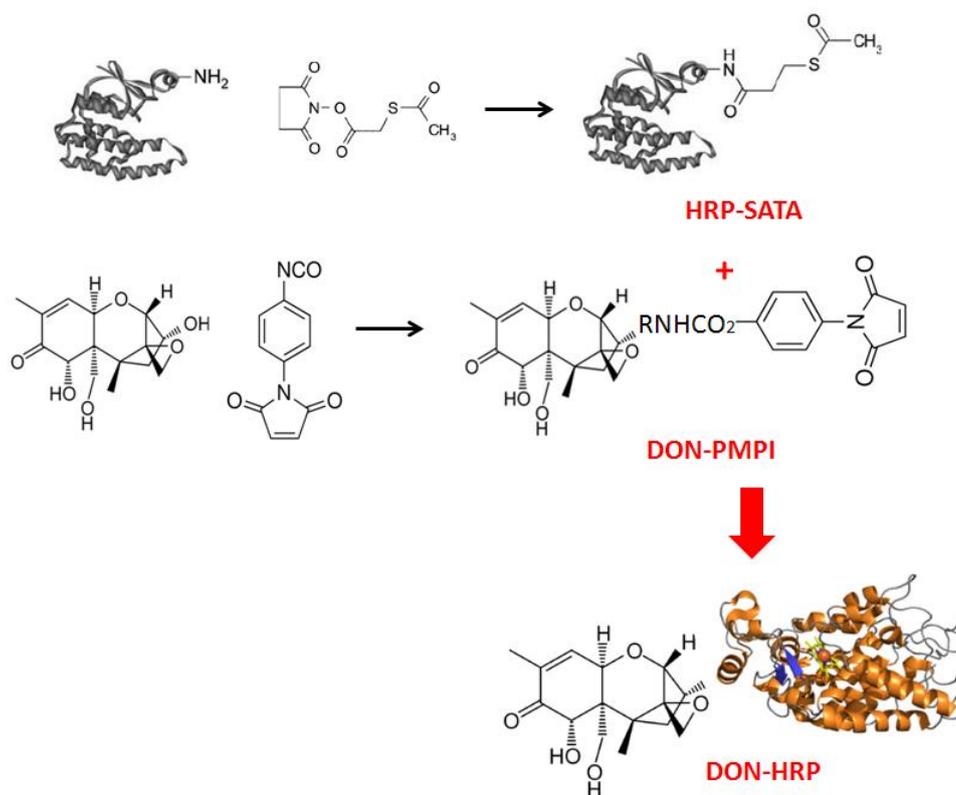
Por la inexistencia de un conjugado independiente comercial de DON unido al enzima peroxidasa (DON-HRP) necesario para la etapa de competición y para generar la señal analítica tras la reacción enzimática, se optó por realizar la síntesis de un conjugado enzimático DON-HRP mediante un procedimiento similar al descrito por *S.H. Wang* [101]. Esta conjugación se realizó a través de la síntesis previa de los dos conjugados SATA-HRP y DON-PMPI con los reactivos bifuncionales indicados, y tal como se esquematiza en la figura 28.

El reactivo PMPI (p-maleimidofenil isocianato) tiene la función de conjugar los grupos hidroxilo del DON con moléculas que contengan grupos sulfhidrilo. Por su parte, el reactivo SATA (N-succinimidil S-acetiltioacetato) se usa para introducir un grupo sulfhidrilo en el enzima HRP, para después reaccionar con los grupos  $\text{NH}_2$  de las proteínas y otras moléculas a través de su grupo N-hidroxisuccinimida (NHS). De este modo, en el enzima HRP se forma un grupo sulfhidrilo protegido que puede ser almacenado sin degradarse. El éster activo NHS en el extremo del SATA permite reaccionar con los grupos amino de las proteínas y formar enlaces amida muy estables, formando finalmente el conjugado DON-HRP [255].

Para la síntesis, primero se llevó a cabo la reacción de formación del conjugado SATA-HRP. Se utilizó 1 mg de SATA que fue disuelto en 50  $\mu\text{l}$  de DMF y se mezcló con una disolución de HRP (1  $\text{mg ml}^{-1}$ ) en tampón A (pH 7,8) añadiendo la disolución de SATA sobre la de HRP. Se mantuvo durante 1 h con agitación y se dializó cambiando el pH del tampón A de pH=7,8 a pH=6,8.

El segundo paso fue la preparación del conjugado DON-PMPI. Se tomó 1 mg de DON y se disolvió en 150  $\mu\text{l}$  de DMSO. A continuación se disolvieron 4,82 mg de PMPI en 160  $\mu\text{l}$  de DMSO. Se realizó la mezcla de ambas disoluciones y se mantuvo con agitación durante 1 h a T ambiente.

El conjugado DON-HRP se sintetizó utilizando 130  $\mu\text{l}$  del conjugado DON-PMPI y 1 ml de SATA-HRP en tampón A a pH= 6,8 mediante agitación durante 2 h a T ambiente.



**Figura 28: Reacciones de la síntesis de DON-HRP**

El DON-HRP sintetizado según el protocolo anterior se utilizó en las experiencias en las que se trabaja con el anticuerpo policlonal (pAbDON). Posteriormente se adquirió un nuevo DON-HRP comercial (reactivo incluido en un *kit* ELISA de Europroxima) que tenía una alta afinidad hacia un anticuerpo monoclonal (mAbDON de R-Biopharm), también proveniente de un *kit* comercial ELISA, y muy selectivo hacia el DON.

Fue muy importante comparar la afinidad de ambos anticuerpos de DON frente al DON y frente al DON-HRP con técnicas analíticas sin etiquetado, para lo que se utilizó la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, *Surface Plasmon Resonance*). Como se menciona en apartados posteriores, tanto esta afinidad como el reconocimiento de cada anticuerpo de DON con diferentes conjugados de DON-HRP varía en gran medida, hasta el punto de no reconocer al conjugado según el tipo de anticuerpo. El motivo es el inmunógeno utilizado en la síntesis de cada anticuerpo, en donde la unión de la micotoxina a la proteína generadora del efecto antigénico en el animal puede realizarse utilizando diferentes grupos funcionales del DON o con diferentes procedimientos de bioconjugación. Es muy importante que la conjugación en el biorreactivo DON-HRP y en el inmunógeno que se utilizó para generar el anticuerpo sea la misma, para que la selectividad del anticuerpo hacia el DON-HRP se mantenga.

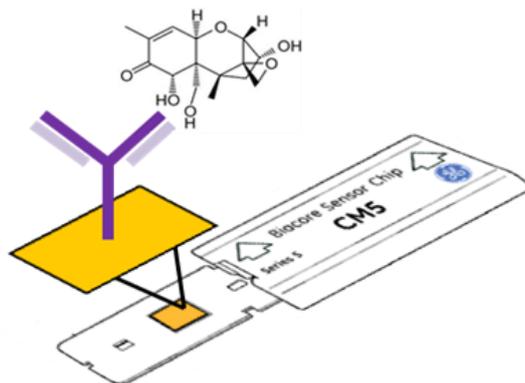
### 3.4.2 Resonancia de Plasmón Superficial

Para el estudio de la reacción de afinidad entre el anticuerpo policlonal selectivo a DON (pAbDON) y el DON se utilizó la técnica de Espectroscopía de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). Se utilizó un esquema directo con inmovilización del anticuerpo sobre la superficie del chip de oro recubierto de dextrano, y se inyectaron concentraciones crecientes de DON. Esta técnica no necesita de etiquetado enzimático para la transducción óptica de la señal analítica [70].

Para la inmovilización del elemento de biorreconocimiento sobre la superficie del chip fueron necesarias tres etapas: activación de la superficie de dextrano del chip, inyección del anticuerpo y bloqueo de los sitios libres que quedan sobre la superficie del chip, realizadas de forma automatizada con el propio instrumento.

En primer lugar se realizó la activación de la superficie del chip con el método de la carbodiimida, mediante inyección manual de 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, EDC (200 mM) y de N-hidroxisuccinimida, NHS (50 mM). A continuación se procedió a la inyección del anticuerpo pAbDON (1  $\mu\text{l}$  de 1000  $\text{mg l}^{-1}$  en 130  $\mu\text{l}$  tampón AC) sobre la superficie activada del chip a una velocidad de 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  durante 600 s [70].

Finalizada la inmovilización del pAbDON se bloquearon los sitios libres del chip con 60  $\mu\text{l}$  de etanolamina (1 M pH 8,5) para evitar posibles uniones inespecíficas de los biorreactivos utilizados.



**Figura 29: Esquema del estudio de la afinidad entre pAbDON y DON por SPR**

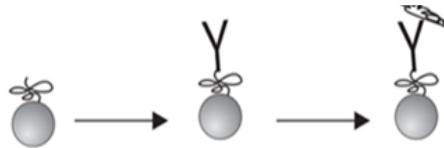
Con el objetivo de evaluar la unión selectiva del DON al pAbDON y descartar posibles uniones inespecíficas de la HRP sobre el pAbDON o sobre el chip se inyectaron concentraciones crecientes (de 0 a 2  $\text{mg l}^{-1}$ ) de disoluciones de DON, de HRP y de DON-HRP en *Running Buffer* (Tampón HBS-EP, HEPES (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (3 mM), Polysorbate20 (0.005%), pH 7,4).

### 3.4.3 Inmovilización del anticuerpo sobre las partículas magnéticas

Comercialmente existen partículas magnéticas (MBs) modificadas en su superficie externa con diversos grupos funcionales que pueden utilizarse para la inmovilización de moléculas específicas y actualmente constituyen una herramienta muy potente en una gran variedad de aplicaciones analíticas y biotecnológicas relacionadas con la determinación de contaminantes en alimentos [190].

En la optimización y desarrollo del inmunosensor se utilizaron diferentes tipos de MBs comerciales en las que la inmovilización del anticuerpo se realizó tanto por afinidad (MBs-prA, MBs-prG y MBs-*algG*) como mediante enlaces covalentes (MBs-To y MBs-COOH). Se comprobó que la unión del anticuerpo sobre las MBs más favorable resultó ser la unión por afinidad, debido a que es más probable una inmovilización correcta a través de la zona  $F_c$  del anticuerpo, permitiendo que la zona de biorreconocimiento  $F_{ab}$  quede libre y accesible para el antígeno.

Los pasos para la reacción de competición se desarrollaron de modo similar para todos los tipos de MBs que hemos utilizado, como se muestra en el siguiente esquema:



**Figura 30: Esquema de inmovilización del anticuerpo y reconocimiento del antígeno sobre partículas magnéticas modificadas con un grupo funcional genérico [184]**

En el proceso de inmovilización, en primer lugar las partículas magnéticas se prepararon para las condiciones de incubación mediante lavados (eliminación de conservantes tipo azida de sodio con tampones apropiados) en presencia de un campo magnético, y a continuación se añadió el elemento de biorreconocimiento (anticuerpo), que se incubó con agitación vigorosa según el tiempo y temperatura que se aconseje en cada caso, siguiendo el protocolo recomendado en las especificaciones técnicas de las MBs. Finalmente se eliminó el anticuerpo en exceso no inmovilizado mediante sucesivos lavados con la presencia de un campo magnético.

La cantidad de anticuerpo AbDON que se inmovilizó sobre las partículas magnéticas se optimizó teniendo en cuenta inicialmente la capacidad teórica de unión de cada tipo de MBs recomendada por el fabricante. Los protocolos de inmovilización del anticuerpo sobre cada una de las MBs disponibles comercialmente varían según el tipo de grupo funcional de la MB, y se explican más adelante.

Las capacidades de unión teóricas de todas las MBs que se han utilizado, así como los tiempos y temperaturas recomendados para el proceso de inmovilización recogidos en las especificaciones comerciales de cada una de ellas, se muestran en la tabla 10:

	[C] mg/ml	Capacidad ( $\mu\text{g Ab/mg MBs}$ )	t inmov	T inmov
<b>MBs-pr A</b>	30	8	10 min	T amb
<b>MBs-pr G</b>	30	8	10 min	T amb
<b>MBs-To</b>	30	20	20 h	T amb
<b>MBs-algG</b>	10	2,5	10-60 min	T 2-8°C
<b>MBs-COOH</b>	10	50	24 h	T amb

*Tabla 10: Resumen de las características de cada tipo de MBs utilizadas*

A continuación se recogen los protocolos de trabajo de cada una de las MBs utilizadas y los tampones necesarios en cada caso (recogidos también en la Tabla 9).

### **3.4.3.1 Inmovilización del anticuerpo sobre partículas magnéticas modificadas con proteína A (MBs-prA):**

Las partículas magnéticas funcionalizadas con proteína A (MBs-prA) son utilizadas principalmente para la inmunoprecipitación de proteínas, aunque también se utilizan en inmunoensayos. La fuerza de la unión entre el anticuerpo y las MBs-prA (por afinidad) depende de la naturaleza y procedencia del anticuerpo. La mayor afinidad con la proteína A la tienen anticuerpos tipo IgG1, IgG2 o IgG3 de origen humano, IgG2 procedente de cabra, o IgG de conejo entre otros, por lo que pueden ser utilizadas para la inmovilización del pAbDON (procedente de conejo). Sin embargo anticuerpos tipo IgG1 de ratón, IgG1 de cabra o IgG1 de oveja tienen una baja afinidad por la proteína A [256].

La inmovilización sobre la proteína A se produce con la orientación correcta al unirse a la parte  $F_c$  de los anticuerpos y dejando expuesta al exterior la parte  $F_{ab}$  hacia el antígeno.

Los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-prA fueron:

- Tampón de reacción, PBS:  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4
- Tampón de lavado PBST: PBS con tween20 (0,02% m/v)

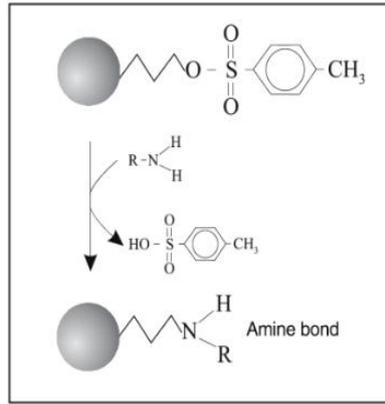
El protocolo de trabajo que se siguió con estas partículas magnéticas se describe a continuación. La capacidad teórica de unión es 8  $\mu\text{g}$  de anticuerpo por 1 mg de MBs-prA.

1. Agitación de las partículas magnéticas durante 3 minutos.
2. Adición de 1,5 mg MBs-prA (50  $\mu\text{l}$ , 30  $\text{mg ml}^{-1}$ ) en un vial *eppendorf*
3. Lavados: se realizan 2 lavados con 500  $\mu\text{l}$  de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,02%) y 1 lavado con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (0,1 M, pH 7,4)
4. Adición de 1  $\mu\text{g}$  pAbDON (1  $\mu\text{l}$ , 1000  $\text{mg l}^{-1}$ ) en PBS (0,1 M, pH 7,4)
5. Etapa de inmovilización: agitación durante 10 minutos a T ambiente en un volumen total de 500  $\mu\text{l}$
6. Lavados: se realizar 2 lavados con 500  $\mu\text{l}$  de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,02%) y 1 lavado con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (0,1 M, pH 7,4)
7. Almacenamiento de las MBs-prA-pAbDON a 4 °C hasta su uso en PBS (0,1 M pH 7,4).

#### **3.4.3.2 Inmovilización del anticuerpo sobre partículas magnéticas modificadas con grupos tosilo (MBs-To):**

Las partículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo (MBs-To) son comúnmente utilizadas como fase sólida de inmovilización de biorreactivos como anticuerpo o antígenos, uniéndose a los grupos amino de la biomolécula (por unión covalente) sin necesidad de ningún reactivo adicional. La combinación de anticuerpos o antígenos con las propiedades superparamagnéticas de las MBs-To producen una rápida cinética de reacción y una fácil separación durante las etapas de lavado.

Cualquier ligando que contenga un grupo amino o un grupo sulfhidrilo como anticuerpos, proteínas, péptidos o glicoproteínas puede unirse mediante un enlace covalente a los grupos tosilo de la superficie de estas partículas magnéticas, mediante la reacción química que se muestra en la figura 31:



**Figura 31: Inmovilización de un anticuerpo sobre las MBs-To mediante el enlace covalente del grupo amino (lisina) del mismo [184]**

En la inmovilización sobre las MBs-To se utilizaron los siguientes tampones específicos:

- Tampón fosfato (PBS):  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4
- Tampón de lavado (PBST): PBS con tween20 (0,02% m/v)
- Tampón almacén y bloqueo: PBS con BSA (0,1 % m/v)

A continuación se muestra el procedimiento de inmovilización de los anticuerpos sobre las MBs-To. La capacidad teórica de unión de las MBs-To es de 20  $\mu\text{g}$  de pAbDON por 1 mg de MBs-To.

1. Agitación de las MBs-To durante 5 minutos (T ambiente).
2. Adición de 100  $\mu\text{g}$  MBs-To (3,3  $\mu\text{l}$ , 30  $\text{mg ml}^{-1}$ ) en un vial *eppendorf*
3. Lavados: se realizan 2 lavados con 500  $\mu\text{l}$  de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,02%) y 1 lavado con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (0,1 M, pH 7,4) para preparar las MBs-To antes de la inmovilización
4. Adición de 2  $\mu\text{g}$  de pAbDON (2  $\mu\text{l}$ , 1000  $\text{mg l}^{-1}$ ) en tampón PBS (0,1 M, pH 7,4)
5. Etapa de inmovilización: agitación durante 20 h a T ambiente en un volumen total de 500  $\mu\text{l}$
6. Lavado: se realizan 2 lavados con 500  $\mu\text{l}$  de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,02%) y 1 lavado con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (0,1 M, pH 7,4)
7. Resuspensión de MBs-To-pAbDON en tampón de almacenamiento y bloqueo PBS con BSA (0,1 M, pH 7,4; BSA 0,1%) en un volumen total de 500  $\mu\text{l}$
8. Almacenamiento de las MBs-To-pAbDON en PBS con BSA (0,1 M, pH 7,4; BSA 0,1%) a 4 °C hasta su uso.

### 3.4.3.3 Inmovilización del anticuerpo sobre partículas magnéticas modificadas con anticuerpo genérico tipo IgG (MBs-*algG*):

Las partículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo genérico tipo IgG son utilizadas como soporte sólido para la unión eficiente de inmunoglobulinas procedentes de conejo (existe otro tipo de MBs-*algG* específicas para la unión de anticuerpos procedentes de ratón). Después de un corto periodo de tiempo de incubación (inferior a 60 min) el anticuerpo queda inmovilizado sobre las MBs-*algG*. Es al igual que en el caso anterior, una inmovilización orientada (por afinidad), al unirse el *algG* genérico a la parte  $F_c$  del AbDON.

Los tampones que se utilizaron fueron:

- Tampón lavado inicial de MBs-*algG*:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1,16 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6,90 mM), NaCl (0,138 M) pH 7,4
- Tampón de reacción, PBS:  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4

La inmovilización teniendo en cuenta la capacidad de unión de las MBs-*algG* (2,5  $\mu\text{g}$  de anticuerpo por 1 mg de MBs-*algG*) se realizó siguiendo las etapas:

1. Agitación de las MBs durante 3 minutos.
2. Adición de 30  $\mu\text{g}$  MBs-*algG* (3  $\mu\text{l}$ , 10  $\text{mg ml}^{-1}$ ) en un vial *ependorf*
3. Lavados: se realizan 3 lavados con 500  $\mu\text{l}$  del tampón de lavado inicial MBs-*algG*
4. Adición de 0,075  $\mu\text{g}$  pAbDON (0,075  $\mu\text{l}$ , 1000  $\text{mg l}^{-1}$ ) en PBS (0,1 M, pH 7,4)
5. Etapa de inmovilización: agitación durante de 10 a 60 minutos a T 4 °C en un volumen total de 500  $\mu\text{l}$
6. Lavados: se realizar tres lavados con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (0,1 M pH 7,4)
7. Almacenamiento de las MBs-*algG*-pAbDON a 4 °C hasta su uso en PBS (0,1 M pH 7,4)

### 3.4.3.4 Inmovilización del anticuerpo sobre partículas magnéticas modificadas con grupos carboxilo (MBs-COOH):

Las partículas magnéticas modificadas con grupos carboxilo se utilizan para la unión de múltiples biorreactivos por unión covalente. La inmovilización del anticuerpo se produce a través de un enlace carbodiimida usando el reactivo 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) que activa los grupos carboxilo de las partículas magnéticas para unirse con el anticuerpo mediante un enlace amida. El

producto de reacción entre el ácido carboxílico y la carbodiimida es muy lábil (se hidroliza rápidamente) por lo que la inmovilización del anticuerpo debe producirse inmediatamente después de la etapa de activación.

Las disoluciones tampón que se utilizaron fueron:

- Tampón MES (15 mM, pH 6)
- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, EDC (10 mg ml<sup>-1</sup>) en agua
- Tampón fosfatos: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,88 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8 mM), NaCl (0,15 M) pH 7,4
- Tampón fosfatos con tween20 (0,1% m/v)

La capacidad teórica de unión de estas MBs es 50 µg de anticuerpo por cada 1 mg de MBs-COOH. El procedimiento de inmovilización fue el siguiente:

1. Agitación de las MBs-COOH durante 30 min
2. Adición de 30 µg de las MBs-COOH (3 µl, 10 mg ml<sup>-1</sup>) en un vial *ependorf*
3. Lavados: se realizan 2 lavados con 1 ml de tampón MES (15 mM, pH 6)
4. Resuspensión en 100 µl de tampón MES (15 mM, pH 6)
5. Activación de las partículas: Adición de 100 µl EDC (10 mg ml<sup>-1</sup> en H<sub>2</sub>O mili Q)
6. Incubación durante 30 minutos con agitación a T ambiente
7. Adición de 1,5 µg de pAbDON (1,5 µl, 1000 mg l<sup>-1</sup>) en PBS (0,1 M, pH 7,4)
8. Inmovilización: Incubación durante 24 h con agitación en un volumen total de 500 µl.
9. Lavados: se realizan 2 lavados con 500 µl de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,02%) durante 10 min con agitación y 1 lavado 500 µl de PBS (0,1 M, pH 7,4)
10. Almacenamiento de las MBs-COOH-pAbDON a 4 °C hasta su uso en PBS (0,1 M pH 7,4)

#### **3.4.3.5 Inmovilización del anticuerpo sobre partículas magnéticas modificadas con proteína G (MBs-prG):**

Las partículas magnéticas modificadas con proteína G (MBs-prG) están especialmente diseñadas para la inmunoprecipitación de proteínas, complejos proteicos, ácidos nucleicos u otros antígenos, así como para la inmovilización directa (por afinidad) de anticuerpos en el desarrollo de inmunoensayos. La característica fundamental de la

proteína G es su capacidad para orientar el anticuerpo durante la inmovilización por afinidad, a través de su región  $F_c$ , dejando libre la región  $F_{ab}$  del anticuerpo para poder reconocer más fácilmente al antígeno.

Las MBs-prG son similares a las MBs-prA con ligeras diferencias entre la afinidad con los diferentes tipos de anticuerpos. La diferencia más significativa es que mientras las MBs-prA poseen una muy baja afinidad con los anticuerpos IgG1 procedentes de ratones, las MBs-prG tienen una alta afinidad, por lo que son más adecuadas para el anticuerpo utilizado (mAbDON) [256].

Los tampones específicos utilizados con las MBs-prG fueron:

- Tampón de reacción, PBS:  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4
- Tampón lavado PBST: PBS con tween20 (0,1% m/v)

La capacidad de unión que poseen las MBs-prG son 8  $\mu\text{g}$  de anticuerpo por mg de MBs-prG. El protocolo de trabajo (final después de las optimizaciones) con estas partículas magnéticas fue el siguiente:

1. Agitación de las partículas magnéticas durante 3 minutos.
2. Adición de 690  $\mu\text{g}$  MBs-prG (23  $\mu\text{l}$ , 30  $\text{mg ml}^{-1}$ ) en un vial *eppendorf*
3. Lavados: se realizan 2 lavados con 500  $\mu\text{l}$  de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,1%) y 1 lavado con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (0,1 M, pH 7,4)
4. Adición de 5,5  $\mu\text{g}$  mAbDON (1  $\mu\text{l}$ , 5500  $\text{mg l}^{-1}$ ) en PBS (0,1 M, pH 7,4)
5. Etapa de inmovilización: agitación durante de 10 minutos a T ambiente en un volumen total de 1380  $\mu\text{l}$
6. Lavados: se realizan 2 lavados con 500  $\mu\text{l}$  de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,1%) y 1 lavado con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (0,1 M, pH 7,4)
7. Almacenamiento de las MBs-prG-mAbDON a 4 °C hasta su uso en PBS (0,1 M pH 7,4)

#### 3.4.4 ELISA espectrofotométrico

El trabajo realizado con la técnica *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) con detección espectrofotométrica se utilizó principalmente para el estudio de la afinidad

entre los anticuerpos y la micotoxina, además de la optimización de las etapas del inmunoensayo y para diseñar inmunosensores ELISA magnéticos.

#### **3.4.4.1 ELISA espectrofotométrico convencional**

Se utilizaron esquemas de inmunoensayo directo (inmovilización del anticuerpo sobre los pocillos de poliestireno) y posterior incubación competitiva de DON y DON-HRP. La inmovilización se realizó en tampón de carbonatos (CB) y a continuación se llevó a cabo la reacción competitiva entre el DON y el conjugado enzimático DON-HRP.

Para realizar el ensayo ELISA convencional, de forma general, se llevaron a cabo las siguientes etapas [67; 74]:

1. Lavado de los pocillos con tampón CB (2 veces)
2. Adición de diferentes concentraciones de AbDON (policlonal o monoclonal) en tampón CB (50 µl por pocillo)
3. Incubación durante 24 h sin agitación a 4 °C
4. Lavados con 300 µl de PBS (0,1 M, pH 7,4) (3 veces)
5. Etapa de bloqueo: caseinato de sodio (2% m/v) en 200 µl de PBS (0,1 M, pH 7,4) durante 30 minutos con agitación y a T ambiente
6. Lavados con 300 µl de PBS (0,1 M, pH 7,4) (3 veces)
7. Adición DON-HRP (y DON en los casos de reacción competición)
8. Agitación durante 60 minutos (agitación orbital) a T ambiente
9. Lavado con 300 µl de PBS (0,1 M, pH 7,4) (3 veces)
10. Adición de 50 µl de TMB: reacción con agitación orbital, 20 minutos a T ambiente.
11. Adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 M) para parar la reacción enzimática
12. Medida de la absorbancia a 450 nm con el lector ELISA.

Con esta técnica se estudió la afinidad entre el DON tanto en su modo libre como en el conjugado con el enzima peroxidasa (DON-HRP) y el anticuerpo inmovilizado sobre los pocillos de la placa de polietileno, y para comprobar la competición entre los intervalos de concentraciones de DON necesarios para una sensibilidad adecuada.

Otro objetivo fue el estudio de posibles adsorciones inespecíficas del DON-HRP sobre los pocillos de poliestireno, que produciría falsos negativos en las señales obtenidas (mayores absorbancias debidas al conjugado adsorbido que significarían menores concentraciones competitivas de la micotoxina).

#### **3.4.4.2 ELISA espectrofotométrico utilizando partículas magnéticas como superficie de inmovilización**

Se diseñaron nuevos esquemas de inmunoensayo sobre MBs a los que llamaremos ELISA inmunomagnético (mELISA), con el objetivo de comprobar y cuantificar la afinidad y selectividad de los anticuerpos de DON (inmovilizado sobre las propias MBs), así como la optimización de todas las etapas y protocolos que posteriormente se utilizaron en el inmunosensor con transducción electroquímica [223].

Para integrar las optimizaciones, el mELISA se realizó de forma muy similar a un ELISA convencional, con la única diferencia de que previamente se inmovilizaron los anticuerpos sobre las MBs (en lugar de realizar la inmovilización sobre los pocillos de poliestireno) siguiendo los procedimientos específicos recogidos en el apartado 3.4.3 para cada una de ellas, y las etapas de lavados, y separaciones se realizaron bajo la acción de un campo magnético externo. El modo de trabajo es más cómodo y rápido comparado con la inmovilización del anticuerpo sobre los pocillos, ya que las partículas magnéticas se pueden almacenar con el anticuerpo inmovilizado sobre su superficie (se ha estimado hasta 25 días a 4 °C para las MBs-prG) y el gasto de anticuerpo es menor debido a que la superficie relativa de reacción es mayor utilizando las MBs. Además las etapas de lavado y separación de las partículas magnéticas son más efectivas al disponer de la ayuda de un campo magnético que retiene las partículas magnéticas modificadas con los diferentes biorreactivos [222]. Al encontrarse las MBs modificadas en dispersión, el transporte y acceso de las moléculas de antígeno es más efectivo y rápido que en el caso de los anticuerpos inmovilizados sobre la pared sólida de los pocillos.

El protocolo de trabajo genérico que se utilizó fue el siguiente:

1. Inmovilización del anticuerpo (protocolos anteriores según el tipo de MBs)
2. Adición del conjugado enzimático: 25 µl DON-HRP (concentración constante en todos los pocillos)
3. Adición 25 µl DON (con concentraciones crecientes para los calibrados)
4. Adición de MBs-AbDON (la concentración dependerá de la inmovilización)

5. Etapa de competición: Incubación con agitación orbital y a T ambiente
6. Lavado: se realizan 2 lavados con 300  $\mu$ l de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,1%) y 1 lavado con 300  $\mu$ l de PBS (0,1 M, pH 7,4)
7. Reacción enzimática: Adición de 50  $\mu$ l de TMB. Reacción durante 20 minutos con agitación orbital y a T ambiente
8. Parada de la reacción enzimática: Adición de 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 M)
9. Detección espectrofotométrica midiendo la absorción molecular a una longitud de onda de 450 nm

El protocolo expuesto es general ya que para cada tipo de MBs se debe optimizar la cantidad de anticuerpo dependiendo de sus características y de la capacidad de unión de las partículas magnéticas, la concentración de DON-HRP y el intervalo de concentraciones de DON en el que se realiza la competición y el correspondiente calibrado, así como los tiempos y temperaturas de incubación, competición, etc. Todos estos parámetros influyen decisivamente en el funcionamiento óptimo del inmunosensor electroquímico que se diseñe, por lo que se requiere una optimización muy cuidadosa.

Se han utilizado varios tipos de partículas magnéticas (MBs) modificadas con diferentes grupos funcionales, con el objetivo de comprobar las prestaciones que ofrece cada una de ellas y seleccionar las MBs óptimas para el desarrollo del inmunosensor. Los protocolos específicos de inmovilización del anticuerpo sobre cada tipo de MBs son los detallados en el Apartado 3.4.3.

### **3.4.5 Inmunosensor electroquímico con electrodos serigrafiados SPCEs individuales**

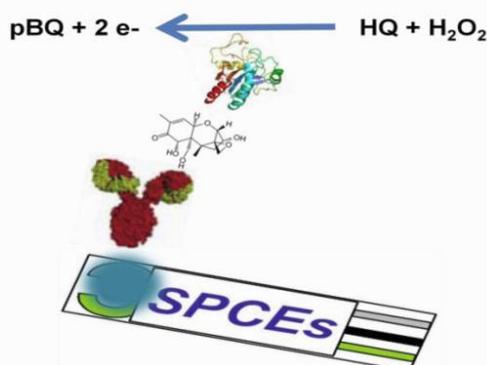
A continuación se indica el protocolo genérico de los inmunosensores electroquímicos que hemos desarrollado utilizando electrodos individuales serigrafiados de base carbono (SPCEs, Universidad de Florencia). Estos electrodos individuales sirvieron para las optimizaciones iniciales, antes de una segunda fase de mayor productividad analítica con los sensores serigrafiados de 8 canales. No obstante, las condiciones de transducción se adaptaron a cada tipo de SPEs.

De forma general, las etapas de los inmunosensores electroquímicos con SPCEs individuales se realizaron según:

1. Inmovilización del anticuerpo sobre las MBs (protocolo seguido y condiciones dependiendo del tipo de MBs utilizadas) en viales *ependorf* de 1,5 ml

2. Adición de un volumen constante de MBs-AbDON (policlonal o monoclonal) en cada vial *ependorf* de 1,5 ml
3. Adición de una concentración constante del conjugado enzimático DON-HRP
4. Adición de la micotoxina DON (concentraciones crecientes)
5. Etapa de competición: Incubación con agitación orbital a T ambiente
6. Lavados: 2 lavados con 500  $\mu$ l de PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,1%) y 1 lavado con 500  $\mu$ l de PBS (0,1 M, pH 7,4) con ayuda de un campo magnético y agitación orbital
7. Resuspensión de MBs-AbDON en PBS (0,1 M, pH 7,4) en el volumen de partida en el propio vial *ependorf*.
8. Deposición de 10  $\mu$ l de la suspensión de MBs-AbDON sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE individual.
9. Reacción enzimática: Adición de 25  $\mu$ l de HQ y 25  $\mu$ l de  $H_2O_2$  para cubrir la superficie de los tres electrodos. Reacción durante 10 minutos a T ambiente
10. Detección electroquímica: cronoamperometría con un salto de potencial ( $\Delta E_{CRA}$ ) desde 0 a -0,25 V y se toma el valor de la corriente a un tiempo constante de 90 s (Potenciostato Autolab PGSTAT12)

Las etapas de incubación y competición se desarrollan en viales *ependorf* (1,5 ml) individuales, y una vez terminadas las reacciones se depositó la suspensión de las partículas magnéticas sobre la superficie del electrodo de trabajo bajo la acción de un campo magnético, y en donde se produce la reacción enzimática de oxidación de la hidroquinona a  $H_2O_2$  catalizada por la HRP del conjugado, tal y como se esquematiza en la figura 32:



**Figura 32: Esquema de la reacción enzimática y detección electroquímica que se produce sobre la superficie del electrodo de trabajo con los SPCEs individuales**

Después de 10 minutos de la reacción de oxidación enzimática, se aplica un impulso de potencial de 0 a -0,25 V y se mantiene el potencial constante durante 90 s, tomando el valor de la corriente catódica generada por la reducción de la *p*-benzoquina (*p*BQ) (formada por la reacción enzimática con la HRP en presencia de peróxido de hidrógeno) a hidroquinona (HQ).

#### 3.4.6 Inmunosensor electroquímico con electrodos múltiples

En el caso de utilizar una batería (*array*) de 8 electrodos serigrafiados (CH8) durante la etapa de detección electroquímica (Figura 26) y para facilitar el trabajo, hacerlo de un modo más limpio y utilizando menor cantidad de reactivos y tampones se propuso el trabajo sobre placas de poliestireno en lugar del trabajo en viales *ependorf* utilizados anteriormente con SPCEs individuales, y con un separador magnético para placas ELISA con 96 imanes individuales dispuestos para cada pocillo (Figura 15).

La forma de trabajo fue similar a la indicada en el apartado anterior con el mELISA, realizando de igual modo las etapas del inmunoensayo de forma simultánea en los pocillos de una placa convencional ELISA pero finalmente la suspensión de las MBs modificadas fue depositada sobre la superficie de cada uno de los 8 electrodos de trabajo para la transducción electroquímica y bajo la acción de un campo magnético de 8 imanes coincidentes sobre la superficie de los 8 electrodos de trabajo.

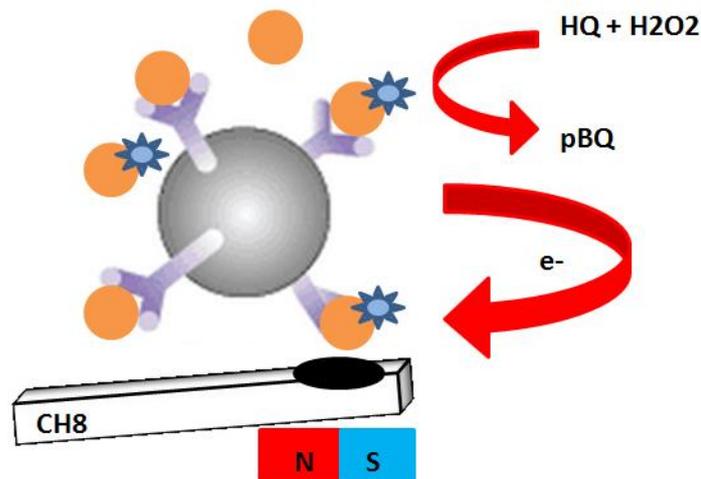
La correcta posición de las partículas magnéticas sobre la superficie del electrodo de trabajo es fundamental para lograr una alta reproducibilidad y sensibilidad en la medida. El uso de un dispositivo que cuenta con 8 imanes colocados bajo cada uno de los electrodos de trabajo, facilita el proceso de deposición de las partículas magnéticas. Este tipo de *array* permite una adaptación rápida de 8 medidas de inmunoensayo sobre una columna de una placa convencional ELISA.

Esta forma de trabajo ha permitido de una forma rápida, sencilla y efectiva trasladar las condiciones y parámetros optimizados con inmunoensayo al trabajo con electrodos serigrafiados múltiples, y nos ha permitido comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas, ya que la única diferencia en el modo de trabajo es la etapa de transducción (óptica o electroquímica), aunque en la práctica dependiendo del tipo de transducción algunas variables se optimizaron de forma diferente.

El protocolo que se expone a continuación es el resultado final del proceso de optimización de cada uno de los parámetros que influyen en el funcionamiento del inmunosensor.

1. Inmovilización del anticuerpo sobre las MBs (condiciones dependientes del tipo de MBs utilizadas)
2. Adición DON-HRP (10x), proveniente del *kit* comercial Europroxima (ELISA 5121DON) → 25  $\mu\text{l}$  dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M pH 7,4).
3. Adición de 25  $\mu\text{l}$  DON (0,01-100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).
4. Adición de 25  $\mu\text{g}$  MBs-prG-mAbDON (50  $\mu\text{l}$  0,5  $\text{mg ml}^{-1}$ )
5. Etapa de competición: Incubación durante 60 minutos, con agitación orbital a T ambiente.
6. Lavado: se realizan 2 lavados con PBST (0,1 M, pH 7,4; tween20 0,1%) y 1 lavado con PBS (0,1 M, pH 7,4) durante 2 minutos cada uno, con agitación orbital y T ambiente.
7. Resuspensión de las MBs-mAbDON en 22  $\mu\text{l}$  de PBS (0,1 M, pH 6,5).
8. Deposición de 20  $\mu\text{l}$  de MBs sobre cada electrodo de trabajo del electrodo múltiple CH8 manteniendo un campo magnético independiente debajo de cada electrodo de trabajo.
9. Reacción enzimática: Adición de 40  $\mu\text{l}$  de HQ (4,5 mM, concentración final de 1,8 mM) y 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (24 mM, concentración final de 9,6 mM) en PBS (0,1 M, pH 6,5) para cubrir la superficie de los tres electrodos. Reacción durante 10 minutos a T ambiente.
10. Detección electroquímica: Aplicar salto de potencial  $\Delta E_{AD}$  de 0 a -0,35 V. Medida por *Amperometric Detection (alternate mode)* a los 90 seg (Potenciostato PalmSens).

La etapa de transducción electroquímica en el inmunosensor sobre cada uno de los electrodos de trabajo se esquematiza en la siguiente figura (Figura 33):



**Figura 33: Esquema del inmunosensor electroquímico para la determinación de DON con electrodos múltiples CH8**

Se observa que el ensayo y la reacción enzimática es la misma que en el caso de los SPCEs individuales pero se ha modificado ligeramente la forma de trabajo, asemejándose más al protocolo con el inmunoensayo mELISA y reduciendo considerablemente el tiempo en la medida electroquímica. Con la técnica amperométrica en modo alternado (*alternate mode*), explicada más adelante, se pueden medir simultáneamente los ocho electrodos de trabajo, tomando medidas cada 0,24 s, en forma de señal potencioestática multiplexada con el monopotenciostato Palmsens (Figura 24).

### 3.4.7. Inmunosensor competitivo para la determinación de Fumonisina B1:

Las condiciones optimizadas del inmunosensor para la determinación de la FB1, surgen del trabajo dentro de nuestro grupo de investigación, de forma paralela al desarrollo del inmunosensor para DON. Del mismo modo, el anticuerpo monoclonal selectivo a la FB1 se inmovilizó sobre partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G.

Las condiciones óptimas y fijadas para el inmunosensor de FB1 son las siguientes:

1. Inmovilización del anticuerpo mAbFB1 sobre las MBs-prG según las especificaciones de las partículas magnéticas
2. Adición a los pocillos del conjugado enzimático FB1-HRP, proveniente del *kit* ELISA comercial de Europroxima (5121FUMCO) → 25 µl dilución 1/200 (v/v) en PBS (0,1 M pH 7,4)

3. Adición de 25  $\mu\text{l}$  FB1 ( $0,01\text{-}100 \mu\text{g l}^{-1}$ )
4. Adición de 25  $\mu\text{g}$  MBs-prG-mAbFB1 ( $50 \mu\text{l } 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ )
5. Etapa de competición: Incubación durante 30 minutos, con agitación orbital a T ambiente
6. Lavado: se realizan 2 lavados con PBST ( $0,1 \text{ M}$ , pH 7,4; tween-20, 0,1% (m/m)) y 1 lavado con PBS ( $0,1 \text{ M}$ , pH 7,4) durante 2 minutos cada uno, con agitación orbital y T ambiente

La detección se realizó por absorción UV-visible (procedimiento mELISA) y por detección amperométrica (modo alternado, AD-a).

En el mELISA se utilizó el TMB (20 minutos) como sustrato del enzima realizando la parada de la reacción enzimática con  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ M}$  y midiendo posteriormente la absorbancia producida a una longitud de onda  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .

En la detección amperométrica se obtuvo la corriente después de la reacción enzimática de la HRP inmovilizada con HQ ( $1,8 \text{ mM}$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $9,6 \text{ mM}$ ) durante 10 minutos, y se midió con amperometría (AD-a) de modo semejante al inmunosensor para DON.

### 3.4.8 Extracción de micotoxinas en muestras de harina de cereales

Para la determinación de las micotoxinas por alguna de las técnicas instrumentales disponibles, es preciso su extracción y puesta en disolución a partir de los alimentos (sólidos) en los que se determine.

La etapa de extracción de la totalidad de micotoxina contenida en los cereales es un proceso clave para la determinación cuantitativa de la concentración de las mismas, con el fin de elucidar si su consumo resultaría tóxico o no para la salud humana y animal. La elección del disolvente de extracción se debe basar en la obtención de la máxima recuperación del analito (máximo porcentaje de extracción), y evitando en todo lo posible las interferencias provocadas por efectos del disolvente orgánico de extracción sobre la reactividad del anticuerpo en el momento de la etapa de competición, o incluso en su posible interferencia sobre la reacción enzimática de la HRP.

Los disolventes más utilizados para la extracción de micotoxinas son mezclas de agua en diferentes proporciones, con disolventes orgánicos como metanol, hexano o

acetonitrilo [8, 12]. Sin embargo, para el caso del DON, y debido a su alta polaridad, con frecuencia se ha utilizado simplemente agua o disoluciones acuosas tamponadas (PBS) para su extracción efectiva a partir de las muestras sólidas que contienen a esta micotoxina [77; 257].

Los procedimientos utilizados se resumen a continuación.

#### **3.4.8.1 Extracción de DON en harinas de cereales para la determinación con el inmunosensor (mELISA e inmunosensor electroquímico).**

La extracción realizada sobre las muestras de harina de trigo se resume en los siguientes pasos [58; 257]:

1. Pesada 1 g de muestra (precisión  $\pm 0,1$  mg) de harina finamente molida.
2. Extracción con 5 ml PBS (0,1 M) durante 30 minutos con agitación por volteo.
3. Centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos a T ambiente
4. Filtrado del sobrenadante con un microfiltro de 0,22  $\mu\text{m}$ .
5. Almacenamiento a 4 °C hasta su uso.

Se comprobó que el extracto, almacenado como se indica, mantiene la concentración de DON durante al menos 20 días (ver apartado 4.6.1) sin que haya disminución estadísticamente significativa (95% nivel de confianza) de este valor durante este tiempo. Pasando este tiempo se observó un aumento de la turbidez y en ocasiones la aparición sólidos en suspensión (mohos), así como una disminución de la concentración del DON, por lo que no es posible su utilización para determinar la micotoxina.

#### **3.4.8.2 Extracción de FB1 en harinas de cereales para la determinación con el inmunosensor (mELISA y electroquímico).**

El procedimiento para la extracción de FB1 de las harinas de maíz fue el siguiente [258]:

1. Pesada de 1 g de muestra (precisión  $\pm 0,1$  mg) de harina finamente molida
2. Extracción con 10 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) durante 30 minutos con agitación por volteo
3. Centrifugación 2000 x g durante 30 minutos a T ambiente

4. Filtrado con microfiltro de 0,22  $\mu\text{m}$
5. Almacenamiento a 4° C hasta su uso

Se comprobó que el extracto en MeOH y almacenado a 4 °C hasta su uso, mantiene su concentración de FB1 durante al menos una semana sin que haya variación estadísticamente significativa (95 % nivel de confianza) de este valor durante este tiempo. Para tiempos superiores a una semana la concentración tiende a aumentar provocado por la evaporación del disolvente de extracción (MeOH), por lo que no se puede utilizar para llevar a cabo la determinación de FB1, pues obtendríamos falsos positivos.

#### **3.4.8.3 Extracción simultánea de DON y FB1 en harinas de cereales (base trigo y maíz) para la determinación mediante el inmunosensor (mELISA e inmunosensor electroquímico).**

En estudios sobre la presencia simultánea de la FB1 y DON, se concluyó que aunque para el DON la extracción podría realizarse en agua o PBS, para la extracción de la fumonisina B1 (FB1) de las harinas fue necesario utilizar un disolvente orgánico. Para este caso, se propuso realizar una extracción múltiple y simultánea de las dos micotoxinas de forma semejante a la utilizada en el caso de la determinación individual de FB1 por el hecho de que tanto el DON y la FB1 son solubles en MeOH, pero la FB1 no podría extraerse únicamente con PBS (0,1 M, pH 7,4) [57].

El procedimiento de extracción múltiple se realizó de la siguiente forma:

1. Pesada de 1,25 g (precisión  $\pm 0,1$  mg) de las harinas
2. Extracción con 5 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) durante 30 minutos con agitación por volteo
3. Centrifugación 2000 x g durante 30 minutos a T ambiente
4. Filtrado del sobrenadante con microfiltro 0,22  $\mu\text{m}$
5. Almacenamiento a 4° C hasta su uso

El extracto de cereal que contenga DON y FB1 únicamente puede estar almacenado durante una semana a 4 °C previamente a las determinaciones, dada la fácil evaporación del MeOH utilizado en la extracción para evitar la preconcentración de micotoxinas provocada por la evaporación del disolvente, ya que en este caso se ha utilizado MeOH como disolvente de extracción.

#### 3.4.8.4 Extracción de DON en harinas de cereales para la determinación mediante HPLC-UV-Vis.

Para la mayoría de los tricotecenos de tipo A y B se realizan extracciones de muestra basadas en disoluciones acuosas de ACN o MeOH en diferentes proporciones por el hecho de obtener extractos más limpios y menos turbios [259], aunque este tipo de extracción es útil sólo para cromatografía líquida (HPLC). En el caso de extracción de muestras con columnas cromatográficas de inmunoafinidad (IAC), éstas se basan únicamente en la elución con tampones acuosos.

En la extracción de DON para su determinación por HPLC hay procedimientos en agua añadiendo polietilenglicol (PEG8000) para aumentar la velocidad de extracción pero por el contrario tiende a disminuir la recuperación de DON en el extracto, por lo que es preciso evaluar su rendimiento [65].

En el caso particular de realizar la extracción de DON de las harinas de cereales para la determinación por HPLC-UV-Vis, se llevó a cabo el procedimiento basado en columnas de inmunoafinidad (IACs) de (Vicam) denominadas DonTest, para la limpieza y preconcentración de la muestra previamente a su introducción en el cromatógrafo.



**Figura 34: Dibujo de una IAC DonTest (Vicam) [260]**

El procedimiento HPLC utilizado para la determinación del DON, basado en un procedimiento de referencia según la AOAC, fue el siguiente [71; 151]:

1. Pesada de 1 g de muestra (precisión  $\pm 0,1$  mg) de harina finamente molida
2. Adición de 4 ml de una disolución compuesta por 1 g de polietilenglicol (PEG 8000) en 20 ml de agua milliQ
3. Agitación durante 10 minutos por volteo y a T ambiente.
4. Centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos a T ambiente

5. Filtrado del sobrenadante con un microfiltro de teflón (PTFE) con diámetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  en un tubo de 50 ml
6. Almacén en el frigorífico a 4 °C hasta su uso
7. Inyección de 2 ml del extracto de harina (equivalente a 0,50 g de muestra) a través de la columna de inmunoafinidad DONTest HPLC, a una velocidad aproximada de 1 gota por segundo
8. Lavado de la IAC con 5 ml de agua mili Q a una velocidad de 1 gota por segundo
9. Elución el DON retenido en la columna con 1 ml de metanol (grado HPLC) a una velocidad de 1 gota por segundo
10. Evaporación del metanol del extracto hasta sequedad total con una corriente de nitrógeno y siempre bajo la campana extractora
11. Reconstitución de la muestra en 400  $\mu\text{l}$  de fase móvil ACN/H<sub>2</sub>O (10:90, v/v) para su posterior inyección en el cromatógrafo líquido de alta resolución

#### **3.4.9 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC):**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detección UV-vis se ha utilizado para la validación de los resultados analíticos del DON, obtenidos con el inmunosensor competitivo directo mELISA y electroquímico, al tratarse de la técnica oficial para la determinación de esta micotoxina. El procedimiento de HPLC utilizado es el que está considerado de referencia según la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para la determinación del contenido de DON en cereales [71; 261].

Se trabajó con un cromatógrafo líquido de alta resolución modelo Water2796 realizando la detección con detector UV-visible (Waters 996).

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Columna en fase reversa C18 (Waters Nova Pack C18, 3,5 $\mu\text{m}$ , 4,6 x 75mm)
- Fase móvil: ACN/H<sub>2</sub>O (10:90, v/v) filtrada en filtro 0,45  $\mu\text{m}$
- Velocidad de flujo: 0,6 ml min<sup>-1</sup>
- Volumen de inyección: 50  $\mu\text{l}$
- Volumen de inyección de muestra en el *loop*: 200  $\mu\text{l}$
- T muestra = 20 °C
- Tiempo de retención = 6,8 minutos
- Detección:  $\lambda$  = 218 nm (Detector UV-visible)

- Calibrado con patrones de DON (0 y 3 mg l<sup>-1</sup>) en la fase móvil ACN/H<sub>2</sub>O (10:90, v/v)

Después de la puesta a punto de la instrumentación, que incluye entre otras las etapas de limpieza del circuito, de la aguja y de la columna (con MeOH 100%) y etapas de purgado, se programó el método de trabajo través del software del equipo (*Mass Lynx* 4.1 de Waters) donde se incluyeron las condiciones de trabajo (flujo de la fase móvil, temperatura de la muestra, tiempo de media del detector, intervalo de longitudes de onda de medida, etc).

A continuación se programó el equipo para la inyección automática de los patrones de DON junto con los extractos preparados siguiendo el protocolo de extracción de las muestras descritos anteriormente (Apartado 3.4.8.4,) y el protocolo de detección.

#### **3.4.10. Procedimiento de inmunoensayo con el *kit* ELISA comercial (Europroxima, 5121DON):**

Se utilizó un *kit* ELISA comercial de Europroxima (5121DON) como método de comparación y validación de los resultados obtenidos con los inmunosensores que hemos desarrollado (electroquímico y mELISA).

Se trata de un ensayo ELISA convencional competitivo directo que se utiliza para la determinación de DON en alimentos y en muestras biológicas. El ensayo se desarrolla sobre una placa de poliestireno de 96 pocillos realizando una reacción de competición entre el anticuerpo suministrado (no indica si se trata de un anticuerpo monoclonal o policlonal) y el conjugado enzimático DON-HRP (no indica el inmunógeno ni la concentración) con patrones de DON comprendidos entre 0 - 10 µg l<sup>-1</sup> (ng ml<sup>-1</sup>).



**Figura 35: Fotografía del *kit* ELISA de Europroxima para la determinación del DON (5121DON) [262]**

El anticuerpo incluido en el *kit* tiene las reactividades cruzadas siguientes con las siguientes micotoxinas, según se indica en sus especificaciones:

- Deoxinivalenol (DON) 100%
- 3-Acetil-deoxinivalenol 96 %
- 15-Acetil-deoxinivalenol < 0.1 %
- Nivalenol 40 %
- T-2 toxin < 0.1 %
- Zearalenona < 0.1 %
- Fumonisina < 0.1 %

Las indicaciones que incluye el *kit* en cuanto a la preparación de los reactivos se resumen a continuación:

- Deben estar siempre almacenados entre 2 y 8 °C. Antes del uso llevar a T ambiente
- Tampón de lavados (*Rinsing Buffer*): realizar dilución 1/20 (v/v en agua)
- Tampón de dilución (*Dilution buffer*): Viene preparado directamente. Se usa para resuspender o realizar las diluciones de anticuerpo y de DON-HRP.
- Disolución sustrato: mantener a T 4 °C y aislado de la luz
- Disoluciones patrón: DON 0, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 y 10  $\mu\text{g l}^{-1}$
- Anticuerpo y conjugado DON-HRP: ambos se incluyen en formato sólido liofilizados. Deben disolverse con *Dilution buffer* (4 ml) (composición no indicada) en los botes de cristal ámbar en los que se suministran, y conservar entre 2 y 8 °C.
- El conjugado DON-HRP [5121DONCO/NN6994 de Europroxima, Holanda] del *kit* comercial fue el conjugado enzimático utilizado para el desarrollo de uno de los inmunosensores de esta Tesis, y que fue utilizado junto con el anticuerpo mAbDON de R-Biopharm.

El protocolo del ensayo se resume en las 10 etapas siguientes:

1. Adición de 100  $\mu\text{l}$  de patrón DON (0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) como prueba de control

2. Adición de 50  $\mu\text{l}$  de patrón DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y 50  $\mu\text{l}$  cada uno de los patrones de DON ( $0,313 - 10 \mu\text{g l}^{-1}$ ). En los casos en los que se introduzca muestra, adición de 50  $\mu\text{l}$  en los pocillos según el número de muestras a determinar
3. Adición de 25  $\mu\text{l}$  de DON-HRP en todos los pocillos excepto en los del punto 1.
4. Adición de 25  $\mu\text{l}$  de anticuerpo en todos los pocillos excepto en los del punto 1.
5. Etapa de competición durante 60 minutos a 4 °C en ausencia de luz y sin agitación
6. Lavado: 3 veces con el *Rinsing Buffer* (diluido 20 veces)
7. Adición de 100  $\mu\text{l}$  del sustrato TMB en todos los pocillos
8. Incubación durante 30 min a 4 °C en ausencia de luz
9. Adición de 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de parada  $\text{H}_2\text{SO}_4$
10. Lectura de la señal de absorbancia a  $\lambda=450 \text{ nm}$

La extracción de las muestras, ya sean de cereales, comida o piensos para animales se realiza en agua siguiendo los pasos que se recogen a continuación:

1. Pesada de 1 g de la muestra (precisión  $\pm 0,1 \text{ mg}$ ) de harina finamente molida
2. Dilución con 19 ml  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ
3. Extracción del DON: agitación constante durante 5 min (agitación por volteo)
4. Centrifugado durante 5 min, 2000 x g a T ambiente
5. Filtrado con filtro de papel del sobrenadante
6. Almacén a 4 °C hasta su uso
7. Se recomienda una dilución del extracto obtenido de 1/5 (v/v) con "*Dilution Buffer*" junto antes de su adición a los pocillos

### 3.5 MODELO MATEMÁTICO DE AJUSTE NO LINEAL DE LOS CALIBRADOS COMPETITIVOS: MODELO 4PL

Las curvas de calibrado para ensayos de unión de ligandos por afinidad se caracterizan generalmente por una **relación no lineal** entre la señal analítica y la concentración de analito. Normalmente, la respuesta produce una relación sigmoidea (punto de inflexión central) con respecto a la concentración [263; 264].

Muchos tipos de funciones han sido probadas para el ajuste de las curvas para inmunoensayos, pero pocos de ellos poseen todas las propiedades necesarias para que el ajuste sea óptimo [263]. Uno de estos modelos es el modelo logit-log el cual funciona bien pero solamente en los casos en los que los datos son simétricos, y además empeora el carácter del ruido en los datos estándar [265]. Además, en la linearización de la ecuación sigmoidea se pierde información estadísticamente significativa.

El modelo de referencia que se utiliza normalmente (y que mejor se ajusta) en uniones de afinidad competitiva es el llamado “modelo de los 4 parámetros logísticos” (modelo 4PL), que optimiza la exactitud y la precisión en todo el rango máximo de concentraciones del antígeno (el DON). La ecuación de este modelo, muy utilizado en las técnicas de inmunoensayo, es:

$$y = m_1 + \frac{(m_2 - m_1)}{\left(1 + \frac{x}{m_3}\right)^{m_4}}$$

**Ecuación 1: Ecuación para aplicar el modelo 4PL**

En donde:

$m_1$  = señal mínima (señal del máximo de inhibición del anticuerpo, en ensayo directo la máxima concentración de DON)

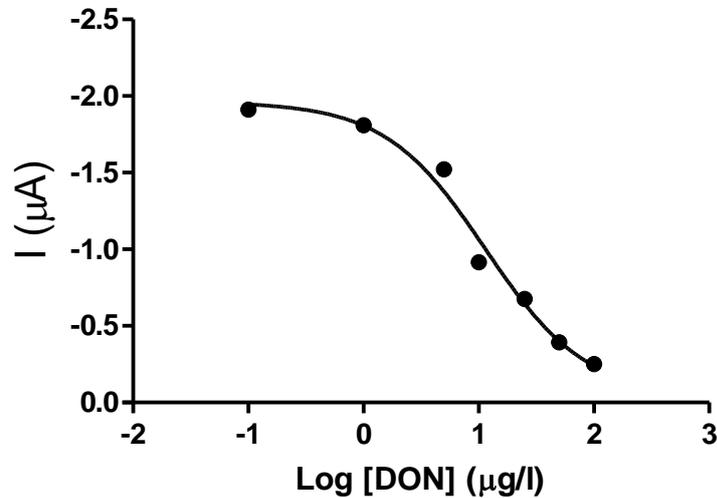
$m_2$  = señal máxima (señal del 0% de inhibición de la unión de DON-HRP, en ensayo directo la mínima concentración de DON que no compite con este conjugado)

$m_3$  = punto de inflexión (factor  $EC_{50}$ , correspondiente a la concentración de DON, normalmente logarítmica, que produce un 50% de inhibición en el anticuerpo)

$m_4$  = pendiente del tramo aproximadamente lineal (central) del calibrado.

Para aplicar el modelo 4PL, se toma el logaritmo de las concentraciones de DON ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) y se representa frente a la señal obtenida (Abs o  $\mu\text{A}$ ). En la figura 36 se representa un calibrado típico. Se utilizó el software GraphPad Prism v.6.0 de ajuste no lineal [266], pues otros procedimientos de linearización de la ecuación 4PL anterior producen

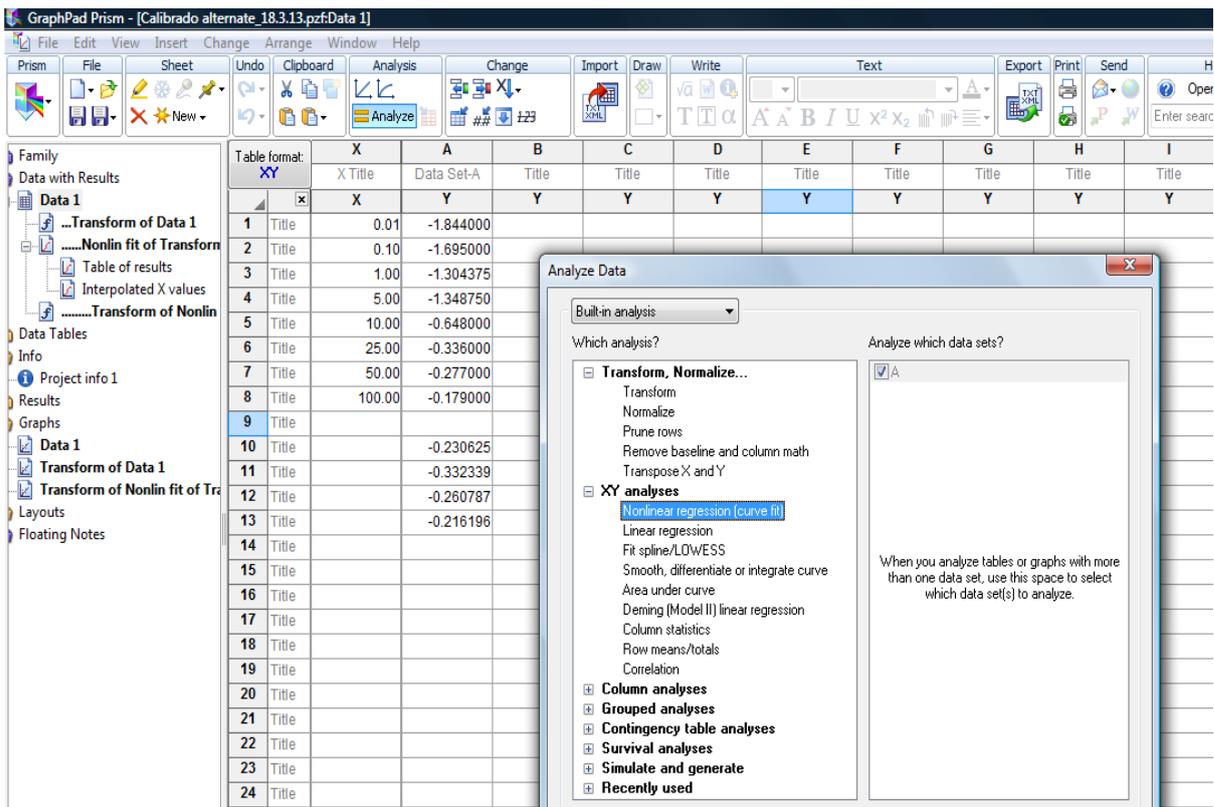
pérdida significativa de información estadística. Este software ajusta los datos experimentales a la ecuación 4PL de forma no lineal, evitando esta pérdida de información, y para un nivel de confianza dado (hemos tomado como estándar el 95% de probabilidad estadística) [263].



**Figura 36: Calibrado sigmoideo de DON ajustado por el modelo 4PL**

Con el software de GraphPad Prism v6.0, una vez introducidos los datos del calibrado (junto con las señales obtenidas en la determinación de muestras) se realiza la conversión de los valores de concentración en su logaritmo a modo de hoja de cálculo, y a continuación se lleva a cabo el ajuste no lineal basado en este modelo 4PL.

En la figura 37 se incluye una imagen del software de GraphPad Prism v6.0 mientras se realiza un ajuste no lineal de la curva sigmoidea por el modelo 4PL:



**Figura 37: Interfase de trabajo con el programa GraphPad Prism v6.0 para el ajuste no lineal de los datos de calibración de una curva sigmoidea típica de inhibición**

El propio software ofrece la opción de realizar el ajuste sigmoideo en función únicamente de tres de los parámetros logísticos (modelo 3PL) en los casos en los que la pendiente de la zona lineal de la curva es próxima a 1, y tomando este valor teórico de pendiente (relación molar 1:1 antígeno/anticuerpo) como valor constante.

Para realizar el ajuste óptimo el programa compara estadísticamente ambos modelos de ajuste (3PL y 4PL) en cada uno de los calibrados realizados [266], y el propio programa elige estadísticamente el modelo que se ajusta con mayor probabilidad (95% nivel de confianza) a las medidas de los calibrados. Insistimos que este ajuste es no lineal y se realiza tomando todos los puntos experimentalmente medidos, con lo que no se produce pérdida de información como ocurre en otros modelos (ya obsoletos) que linealizan la ecuación logarítmica 4PL [266].



---

## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los esquemas de inmunoensayo sobre los que se basarán los inmunosensores de este trabajo serán ensayos directos mediante la inmovilización de los anticuerpos sobre la superficie sólida de micropartículas magnéticas. En una dispersión de estas partículas magnéticas (MBs) modificadas con el anticuerpo, se lleva a cabo una incubación competitiva de una concentración constante del conjugado DON-HRP (micotoxina deoxinivalenol unida al enzima peroxidasa) con disoluciones de DON libre. Después de etapas de lavado y separación del exceso de DON-HRP no unido al anticuerpo, se lleva a cabo la etapa de transducción (hemos estudiado paralelamente transducción espectrofotométrica y electroquímica) añadiendo un sustrato del enzima HRP (HQ ó TMB) y peróxido de hidrógeno. El producto de la reacción enzimática amplificada se detecta mediante absorción molecular o amperométricamente.

Hemos escogido un esquema de ensayo directo evitando el problema de reconocimiento por el anticuerpo de la micotoxina una vez inmovilizada. Para una mayor accesibilidad del anticuerpo, la micotoxina ha de conjugarse previamente a una proteína de gran tamaño, como por ejemplo albúmina sérica bovina, por lo que no quedan muchos grupos funcionales epítopos del anticuerpo en el ensayo indirecto.

La gran ventaja del inmunoensayo directo del DON es que menores concentraciones de DON hacen que aumente competitivamente la cantidad de DON-HRP que se une a los sitios de anticuerpo disponibles, por lo que aumenta la señal obtenida. De esta forma, se mejora la sensibilidad y el límite de detección. Como se irá comentando más adelante, el uso de partículas magnéticas hace que las etapas de lavado y separaciones (en presencia de un campo magnético externo) tengan una eficiencia del 100%. La dispersión de MBs mejora la accesibilidad en las reacciones antígeno-anticuerpo, por lo que los tiempos de incubación y la eficacia de la reacción de inmunoensayo mejoran comparando con una inmovilización del anticuerpo de DON directamente sobre una superficie sólida, como por ejemplo un pocillo de una microplaca ELISA.

### **4.1 CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO ENZIMÁTICO DEOXINIVALENOL-PEROXIDASA (DON-HRP)**

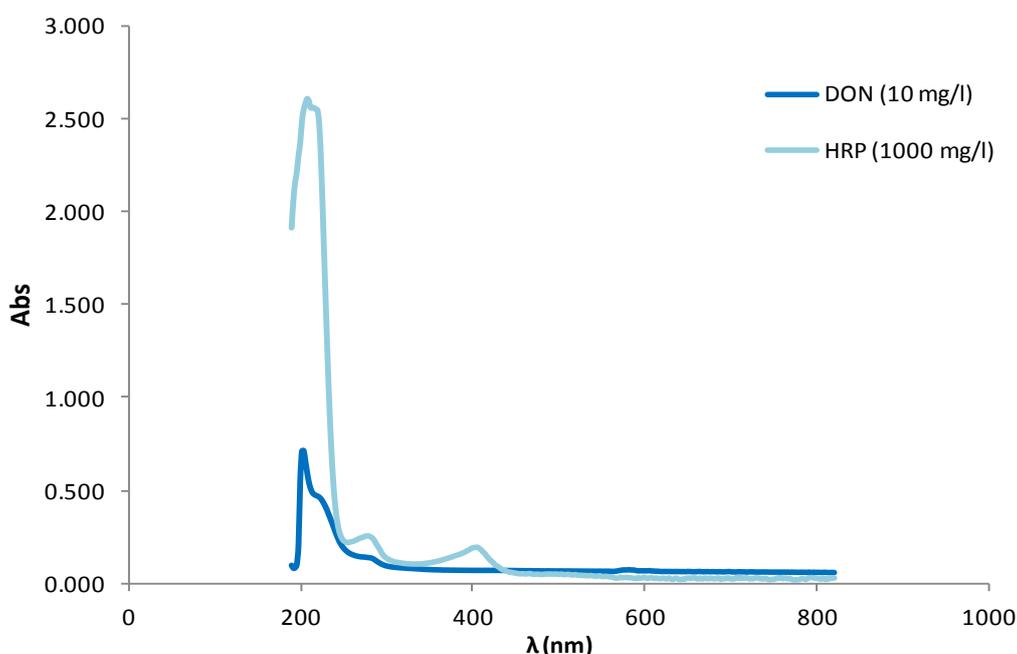
El conjugado DON-HRP es uno de los reactivos más importantes de los esquemas de inmunoensayo en el que se han basado los inmunosensores electroquímicos y procedimientos mELISA que hemos desarrollado en todo este trabajo, puesto que

compite junto al DON por los sitios de unión de los anticuerpos, y es el responsable de producir las señales analíticas (absorbancia y corriente). Por lo tanto, es importante su caracterización inicial y el estudio de su afinidad hacia los anticuerpos.

Después de la síntesis del conjugado enzimático DON-HRP (apartado 3.4.1) se calculó la relación molar teórica de DON/HRP = 13,48 según las cantidades añadidas de cada uno de ellos. Con el objetivo de comprobar que la síntesis había sido satisfactoria y para conocer aproximadamente la **relación molar real entre el DON y la HRP** y el rendimiento de la reacción, se aplicaron diferentes técnicas analíticas para elucidar esta relación molar en el conjugado enzimático sintetizado. El valor tiene interés teórico en la optimización de concentraciones del inmunoensayo, aunque esta optimización en realidad se llevó a cabo según las condiciones encontradas experimentalmente.

Ambas moléculas presentan absorción molecular y fluorescencia molecular, por lo que a partir de espectros individuales se ensayó discernir las concentraciones de ambas en el nuevo conjugado enzimático DON-HRP.

Mediante espectrometría de absorción molecular UV-visible (EAM-UV-Visible) se realizó un barrido en todo el espectro ( $\lambda = 180 - 800 \text{ nm}$ ) en cubeta de cuarzo ( $l=1 \text{ cm}$ ) con disoluciones individuales de DON y de HRP, para comprobar su absorción molecular. Para ello se midieron disoluciones de DON ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de HRP ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) en agua, obteniéndose los espectros de la Figura 38.



**Figura 38: Espectro de absorción molecular ( $\lambda = 0 - 800 \text{ nm}$ ) de DON ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de HRP ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) en agua**

Los resultados obtenidos demostraron que el máximo de absorción del DON y de la HRP aparece en  $\lambda = 218$  nm provocando una interferencia aditiva que impide que se pueda realizar la determinación de ambos compuestos en el conjugado DON-HRP. Se observó también un pico a  $\lambda = 402$  nm para la HRP (originado por su grupo hemo) [255], pero debido a su baja sensibilidad no se obtuvo una buena recta de calibrado con patrones de HRP a esa longitud de onda (coeficiente de regresión  $R = 0,6870$ ) por lo que la concentración de HRP obtenida no fue coherente con lo esperado.

Se propuso medir por espectrofotometría de absorción molecular UV-visible aplicando la Ley de Aditividad de Absorbancias donde se cumple (Ecuación 2):

$$\text{Abs}_{\text{total}} = \text{Abs}_{\text{DON}} + \text{Abs}_{\text{HRP}}$$

***Ecuación 2: Ley de Aditividad de Absorbancias***

Se realizó la medida de la absorbancia producida por los patrones de DON ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de HRP ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) en agua a dos longitudes de onda diferentes, 218 y 402 nm y se aplicó la Ley de Lambert-Beer, según el sistema de ecuaciones (Ecuación 3):

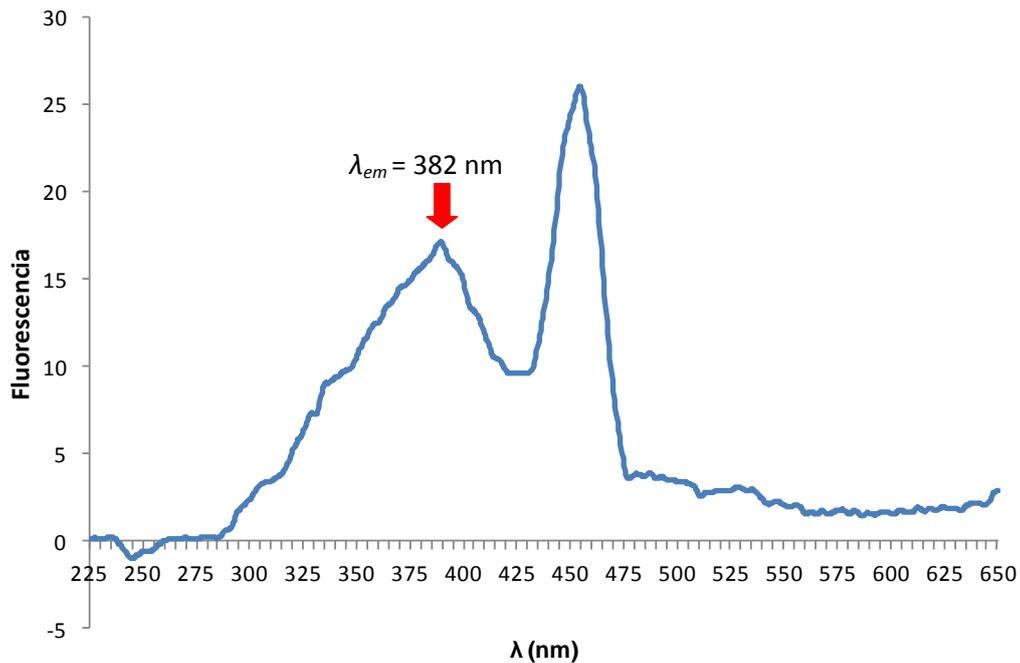
$$\text{Abs}_{\text{total}}^{218} = \varepsilon_{\text{DON}}^{218} \cdot l \cdot c_{\text{DON}} + \varepsilon_{\text{HRP}}^{218} \cdot l \cdot c_{\text{HRP}}$$

$$\text{Abs}_{\text{total}}^{402} = \varepsilon_{\text{DON}}^{402} \cdot l \cdot c_{\text{DON}} + \varepsilon_{\text{HRP}}^{402} \cdot l \cdot c_{\text{HRP}}$$

***Ecuación 3: sistema de ecuación de la ley de Aditividad de Absorbancias para  $\lambda$  218 y 402 nm***

Con los resultados obtenidos no se pudo calcular la relación molar DON/HRP, y se obtuvieron valores negativos o incoherentes. Por lo tanto, la relación molar no se puede medir de esta forma, teniendo en cuenta también que el método de Aditividad de Absorbancias solo es **válido para mezclas de moléculas simples pero no para conjugados**, al aparecer absorbancias diferentes debidas a la conjugación. Esto significa que la suma de las absorbancia de ambos compuestos puros no es igual a la absorbancia producida por el conjugado enzimático resultante de la reacción entre ambos individualmente, provocando que las igualdades propuestas no sean correctas y que por lo tanto el sistema de ecuaciones sea matemáticamente erróneo.

Mediante fluorescencia molecular (cubetas de cuarzo,  $l=1$  cm), se realizó un espectro de emisión de fluorescencia para el DON utilizando como longitud de onda de excitación su máximo de absorción ( $\lambda_{\text{exc}} = 218$  nm). El espectro obtenido se muestra en la Figura 39:



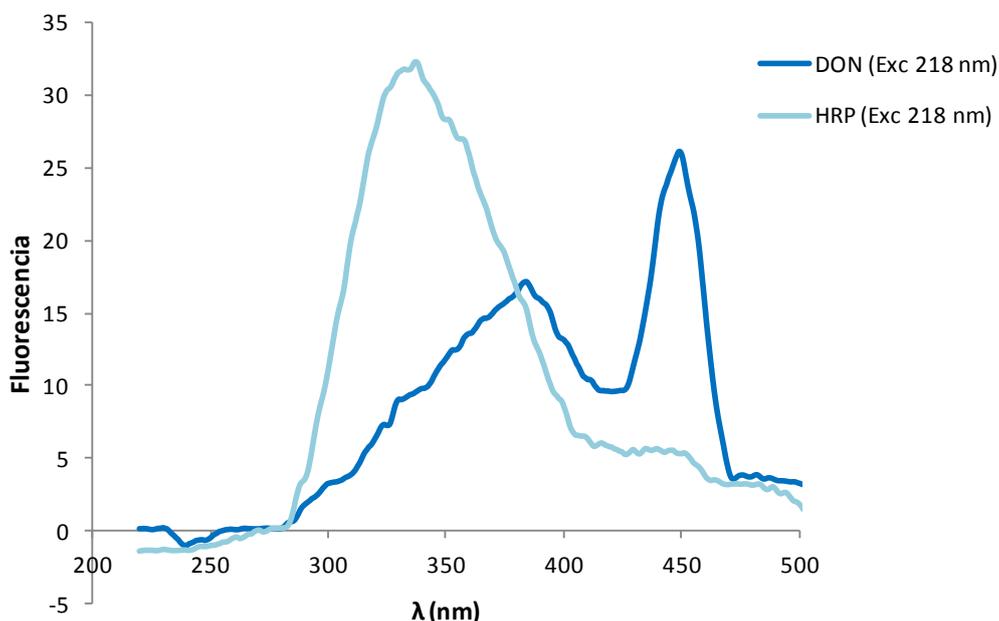
**Figura 39: Espectro de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 218 \text{ nm}$ ) de DON ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) en tampón PBS**

En el espectro de emisión obtenido se obtuvieron dos picos. Se comprobó mediante pequeños cambios en la  $\lambda_{exc}$  que el pico debido a la fluorescencia del DON es el que se encuentra en  $\lambda_{em} = 382 \text{ nm}$  (el pico en  $450 \text{ nm}$  corresponde a algún tipo de dispersión porque al modificar  $\lambda_{exc}$  no permanece fijo). Se ensayaron diferentes  $\lambda_{em}$  para comprobar la existencia de otros máximos de fluorescencia. El máximo de emisión del DON apareció en  $\lambda_{em} = 382 \text{ nm}$ , por lo tanto, las longitudes de onda óptimas de trabajo fueron:

$$\lambda_{exc} = 218 \text{ nm}$$

$$\lambda_{em} = 382 \text{ nm}$$

En estas condiciones, los espectros de fluorescencia de los patrones de DON ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de HRP ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) son los representados en la Figura 40.



**Figura 40:** Espectro de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{em} = 200 - 500 \text{ nm}$ ) con  $\lambda_{exc} = 218 \text{ nm}$ , de DON ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de HRP ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) en tampón PBS ( $\text{pH}=7,04$ )

A la vista del espectro de emisión obtenido, se concluyó que no es adecuada la resolución individual solamente por medidas de fluorescencia molecular, al producirse una absorción y fluorescencia moleculares muy altas en longitudes de onda coincidentes.

Un cálculo preciso de esta relación molar podría haberse realizado, por ejemplo, con MALDI-TOF, técnica de la que no disponemos en nuestro laboratorio. No obstante, como se ha mencionado, las **condiciones óptimas fueron las resultantes de los ensayos experimentales** a partir de diferentes diluciones de DON-HRP y estudiando su influencia en el inmunoensayo. El conjugado se sintetizó con un exceso molar de DON frente a la HRP (por la capacidad de la HRP de unirse a varias moléculas de DON) consecuencia del alto número de lisinas disponibles en su molécula [255].

## 4.2 ESTUDIO DE LA AFINIDAD DE ANTICUERPOS POLICLONAL Y MONOCLONAL PARA EL DEOXINIVALENOL

Los anticuerpos constituyen el principal elemento de los biosensores de afinidad que hemos desarrollado para el DON, y participa directamente en el biorreconocimiento del DON y en la especificidad y sensibilidad de estos inmunosensores. En los apartados

siguientes se describe el estudio de la afinidad de los anticuerpos utilizados en este trabajo por diferentes técnicas de caracterización.

#### **4.2.1 Anticuerpo policlonal**

##### **4.2.1.1 Estudio de la afinidad por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)**

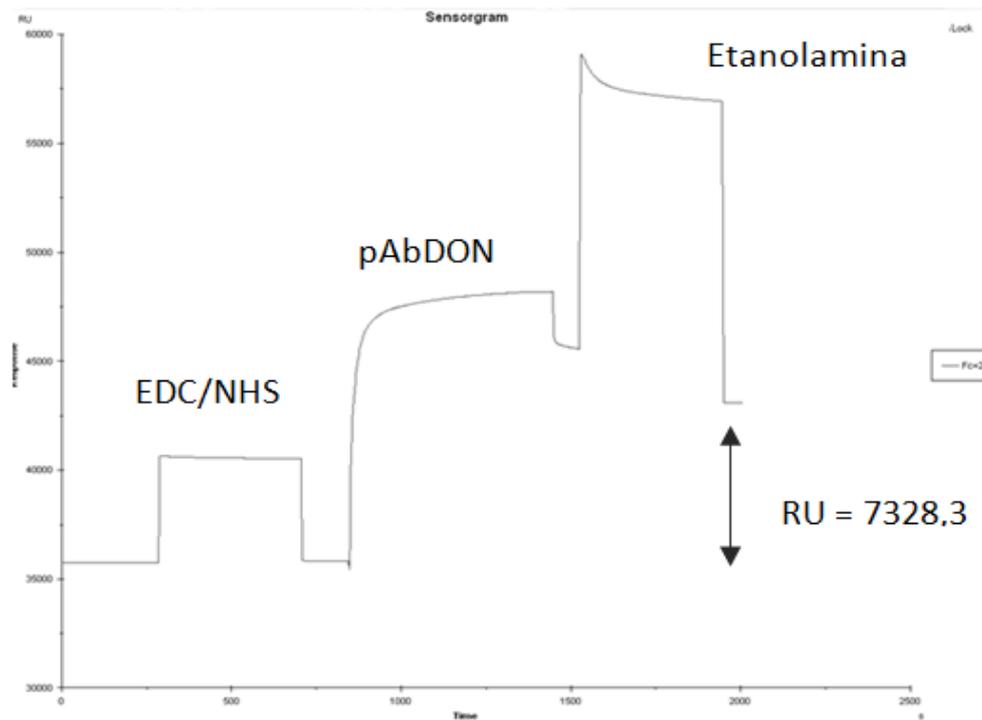
La Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) permite evaluar la afinidad entre moléculas inmovilizadas sobre un chip de oro recubierto de dextrano y proteínas o moléculas en disolución, sin necesidad de etiquetado enzimático. Las variaciones de masa de las reacciones de unión del anticuerpo y la micotoxina en nuestro caso, se relacionan con la extensión de la reacción de afinidad.

Con el instrumento de SPR se mide la variación del ángulo de difracción ( $\alpha$ ) que está relacionado directamente con la concentración de biorreactivos fijados sobre la superficie del chip. Se trabaja en unidades arbitrarias (RU) que se corresponden aproximadamente con  $1RU = 1 \text{ pg mm}^{-2}$ . Pueden determinarse cuantitativamente pequeños cambios en la concentración de la masa depositada sobre la superficie del sensor, producidos por la unión o la disociación de moléculas que interactúan, por ejemplo, entre un antígeno inmovilizado y un anticuerpo específico (o a la inversa) en la disolución de ensayo. Por lo general, la detección directa se limita a moléculas grandes de aproximadamente 10 kDa o de sustancias con un índice de refracción alto [267; 268].

El objetivo de este estudio fue comparar la afinidad del anticuerpo policlonal de DON (tipo IgG1 procedente de conejo, D01F-1 lote 1, (Antiprot, Aachen, Alemania) con la micotoxina y con el conjugado enzimático de DON (DON-HRP) mediante un ensayo directo. El primer paso para el estudio de la reacción de afinidad entre el DON y el pAbDON tal y como se ha descrito en el apartado 3.4.2 consiste en la inmovilización de pAbDON sobre la superficie de un chip de dextrano en uno de los canales del chip (cada chip dispone de cuatro canales idénticos).

Previamente a la inyección del pAbDON ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$  en  $130 \text{ }\mu\text{l}$  de tampón AC) la superficies del chip es activada mediante la reacción de la carbodiimida con EDC y NHS y tras la inyección del pAbDON en tampón de acetatos (AC) se procedió al bloqueo de los sitios libres de unión sobre el chip con etanolamina [128].

A continuación se muestra el sensograma obtenido de las tres etapas necesarias para la inmovilización correcta del anticuerpo sobre el chip.



**Figura 41: Sensograma obtenido en el proceso de inmovilización de pAbDON sobre el dextrano del chip CM5 en tampón acetato (0,1 M) pH 4**

En el sensograma se observan perfectamente las tres etapas: en primer lugar la activación del chip con EDC/NHS donde se produce un aumento de la señal y una posterior bajada a la línea base una vez que la activación se ha producido, a continuación se observa la etapa de inyección del pAbDON y la última etapa corresponde al bloqueo con etanolamina, para evitar posibles uniones no específicas sobre la superficie del chip.

La señal analítica es medida en unidades arbitrarias (RU) y representa la inmovilización eficiente del pAbDON sobre el chip tomando la diferencia entre la señal final después del bloqueo y la señal de la línea base. Se obtuvo una señal de 7328,3 RU, que se comparó con la señal máxima necesaria para evaluar la afinidad, que viene expresada en función del ligando inmovilizado (pAbDON) y del analito (DON-HRP sintetizado en este caso) según la ecuación 4:

$$RU_{\text{máx}} = \frac{PM_{\text{analito}}}{PM_{\text{pAbDON}}} \cdot RU_{\text{inmov}} \cdot \text{Estequiometria}$$

**Ecuación 4: Ecuación para el cálculo de la señal máxima necesaria para el trabajo con SPR**

Donde:

- $PM_{\text{analito}}$  es la masa molecular del DON-HRP (se considera 44 kDa)
- $PM_{\text{pAbDON}}$  es la masa molecular del pAbDON (se considera 150 kDa)
- $RU_{\text{inmov}}$  es la cantidad de ligando inmovilizado (en este caso 7328,3 RU)
- Estequiometría es la relación molar de la reacción de afinidad del pAbDON con el DON (se considera 1:1)

Una vez determinadas experimentalmente las RU obtenidas tras la inmovilización del pAbDON (7328,3 RU) se calcularon las RU máximas (ecuación 4) que son necesarias para que pueda considerarse que se han fijado un número suficientes de ligandos (pAbDON) sobre el chip para el reconocimiento del antígeno. Se obtuvo una señal máxima de 2149,6 RU, por lo que la señal de inmovilización obtenida (7328,3 RU) indica que **la inmovilización ha sido correcta y la señal suficiente.**

Una vez que el pAbDON se encuentra inmovilizado sobre uno de los canales del chip CM5 se estudió la afinidad entre el DON y DON-HRP con el anticuerpo policlonal. En primer lugar se inyectó el DON ( $0 - 2 \text{ mg l}^{-1}$ ), obteniéndose baja señal para todas las concentraciones estudiadas,  $RU < 4,5$  (Tabla 11). En principio, podría significar que existe una baja afinidad entre el DON y el anticuerpo policlonal, pero estas variaciones de las señales tan bajas son debidas al bajo peso molecular del DON (296,32 Da) que no permite observar variaciones apreciables de señal al cambiar su concentración [70; 136].

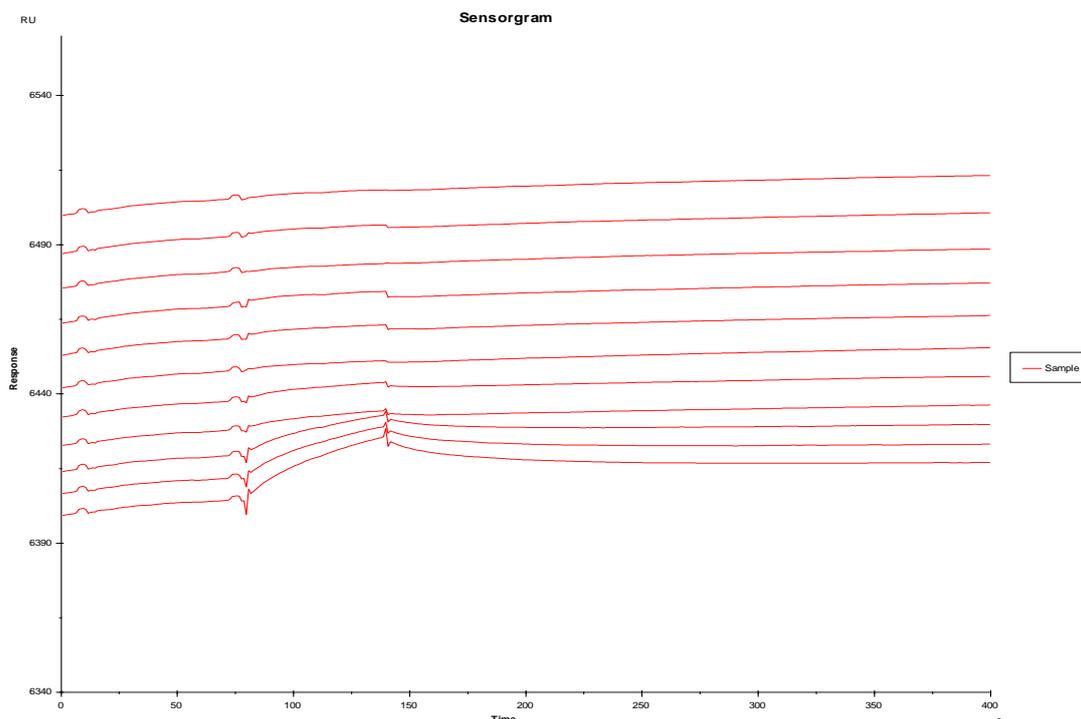
A continuación se estudió la unión de la peroxidasa, HRP ( $0 - 5 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre el pAbDON inmovilizado, para descartar las posibles uniones no específicas producidas sobre el anticuerpo por el conjugado enzimático DON-HRP. Se obtuvieron señales muy pequeñas ( $RU < 3,8$ ) para todas las concentraciones de HRP estudiadas, por lo que siendo una molécula de alto peso molecular (44 kDa) significa que no existe afinidad entre el enzima HRP y el pAbDON y por lo tanto no se va a producir unión inespecífica entre el DON-HRP y el anticuerpo (Tabla 11).

En la tabla 11 se han recopilado los valores de señal (RU) que se obtuvieron en las experiencias anteriores:

pAbDON			
[DON] mg l <sup>-1</sup>	RU	[HRP] mg l <sup>-1</sup>	RU
0	3,6	0	3,1
0,01	4	0,5	3,8
0,05	3,4	1	3,7
0,1	3,7	5	3,6
0,5	3,5		
0,75	3,4		
1	3,6		
1,5	3,6		
2	4,5		

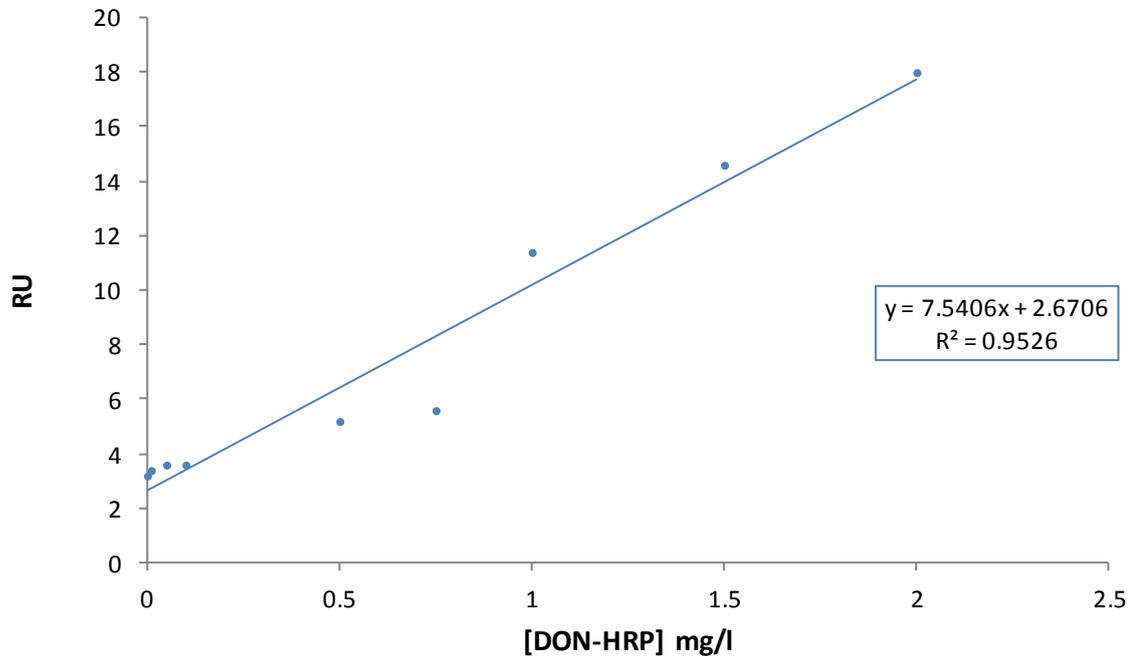
**Tabla 11: Señales SPR obtenidas (RU) en el estudio de la afinidad del DON y de la HRP con el pAbDON**

El siguiente paso fue comprobar la afinidad del DON-HRP sintetizado (Apartado 3.4.1) con el pAbDON. Para ello se estudiaron varias concentraciones de DON-HRP en el intervalo entre 0 y 2 mg l<sup>-1</sup>. El sensograma obtenido es el de la Figura 42.



**Figura 42: Sensograma SPR obtenido en la inyección de concentraciones crecientes de DON-HRP (0 y 2 mg l<sup>-1</sup>) sobre el pAbDON inmovilizados**

A partir de los valores obtenidos (RU) para cada concentración se realizó el ajuste lineal frente a la concentración de DON-HRP sintetizado (concentraciones teóricas) en el intervalo de concentraciones de DON entre 0 y 2 mg l<sup>-1</sup>:



**Figura 43: Ajuste lineal de las señales (RU) frente a DON-HRP (0-2 mg l<sup>-1</sup>) sobre pAbDON inmovilizado sobre el dextrano del chip CM5 en el running buffer utilizado**

Se obtuvo una señal máxima de 18 RU para la concentración máxima de DON-HRP. Pese a obtenerse señales bajas se observó un aumento proporcional de la señal con el aumento de la concentración de DON-HRP obteniendo un ajuste lineal con un coeficiente de regresión lineal  $R = 0,9760$ , con lo que puede afirmarse que existe una afinidad comparativamente mayor entre el DON-HRP y el anticuerpo policlonal selectivo a esta micotoxina.

#### 4.2.1.2. Estudio de la afinidad del pAbDON y DON mediante ELISA

##### - ELISA espectrofotométrico convencional

Una vez evaluada la afinidad entre pAbDON y DON por SPR, se utilizó además la técnica ELISA convencional para comprobar la afinidad entre el anticuerpo policlonal por el DON (DON-HRP procedente de la síntesis). Tal como se ha comentado, se utilizó la técnica ELISA para la optimización inicial de los parámetros que son importantes en las reacciones del inmunoensayo, y se realizó en primer lugar una experiencia en la que se hicieron reaccionar diferentes concentraciones del pAbDON inmovilizado sobre

los pocillos de poliestireno de la placa ELISA, con diferentes concentraciones de DON-HRP sintetizado.

Es una experiencia más completa que la llevada a cabo mediante SPR puesto que se van a poder estudiar comparativamente varias concentraciones de ambos biorreactivos, al contrario que en el SPR que solo se puede inmovilizar una concentración determinada de pAbDON para cada experiencia, pues una vez inmovilizado, se consume ese canal del chip y supone un elevado coste económico.

La etapa más importante del ensayo ELISA es la inmovilización del anticuerpo sobre los pocillos de poliestireno porque una correcta inmovilización dará como resultado una orientación apropiada de los anticuerpos con su región  $F_{ab}$  libre para el reconocimiento del analito y por lo tanto una mayor sensibilidad obteniéndose por lo tanto mayores señales. Sin embargo, la adsorción física sobre los pocillos de poliestireno no asegura la correcta orientación de los anticuerpos, y su adecuada y uniforme orientación de su región  $F_{ab}$  en posición óptima y accesible para el reconocimiento de DON y DON-HRP, pudiendo producirse ésta de forma aleatoria en posiciones más o menos adecuadas.

Se siguió un procedimiento en el que la inmovilización del pAbDON se realizó con agitación y a T ambiente [74], obteniéndose absorbancias correspondientes con las concentraciones añadidas muy bajas ( $Abs_{máximas} < 0,200$ ), por lo que se decidió modificar las condiciones de esta etapa realizando la inmovilización del pAbDON durante más tiempo (24 h), a 4 °C y sin agitación.

Las absorbancias debidas a diferentes concentraciones de anticuerpo y de conjugado DON-HRP después del tiempo de incubación (60 min), midiendo la cantidad de HRP tras su reacción con TMB/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se recogen en la tabla 12.

	pAbDON (mg l <sup>-1</sup> )					
DON-HRP (mg l <sup>-1</sup> )	2	1	0,5	0,25	0,125	0
5	0,866	0,733	0,708	0,463	0,437	0,374
2,5	0,417	0,204	0,173	0,143	0,094	0,114
1,25	0,318	0,115	0,053	0,030	0,050	0,022
0,625	0,348	0,040	0,028	0,005	0,006	0,005
0	0,266	0,042	0,007	0,003	-0,009	-0,012

**Tabla 12: Absorbancias obtenidos en el ELISA convencional con inmovilización de pAbDON (0-2 mg l<sup>-1</sup>) durante 24 h, 4 °C y DON-HRP (0-5 mg l<sup>-1</sup>) incubación 60 min**

Con estas modificaciones sobre el procedimiento inicial se observó un aumento considerable de las absorbancias, con lo cual se consiguió una mayor sensibilidad. Con

estos resultados experimentales se pudo comprobar que **existe afinidad entre el pAbDON y el DON-HRP**, sin tener en cuenta la etapa de competición posterior ya que se observa que para todas las concentraciones hay una disminución de la señal a medida que se disminuye la concentración de pAbDON (filas) de la misma forma que en los casos que se disminuye la concentración de DON-HRP (columnas).

Se observó, no obstante, **una elevada unión no específica cuando no hay pAbDON** sobre la superficie del pocillo obteniéndose una señal 0,374 unidades de absorbancia para una concentración de DON-HRP de  $5 \text{ mg l}^{-1}$  y una señal de 0,266 cuando no hay DON-HRP y sí hay pAbDON inmovilizado sobre la superficie del pocillo. La existencia de uniones inespecíficas no se había observado con el sensor SPR, por lo que son producidas por uniones de los biorreactivos sobre los pocillos de poliestireno que no se han podido eliminar durante las etapas de lavado. Esta situación es normal, dada la capacidad de adsorción de las proteínas sobre el poliestireno, por lo que se barajó la posibilidad de realizar en futuras experiencias, etapas previas de bloqueo de los pocillos.

#### ***-ELISA inmunomagnético (mELISA) utilizando MBs:***

Las partículas magnéticas se utilizaron como superficie sólida de inmovilización del elemento de biorreconocimiento (anticuerpo) y de las etapas del inmunoensayo, con las ventajas que esto conlleva. El uso de MBs produce una mejora en el rendimiento de la reacción inmunológica debido a un **aumento de la relación superficie/volumen** para la disposición del anticuerpo (evita impedimentos estéricos), así como favorecen separaciones, lavados y preconcentraciones bajo la acción de un campo magnético con un rendimiento próximo al 100%, y garantizan menores tiempos de incubación al tratarse de una dispersión (frente por ejemplo a la superficie sólida de un pocillo ELISA), y una localización muy precisa sobre la superficie del transductor [269].

Las MBs poseen una cinética más rápida ya que se encuentran en suspensión y favorecen la difusión del antígeno y su acercamiento al anticuerpo. Además, presentan una baja adsorción inespecífica y se minimiza el efecto matriz de las muestras analizadas [73] debido a la alta eficiencia en la separación durante las etapas de lavado por acción de un campo magnético que es capaz de atraer las partículas magnéticas con los biorreactivos inmovilizados sobre las mismas y permite la eliminación del sobrenadante con los reactivos en exceso que no se hayan unido [189].

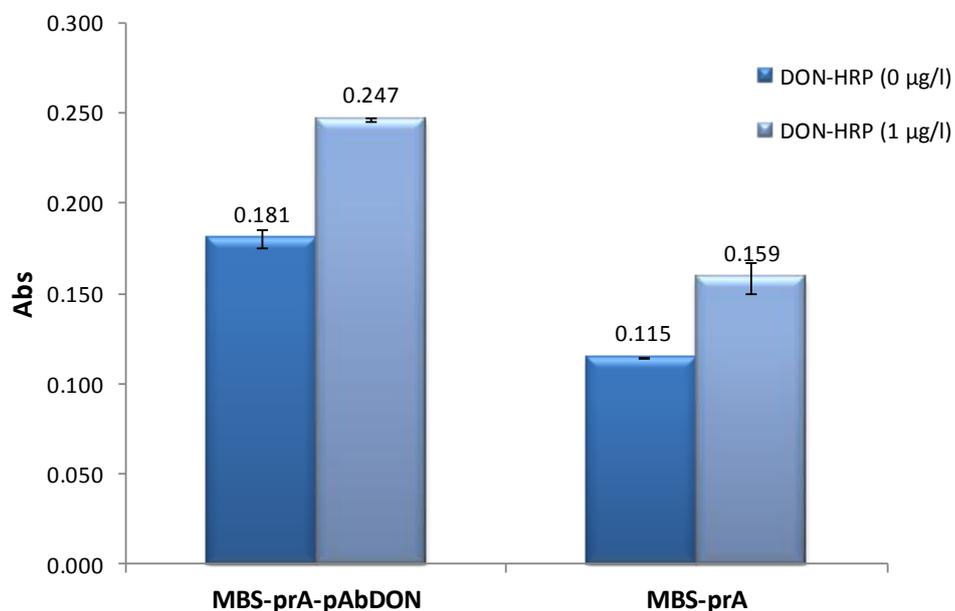
Debido a las ventajas descritas que supone el uso de partículas magnéticas como superficie sólida de inmovilización del anticuerpo como elemento de biorreconocimiento y en el inmunoensayo, se propuso el modo de trabajo con MBs. La

detección de la señal se realizó mediante un lector ELISA espectrofotométrico de absorción molecular, de forma semejante a la realizada en las reacciones sobre el pocillo de poliestireno.

En un primer lugar, se utilizaron para este estudio **MBs modificadas con la proteína A**, capaz de orientar favorablemente anticuerpos tipo IgG1, especialmente los procedentes de conejo (coincidiendo con el tipo de anticuerpo pAbDON), uniéndose a su región  $F_c$  y dejando por lo tanto libre la región  $F_{ab}$  libre para el reconocimiento del antígeno.

La experiencia se realizó en presencia del pAbDON ( $1 \mu\text{g}$ ) inmovilizado sobre las MBs-prA y en ausencia de éste. Se incubó en ambos casos DON-HRP ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y DON-HRP ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ) para evaluar la afinidad entre la micotoxina y el pAbDON cuando éste se encuentra inmovilizado sobre las MBs-prA y la especificidad y selectividad de esta unión. La incubación del DON-HRP ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ) se realizó de modo que fuera en un principio equimolar a la concentración de pAbDON inmovilizada según el procedimiento recomendado por la casa comercial asumiendo que la unión de pAbDON y de DON-HRP (procedente de la síntesis) tenga una estequiometría 1:1.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 44:



**Figura 44: Afinidad y especificidad entre pAbDON (0 y 1 µg) inmovilizado sobre MBs-prA durante 10 min y DON-HRP (0 y 1 µg l<sup>-1</sup>). Tiempo de incubación: 60 min**

Se observa el biorreconocimiento del DON-HRP sintetizado por parte del pAbDON, obteniéndose una mayor señal en la experiencia que incluye pAbDON y DON-HRP (Abs 0,247), pero se observa una fuerte unión inespecífica del DON-HRP sobre la proteína A en los casos en los que no hay pAbDON y por lo tanto la señal debería ser mínima (no existe unión de DON-HRP ni de enzima catalizando la reacción del TMB y la señal de absorbancia obtenida es alta), provocadas por un gran exceso de la cantidad de HRP en relación al DON en el conjugado enzimático sintetizado. Además aparece una alta señal de blanco en los casos en los que no se añadió el DON-HRP, producida por la unión inespecífica del sustrato TMB sobre la proteína A.

No es posible trabajar con una señal mínima de absorbancia de 0,115 producida por uniones inespecíficas con este tipo de MBs, por lo que se ensayaron a continuación con otro tipo de MBs funcionalizadas con **grupos Tosilo (MBs-To)**.

El anticuerpo pAbDON fue inmovilizado mediante un enlace covalente a través de sus grupos amino sobre las MBs-To según se ha indicado en el apartado 3.4.3.2 (concentración de pAbDON utilizada  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ ) produciendo el desplazamiento de los grupos tosilo. A continuación se llevó a cabo la incubación con diferentes concentraciones de DON-HRP ( $0-5 \text{ mg l}^{-1}$ ) con la finalidad de comprobar la afinidad entre ambos.

Una vez incubado y tras los lavados posteriores se añadieron  $50 \mu\text{l}$  de MBs-To-pAbDON-DON-HRP en los pocillos para llevar a cabo la reacción con el sustrato enzimático TMB.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 13:

MBs-To-pAbDON ( $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ )						
DON-HRP ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0	0,3	0,6	1,25	2,5	5
	0,060	0,232	0,282	0,334	0,545	0,849

**Tabla 13: Absorbancias obtenidas en el ELISA inmunomagnético utilizando MBs-To con inmovilización de pAbDON ( $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ ) durante 24 h y DON-HRP ( $0-5 \text{ mg l}^{-1}$ ). Tiempo de incubación: 60 min**

Se obtuvo un aumento proporcional de señales de absorbancia a medida que se aumentó la concentración de DON-HRP en el ensayo, lo que significa que al utilizar MBs-To se produce la reacción de afinidad entre el pAbDON inmovilizado y el DON-HRP sintetizado. Quizás por una mejor inmovilización del anticuerpo sobre las partículas magnéticas modificadas con el grupo tosilo en comparación con las modificadas con proteína A.

Se realizó una comparativa entre los resultados obtenidos con la inmovilización sobre el pocillo de poliestireno y sobre las MBs-To para una concentración similar de pAbDON se resume en la Tabla 14:

	SIN MBs	CON MBs
DON-HRP ( $\text{mg l}^{-1}$ )	pAbDON ( $0,25 \text{ mg l}^{-1}$ )	pAbDON ( $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ )
0	0,003	0,060
0,6	0,005	0,282
1,25	0,030	0,334
2,5	0,143	0,545
5	0,363	0,849

**Tabla 14: Comparativa de absorbancias obtenidas utilizando el ELISA inmunomagnético con inmovilización del pAbDON ( $0,25$  o  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ ) durante 24 h sobre el pocillo de poliestireno o sobre las MBs-To y DON-HRP ( $0-5 \text{ mg l}^{-1}$ ) incubación 60 min**

Estos datos (Tabla 14) han demostrado que los valores de absorbancia obtenidos con MBs-To y con inmovilización del pAbDON sobre el pocillo muestran la misma tendencia, pero en el caso de utilizar MBs-To las señales de absorbancia son mucho mayores.

Por el contrario, se observa que las señales de blanco o para concentraciones bajas de DON-HRP son mucho mayores utilizando MBs-To que sin ellas, esto es debido a una alta unión no específica sobre la superficie de las partículas magnéticas modificadas con el grupo tosilo, lo que provoca **problemas de unión inespecífica de la HRP del conjugado DON-HRP sobre las MBs-To**, pero que no se producen en el caso de trabajar sobre el pocillo de poliestireno.

#### 4.2.1.3. Optimización de la transducción electroquímica del inmunosensor

**- Optimización de la detección electroquímica y de la reacción enzimática sobre electrodos serigrafiados individuales (SPCEs):**

La etapa final de los inmunosensores electroquímicos mide la cantidad de conjugado enzimático micotoxina-HRP unido competitivamente a los anticuerpos inmovilizados que no ha sido desplazada por la micotoxina libre, por consiguiente, **la señal obtenida es menor cuanto mayor es la concentración de DON que compete.**

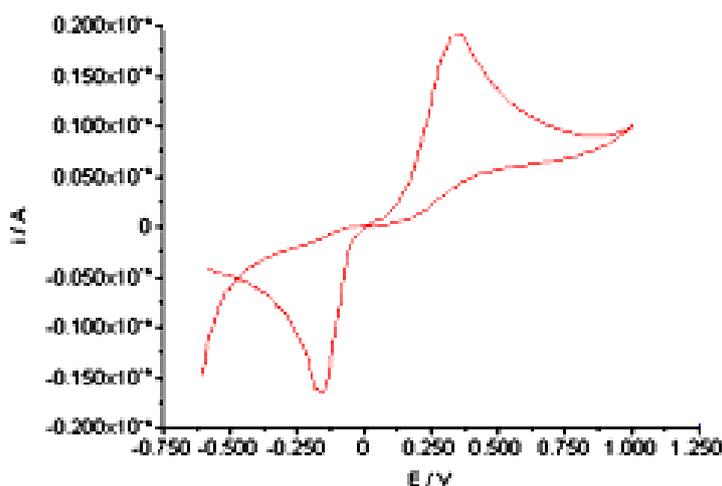
Puesto que son muy diversos los sustratos enzimáticos catalizados por este enzima (HRP), para nuestro trabajo se caracterizó únicamente la hidroquinona. La hidroquinona (HQ) es un sustrato muy sensible de la reacción enzimática de la HRP, y en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se oxida a p-benzoquinona (*p*BQ), compuesto activo electroquímicamente por lo que podemos cuantificarla aplicando el potencial de reducción adecuado.

Para seleccionar el potencial óptimo de reducción de la *p*BQ, se caracterizó electroquímicamente la HQ (1,8 mM) aplicando un barrido cíclico de potenciales (voltametría cíclica, VC) sobre los mismos SPCEs. Las condiciones que se fijaron en el potenciostato fueron:

- Potencial inicial: -0,6 V
- Potencial final: 1 V
- Velocidad de barrido de potencial:  $50 \text{ mV s}^{-1}$
- Electrodo serigrafiado SPCEs (Universidad de Florencia, Italia).

Con la voltametría cíclica (VC) realizada en primer lugar hacia potenciales positivos se provocó la oxidación de la HQ para posteriormente llevar a cabo la reducción, de igual forma que se realizó en la etapa final del inmunosensor sobre el electrodo serigrafiado de carbono (SPCE).

El voltagrama cíclico obtenido se muestra en la figura 45:



**Figura 45: Voltametría cíclica HQ (1,8 mM) de -0,6 a 1 V a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  utilizando los SPCEs individuales**

El compuesto químico HQ presenta un potencial de oxidación en torno a +0,4 V, y una vez oxidada, la *p*BQ generada se reduce a un potencial cercano a -0,2 V.

El alto valor de potenciales que separa a ambos picos (460 mV), mucho mayor del valor teórico de reversibilidad ( $52/n$  mV), indica un proceso de transferencia de carga lento o irreversible electroquímicamente. Esto que en principio puede parecer un inconveniente, en realidad en nuestro caso supone una ventaja en la detección voltamétrica aplicada al inmunosensor, pues durante un barrido catódico se evita de una forma más eficaz la posible oxidación electroquímica en los menores potenciales iniciales de la HQ, con lo que la  $pBQ$  generada provendría en parte de la oxidación enzimática y además de la oxidación electroquímica no relacionada esta última con la extensión de la reacción del inmunoensayo competitivo. Al contrario, es importante observar que al potencial inicial de la medida (0 V) todavía no se ha producido la oxidación electroquímica de la HQ debido a la irreversibilidad (separación de los picos anódico y catódico) del voltograma cíclico.

Con estos valores de potencial de oxidación y reducción se seleccionó el salto de potencial óptimo para la técnica cronoamperometría ( $\Delta E_{CRA}$ ), para ello se tomó la posición del pico catódico (-0,16 V) y se eligió un salto de potencial en el sentido de la reducción desde 0 hasta -0,25 V durante 90 segundos.

**- Optimización de la concentración  $H_2O_2$ :**

Se realizaron medidas por cronoamperometría (CRA) con el potenciostato PGSTAT12, provocando un salto de potencial desde 0 hasta -0,25 V para optimizar las concentraciones del sustrato y cosustrato de la reacción enzimática (HQ y  $H_2O_2$ ), en primer lugar **en ausencia del enzima HRP** unida a estreptavidina (eaHRP tomada como patrón) para comprobar la corriente capacitativa (y faradaica) de una disolución blanco, que equivaldría a la corriente de una medida del inmunosensor en condiciones de competitividad total (ausencia de DON-HRP completamente desplazado por el DON).

Las corrientes obtenidas se muestran en la tabla 15:

EXPERIENCIA	Sin HQ	Con HQ (1,8 mM)
<b>Ausencia HRP</b>	<b>I (<math>\mu A</math>)</b>	<b>I (<math>\mu A</math>)</b>
<b><math>H_2O_2</math> (0 mM)</b>	-0,059	-0,134
<b><math>H_2O_2</math> (0,4 mM)</b>	-0,068	-0,110
<b><math>H_2O_2</math> (0,6 mM)</b>	-0,073	-0,114
<b><math>H_2O_2</math> (1 mM)</b>	-0,098	-0,142
<b><math>H_2O_2</math> (1,8 mM)</b>	-0,102	-0,143
<b><math>H_2O_2</math> (2,4 mM)</b>	-0,113	-0,140

**Tabla 15: Corrientes CRA entre 0 y -0,25 V con  $H_2O_2$  (0 - 2,4 mM), en ausencia de HQ y con HQ (1,8 mM) y en ausencia de eaHRP**

Se observó que cualquier concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produce corrientes muy pequeñas en ausencia del enzima HRP (del orden de nA). Cuando se añadió además HQ (1,8 mM) y todavía en ausencia del enzima HRP la corriente aumentó, pero en principio no se puede considerar interferente (aprox.  $-0,1 \mu\text{A}$ ). Este aumento en la corriente en presencia de la HQ y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue debido a la oxidación de la HQ que se produce una vez disuelta, dando pBQ generada químicamente por el oxígeno del aire, y su posterior reducción electroquímica, lo que **demuestra la inestabilidad de la disolución de HQ** que es preciso preparar inmediatamente antes de cada medida electroquímica.

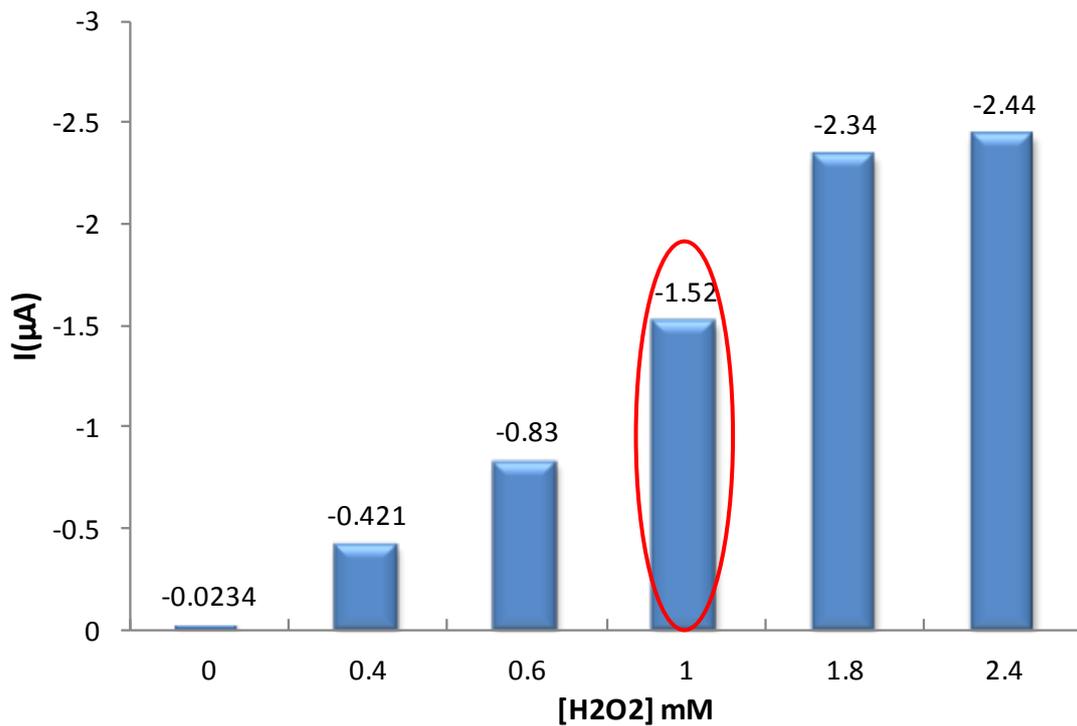
Otro factor a tener en cuenta es el efecto de la presencia de la HQ en contacto con la HRP. Se inmovilizó el enzima peroxidasa (la eaHRP comercial se tomó como patrón de la concentración de HRP) durante 24 h sobre la superficie del electrodo de trabajo (4  $\mu\text{l}$ ) a 4 °C y protegida de la luz, y se midió la corriente generada mediante la técnica de CRA (cronoamperometría) después de 10 minutos de reacción enzimática con los sustratos de la reacción ( $\text{HQ} + \text{H}_2\text{O}_2$ ), contados desde la adición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el SPCE.

Los resultados que se obtuvieron son:

EXPERIENCIA	Sin HQ	Con HQ (1,8 mM)
<b>HRP (0,13 <math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>I (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>I (<math>\mu\text{A}</math>)</b>
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (0 mM)</b>	-0,057	-0,023
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (0,4 mM)</b>	-0,033	-0,421
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (0,6 mM)</b>	-0,033	-0,831
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (1 mM)</b>	-0,033	-1,52
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (1,8 mM)</b>	-0,023	-2,34
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (2,4 mM)</b>	-0,026	-2,44

**Tabla 16: Resultados cronoamperometría entre 0 y  $-0,25 \text{ V}$  con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0 – 2,4 mM), en ausencia y con HQ (1,8 mM) y en presencia de eaHRP (0,13  $\mu\text{g}$ ) tras 10 min de reacción**

Con estos resultados se demuestra que, lógicamente, para que la reacción enzimática se produzca tienen que intervenir los tres reactivos (enzima + sustrato + mediador de transferencia de carga). En ese caso, se observó un aumento proporcional de la señal con el aumento de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta la saturación de la señal a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,8 mM), tal y como se recoge en la tabla 16 y se representa en la figura 46:



**Figura 46: Resultados cronoamperometría entre 0 y -0,25 V con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 – 2,4 mM), con HQ (1,8 mM) y en presencia de eaHRP (0,13 µg) después de 10 min de reacción**

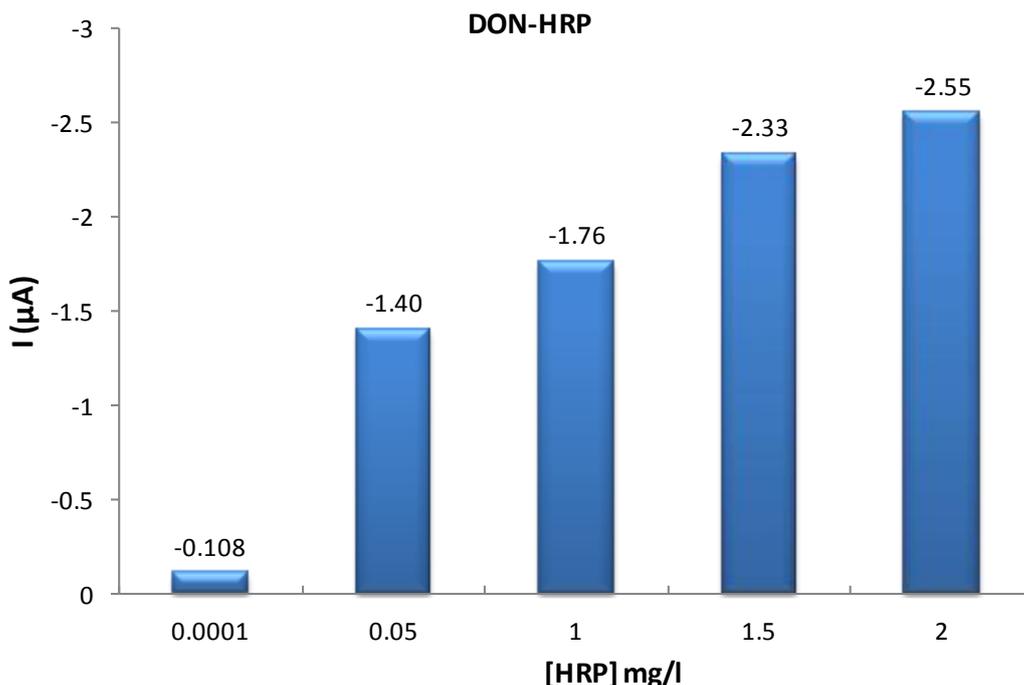
A la vista de los resultados se seleccionó la concentración óptima del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), por los buenos calibrados que se obtuvieron con esta cantidad de conjugado. A partir de 1,8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la corriente alcanza un valor constante, lo que significa una saturación cinética de la señal máxima con mayores concentraciones.

Las condiciones seleccionadas como óptimas para la reacción enzimática y detección electroquímica del inmunosensor electroquímico fueron:

- HQ (1,8 mM)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM)
- 10 minutos de reacción enzimática
- Cronoamperometría (0 a -0,25 V) durante 90 segundos

Una vez fijadas estas condiciones, se realizó un calibrado inmovilizando la concentración teórica deseada de DON-HRP (HRP entre 0,0001 y 2 mg l<sup>-1</sup>) durante 24 h sobre la superficie del electrodo de trabajo (4 µl) a 4 °C mediante adsorción física. Se llevó a cabo la medida por CRA (0 a -0,25 V) tras la correspondiente reacción enzimática junto con HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) una vez transcurridos los 10 min.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 47:



**Figura 47:** Resultados cronoamperometría entre 0 y -0,25 V con  $H_2O_2$  (1 mM), y HQ (1,8 mM) con concentraciones DON-HRP ([HRP] 0,0001-2 mg l<sup>-1</sup>). Reacción enzimática 10 min.

La corriente medida va aumentando frente al aumento de la cantidad de HRP inmovilizada. En esta experiencia se confirmó que la reacción electroquímica entre el DON-HRP sintetizado con HQ (1,8 mM) y  $H_2O_2$  (1 mM) por CRA (0 a -0,25 V) sucede de forma satisfactoria, y existe un aumento de la señal con respecto al aumento de la concentración del conjugado enzimático.

#### 4.2.1.4 Estudio de la afinidad del pAbDON sobre diferentes partículas magnéticas

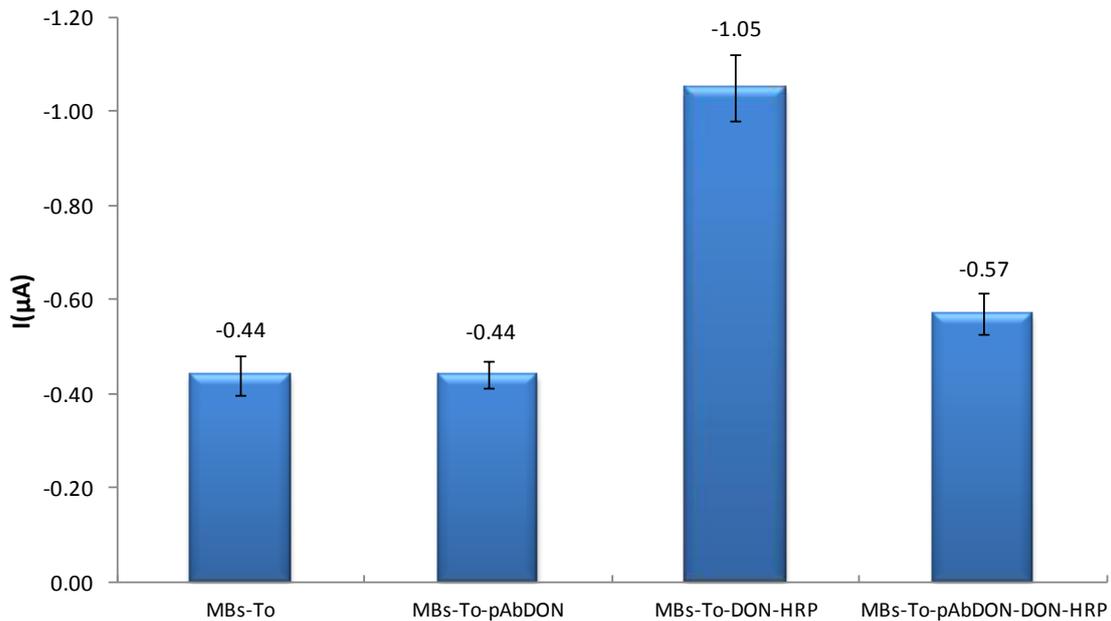
Después del estudio de afinidad utilizando MBs-To como superficie sólida de inmovilización en un ensayo basado en un ELISA espectrofotométrico en el que se ha observado un cierto biorreconocimiento del DON-HRP sintetizado por el pAbDON y tras la elección de la técnica electroquímica y la optimización de las condiciones óptimas de la reacción enzimática, **se estudió la afinidad de pAbDON y el DON-HRP utilizado transducción electroquímica** con el objetivo de seleccionar las MBs que ofrezcan los mejores resultados.

**- Afinidad del pAbDON inmovilizado sobre partículas magnéticas funcionalizadas con el grupo tosilo (MBs-To):**

Se realizaron experiencias para evaluar la adsorción inespecífica del DON-HRP sintetizado sobre las MBs-To (en ausencia de anticuerpo), la especificidad del anticuerpo con las MBs-To conjugadas al anticuerpo y la competitividad de la micotoxina. Se realizó una incubación durante 60 min y una posterior detección electroquímica en las condiciones anteriormente descritas de las experiencias en las que se utilizó:

1. MBs-To
2. MBs-To-pAbDON
3. MBs-To-DON-HRP
4. MBs-To-pAbDON-DON-HRP

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 48:



**Figura 48: Estudio de afinidad y especificidad del pAbDON y el DON-HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre las MBs-To y detección por CRA con HQ ( $1,8 \text{ mM}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mM}$ ) 10 min,  $\Delta E_{\text{CRA}}$  0 a  $-0,25 \text{ V}$ .**

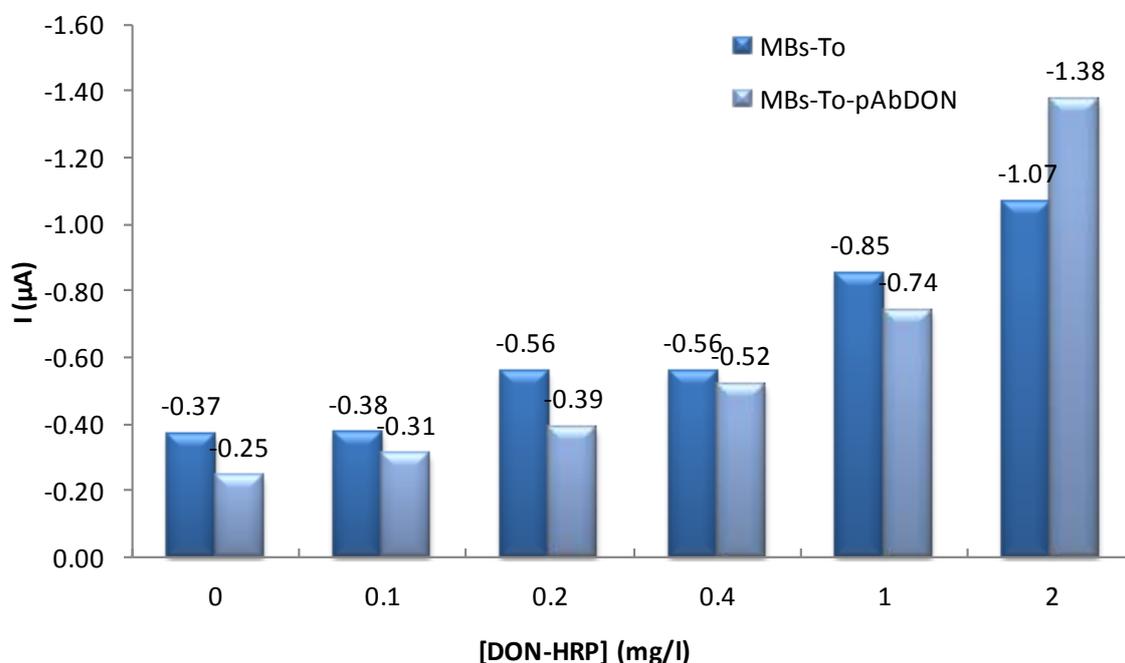
El ensayo ha producido en primer lugar una alta señal de fondo ( $-0,44 \mu\text{A}$ ) en las experiencias en la que no se ha incluido el DON-HRP por lo que es una señal mínima que va a aparecer en cualquier experiencia. Además se observa una alta señal

inespecífica producida por la unión del DON-HRP sobre las MBs-To produciendo una señal de  $-1,05 \mu\text{A}$  mucho más alta en ausencia del pAbDON que la corriente específica obtenida en la última experiencia que en presencia del mismo ( $-0,57 \mu\text{A}$ ).

En el caso de que sobre las MBs-To aparezcan altas uniones inespecíficas, es recomendable su **almacenamiento en tampón de bloqueo con PBS en presencia de 0,1% (m/v) de albúmina sérica bovina (BSA)** tal y como recomiendan sus especificaciones técnicas. La proteína BSA es una proteína de gran tamaño que se usa habitualmente para el bloqueo de los sitios activos libres, por ejemplo en las MBs-To, que no han sido ocupados por el pAbDON inmovilizado, y debido a la alta reactividad de este grupo funcional hacia los grupos amino. El bloqueo con BSA evita teóricamente la unión inespecífica del DON-HRP sobre estas partículas magnéticas funcionalizadas y hacia el grupo activo tosilo excedente.

Para comprobar lo anterior, se comparó la corriente debida a la incubación de DON-HRP sintetizado (concentración teórica  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre las MBs-To con pAbDON inmovilizado y en su ausencia, bloqueando en ambos casos con PBS con BSA ( $0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7,4$ ; BSA  $0,1\% \text{ m/v}$ ) durante el almacenamiento a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Las corrientes obtenidas se recogen en la figura 49:



**Figura 49: Estudio uniones inespecíficas de DON-HRP ( $0\text{-}2 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre MBs-To sin pAbDON y con inmovilización de pAbDON ( $2 \mu\text{g}$ ). Detección por CRA con HQ ( $1,8 \text{ mM}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mM}$ )  $10 \text{ min}$ ,  $\Delta E_{\text{CRA}}$  de potencial desde  $0$  a  $-0,25 \text{ V}$ .**

Según los resultados obtenidos, las señales inespecíficas que se producen en la reacción de incubación del conjugado enzimático DON-HRP en ausencia de pAbDON son del mismo orden que las que se producen de forma específica por el reconocimiento del DON-HRP por el pAbDON. El bloqueo con BSA (0,1 % m/v) no fue satisfactorio, sino que provocó que la peroxidasa (DON-HRP) se uniera más fuertemente a las MBs que cuando no se realizó bloqueo, probablemente debido a una afinidad intrínseca entre ambas en estas condiciones.

A la vista de los malos resultados obtenidos con las MBs-To, se desechó su uso para el desarrollo de los inmunosensores de DON, y se procedió al estudio **con otros tipos de funcionalizaciones**.

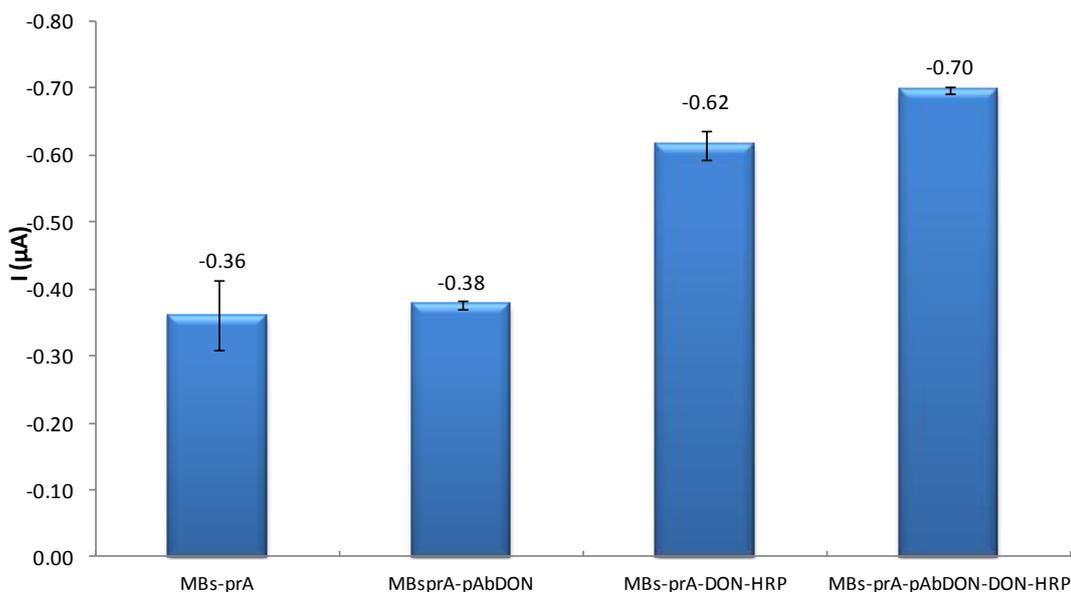
***- Afinidad del pAbDON inmovilizado sobre partículas magnéticas funcionalizadas con la proteína A (MBs-prA):***

De la misma forma a la explicada en el apartado anterior, se ensayaron las MBs funcionalizadas con proteína A para estudiar la afinidad del pAbDON, o la ausencia de adsorciones inespecíficas sobre la superficie de estas MBs-prA o sobre la superficie de los pocillos de poliestireno utilizados para las incubaciones del inmunosensor y previas a la detección por transducción óptica o electroquímica.

Las experiencias realizadas son las esquematizadas en los cuatro puntos posteriores (según el tipo de superficie sensora sobre la que se realizaron las incubaciones, en presencia o ausencia de elemento de biorreconocimiento):

1. MBs-prA
2. MBs-prA-pAbDON
3. MBs-prA-DON-HRP
4. MBs-prA-pAbDON-DON-HRP

En la figura 50 se han representado las corrientes obtenidas:



**Figura 50: Estudio de afinidad y especificidad del pAbDON y el DON-HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre las MBs-prA y detección por CRA con HQ ( $1,8 \text{ mM}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mM}$ ) 10 min,  $\Delta E_{\text{CRA}}$  0 a  $-0,25 \text{ V}$ .**

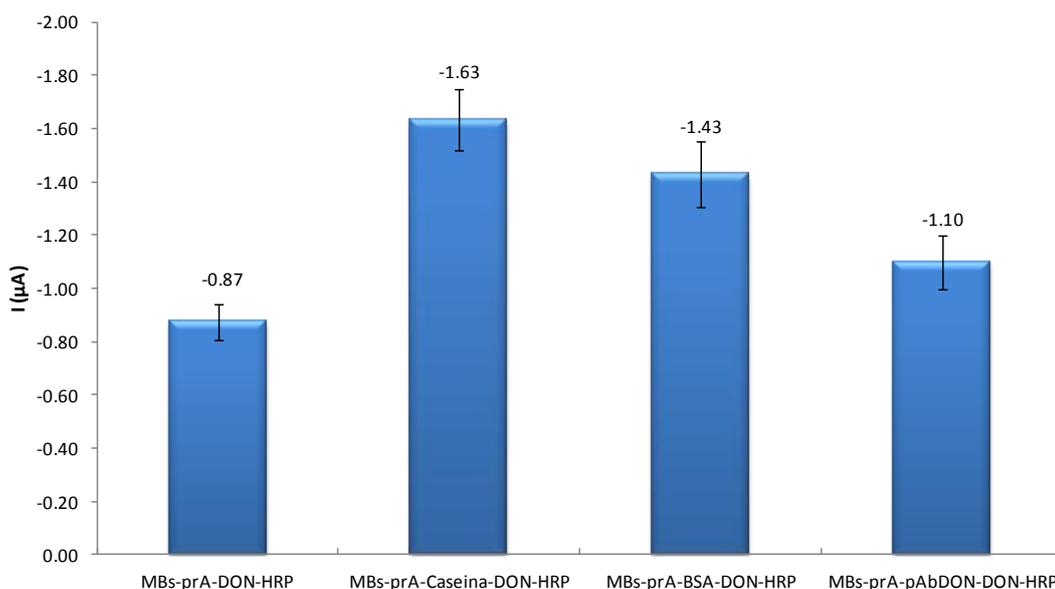
Se obtuvo una alta unión inespecífica entre la peroxidasa del DON-HRP y la proteína A de las MBs-prA dando una corriente de  $-0,62 \mu\text{A}$ , mientras que la señal producida por el reconocimiento específico del DON-HRP por el pAbDON es de  $-0,70 \mu\text{A}$  (diferencia de  $0,08 \mu\text{A}$ ). Además, del mismo modo que ocurrió con las MBs-To la señal de fondo que se obtiene en ausencia del conjugado enzimático es de aproximadamente  $-0,4 \mu\text{A}$ .

Se procedió de igual manera que para las MBs-To utilizando los bloqueantes típicos como son BSA y caseína ( $0,1\% \text{ m/v}$ ) para evitar las uniones inespecíficas del DON-HRP sobre las partículas magnéticas o sobre los sitios libres de unión de su superficie.

En este caso se realizó una etapa de bloqueo de 30 min con cada uno de los bloqueantes (caseína y BSA) únicamente sobre las MBs-prA sin el anticuerpo inmovilizado para evaluar si mediante el uso de bloqueantes se podrían minimizar las señales producidas por la unión del conjugado enzimático a la proteína A. Tras la etapa de bloqueo se procedió a realizar tres etapas de lavado (dos lavados con  $500 \mu\text{l}$  PBST y un lavado con  $500 \mu\text{l}$  PBS) según el procedimiento habitual utilizando un campo magnético.

Además para tener las señales de referencia y poder comprobar si el bloqueo es efectivo se incubó también DON-HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre las MBs-prA y sobre las MBs-prA-pAbDON ambas sin bloquear.

Los resultados obtenidos se representan en la siguiente figura 51:



**Figura 51: Estudio de especificidad del pAbDON y el DON-HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre las MBs-prA y detección por CRA con HQ ( $1,8 \text{ mM}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mM}$ ) 10 min,  $\Delta E_{\text{CRA}}$  0 a  $-0,25 \text{ V}$ .**

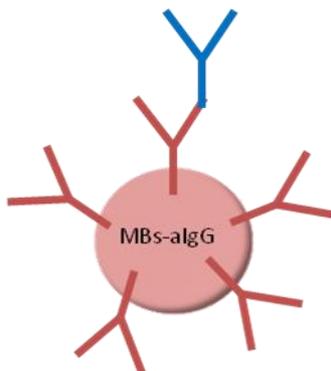
Se concluyó con estos resultados que el uso de estos bloqueantes de naturaleza proteica no es satisfactorio para evitar la unión inespecífica durante el biorreconocimiento, ya que se observa que la peroxidasa del conjugado DON-HRP se une mejor a los bloqueantes de lo que es capaz de unirse al pAbDON inmovilizado, al ser mayores las corrientes debidas a la HRP del conjugado sintetizado sobre el bloqueante.

Por lo tanto, se decidió ensayar otros tipos de funcionalizaciones de las MBs que permitieran un mayor recubrimiento de su superficie por el pAbDON inmovilizado evitando así que queden huecos libres en los que el DON-HRP pueda fijarse dando los problemas de inespecificidad que se han obtenido tanto con las MBs-To como con las MBs-prA.

#### **- Afinidad del pAbDON sobre partículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo genérico (MBs-*algG*)**

Viendo los resultados de experiencias anteriores utilizando MBs-To y MBs-prA se decidió estudiar otras partículas magnéticas modificadas con un anticuerpo genérico tipo IgG. La **unión entre anticuerpos se produce siempre entre la región  $F_{ab}$  de uno de ellos, con la región  $F_c$  del otro**, por lo que la unión del pAbDON sobre el anticuerpo IgG permite que su región  $F_{ab}$  se mantenga libre para que la reacción de

biorreconocimiento con el DON y el DON-HRP se produzca satisfactoriamente, tal y como se muestra en la figura 52.

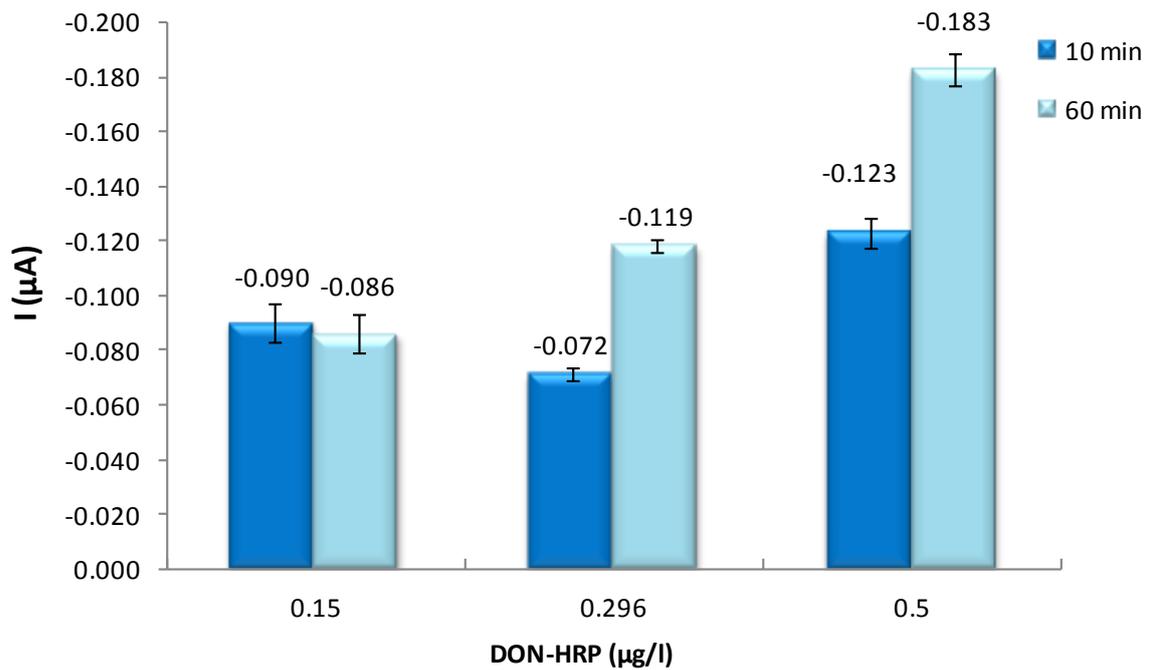


**Figura 52: Inmovilización del pAbDON (azul) por su región  $F_c$  a la región  $F_{ab}$  del anticuerpo tipo IgG del recubrimiento de las MBs-algG**

Al igual que para los otros tipos de MBs, en este apartado se describe el estudio de las MBs-algG como soporte sólido de inmovilización de los anticuerpos de DON y sus características que permiten utilizarlas en el diseño de inmunosensores de esta micotoxina. Para optimizar la cantidad de anticuerpo, se realizó el estudio de la inmovilización de pAbDON sobre las MBs-algG durante 10 y 60 minutos, ya que en las especificaciones técnicas se recomienda este intervalo de tiempos, a una temperatura de 4 °C y con agitación. A continuación las MBs-algG-pAbDON se incubaron durante 60 minutos con tres concentraciones diferentes de DON-HRP.

Se midieron las corrientes de la pBQ generada después de la reacción enzimática de transformación de la HQ con concentraciones de DON-HRP que se modificaron entre la concentración estequiométrica de DON-HRP ( $0,296 \mu\text{g l}^{-1}$ ) para la cantidad de pAbDON inmovilizado sobre las MBs-algG suponiendo una relación molar 1:1, y otras dos concentraciones diferentes, una por encima ( $0,50 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y otra por debajo ( $0,15 \mu\text{g l}^{-1}$ ) de este valor estequiométrico.

Los valores de corrientes medidas se indican en la figura 53:

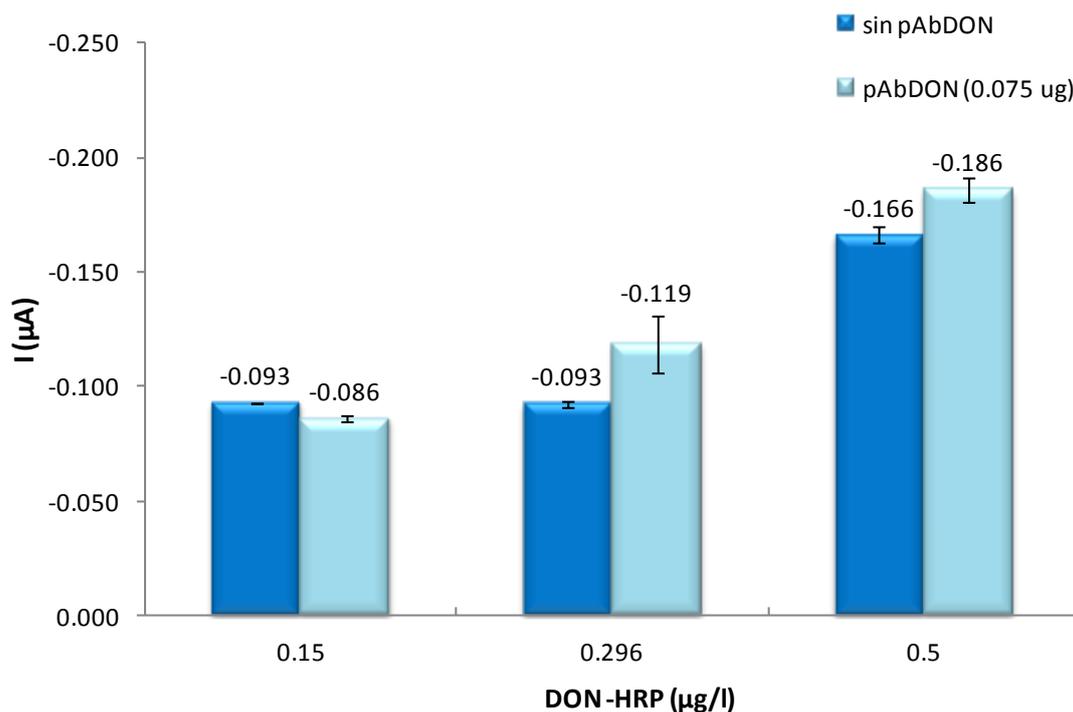


**Figura 53: Comparación de las corrientes obtenidas con diferentes concentraciones de DON-HRP (0,15 0,296 y 0,5 µg l<sup>-1</sup>), sobre MBs-algG- pAbDON (0,075 µg), inmovilización 10 min o 60 min,  $\Delta E_{CRA}$ : de 0 a -0.25 V**

Se observó que para la misma concentración de DON-HRP la corriente fue mayor para las experiencias que se llevaron a cabo con un tiempo de inmovilización del pAbDON sobre las MBs-algG de 60 min, obteniéndose un incremento en la corriente medida del 50 % aproximadamente, lo que parece indicar que se **inmovilizó el doble de pAbDON durante los 60 minutos que durante los 10 minutos.**

A continuación se estudió la unión no específica entre el DON-HRP y las MBs-algG, comparando experiencias en ausencia y en presencia de pAbDON tras la inmovilización durante 60 min, para las tres concentraciones de DON-HRP utilizadas anteriormente.

Las corrientes medidas fueron las indicadas en la Figura 54:



**Figura 54:** Comparación de diferentes concentraciones de DON-HRP (0,15 0,296 y 0,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), sobre MBs-*algG*- pAbDON (0,075  $\mu\text{g}$ ), inmovilización 60 min,  $\Delta E_{\text{CRA}}$ : de 0 a -0.25 V

Se observó un ligero aumento de la corriente a medida que aumenta la concentración de DON-HRP en el ensayo, aunque apareció una fuerte unión inespecífica del conjugado enzimático DON-HRP sobre las MBs-*algG* en las experiencias en ausencia de pAbDON.

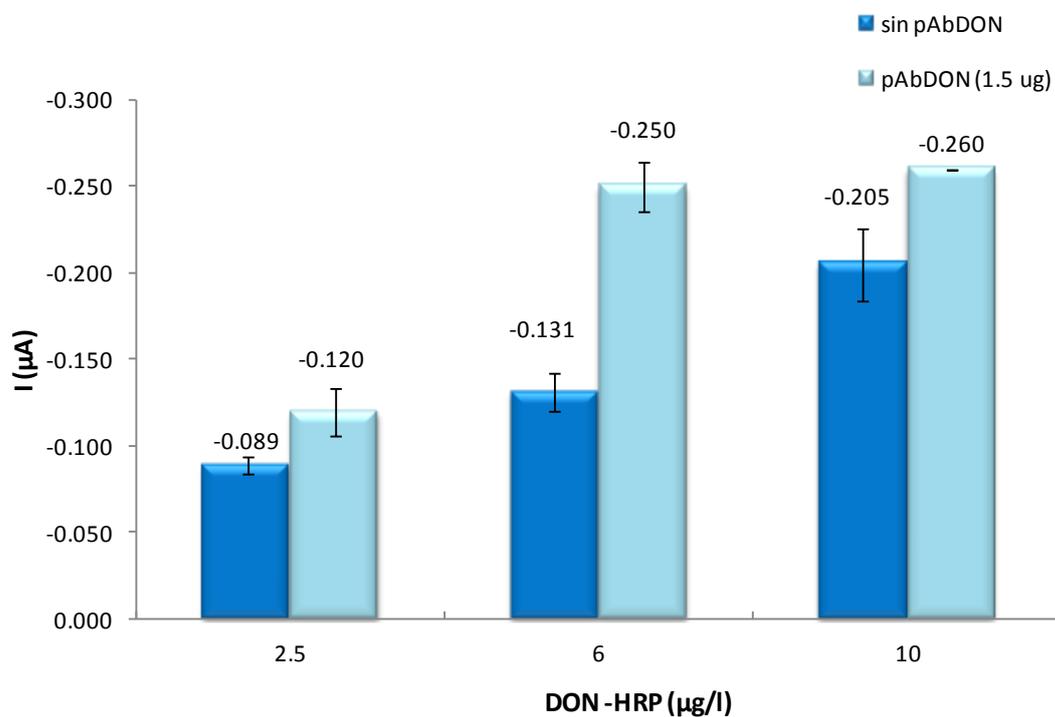
La **señal obtenida en presencia y ausencia de pAbDON fue muy similar**, por lo que se concluyó que el ensayo realizado sobre MBs-*algG* no es el adecuado para llevar a cabo el desarrollo del inmunosensor, es decir, **la unión inespecífica del conjugado enzimático con este tipo de MBs es elevada** (-0,166  $\mu\text{A}$  frente a -0,186  $\mu\text{A}$  de unión específica).

**- Afinidad del pAbDON sobre partículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilos (MBs-COOH):**

Después del estudio de la afinidad del pAbDON inmovilizado sobre diferentes tipos de MBs, obteniéndose resultados analíticamente poco favorables producidos por la baja diferencia de señal producida entre las experiencias que incluyen pAbDON y las que no, se procedió a utilizar partículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilos (MBs-COOH). Para la inmovilización del pAbDON sobre las MBs-COOH se realiza un enlace amida utilizando el reactivo EDC (procedimiento habitual de la carbodiimida).

En la optimización de la concentración de DON-HRP se trabajó con tres concentraciones diferentes (2,5, 6 y 10  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). La concentración de 6  $\mu\text{g l}^{-1}$  correspondía con la cantidad estequiométrica en relación a los moles de pAbDON inmovilizados sobre las MBs-COOH (5,926  $\mu\text{g l}^{-1}$  de DON-HRP) suponiendo una unión 1:1 entre el pAbDON y el DON durante la reacción de afinidad, y otras dos concentraciones, una por encima (10  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) y otra por debajo (2,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) del valor teórico anterior. Se evaluaron los resultados en presencia y ausencia del elemento de biorreconocimiento (pAbDON).

Las corrientes medidas para cada una de las concentraciones fueron:



**Figura 55:** Comparación de las corrientes obtenidos utilizando distintas concentraciones de DON-HRP, MBs-COOH (30  $\mu\text{g}$ ) en presencia y ausencia de pAbDON (1,5  $\mu\text{g}$ ).  $\Delta E_{C_{RA}}$  0 y -0,25 V

Se observó un aumento en las corrientes medidas al comparar las experiencias en presencia y ausencia de pAbDON, por lo que se puede asegurar que el pAbDON ha sido inmovilizado con la orientación adecuada sobre las MBs-COOH, y mantiene su afinidad hacia el DON-HRP.

La mayor diferencia de corriente en presencia y en ausencia del pAbDON, se observó para la concentración de DON-HRP de 6  $\mu\text{g l}^{-1}$ , que coincide con la concentración estequiométrica calculada para la concentración añadida de pAbDON en función de la capacidad teórica de unión de las MBs-COOH. Se produjo un aumento en la corriente medida del 47,6% entre la experiencia en ausencia y en presencia de pAbDON. Además

se puede asegurar que no sería necesario aumentar la concentración de DON-HRP en el ensayo ya que la señal permanece constante a partir de DON-HRP ( $6 \mu\text{g l}^{-1}$ ) que produce la saturación de los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado en las condiciones citadas. Por el contrario se obtuvo una alta señal de fondo ( $-0.131 \mu\text{A}$ ) en ausencia del anticuerpo, especialmente alta en la experiencia que incluye DON-HRP ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

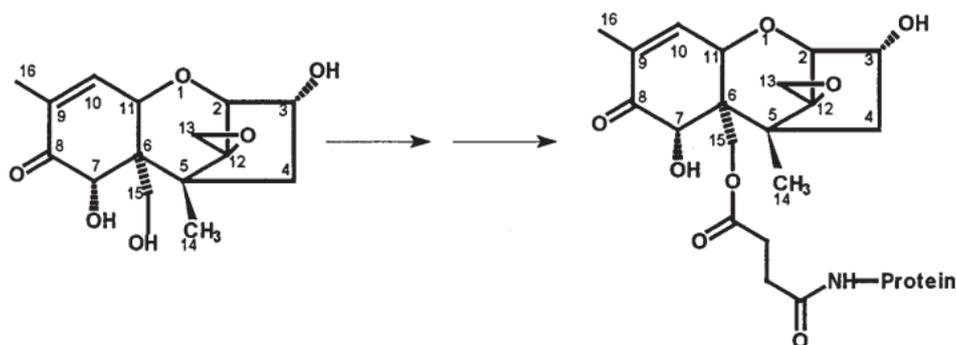
En el estudio de la afinidad del anticuerpo policlonal (pAbDON) con el conjugado DON-HRP sintetizado siguiendo el procedimiento 3.4.1 [101] se ha demostrado experimentalmente que **la reacción de biorreconocimiento de este anticuerpo policlonal no es adecuada** como base para un inmunosensor suficientemente sensible, específico y selectivo a esta micotoxina. El motivo ha sido la baja afinidad del anticuerpo policlonal hacia el DON una vez que éste ha sido conjugado a la HRP por el procedimiento explicado.

El DON requiere la introducción de un grupo carboxilo que pueda ser activado fácilmente para la unión covalente a los grupos amina contenidos en las proteínas portadoras formando enlaces amida muy estables. El **DON posee varios grupos funcionales disponibles** por lo que pueden realizarse diferentes reacciones químicas de conjugación para la formación de esta amida. Las más frecuentes han sido las que hacen uso de la N-hidroxisuccinimida (NHS), de las carbodiimidias solubles en agua (WSC) o través del 1,1,-carbodiimidazol (CDI) y de los anhídridos mixtos (MA) [270].

El 1,1'Carbonildiimidazol (CDI) es un reactivo de acoplamiento multifuncional que forma enlaces amida y carbamato no cargados y de longitud cero. El carboxilo y los grupos hidroxilo de moléculas diana se convierten fácilmente en un acilimidazol o imidazolcarbamato por reacción con el CDI. Estos intermedios son entonces reemplazado con nucleófilos tales como las aminas de las proteínas para formar enlaces covalentes estables. La reacción CDI por lo tanto, se debe complementar con una micotoxina que posea grupos carboxilo o hidroxilo (naturales o introducidos por otra reacción química de acoplamiento) [270].

Para que un anticuerpo sea capaz de reconocer de forma eficiente a un antígeno (DON en este caso) sería conveniente que el conjugado de DON utilizado en la inmunización del animal vivo para la obtención de los anticuerpos, tuviera la proteína portadora en la misma posición que el conjugado enzimático utilizado en los inmunoensayos y que debe reconocer dicho anticuerpo. Es decir, dado que las posiciones más activas del DON para la unión de grupos funcionales (o proteínas en este caso) son las posiciones 3 y 15, sería recomendable que los conjugados de DON utilizados tanto en la etapa de inmunización del animal como en el inmunosensor contuvieran la proteína o enzima unida por el mismo carbono.

Frecuentemente, se lleva a cabo una reacción donde se transforma el DON en 15-acetil-DON [271] para posteriormente conjugarlo en la posición 15 de forma selectiva con hemocianina y albúmina de sérica bovina donde el grupo NH-se origina a partir de un grupo amino primario de la proteína [67; 111].



**Figura 56: Conjugación de una proteína al DON mediante su posición [67]**

Este procedimiento implica el bloqueo previo del OH- de la posición 3, (el grupo OH- de la posición 7 no sería necesario debido a su baja reactividad) para que la única posición reactiva sea la del carbono 15.

Es preciso recordar que, tal como se ha explicado, el DON posee varios grupos funcionales desde los que se pueden unir por enlaces covalentes a moléculas de proteína [255].

En nuestro caso, el procedimiento seguido para la síntesis del DON-HRP se realizó en dos etapas. En primer lugar la HRP se añadió con los grupos sulfhidrilos protegidos de la unión de aminas que posteriormente se desprotegen por reacción con SATA. A continuación, los grupos -OH de deoxinivalenol hicieron reaccionar con el grupo isocianato del reactivo PMPI para formar un enlace carbamato. Por último se realizó una reacción entre la maleimida del deoxinivalenol-PMPI con los grupos -SH del conjugado HRP-SATA formando enlaces tioéter estables [101; 118]. En una comparativa de las bandas obtenidas por SDS-PAGE para HRP y deoxinivalenol-HRP, se observó que la formación de conjugado de HRP era evidente ya que se obtuvo una banda de peso molecular más alto que la de la HRP no conjugada. Sin embargo, no pudo determinarse el grado de carga de hapteno por SDS-PAGE, debido a las limitaciones en la resolución y el tamaño de la proteína grande en relación con la de la forma conjugada [228].

A la vista de los resultados obtenidos, **la síntesis realizada del conjugado de DON-HRP no fue selectiva en una de las posiciones**, por lo que el reconocimiento del pAbDON no fue correcto. En conclusión, el anticuerpo pAbDON D01F-1 lote 1, (Antiprot,

Aachen, Alemania) no es el adecuado para el reconocimiento específico y selectivo del conjugado DON-HRP que se ha sintetizado mediante los grupos OH disponibles del DON por el motivo de no coincidir con el conjugado utilizado como inmunógeno DON-BSA utilizado en la elicitación de la creación de este anticuerpo. Por otro lado, además de la difícil accesibilidad del DON (proveniente del DON-HRP), el conjugado DON-HRP se adsorbe inespecíficamente sobre las superficies sólidas (y sobre otras biomoléculas) utilizadas en el inmunosensor, tales como la superficie de los pocillos de poliestireno o las partículas magnéticas, debido a la activación producida por los reactivos de la síntesis (SATA y PMPI), que interfieren a la unión específica del anticuerpo. El exceso en la relación molar de HRP sobre el DON dificulta así mismo el biorreconocimiento del anticuerpo sobre la micotoxina.

Por estos motivos, **se decidió utilizar nuevos biorreactivos (anticuerpo y conjugado DON-HRP)** que permitieran por un lado un reconocimiento más eficiente del DON y DON-HRP por el anticuerpo y por otro que se evitaran uniones no específicas del conjugado enzimático sobre las MBs, los grupos funcionales que recubren estas MBs y en general todas las superficies sólidas del inmunosensor.

Aunque no siempre es así, en general los anticuerpos monoclonales suponen mayor afinidad, reproducibilidad y especificidad hacia el antígeno correspondiente, siempre que se escoja el conjugado enzimático del antígeno adecuado, que habrá de coincidir con el reconocimiento de los grupos funcionales de la propia molécula de antígeno (epítomos) tanto en este conjugado como en el utilizado como inmunógeno.

#### 4.2.2 Anticuerpo monoclonal

A la vista de los resultados obtenidos con el par formado por el pAbDON y el DON-HRP sintetizado en nuestro laboratorio, con los que se concluyó que la afinidad entre ellos se producía con un bajo rendimiento, y con altas uniones inespecíficas por parte de la HRP sobre las superficies sólidas de trabajo (diferentes funcionalizaciones de MBs), se decidió estudiar la afinidad entre nuevos pares de biorreactivos (anticuerpos y DON-HRP).

Después de una recopilación de la disponibilidad de diferentes anticuerpos comerciales y posibilidades de conjugación del DON compatibles, y de ensayos previos con varios de ellos (ELISA convencional), los mejores resultados analíticos previos se dieron con el anticuerpo monoclonal mAbDON de R-Biopharm IB12 (tipo IgG1 procedente de ratón, R-Biopharm, Darmstadt, Alemania) y el conjugado enzimático DON-HRP (5121DONCO/NN6994, Europroxima, Holanda) procedente de un *kit*

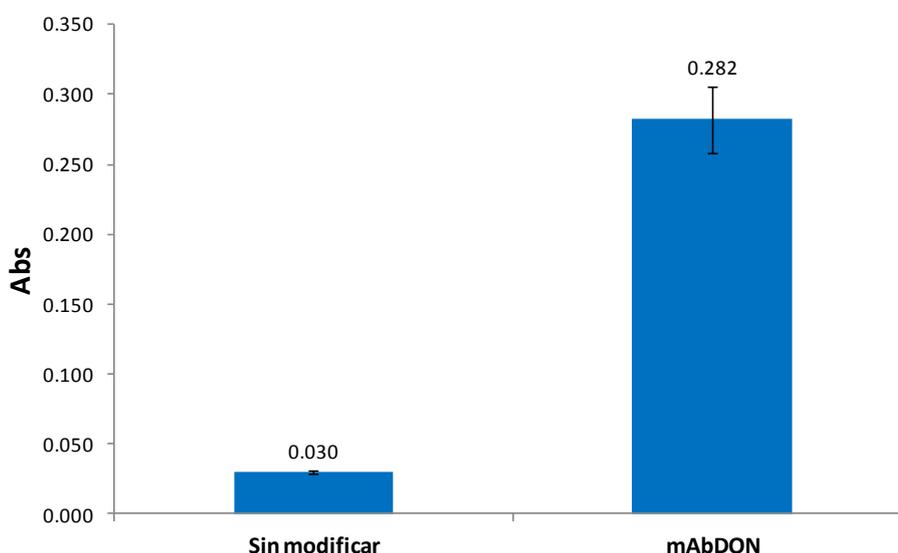
comercial ELISA de esta casa comercial (*kit* 5121DON, Europroxima, Holanda). La calidad de estos reactivos, que se encuentran purificados por cromatografía de afinidad, produjo a priori buenos resultados.

En los apartados posteriores se muestran los resultados del estudio analítico del anticuerpo mAbDON (R-Biopharm) combinado con el conjugado enzimático DON-HRP (Europroxima), y su utilización en nuevos inmunosensores del DON.

#### 4.2.2.1 Estudio de la afinidad (mAbDON) mediante ELISA convencional

En primer lugar se estudió la afinidad del mAbDON (R-Biopharm) mediante procedimientos ELISA convencionales de inmunoensayo, utilizando competitivamente DON-HRP (Europroxima). Para ello se realizaron incubaciones antígeno-anticuerpo en un tiempo optimizado de 60 min utilizando 50  $\mu$ l del DON-HRP sobre los pocillos de la placa ELISA directamente sin modificar, y sobre los pocillos modificados con mAbDON ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ) en tampón CB durante 24 h a 4 °C. Con esta experiencia se evaluó la unión inespecífica del DON-HRP sobre el pocillo de poliestireno y la afinidad del mAbDON por el DON-HRP.

Los resultados se representan en la figura 57:



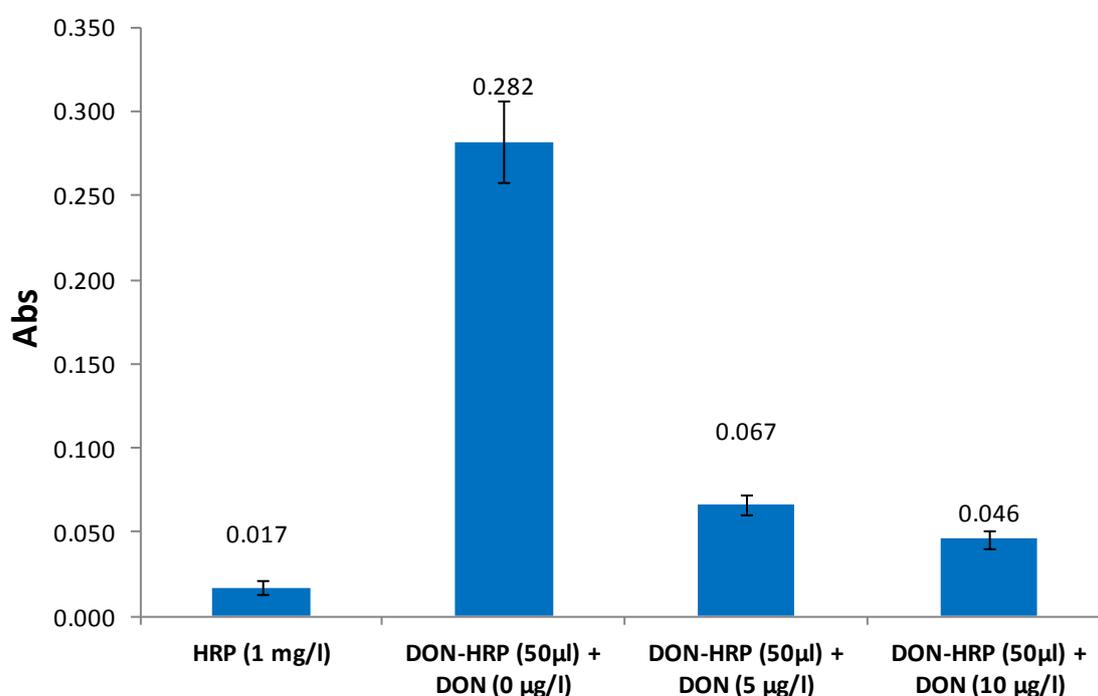
**Figura 57: Absorbancias obtenidos en ELISA añadiendo DON-HRP (50  $\mu$ l Europroxima), 60 min de incubación sobre pocillo sin modificar y con inmovilización de mAbDON ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ) en tampón CB durante 24 h a 4 °C**

Estos resultados fueron muy satisfactorios, encontrándose que la unión inespecífica observada del DON-HRP sobre el pocillo (sin bloquear) fue muy baja (0,030 unidades

de absorbancia). De igual modo, se comprobó que existe una alta reacción de afinidad entre el mAbDON y el DON-HRP (0,282 unidades de absorbancia), existiendo un biorreconocimiento específico del anticuerpo hacia el DON-HRP.

Para comprobar si la propia HRP presenta unión inespecífica hacia el mAbDON, sobre los pocillos modificados con mAbDON ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ) en tampón CB durante 24 h a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , se utilizó un patrón de HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) y se incubó sobre este pocillo en las mismas condiciones (para descartar uniones inespecíficas del enzima HRP sobre el mAbDON) y se llevó a cabo una experiencia competitiva utilizando mAbDON ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ) inmovilizado sobre los pocillos, y DON-HRP ( $50 \text{ } \mu\text{l}$  Europroxima) junto con patrones de DON ( $0, 5 \text{ y } 10 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ ) durante 60 min de competición.

Los resultados se han representado en la figura 58:



**Figura 58: Absorbancias obtenidas por ELISA añadiendo HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) o DON-HRP ( $50 \mu\text{l}$  Europroxima) 60 min incubación sobre pocillos con mAbDON inmovilizado ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ) en tampón CB durante 24 h a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$**

En primer lugar se observó que la HRP no se une inespecíficamente sobre el mAbDON, dado que la absorbancia obtenida (0,017 unidades de absorbancia) es muy pequeña (es decir, prácticamente ausencia de HRP que produzca la aparición de absorbancia con el sustrato). Por otro lado, en comparación con la absorbancia en ausencia de DON (unión del DON-HRP al anticuerpo inmovilizado sobre el pocillo), la presencia de concentraciones crecientes de DON provoca disminuciones de absorbancia debidas a la competitividad de la micotoxina en la unión sobre los sitios disponibles de

anticuerpo. Con respecto a la experiencia sin inhibición con DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), la disminución de la absorbancia medida es del 76% para  $5 \mu\text{g l}^{-1}$  de DON y de un 83% para  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  de DON.

Con los resultados obtenidos con medidas por ELISA espectrofotométrico en las condiciones indicadas, se demostraron varios hechos importantes para un inmunosensor: **el mAbDON (R-Biopharm) reconoce al DON y al DON-HRP satisfactoriamente y se demostró una alta reacción de afinidad por el DON-HRP (Europroxima) y una casi despreciable unión inespecífica de la HRP sobre el mAbDON**, lo que indica en primer lugar que el mAbDON y DON-HRP son puros y se unen por su afinidad mutua, al contrario de lo que ocurrió con el pAbDON (de ahí todos los problemas derivados de uniones inespecíficas). Además la síntesis del conjugado enzimático comercial utilizado y la purificación posterior es correcta ya que no se ha observado un exceso de la HRP sobre el DON viendo que el conjugado no se puede unir inespecíficamente ni sobre el pocillo ni sobre el mAbDON, tal y como se observó en el caso del DON-HRP sintetizado por el procedimiento SATA-PMPI.

Por todas estas primeras conclusiones **se decidió seguir utilizando estos nuevos biorreactivos y su posterior optimización para el diseño de nuevos inmunosensores**, descartando en el futuro el uso del pAbDON y del DON-HRP sintetizado en nuestro laboratorio, por los problemas analíticos descritos en los apartados anteriores.

#### 4.2.2.2 Partículas magnéticas (MBs) en el desarrollo y optimización de un ELISA inmunomagnético

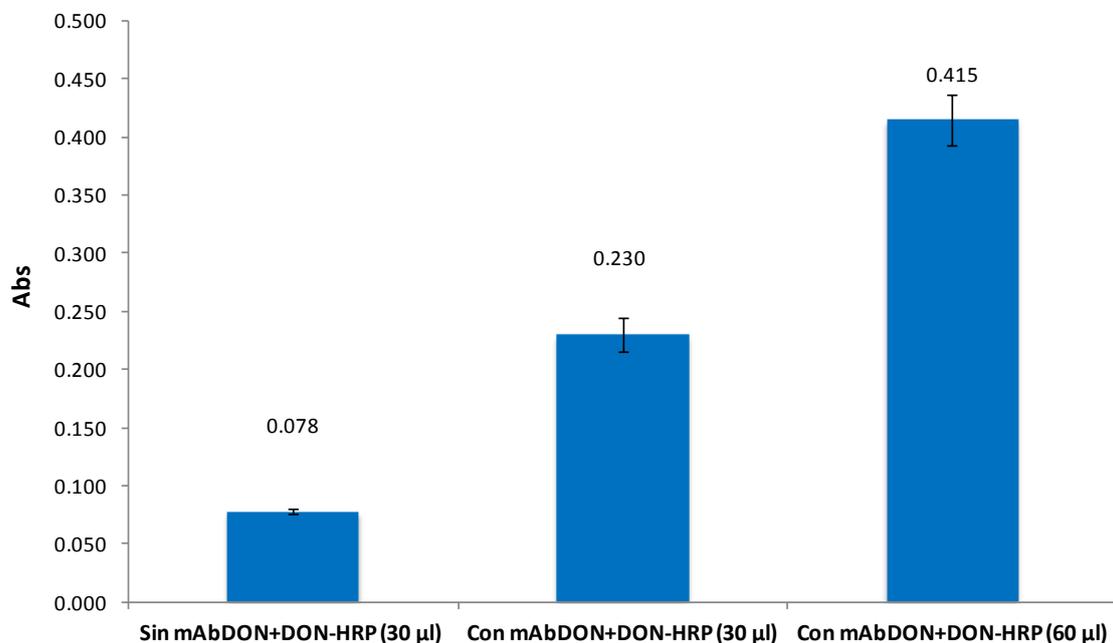
Una vez comprobado que el mAbDON inmovilizado sobre los pocillos de poliestireno reconoce correctamente y con alta selectividad tanto al DON libre provocando una reacción competitiva, como al DON del conjugado enzimático (DON-HRP, Europroxima) se procedió a la inmovilización del anticuerpo sobre diferentes tipos de MBs para estudiar las más adecuadas para su uso en un inmunosensor magnético.

En primer lugar se ensayaron MBs funcionalizadas con grupos tosilo (MBs-To), por la sencillez de unión covalente con proteínas a través de su grupo amino (sin necesidad de reactivos adicionales, como en el caso del procedimiento de la carbodiimida).

Para evaluar la posible adsorción de la HRP sobre las MBs-To sin modificar se añadió DON-HRP ( $30 \mu\text{l}$ ) sobre MBs-To ( $5 \mu\text{g}$  por experiencia), en ausencia de mAbDON. Además se incubó durante 60 minutos DON-HRP ( $30$  y  $60 \mu\text{l}$ ) sobre MBs-To-mAbDON (inmovilización del mAbDON ( $6 \mu\text{g}$ ), sobre  $10 \mu\text{l}$  de MBs-To durante 24 h (Apartado

3.4.3.2) quedando finalmente en el pocillo 5  $\mu\text{g}$  de MBs-To-mAbDON en cada experiencia.

Los resultados con los tipos de MBs-To indicadas se recogen en la figura 59:



**Figura 59: Absorbancias obtenidos utilizando MBs-To (5  $\mu\text{g}$ ) en presencia y ausencia de mAbDON (0,1  $\mu\text{g}$  por experiencia), DON-HRP (30 o 60  $\mu\text{l}$ ) durante 60 min**

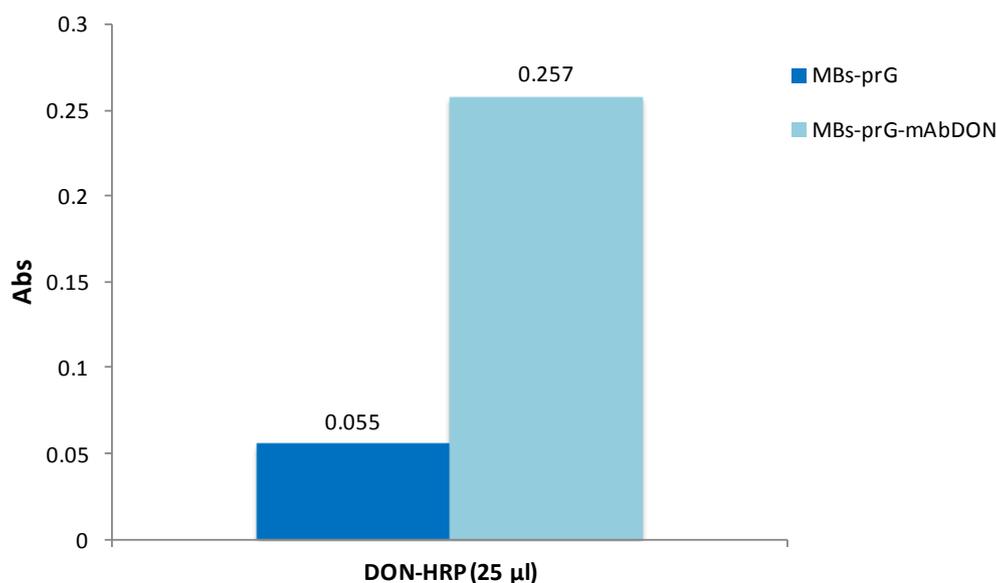
A partir de los resultados obtenidos puede decirse que el mAbDON (R-Biopharm) inmovilizado sobre las MBs-To es capaz de reconocer satisfactoriamente al DON-HRP, obteniéndose además un aumento proporcional de la señal con el aumento de la cantidad de DON-HRP durante la incubación (en otros ensayos se observó saturación de los sitios libres de unión del anticuerpo para esta cantidad de DON-HRP) y una baja adsorción de la HRP (Abs = 0,078) sobre los grupos tosilo no modificados con anticuerpo.

Se evaluaron además otros tipos de partículas magnéticas para tener una comparativa y poder seleccionar las MBs con mejores resultados analíticos. Como consecuencia de ensayos previos con diferentes tipos de MBs y de anticuerpos realizados en el grupo de investigación, y por sus características, **se estudiaron MBs funcionalizadas con proteína G (MBs-prG)**, donde la proteína G se une con gran afinidad a la región  $F_c$  de anticuerpo procedentes de ratones, como es el caso del mAbDON, dejando así su parte  $F_{ab}$  hacia el exterior y mejor expuesta a las uniones de afinidad con el DON.

Nuevamente se comprobó tanto la afinidad como la aparición de adsorciones inespecíficas de la HRP sobre la proteína G, realizando una incubación durante 60

minutos de DON-HRP (25  $\mu$ l) sobre las MBs-prG (5  $\mu$ g) en ausencia de mAbDON y sobre MBs-prG-mAbDON (inmovilización del mAbDON (2,4  $\mu$ g), sobre 10  $\mu$ l de MBs-prG durante 10 min (Apartado 3.4.3.5), quedando finalmente en el pocillo 5  $\mu$ g de MBs-prG-mAbDON.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 60:

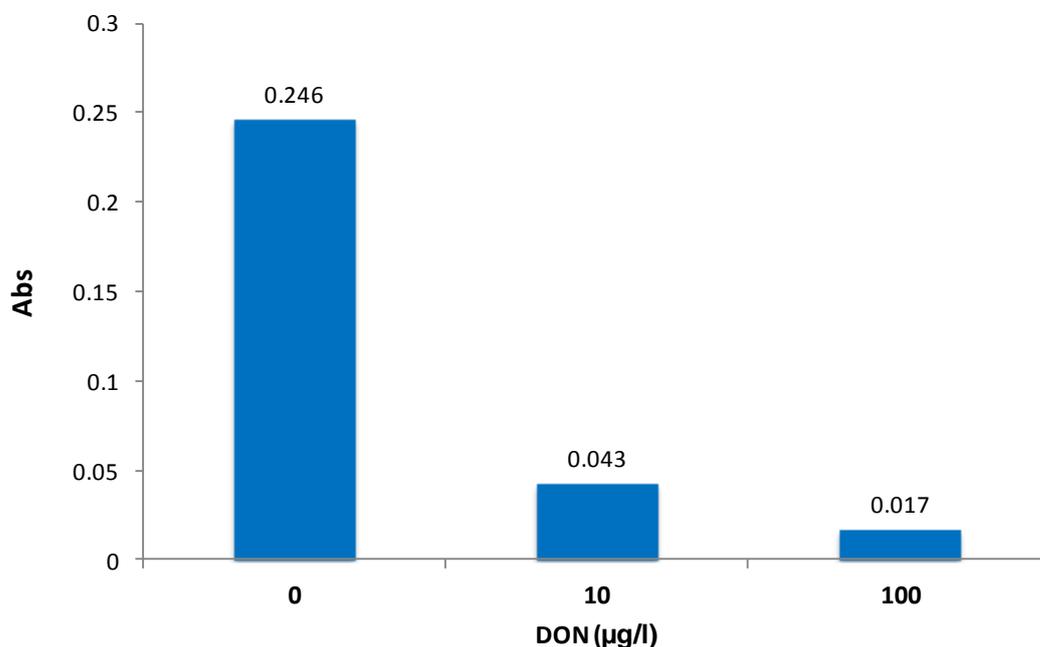


**Figura 60: Absorbancias obtenidos utilizando MBs-prG (5  $\mu$ g) en presencia y ausencia de mAbDON (0,04  $\mu$ g por experiencia), DON-HRP (25  $\mu$ l, Europroxima) durante 60 min**

Se observó que del mAbDON no disminuye su afinidad por el DON-HRP una vez inmovilizado sobre las MBs-prG, y se ha obtenido una mayor absorbancia para la experiencia con MBs-prG que con MBs-To pese a utilizar menor cantidad de mAbDON acorde con la capacidad de unión de cada una de las partículas magnéticas (capacidad de unión 20  $\mu$ g Ab/mg MBs en las MBs-To frente a 8  $\mu$ g Ab/mg MBs de las MBs-prG), y por consiguiente también menor cantidad de DON-HRP en las condiciones comprobadas de saturación (defecto de anticuerpo sobre DON-HRP), lo que pone de manifiesto que la correcta inmovilización del mAbDON sobre este tipo de partículas (MBs-prG) y la mayor eficiencia de reconocimiento del anticuerpo al encontrarse inmovilizado de forma orientada.

La absorbancia obtenida añadiendo DON-HRP (25  $\mu$ l) sobre las MBs-prG en ausencia de mAbDON fueron menores que en el caso de las MBs-To con iguales cantidades de MBs y de DON-HRP, lo que además significa una menor afinidad (inespecífica) de la proteína G hacia el enzima HRP (unida al DON).

En el estudio de reacción competitiva del DON-HRP en presencia de micotoxina libre, se llevó a cabo la competición durante 60 minutos con DON (10 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), utilizando MBs-prG (5  $\mu\text{g}$ ) con inmovilización de mAbDON (0,04  $\mu\text{g}$ ).



**Figura 61: Absorbancias obtenidos utilizando en cada experiencia MBs-prG (5  $\mu\text{g}$ ) con mAbDON 0,04  $\mu\text{g}$ ), reacción de competición de DON-HRP (25  $\mu\text{l}$ ) y DON (0, 10 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) durante 60 min**

En las absorbancias de esta figura (Figura 61), se observa una disminución progresiva de la señal con concentraciones crecientes del DON en comparación con la absorbancia en ausencia no competitiva del DON (0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), siendo esta disminución del 82,5% para DON (10  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) y de un 93,1% para DON (100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

Además dentro del grupo de investigación se consideraron otros tipos de MBs (MBs-COOH, MBs-NH<sub>2</sub>, MBs-algG), que no mejoraron las propiedades de las MBs-prG habiendo efectuado similares ensayos previos de adsorción inespecífica, unión (afinidad) del anticuerpo y competitividad.

En conclusión, la inmovilización del mAbDON sobre MBs funcionalizadas con proteína G se produjo de forma mucho más eficiente (mayor cantidad de anticuerpo en relación a los grupos activos y capacidad de unión), que sobre las MBs con grupos tosilo y obteniendo además menores adsorciones no específicas de los grupos reactivos de estas MBs sobre el enzima HRP, con unas propiedades de biorreconocimiento mejores hacia el DON y DON etiquetado debido a la inmovilización orientada del anticuerpo sobre la proteína G.

Adicionalmente, la inmovilización del anticuerpo requiere mucho menos tiempo en el caso de la proteína G (10 minutos) que con respecto al grupo tosilo (24 horas), siendo

éste más reactivo hacia las proteínas y en consecuencia hacia la HRP. Por estos motivos, **para el desarrollo y optimización del inmunosensor se escogió las MBs-prG por sus mejores resultados analíticos.**

### **4.3 OPTIMIZACIÓN Y DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR DIRECTO COMPETITIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL**

Para el diseño del inmunosensor magnético competitivo directo (transducción electroquímica y óptica) para la determinación cuantitativa de DON se optimizaron cada una de las siguientes variables que influyen en sus propiedades analíticas:

1. Cantidad del mAbDON inmovilizado sobre las MBs-prG
2. Cantidad ( $\mu\text{g}$  totales) de partículas magnéticas (MBs-prG) en cada experiencia
3. Dilución del conjugado enzimático DON-HRP
4. Tiempo de la etapa de competición
5. Temperatura de la etapa de competición
6. Etapas de separación y lavado (número de lavados, presencia de tensoactivos para evitar atracciones hidrofóbicas como Tween-20, agitación)
7. Optimización de la transducción óptica y electroquímica (revelado enzimático amplificado).

Como se ha expuesto en el apartado anterior, se seleccionaron las MBs-prG por sus buenas propiedades con los biorreactivos utilizados en el inmunosensor de DON. En primer lugar, una de las optimizaciones más importantes es la de la cantidad de sitios de unión de anticuerpo (que puede variarse por la cantidad de MBs modificadas añadidas al ensayo o con la cantidad de anticuerpo inmovilizado sobre las mismas) en relación a la concentración competitiva de DON-HRP en el ensayo. Por ejemplo, un gran exceso de anticuerpo monoclonal en relación al conjugado enzimático haría que la competitividad del DON apareciera con mayores concentraciones, mientras que pequeñas cantidades de anticuerpo (con las consiguientes menores cantidades estequiométricas de DON-HRP) harían al inmunosensor más sensible pues menores concentraciones de DON comenzarían a inhibir y disminuir la señal medida.

Sin embargo, aún con mayores cantidades de anticuerpo, la sensibilidad de los inmunosensores que hemos desarrollado se encuentra **muy por debajo de las**

**concentraciones máximas permitidas de DON por la legislación europea (entre 200 y 1750  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  según el Reglamento 1126/2007 [272]).** La ventaja de la gran sensibilidad conseguida frente a la requerida por la legislación, como se verá más adelante, es que tras la extracción de la muestra, ésta podrá diluirse en mayores volúmenes de tampón PBS, disminuyendo sustancialmente los efectos provocados por las matrices naturales de las muestras de cereales, y teniendo así un menores influencias (proporciones) de disolventes orgánicos, utilizado en la extracción.

A continuación se detallan las diferentes experiencias de estas optimizaciones, que se llevaron a cabo tanto con mELISA como utilizando detección electroquímica.

#### **4.3.1 mELISA utilizando partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G:**

En los inmunosensores competitivos que hemos desarrollado, podemos encontrar tres secuencias diferenciadas. La primera, la inmovilización del anticuerpo sobre la superficie sólida de las MBs, la segunda la etapa de competición entre DON y DON-HRP sobre los sitios de unión del anticuerpo monoclonal, y la tercera la transducción analítica de la señal (óptica o electroquímica).

Nuestro objetivo fue el desarrollo de inmunosensores competitivos directos para el DON utilizando partículas magnéticas, tanto con transducción espectrofotométrica UV-Visible (lo denominaremos mELISA) como electroquímica usando detección amperométrica (lo denominamos Inmunosensor electroquímico). Mientras que la primera secuencia es común a los inmunosensores estudiados con los biorreactivos pAbDON y el conjugado DON-HRP sintetizado, en la segunda se utilizaron placas ELISA convencionales de poliestireno de 96 pocillos en el propio inmunoensayo competitivo para hacerla común a ambos tipos de transducción.

La utilización de los pocillos para llevar a cabo la etapa de competición (en lugar de viales independientes), con sus correspondientes etapas de reacciones de afinidad, separaciones y lavados, tiene la ventaja de que pueden llevarse a cabo simultáneamente hasta un número de 96 reacciones (por ejemplo en calibrados simultáneos para determinaciones en alimentos), de forma homogénea, y sin problemas añadidos (por ejemplo posibles adsorciones no específicas o efectos de la matriz sobre las superficies porosas de las tintas de serigrafiado en el caso de realizar las incubaciones directamente sobre electrodos SPCEs). El uso de partículas magnéticas que pueden ser confinadas bajo la acción de un campo magnético facilita enormemente el trabajo, y mejora la eficacia de todas las separaciones que han de llevarse a cabo (el rendimiento de separación magnética alcanza el 100 % de retención de las MBs). Si bien las optimizaciones del propio inmunoensayo se realizaron por lo

tanto sobre los pocillos para ambos inmunosensores, algunas de las variables optimizadas son diferentes dependiendo del tipo de transducción, por ejemplo una cantidad excesiva de MBs podría apantallar las medidas electroquímicas en la transducción amperométrica, al dificultar la velocidad de transferencia de carga de los mediadores electroquímicos generados enzimáticamente ( $\rho$ BQ).

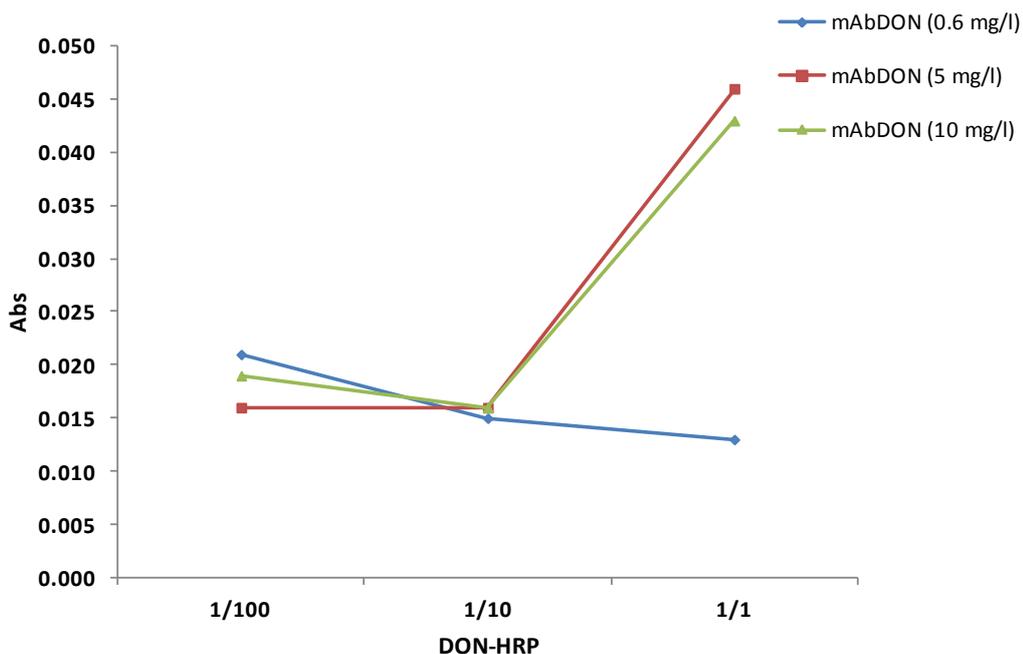
El mELISA permite además, previamente al inmunosensor electroquímico, conocer la reactividad del mAbDON una vez inmovilizado sobre las MBs-prG, la extensión de la reacción de biorreconocimiento, la estequiometría y los valores de inhibición competitiva para diferentes cantidades relativas de conjugado y de anticuerpo (que van a depender de la modulación de la sensibilidad que requerimos para el inmunosensor en base a los requerimientos de la legislación aplicable), y en general conocer las mejores condiciones de la competición.

#### **4.3.1.1 Optimización de la concentración del mAbDON inmovilizado sobre las MBs-prG**

La primera variable estudiada fue la concentración de mAbDON a inmovilizar sobre las MBs-prG. Las especificaciones técnicas de las MBs-prG contemplan una capacidad de unión teórica de 8  $\mu$ g de anticuerpo por cada miligramo utilizado de MBs-prG.

La concentración de mAbDON según la capacidad de unión teórica de las MBs-prG (se partió de 10  $\mu$ l) es de 5 mg l<sup>-1</sup>, que se corresponde con 2,4  $\mu$ g de mAbDON. Se ensayaron tres concentraciones diferentes de mAbDON (0,6; 5 y 10 mg l<sup>-1</sup>), sobre 10  $\mu$ l de MBs-prG, y se inmovilizó durante un tiempo de 10 minutos siguiendo el procedimiento detallado en el Apartado 3.4.3.5. De forma cruzada, para cada una de estas cantidades de anticuerpo se midieron las absorbancias correspondientes a tres diluciones diferentes (1/100, 1/10 y 1/1) del conjugado enzimático DON-HRP (Europroxima) en PBS (0,1 M, pH 7,4) con el objetivo de ver la pareja de concentraciones que proporcionaba la mayor sensibilidad.

Las absorbancias obtenidas se muestran en la figura 62:



**Figura 62: Optimización de la dilución óptima de DON-HRP (1/100, 1/10 y 1/1 en PBS (0,1 M, pH 7,4)) y de la concentración de mAbDON (0,6; 5 y 10 mg l<sup>-1</sup>), inmovilizado sobre MBs-prG (5 µg), Tiempo de incubación: 60 min**

Según los resultados de la figura 62, el uso de una concentración pequeña de mAbDON (0,6 mg l<sup>-1</sup>), inferior a la capacidad de unión teórica de las MBs-prG, es insuficiente y proporciona absorbancias muy pequeñas aún con la mayor concentración de DON-HRP.

Para cantidades mayores de anticuerpo (5 y 10 mg l<sup>-1</sup>), se observó la saturación (máxima señal, igual en ambos casos) con diluciones de DON-HRP de 1/1 (v/v) (máxima concentración disponible) lo que indica que **los sitios de unión de anticuerpo ya se encuentran saturados en el caso intermedio (5 mg l<sup>-1</sup>)**, y que mayor cantidad de anticuerpo (10 mg l<sup>-1</sup>) no permite unirse mayor cantidad de conjugado enzimático al encontrarse en este caso en gran exceso el anticuerpo frente al DON-HRP en defecto (dilución máxima 1/1, v/v). Para evitar un gasto innecesario y trabajar con un gran exceso de anticuerpo que haría al inmunosensor menos sensible (con 10 mg l<sup>-1</sup> de mAbDON, el DON podría unirse directamente al mAbDON en exceso sin competir con el DON-HRP), se seleccionó como valor óptimo de anticuerpo para las MBs-prG la concentración de mAbDON de 5 mg l<sup>-1</sup> (equivalente a 2,4 µg totales de mAbDON para la cantidad total de MBs utilizada).

No obstante, evaluando las absorbancias obtenidas, aun utilizando la máxima concentración de DON-HRP (1/1, v/v) se observó que estos valores son demasiado pequeños (Abs ≈ 0,045), lo que conlleva baja sensibilidad y pequeñas disminuciones

del porcentaje de absorbancia posibles con concentraciones competitivas crecientes de DON.

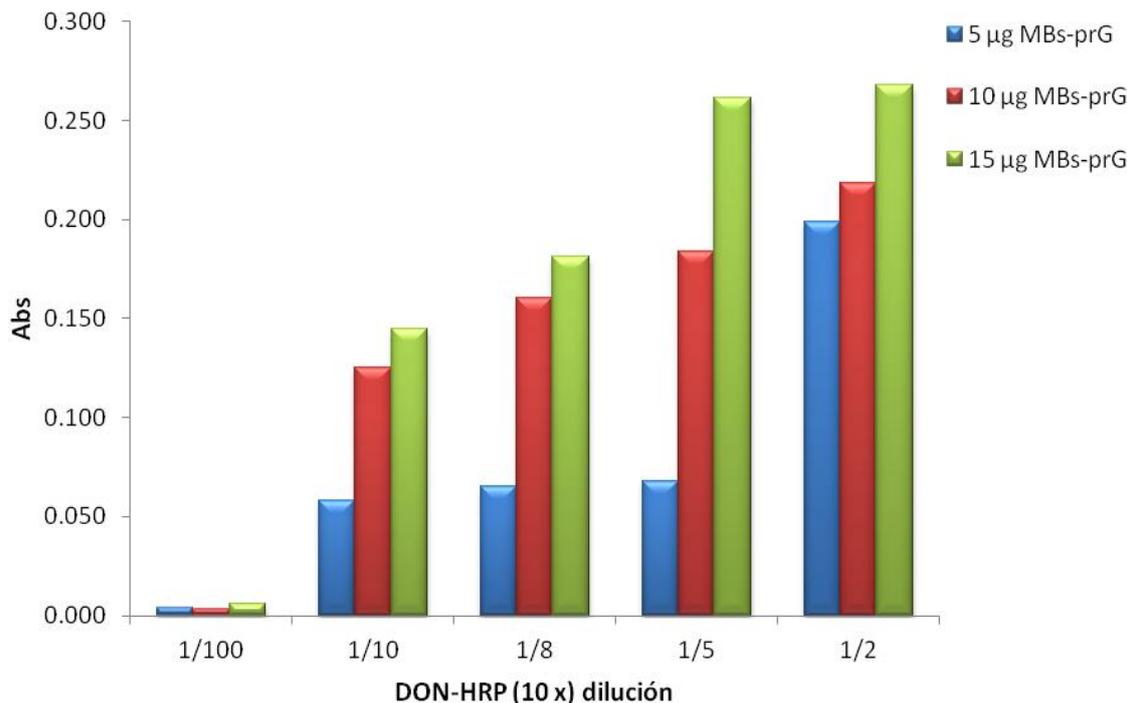
Ante este problema, se precisó de un nuevo conjugado de la misma casa comercial (Europroxima) pero con una mayor concentración, que permitiera aumentar las señales. Se consiguió un nuevo conjugado enzimático, con el mismo número de lote de fabricación (mismas características analíticas) pero concentrado diez veces más (lo denominaremos **DON-HRP (10x)**). En lo sucesivo y a lo largo de todo el trabajo presentado en esta tesis se utilizó este conjugado enzimático DON-HRP (10x), que como veremos más adelante nos proporcionó resultados satisfactorios.

#### **4.3.1.2 Optimización de la dilución del conjugado enzimático DON-HRP (10x):**

Con este nuevo conjugado enzimático DON-HRP (10x), se realizó un estudio completo del rango de diluciones con los valores de 1/100, 1/10, 1/8, 1/5, y 1/2 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4), y se midieron las absorbancias para tres cantidades de MBs-prG-mAbDON (5, 10 y 15 µg), manteniendo constante la cantidad (2,4 µg) de mAbDON inmovilizado sobre las MBs-prG en todos los casos.

Las cantidades de MBs-prG corresponden con los microgramos de partículas magnéticas que se usaron finalmente en cada experiencia y no con la cantidad utilizada durante la inmovilización del anticuerpo. Es decir, la inmovilización se realizó según el procedimiento habitual (10 µl de MBs-prG + 2,4 µg de mAbDON, en 500 µl) y se tomaron diferentes volúmenes según las cantidades de MBs-prG necesarias. Para que los volúmenes finales de reacción fueran iguales y evitar problemas de diferencias en las diluciones del DON-HRP (10x), en lo sucesivo se ajustaron en el pocillo todos los volúmenes finales a 100 µl en PBS (0,1 M, pH 7,4).

Los resultados de las experiencias anteriores sobre la nueva optimización de las cantidades cruzadas de anticuerpo y conjugado enzimático competitivo se representan en la figura 63:



**Figura 63: Optimización de la dilución óptima de DON-HRP (10x) (diluciones 1/100, 1/10, 1/8, 1/5, y 1/2 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4), para 3 cantidades de MBs-prG (5, 10 y 15 µg) con mAbDON (2,4 µg, 5 mg l<sup>-1</sup>), Tiempo de incubación: 60 min**

La señal de absorbancia medida para la experiencia con DON-HRP (10x) dilución 1/10 (v/v), utilizando una cantidad total de 5 µg de MBs-prG, coincide con la absorbancia Abs=0,050 con dilución 1/1 (v/v) del conjugado descrito en el apartado anterior (Figura 62), por lo que se aseguró que el nuevo DON-HRP (10x) es del mismo lote de conjugado enzimático y que tiene una concentración (no facilitada por Europroxima) 10 veces superior a la anterior.

El DON-HRP (10x) permitió obtener mayores absorbancias (y mayor porcentaje de disminución de la señal en presencia de DON, es decir, mayor competición) para cantidades de MBs-prG iguales a las utilizadas con el conjugado enzimático diluido diez veces. La absorbancia máxima de 0,275 unidades se obtiene aproximadamente igual para la experiencia con **15 µg de MBs-prG y DON-HRP (10x) con dilución 1/5 (v/v), que con dilución 1/2 (v/v), logrando una saturación de la señal de absorbancia** medida con lo que se consigue una disminución importante del gasto de DON-HRP sin provocar variación en esta señal máxima.

La finalidad de la experiencia anterior fue evaluar la dilución óptima del conjugado enzimático, seleccionándose una dilución de DON-HRP (10x) de 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4), en primer lugar y 15 µg de MBs-prG con mAbDON inmovilizado (2,4 µg). No obstante, estas mismas proporciones óptimas pueden variarse en función de la

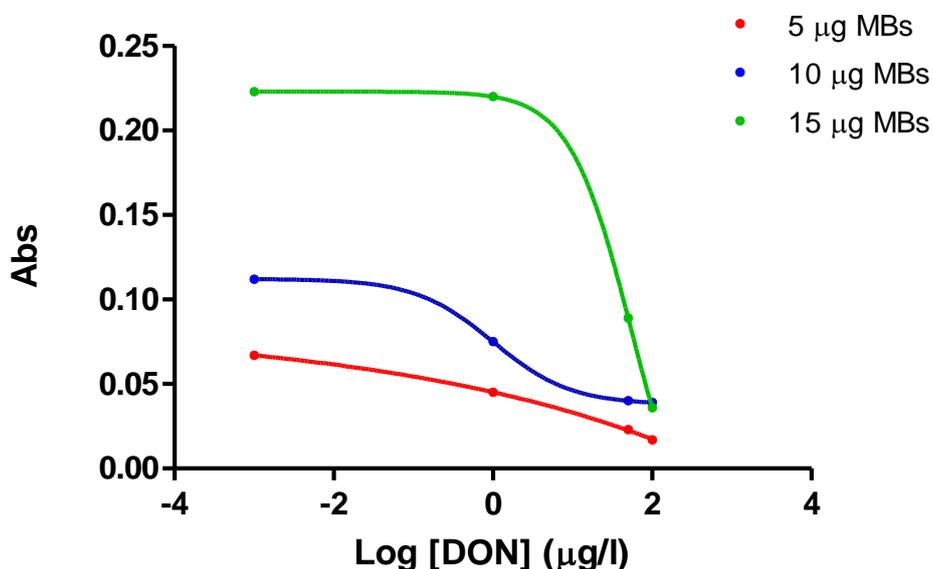
sensibilidad requerida, dentro de las mismas proporciones mutuas (anticuerpo vs conjugado).

#### 4.3.1.3 Optimización de la cantidad de partículas magnéticas (MBs-prG-mAbDON)

Una vez fijada la cantidad de mAbDON a inmovilizar ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ , equivalente a  $2,4 \text{ } \mu\text{g}$  durante la inmovilización) sobre las MBs-prG y seleccionada la dilución óptima de DON-HRP (10x) 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4), se procedió a estudiar la cantidad óptima de MBs-prG ( $\mu\text{g}$  totales) para cada ensayo y para diferentes concentraciones de DON.

Para ello se llevó a cabo la reacción de competición modificando la concentración de DON (calibrado de 0 a  $100 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ ) y una concentración fija de DON-HRP (10x) ( $25 \text{ } \mu\text{l}$ , dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)) durante 60 minutos para tres cantidades de MBs-prG diferentes, comprendidas entre 5 y  $15 \text{ } \mu\text{g}$  con la concentración óptima de mAbDON inmovilizada ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) en cada caso.

Los resultados se muestran en la figura 64. El ajuste sigmoideo se realizó siguiendo el modelo de correlación de 4 parámetros logísticos (4PL), modelo que describe de forma adecuada una inhibición competitiva como la que ocurre en el inmunosensor.



**Figura 64:** Optimización de la cantidad óptima de MBs-prG (5, 10 o 15  $\mu\text{g}$ ) con mAbDON ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ), reacción de competición de DON-HRP 10x ( $25 \text{ } \mu\text{l}$ , dilución 1/5 (v/v)) durante 60 min

En todos los casos, se observa una disminución de la absorbancia con concentraciones competitivas crecientes de la micotoxina, con un mayor porcentaje de disminución de

la señal (84,3%) al utilizar 15  $\mu\text{g}$  de MBs, provocada por una mayor unión de DON-HRP debido a que hay una mayor cantidad de mAbDON en el pocillo. Se comprobó además que este aumento de absorbancia con el aumento de la cantidad de MBs-prG es debido únicamente a la unión específica de mayores cantidades de DON-HRP (10x) sobre el mAbDON inmovilizado, y no debido por ejemplo a la dispersión producida por las partículas magnéticas en suspensión dentro del pocillo.

Para este estudio se midió la absorbancia producida por la reacción con el TMB (20 min) a 450 nm de MBs-prG-mAbDON (5, 10 y 15  $\mu\text{g}$ ) en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  de tampón PBS (0,1 M, pH 7,4) en ausencia de DON-HRP. Las absorbancias obtenidas de este estudio fueron valores próximos a cero en todos los casos, por lo que pudo asegurarse que no existe dispersión producida por las MBs-prG durante la medida espectrofotométrica de las absorbancias moleculares.

Se ensayó la posibilidad de conseguir un aumento de la absorbancia incrementando la cantidad de MBs-prG en cada ensayo, o comprobar si al utilizar 15  $\mu\text{g}$  la señal se estabiliza por saturación (anteriormente se ha concluido que no es necesario aumentar la concentración de mAbDON inmovilizado ni la concentración de DON-HRP (10x) ya que las señales permanecen constantes en este valor máximo). Se llevó a cabo el estudio aumentando la cantidad de MBs-prG hasta 25 y 50  $\mu\text{g}$ , reaccionando con DON-HRP (10x) (25  $\mu\text{l}$  con dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)) durante 60 min, y posterior revelado espectrofotométrico con TMB (20 min).

Los resultados obtenidos fueron:

25  $\mu\text{g}$  de MBs-prG-mAbDON  $\rightarrow$  Abs = 0,249

50  $\mu\text{g}$  de MBs-prG-mAbDON  $\rightarrow$  Abs = 0,305

Por lo tanto, si se quieren conseguir mayores absorbancias habría que aumentar la cantidad de MBs-prG-mAbDON en cada experiencia dado que la señal no se estabiliza, sino que sigue aumentando. Este hecho, en principio no es posible por la limitación de la cantidad de reactivos que se disponen y por el gasto económico que supone, pero además del riesgo existente en el uso de demasiada cantidad de anticuerpo que provoca que la competición se produzca con mayores concentraciones de DON, y por lo tanto se pierda sensibilidad del inmunosensor.

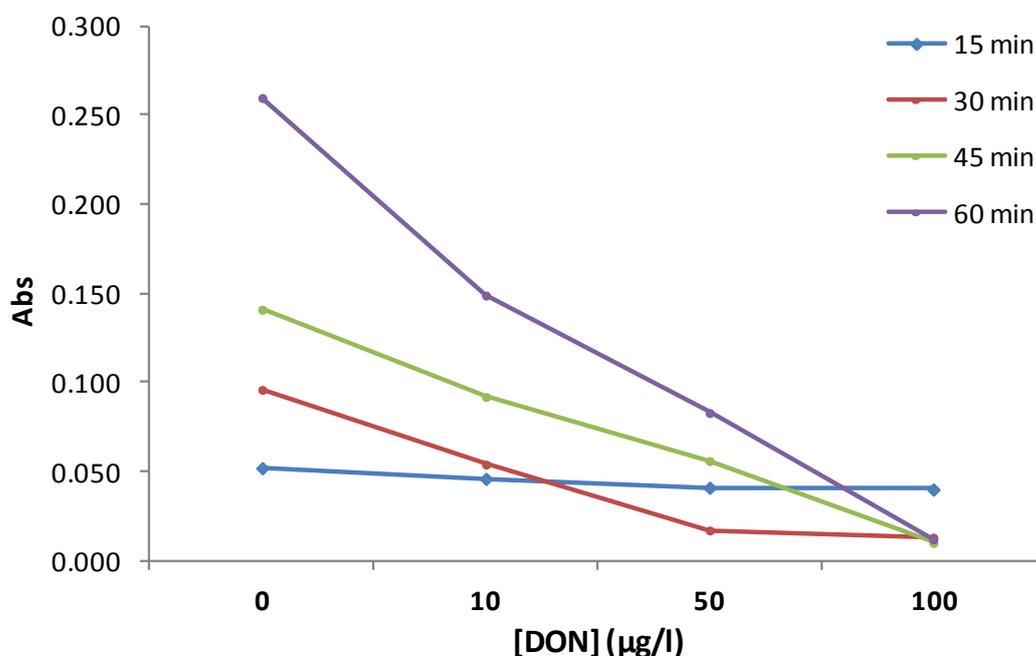
Por estas razones, para experiencias posteriores **se fijó la cantidad óptima de MBs en 15  $\mu\text{g}$ .**

#### 4.3.1.4 Optimización del tiempo de la etapa de competición:

En este esquema de inmunosensor competitivo directo que se ha diseñado, el anticuerpo se inmoviliza por afinidad sobre las MBs-prG y se lleva a cabo una reacción competitiva entre el DON libre y el DON-HRP. El tiempo de la etapa de competición entre el DON y DON-HRP y el anticuerpo es una variable muy importante a tener en cuenta, ya que durante este tiempo de competición el DON presente en la muestra debe ser capaz de unirse al mAbDON desplazando competitivamente al DON-HRP unido al mismo anticuerpo. Si el tiempo de la etapa de competición es demasiado largo podría producirse un aumento de la unión inespecífica (especialmente del conjugado enzimático sobre las MBs), obteniéndose una señal más elevada y una menor competición. En los apartados anteriores se utilizó un tiempo de incubación contante de 60 minutos, que podría considerarse *a priori* suficiente para los volúmenes de biorreactivos utilizados, aunque este valor se ha optimizado.

Manteniendo constante el resto de las variables anteriores ya optimizadas, se realizaron calibrados competitivos con DON-HRP (10x) (25  $\mu$ l con dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)) y DON (0 – 100  $\mu$ g l<sup>-1</sup>) sobre MBs-prG-mAbDON (15  $\mu$ g) durante 15, 30, 45 y 60 minutos, y posterior revelado con TMB (20 min).

Los calibrados competitivos se recogen en la figura 65:

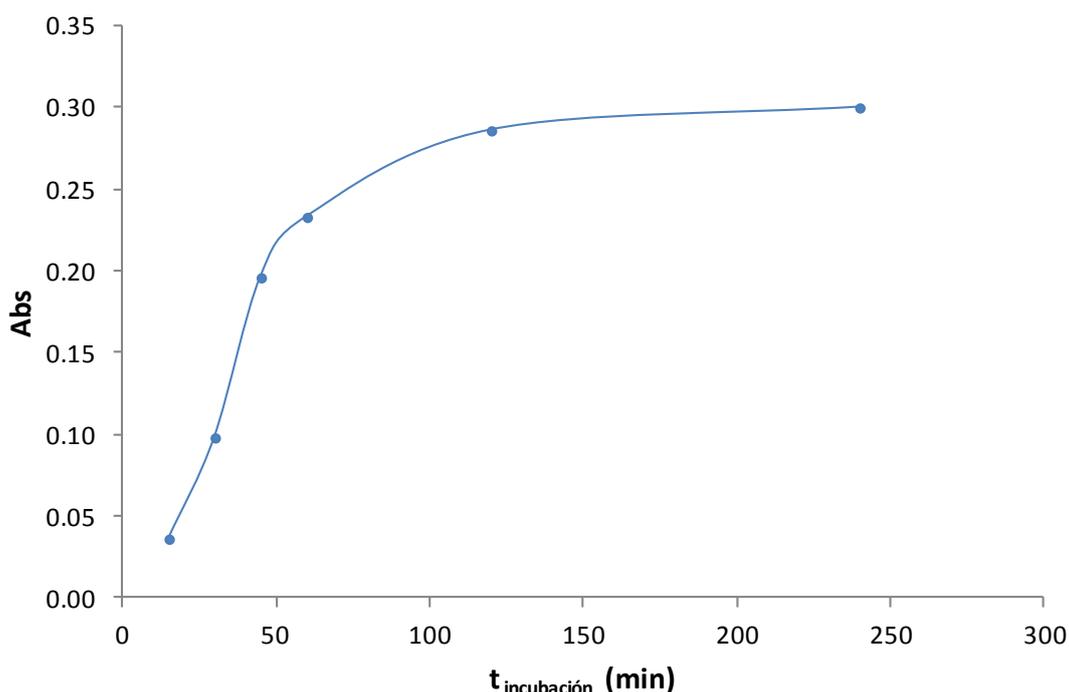


**Figura 65:** Calibrados en función del tiempo de competición (15-60 min) con MBs-prG (15  $\mu$ g) inmovilización de mAbDON (5 mg l<sup>-1</sup>), reacción de competición de DON-HRP 10x (25  $\mu$ l, dilución 1/5 (v/v)) y DON (0-100  $\mu$ g l<sup>-1</sup>)

A la vista de los resultados puede considerarse que 15 minutos es un tiempo insuficiente para la unión del anticuerpo a ambos antígenos, obteniéndose una señal pequeña y constante.

Para los tiempos de competición de 30, 45 y 60 minutos sí se observa la unión del conjugado y la disminución de la señal competitiva a mayores concentraciones de DON libre, teniendo las mayores señales para un tiempo de incubación de 60 minutos, probablemente tan grande debido a una cinética lenta del anticuerpo (en condiciones similares, para otros anticuerpos y micotoxinas hemos encontrado que tiempos de incubación de 30 minutos suelen ser suficientes). Con este tiempo, la diferencia de absorbancias entre la señal máxima y la mínima (inhibición del 0% y 100%) tiene un valor porcentual del 98%, que es adecuado para un calibrado competitivo.

Se ensayaron adicionalmente tiempos superiores a 60 minutos (entre 15 y 240 min) para comprobar el valor máximo de absorbancia con mayores tiempos de incubación, utilizando DON-HRP (10x) (25  $\mu$ l con dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)) sobre MBs-prG-mAbDON (15  $\mu$ g), y un revelado posterior con TMB (20 min).



**Figura 66: Optimización del tiempo de competición (15-240 min) con MBs-prG (15  $\mu$ g) inmovilización de mAbDON (5 mg l<sup>-1</sup>), reacción de incubación de DON-HRP 10x (25  $\mu$ l, dilución 1/5 (v/v))**

La estabilidad de la señal en su valor máximo (Abs = 0,280 aproximadamente) se obtiene en un tiempo de 120 minutos (2 horas), a partir del cual la absorbancia permanece prácticamente constante. Realizar una reacción de competición durante 2

horas supone un importante retraso en cada determinación de DON, dejando así de ser un dispositivo rápido de medida. Otro de los riesgos de utilizar tiempos tan largos es que pueden aumentar notablemente las uniones inespecíficas, apareciendo en este caso problemas analíticos importantes.

Por estos motivos, **se reoptimizó la cantidad de MBs-prG-mAbDON para cada ensayo, junto con la dilución de DON-HRP y el tiempo de competición**, buscando una situación de compromiso entre el consumo de reactivos y de tiempo, y los buenos resultados de sensibilidad y de competición. La alta sensibilidad del inmunosensor en relación a las concentraciones límite requeridas por la legislación permite también en este sentido la solución de compromiso mencionada.

En la tabla adjunta (tabla 17) se resumen los resultados para tres tiempos de competición en el intervalo entre 30 y 120 minutos, experiencias competitivas con DON (0 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en las que se combina un menor gasto de MBs-prG-mAbDON (15  $\mu\text{g}$ ) aumentando la concentración de DON-HRP (10x) realizando una dilución de 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4), o el uso de mayor cantidad de MBs-prG-mAbDON (20  $\mu\text{g}$ ) con una mayor dilución (menor concentración) de DON-HRP (10x), realizando una dilución de 1/10 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4).

DON-HRP (10x)						
Dilución 1/5				Dilución 1/10		
t. comp	MBs-prG	DON (0 $\mu\text{g/l}$ )	DON (100 $\mu\text{g/l}$ )	MBs-prG	DON (0 $\mu\text{g/l}$ )	DON (100 $\mu\text{g/l}$ )
30 min	15 $\mu\text{g}$	0,184	0,066	20 $\mu\text{g}$	0,133	0,049
60 min	15 $\mu\text{g}$	0,248	0,061	20 $\mu\text{g}$	0,152	0,058
120 min	15 $\mu\text{g}$	0,282	0,066	20 $\mu\text{g}$	0,222	0,062

**Tabla 17: Optimización de la dilución óptima de DON-HRP 10x (1/5 y 1/10 en PBS (0,1 M, pH 7,4)), para 2 cantidades de MBs-prG (10 y 15  $\mu\text{g}$ ) con mAbDON (5  $\text{mg l}^{-1}$ ). Tiempos de incubación: 30-120 min.**

Evaluando los resultados de la tabla 17 se observó que la mayor sensibilidad se consigue aumentando el tiempo hasta 120 minutos, y combinando MBs-prG-mAbDON (15  $\mu\text{g}$ ) y DON-HRP (10x) con dilución de 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4), lo que supondría aumentar el tiempo de competición al doble (120 min), con los inconvenientes que se han resaltado anteriormente.

Valorando el resto de experiencias y buscando una situación de compromiso entre sensibilidad y coste económico, se decidió seleccionar como condiciones óptimas:

- MBs-prG-mAbDON (15  $\mu\text{g}$ ) con mAbDON (5  $\text{mg l}^{-1}$ )
- DON-HRP (10x) con dilución de 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)
- Tiempo de competición: 60 min

La sensibilidad en las condiciones seleccionadas es aproximadamente igual que la obtenida con el doble de tiempo (120 minutos) y el porcentaje de disminución de las señales es aproximadamente 76% para las 2 experiencias. Por supuesto, la sensibilidad en estas condiciones es suficiente para la aplicación del inmunosensor en la determinación de DON dentro de los límites establecidos por la legislación europea (entre 200 y 1750  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  según Reglamento 1126/2007) [272].

#### 4.3.1.5 Optimización de la temperatura de la etapa de competición:

La temperatura de incubación antígeno-anticuerpo en un inmunoensayo es una variable importante, que puede afectar a la reactividad del anticuerpo en la etapa de biorreconocimiento competitivo del DON y del conjugado DON-HRP. Dado que la temperatura de funcionamiento natural de los anticuerpos en los organismos vivos es de aproximadamente 37 °C, en numerosos inmunoensayos utilizan esta temperatura como óptima, por ejemplo en algunos *kits* ELISA comerciales (*kit* de Europroxima para FB1), variable que depende sobre todo de la reactividad y constante de afinidad del anticuerpo.

En las especificaciones del mAbDON utilizado no se incluyen recomendaciones en cuanto a la temperatura óptima de trabajo, por lo tanto se comparó la reactividad del mAbDON a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) y a 37 °C.

Para este estudio, se midió la absorbancia después de 60 minutos de incubación a 25 °C y a 37 °C entre MBs-prG-mAbDON (15  $\mu\text{g}$ ) y DON-HRP (10x) (25  $\mu\text{l}$  con dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)), y posterior revelado con TMB (20 min).

TEMPERATURA	
Incubación	Abs
25 °C	0,233
37 °C	0,223

**Tabla 18: Resultados de la optimización de la temperatura de competición (25 y 37° C)**

La reactividad del mAbDON de R-Biopharm objeto del estudio disminuye con el aumento de la temperatura de reacción hasta 37 °C, por lo tanto se fijó la temperatura utilizada durante las etapas de competición en 25 °C, lo que además simplifica el procedimiento del inmunoensayo.

#### 4.3.1.6 Optimización de las etapas previas de bloqueo

Es habitual en los procedimientos de inmunoensayo prever la alta capacidad de adsorción de moléculas orgánicas y proteínas sobre las superficies sólidas utilizadas, que conducirían a resultados erróneos, por lo que es preciso en la mayoría de los casos procedimientos de bloqueo que eliminen estas uniones inespecíficas. Comercialmente se encuentran disponibles diversos tampones, con propiedades definidas, cuya finalidad es **bloquear la superficie de los pocillos de poliestireno de las placas ELISA** para evitar que los biorreactivos se adhieran, como son el tampón *Superblock Blocking* o el tampón *Protein Free Blocking* de la casa comercial Pierce [185], ambos compuestos principalmente de tampón fosfato salino (PBS) y tampón tris salino (TBS) que incluyen agentes bloqueantes. Ambos son especialmente eficaces en el bloqueo de microplacas de poliestireno, según sus especificaciones técnicas.

En el caso del tampón *Protein Free Blocking* está libre de compuestos proteicos muy útil en los casos en lo que se aprecia unión inespecífica de proteínas del ensayo con el tampón de bloqueo. El tampón *Superblock Blocking* sí contiene compuestos proteicos pero está exento de inmunoglobulinas, albúmina o biotina endógena, que lo hace compatible en muchas situaciones en las que los agentes de bloqueo tradicionales fallan [185].

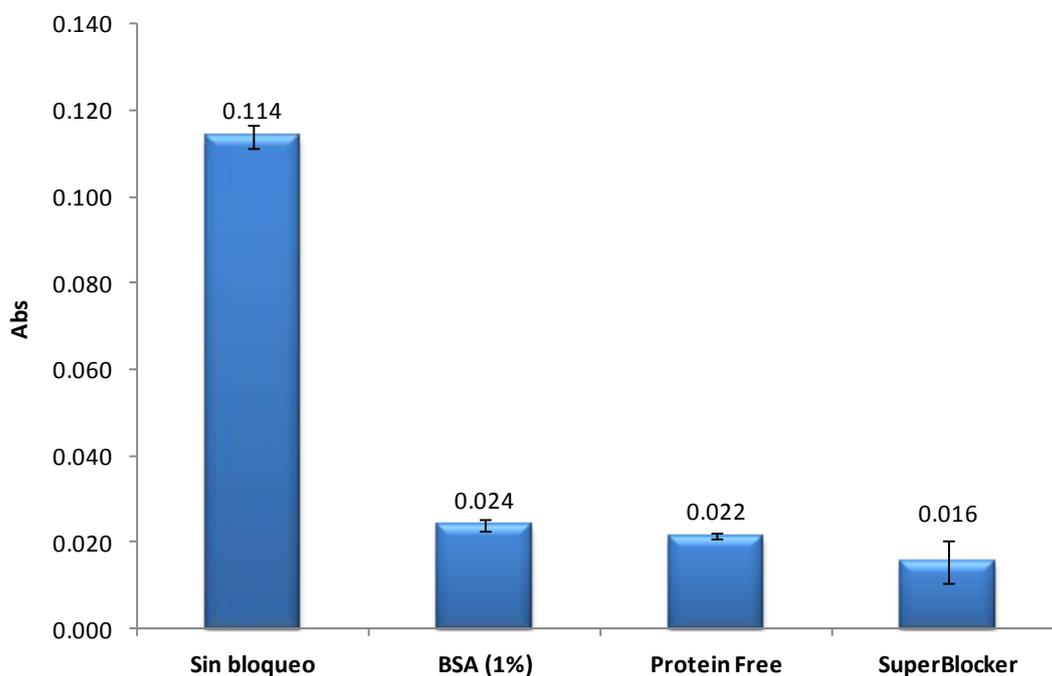
Uno de los procedimientos más utilizados, sin duda, es utilizar disoluciones con un alto contenido (0,01 a 5% m/v) de proteínas como albúmina sérica bovina, BSA (1%) o caseína, con el mismo fin [57; 67]. En algunos tipos de MBs, como es el caso de las MBs-To las especificaciones técnicas recomiendan también un bloqueo con BSA (0,1%, m/v) tras la inmovilización del anticuerpo y como tampón de almacenamiento con el objetivo de cubrir los sitios libres de unión que no han sido ocupados por el anticuerpo. En las especificaciones de las MBs-prG no aparece esta recomendación, y una vez probada no se encontraron diferencias, por lo que se obvió bloquear las MBs modificadas o utilizar BSA para su almacenamiento.

En el estudio de la inespecificidad producida por la HRP del conjugado enzimático de Europroxima DON-HRP (10x) sobre los pocillos así como sobre el mAbDON inmovilizado en los pocillos e inmovilizado sobre MBs-To o sobre MBs-prG se

obtuvieron unas absorbancias de 0,033; 0,078 y 0,055 respectivamente, valores muy próximos a la absorbancia de base en ausencia del DON-HRP. Este apartado pretende realizar la comparativa entre la necesidad de bloquear previamente el pocillo de poliestireno de la placa o de si por el contrario no se obtienen resultados significativamente diferentes.

Para comprobar la necesidad de bloqueo sobre los pocillos utilizados para las incubaciones (placas ELISA de poliestireno) se llevaron a cabo experiencias incubando durante 60 minutos una disolución de HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  en PBS 0,1 M pH 7,4), directamente sobre los pocillos sin bloquear, y sobre pocillos bloqueados con 300  $\mu\text{l}$  BSA (0,1% m/v en PBS 0,1 M pH 7,4, durante 1 h seguido de 2 lavados con PBS 0,1 M pH 7,4) y con los tampones *Protein Free Blocking* (bloqueo con 300  $\mu\text{l}$  por pocillo durante 1 h seguido de 2 lavados con PBS 0,1 M pH 7,4) y *SuperBlocker Blocking* (bloqueo con 300  $\mu\text{l}$  por pocillo durante 3 veces, y desechar inmediatamente, seguido de 2 lavados con PBS 0,1 M pH 7,4), en todos los casos en ausencia de mAbDON. Cabe destacar que para el ensayo se utilizó HRP y no el conjugado DON-HRP del cual no se facilitó su concentración por parte de la casa comercial.

Los resultados se muestran en la figura 67:



**Figura 67:** Incubación de HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) durante 60 minutos directamente sobre los pocillos sin bloquear, y bloqueando con BSA (0,1% m/v en PBS 0,1 M pH 7,4) y con *Protein Free Blocking* y *SuperBlocker Blocking*

De esta experiencia se dedujo que el uso de bloqueantes sobre el pocillo previamente a la adición de los biorreactivos para la etapa competitiva evita posibles uniones inespecíficas de la HRP que se añadió en gran concentración con respecto a la añadida en el desarrollo del inmunosensor.

Se observó que cuando el pocillo está sin bloquear la señal producida por la HRP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) fue de 0,114 unidades de absorbancia, mientras que en los pocillos que se utiliza alguno de los tampones de bloqueo se obtuvo una absorbancia mucho menor (en torno a 0,020 unidades de absorbancia). La señal disminuye, aproximadamente igual para todos ellos (disminución 82%), siendo el mejor bloqueante el tampón *SuperBlocker Blocking* que hace que la señal disminuya un 86% y en menor tiempo.

Se **seleccionó para el trabajo posterior el tampón *SuperBlocker Blocking*** dado que es el más rápido (añadir 300  $\mu\text{l}$  y desechar, 3 veces, sin la espera de 60 minutos necesarios en el *Protein Free Blocking*) y es con el que se obtuvo la menor absorbancia debida a la HRP.

#### 4.3.1.7 Optimización de las etapas de separaciones y lavados

Para la etapa de separación, aprovechando las propiedades magnéticas de las MBs debidas a su núcleo de ferrita, se utilizó un separador magnético (Figura 15) diseñado para placas ELISA de 96 pocillos con fondo plano, con el que se consigue una eliminación rápida y sencilla del sobrenadante de muestras inmovilizadas sobre partículas magnéticas de forma simultánea para los 96 pocillos, en comparación con la separación realizada anteriormente en viales *ependorf* individuales y con imanes independientes. Además este separador magnético, logra una retención más reproducible en los 96 pocillos de la placa, y mejora la recuperación y pureza de los biorreactivos inmovilizados por la facilidad con la que se elimina el sobrenadante con los reactivos en exceso o no unidos a las MBs.

Una separación magnética eficiente y un proceso de lavado correctos después de la etapa de competición asegura una mayor precisión y exactitud en las determinaciones del inmunoensayo, evitando pérdidas de reactivos inmovilizados sobre las MBs y una mejora en la pureza del ensayo, reduciendo además las interferencias y las uniones inespecíficas o los posibles efectos de las matrices de las muestras.

Para la correcta separación magnética tras la colocación de la placa ELISA sobre el imán, se permaneció un tiempo constante de 1 minuto después de cada lavado, con el fin de separar eficientemente las MBs y de forma reproducible. Con 1 minuto de

separación se observa visualmente como las MBs se compactan en el centro del pocillo. Se ensayaron mayores tiempos de separación obteniéndose que 1 minuto es suficiente ya que no se mejoraron los resultados.

Para las etapas de lavado y apoyándonos en la experiencia previa del grupo de investigación, después de la etapa de competición se realizaron dos lavados con el **agente tensoactivo tween-20 (0,1% m/v en PBS 0,1 M pH 7,4)** seguido de un último lavado con PBS (0,1 M pH 7,4).

Según la bibliografía con el uso de tensoactivos en los lavados se consigue eliminar casi la totalidad de HRP no reaccionada [273; 274], evitando así el uso adicional de tampones de bloqueo, que aumentarían el precio del inmunosensor, las etapas de trabajo y el riesgo de uniones no específicas sobre los componentes del bloqueante [275]. Su finalidad es **evitar las atracciones hidrofóbicas**, al aumentar el contenido iónico del medio.

En la tabla 19 se recogen los resultados obtenidos en la incubación durante 60 minutos de 100  $\mu\text{l}$  de DON-HRP (10x, dilución 1/5 en PBS 0,1 M pH 7,4) y de 100  $\mu\text{l}$  de incubación con HRP (1  $\text{mg l}^{-1}$  en PBS 0,1 M pH 7,4) directamente sobre los pocillos sin bloquear, y bloqueando con BSA (0,1% m/v en PBS 0,1 M pH 7,4, con 300  $\mu\text{l}$  por pocillo durante 1 h seguido de dos lavados con PBS 0,1 M pH 7,4) y con los tampones *Protein Free Blocking* (bloqueo con 300  $\mu\text{l}$  por pocillo durante 1 h seguido de 2 lavados con PBS 0,1 M pH 7,4) y *SuperBlocker Blocking* (bloqueo con 300  $\mu\text{l}$  por pocillo tres veces, y desechando inmediatamente el contenido, seguido de dos lavados con PBS 0,1 M pH 7,4), en todos los casos en ausencia de mAbDON.

Después de la incubación se realizaron dos lavados con tampón PBST (tween-20 (0,1% m/v en PBS 0,1 M pH 7,4) seguido de una último lavado con PBS (0,1 M pH 7,4). Los resultados se muestran en la tabla 19:

BLOQUEOS				
	Sin bloqueo	BSA (1%)	Protein Free	SuperBlocker
DON-HRP (10x dil 1/5)	0,008	0,009	0,007	0,005
HRP (1 $\text{mg l}^{-1}$ )	0,011	0,008	0,009	0,008

**Tabla 19: Comparativa de absorbancias obtenidas después de 2 lavados con PBST y 1 lavado con PBS (0,1 M pH 7,4) para DON-HRP (10x dil 1/5 (v/v)) y HRP (1  $\text{mg l}^{-1}$ ) depositados sobre los pocillos sin bloquear y bloqueando con BSA, tampón Protein Free y tampón Superblocker.**

A la vista de los resultados, si se realizan lavados con PBST (0,1%, m/v) en lugar de realizar los lavados únicamente con PBS (0,1 M) después de la etapa de

incubación/competición se llega a la conclusión de que no es necesario utilizar bloqueantes en los pocillos. La absorbancia medida, tanto para la incubación de la HRP como del DON-HRP (10x) en los casos en los que se ha realizado un bloqueo previo son comparables con las experiencias sin bloqueo (incubación directa sobre el pocillo), y despreciables en todos los casos ( $Abs < 0,011$ ).

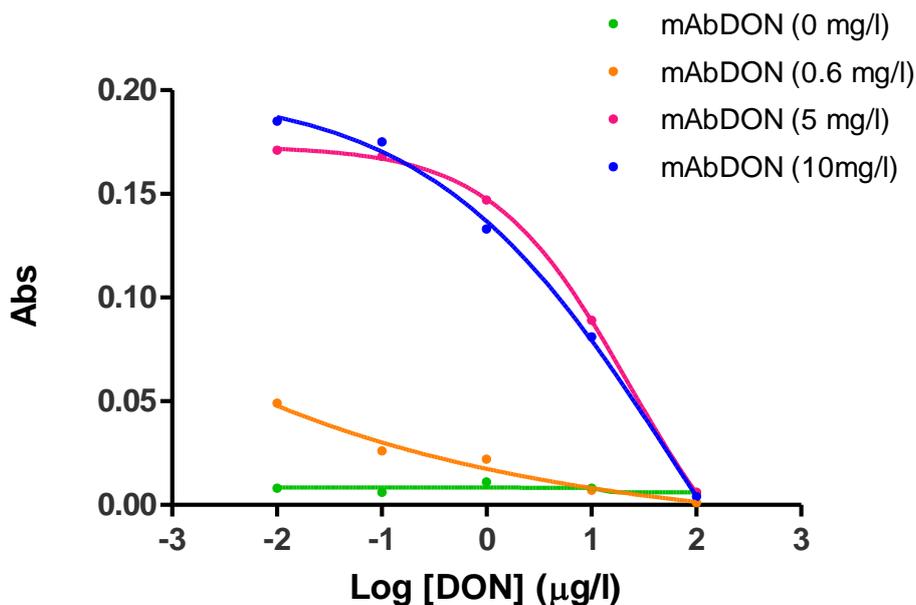
Una vez vistos los resultados obtenidos, y con el fin de disminuir etapas en el inmunosensor y reducir gastos de reactivos que no son necesarios, en el futuro no se llevó a cabo ningún bloqueo previo de los pocillos antes de las etapas de medida del inmunoensayo, a la vez que los lavados se realizaron siempre siguiendo el mismo protocolo de forma reproducible: **2 lavados de 1 minuto cada uno con tampón PBST (tween-20 0,1% m/v en PBS 0,1 M pH 7,4) seguido de un último lavado de 1 minuto con PBS (0,1 M pH 7,4)**. El tiempo de separación se fijó en 1 minuto, tiempo suficiente para observar la separación eficiente de las MBs sobre el imán.

#### **4.3.1.8 Comprobación de las condiciones óptimas en la etapa de competición:**

Todas las condiciones anteriores fueron optimizadas con el conjugado enzimático concentrado, DON-HRP (10x) excepto la cantidad de mAbDON que ya se había evaluado previamente con el DON-HRP original del *kit* de Europroxima. En el apartado de optimización de la dilución de DON-HRP (10x) pudo comprobarse que el conjugado enzimático concentrado era el mismo que el original del *kit* (mismo lote de producción 5121DONCO/NN6994) y se correspondía con una concentración 10 veces superior (Apartado 4.3.1.2).

Una vez optimizadas y fijadas las variables indicadas que influyen en las medidas del inmunosensor, se comprobó la influencia de la variación de la concentración de mAbDON inmovilizado sobre las MBs-prG. En este ensayo se realizó una competición durante 60 min a 25 °C, en el intervalo de DON (0 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), con DON-HRP 10x (25  $\mu\text{l}$ , dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M)) y MBs-prG (15  $\mu\text{g}$ ) realizando la inmovilización de mAbDON (0 a 10  $\text{mg l}^{-1}$ ), a temperatura ambiente y durante 10 minutos siguiendo el protocolo de inmovilización sobre las MBs-prG (Apartado 3.4.3.5).

Los calibrados competitivos obtenidos se representan en la figura 68:



**Figura 68:** Calibrados en las condiciones de inmunoensayo óptimas en función de la concentración de mAbDON.

Las conclusiones son similares a las obtenidas en el apartado de optimización de la concentración de mAbDON inmovilizado (Figura 62). En la experiencia en ausencia de mAbDON inmovilizado [mAbDON (0 mg l<sup>-1</sup>)], no existen uniones inespecíficas de la HRP sobre las MBs-prG. Además, se observó que el uso de una concentración de mAbDON (0,6 mg l<sup>-1</sup>) por debajo de la capacidad de unión teórica de las MBs-prG produjo la competición pero con una baja sensibilidad (menor cantidad de mAbDON retiene poca concentración de DON-HRP).

En las experiencias realizadas a partir de la concentración de mAbDON (5 mg l<sup>-1</sup> equivalente a 2,4 µg) recomendada por el fabricante, se obtuvieron señales máximas próximas a 0,200 unidades de absorbancia (iguales que durante todas las etapas de optimización) y un calibrado competitivo satisfactorio, al observarse la disminución de la señal producida por el aumento de la inhibición competitiva del DON a mayores concentraciones. Además, al igual que se vió en la Figura 62, se produce una estabilización de la señal para mAbDON 5 y 10 mg l<sup>-1</sup>, indicando que no es necesario un mayor gasto de anticuerpo.

Puede asegurarse que la optimización se ha realizado correctamente, viendo que las **conclusiones finales y las iniciales son coincidentes**.

Después de las optimizaciones de las condiciones analíticas para el desarrollo de los ELISAs inmunomagnéticos, que se realizaron midiendo espectrofotométricamente las absorbancias en los pocillos utilizando como sustrato el TMB (Tabla 20), se estudiaron

estas mismas condiciones de las etapas del inmunoensayo para su posterior uso en transducción electroquímica, tal como se describe en apartados posteriores y siguiendo los procedimientos explicado en los apartados 3.4.5 y 3.4.6.

En la tabla 20 se resumen **las condiciones optimizadas del ELISA inmunomagnético**.

VARIABLES	CONDICIONES ÓPTIMAS
Cantidad de MBs-prG	15 $\mu\text{g}$
Cantidad de mAbDON inmovilizado	5 $\text{mg l}^{-1}$ equivalente a 2,4 $\mu\text{g}$
Dilución óptima DON-HRP (10x)	1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)
Intervalo competición	DON (0 y 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ )
Tiempo competición	60 minutos
T competición	25 °C
Bloqueo previo de pocillos	NO
Lavados	2 PBST (0,1% m/v) y 1 PBS (0,1 M)

**Tabla 20: Condiciones óptimas seleccionadas para el inmunosensor competitivo mediante mELISA**

#### 4.3.2 Inmunosensor electroquímico utilizando electrodos serigrafiados (SPCEs) individuales

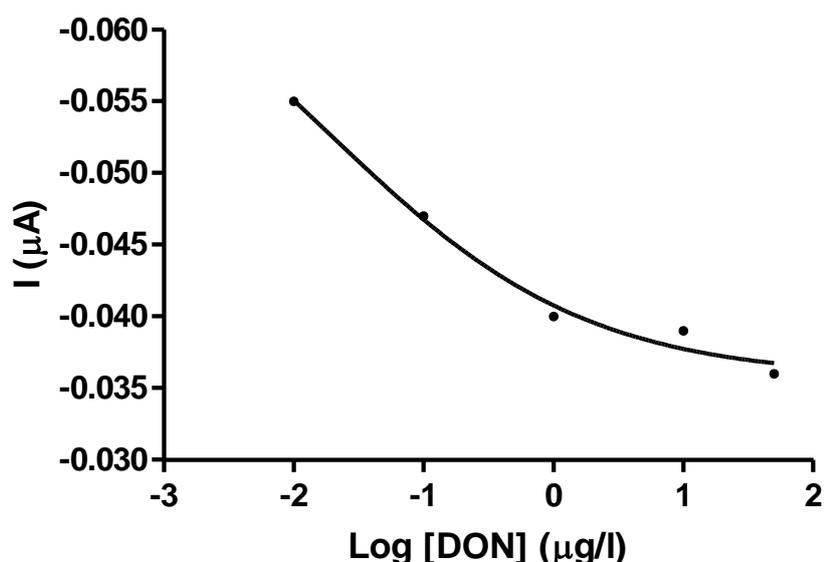
La transducción electroquímica es muy utilizada en biosensores por sus ventajas inherentes, como su gran sensibilidad en la medida de la corriente eléctrica, su instrumentación sencilla y de pequeño tamaño (portabilidad), la posibilidad de medir disoluciones con especies que presenten absorción óptica o turbidez (muestras), o su buena reproducibilidad.

Tal como se ha indicado, el siguiente paso después de la optimización del mELISA competitivo para la determinación de DON, **fue trasladar las condiciones del inmunoensayo a una última etapa de medida utilizando transducción amperométrica** sobre electrodos serigrafiados de base carbono (SPCEs). En un principio se utilizaron electrodos SPCEs individuales (con un instrumento monopotenciostático Autolab PGSTAT12 y conector individual). Una vez optimizada la transducción con estos electrodos individuales, para una mayor productividad y en un avance posterior se trabajó con electrodos múltiples de 8 medidas simultáneas (*array* CH8), con los mismos tipos de tintas de serigráfico y curados, y con un instrumento capaz de medir simultáneamente los 8 canales de forma multiplexada (PalmSens con software PSTrace y conector del potenciostato para el *array* de 8 electrodos).

Las condiciones electroquímicas y los sustratos para la reacción enzimática que da lugar al revelado de la señal, fueron los optimizados en el apartado 4.2.1.3. La reacción enzimática de la HRP (DON-HRP, Europroxima) se llevó a cabo con el sustrato enzimático HQ (1,8 mM) y en presencia del co-sustrato  $H_2O_2$  (1 mM) durante 10 minutos sobre la superficie del electrodo, realizando un salto de potencial por cronoamperometría ( $\Delta E_{CRA}$ ) entre 0 y -0,25 V, manteniendo este potencial final para la medida de la corriente durante 90 segundos (en este tiempo la componente capacitativa de la corriente medida es despreciable).

Los condiciones para realizar un calibrado competitivo con un objetivo de comprobar el comportamiento electroquímico de los biorreactivos, fueron 15  $\mu g$  de MBs-prG con mAbDON inmovilizado (5  $mg\ l^{-1}$ ), 25  $\mu l$  DON-HRP (directo *kit* de Europroxima) y un calibrado realizado con DON (25  $\mu l$ , 0-100  $\mu g\ l^{-1}$ ) durante 60 minutos de competición.

El calibrado obtenido se muestra en la figura siguiente (Figura 69):

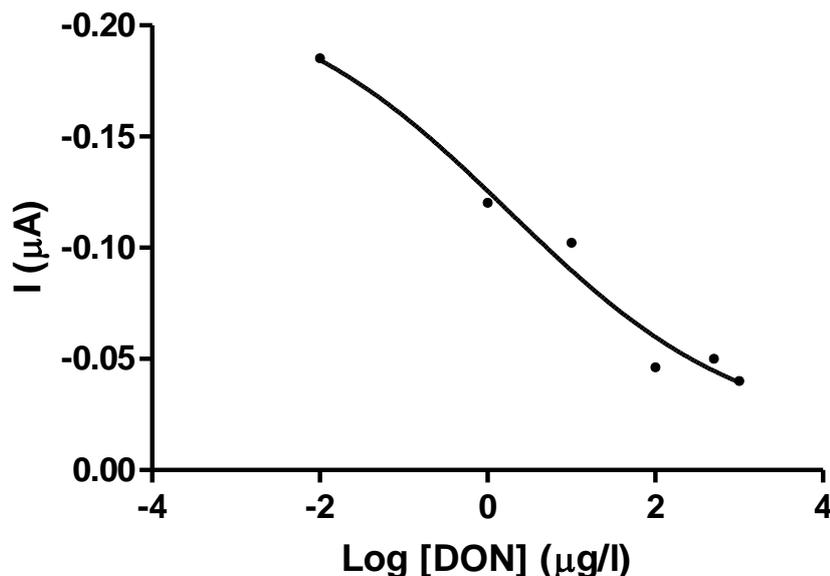


**Figura 69: Calibrado competitivo entre DON (0 y 100  $\mu g\ l^{-1}$ ) utilizando MBs-prG (15  $\mu g$ ) inmovilización de mAbDON (5  $mg\ l^{-1}$ ) y DON-HRP (Europroxima, 25  $\mu l$ ) durante 60 min a  $T$  25° C. Reacción HQ (1,8 mM) y  $H_2O_2$  (1 mM), 10 minutos.  $\Delta E_{CRA}$  sobre los SPCEs entre 0 y -0,25 V, medida de la corriente  $t_m = 90$  s.**

El calibrado realizado produjo un porcentaje de disminución de señales del 32,7%, entre corrientes comprendidas entre -0,055  $\mu A$  y -0,037  $\mu A$ . El ajuste, realizado en el modo 4PL utilizando una regresión no lineal mediante el software GraphPad Prism v.6.0, fue satisfactorio en un nivel de confianza del 95% (coeficiente de regresión  $R = 0,9940$ ).

La baja sensibilidad del calibrado junto con la pequeña diferencia de señales entre el máximo y el mínimo limita la determinación de DON en muestras de cereales, por lo que se utilizó una mayor concentración de etiquetado enzimático, DON-HRP (10x) tal y como se optimizó previamente para el mELISA (DON-HRP (10x) dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)).

En estas condiciones se obtuvieron los calibrados competitivos de la figura 70:



*Figura 70: Calibrado electroquímico de DON (0 y 100 µg l<sup>-1</sup>) utilizando MBs-prG (15 µg) inmovilización de mAbDON (5 mg l<sup>-1</sup>) y DON-HRP ((10x) dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)) durante 60 min a T 25° C. Reacción HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), 10 minutos. ΔE<sub>CRA</sub> entre 0 y -0,25 V, tm= 90 s.*

El calibrado se realizó utilizando el método 4PL. Se observa un buen ajuste a una curva sigmoidea (coeficiente de regresión de R = 0,9874). El factor EC<sub>50</sub> fue de 1,785 µg l<sup>-1</sup> de DON.

Se obtuvo un **porcentaje de disminución de señal de 78%** y una señal máxima de -0,185 µA, porcentaje de inhibición competitiva comparable a los obtenidos por mELISA, indicando que las condiciones fijadas en el apartado 4.3.1 son extrapolables a las medidas electroquímicas.

El principal inconveniente de este procedimiento, además del tiempo utilizado en las medidas individuales sobre cada electrodo, es la inestabilidad de la HQ a partir del momento de preparación en disolución, que junto con los tiempos de medida de todos los puntos de calibración y la reacción enzimática sobre el SPCE de cada uno de los

puntos de calibración hacen que la HQ se vaya oxidando de forma espontánea, con lo que existe el riesgo de medir mayores corrientes que las debidas a la transformación enzimática del etiquetado.

Para superar este inconveniente, y como se explica en apartados posteriores, se disminuyó el tiempo de las medidas mediante el **uso de electrodos serigrafiados múltiples, dispuestos en bloques de 8 SPCEs (CH8)** (Figura 26), además de modificar el procedimiento para eliminar la oxidación espontánea de la HQ durante el tiempo en que se llevan a cabo las medidas electroquímicas.

#### **4.3.3 Inmunosensor electroquímico utilizando electrodos SPCEs múltiples (CH8): *Multistep Amperometric***

Con el objetivo de lograr la máxima rapidez en la determinación de DON en ensayos de rutina, y con el fin de evitar la oxidación espontánea de HQ en disolución se decidió modificar el dispositivo de medida, utilizando placas de 8 electrodos serigrafiados (CH8) conectados a un potenciostato (PalmSens, Figura 24), con capacidad de multiplexado de 8 controles potenciostáticos (es decir la capacidad de medir simultáneamente en 8 electrodos de trabajo).

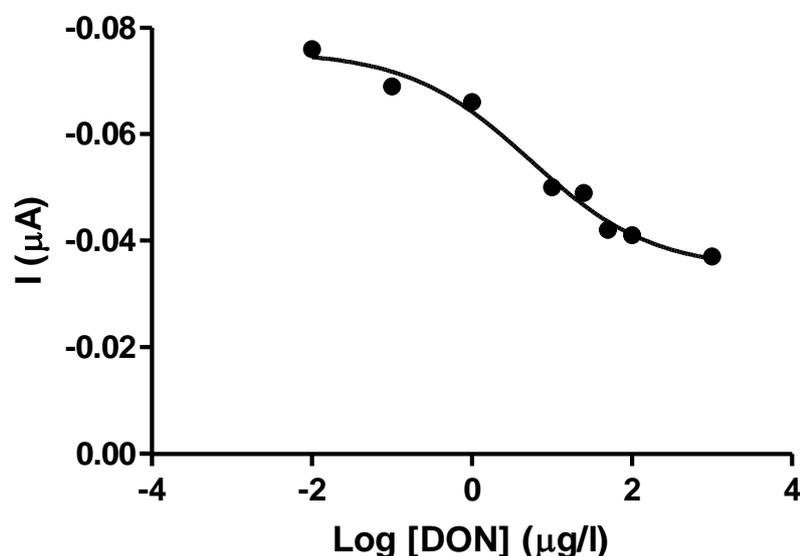
El potenciostato de PalmSens tiene un gran número de técnicas voltamétricas, las más habituales (barrido escalonado, técnicas voltamétricas impulsionales, de redisolución, voltametría cíclica) y amperométricas (detección amperométrica, cronoamperometría y amperometría a varios potenciales constantes *-Multistep Amperometric*).

Los primeros estudios con transducción amperométrica, sobre electrodos SPCEs individuales, se realizaron mediante cronoamperometría (CRA) (denominada en este instrumento como *Multistep Amperometric*), con un  $\Delta E_{CRA}$  desde 0 a -0,25 V, sobre un electrodo individual en cada medida y sobre un conector individual para un solo SPCE, y también bajo la influencia de un campo magnético para retener las MBs sobre el electrodo de trabajo. En comparación con el array CH8, lógicamente el tiempo para realizar el mismo número de medidas es mucho mayor, con los riesgos mencionados de estabilidad de la disolución de HQ recién preparada en cada caso. En el caso del *array* CH8, al disponer de pocillos en donde se mantienen las disoluciones (dispersiones de MBs), se mejora la reproducibilidad en las medidas y la limpieza sobre los electrodos (mayor seguridad en la manipulación).

Otro aspecto diferente entre los SPCEs individuales y el CH8 (ambos suministrados por la Universidad de Florencia (Italia)) son las **dimensiones de los electrodos de trabajo, que modifican las corrientes medidas ( $\varnothing = 2$  mm en los CH8 y  $\varnothing = 3$  mm en los SPCEs)**

[202]. Por ejemplo, en el calibrado de 8 puntos que se representa en la Figura 71, puede observarse que las corrientes son mucho menores en el CH8 que con respecto a los SPCEs individuales por el motivo anterior. En relación a los tipos de tinta de base carbono y su curado, tienen también una influencia muy importante en la velocidad de transferencia de carga y por lo tanto en las corrientes obtenidas.

Las condiciones de trabajo de este calibrado (las mismas que se fijaron en el desarrollo del mELISA) fueron: MBS-prG (15  $\mu\text{g}$ ) inmovilización de mAbDON (5  $\text{mg l}^{-1}$ ) y DON-HRP (10x) dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4) durante 60 min a T 25 °C. La reacción enzimática sobre cada ET se realizó en las condiciones seleccionadas para los SPCEs con HQ (1,8 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) durante 10 minutos. El  $\Delta E_{\text{CRA}}$  por CRA entre 0 y -0,25 V, durante 90 segundos.



**Figura 71:** Calibrado competitivo en un CH8 entre DON (0 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Reacción HQ (1,8 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM), 10 minutos.  $\Delta E_{\text{CRA}}$  0 y -0,25 V,  $t_m = 90$  s.

Los resultados siguieron una tendencia decreciente, propia de un calibrado competitivo directo con un ajuste sigmoideo correcto (coeficiente de regresión  $R = 0,9921$ ). Por el contrario se observa que las corrientes medidas son menores que utilizando los SPCEs en las mismas condiciones de trabajo (señal máxima -0,077  $\mu\text{A}$ ), y el factor  $\text{EC}_{50}$  obtenido fue de 5,37  $\mu\text{g l}^{-1}$  de DON, frente al  $\text{EC}_{50}$  de 1,785  $\mu\text{g l}^{-1}$  obtenido en el calibrado realizado en las mismas condiciones con SPCEs.

Por lo tanto, una vez realizadas las optimizaciones de las concentraciones relativas de DON, DON-HRP y utilizando mELISA para la caracterización de la afinidad del anticuerpo, estas **condiciones se adaptaron a la transducción electroquímica y se reoptimizaron para medir corrientes mayores**, teniendo en cuenta la sensibilidad

necesaria para la determinación del DON y con el objetivo de no provocar un gasto excesivo de biorreactivos que hiciera que el inmunosensor electroquímico incrementara su precio notablemente. Estos estudios se detallan en los apartados que siguen a continuación.

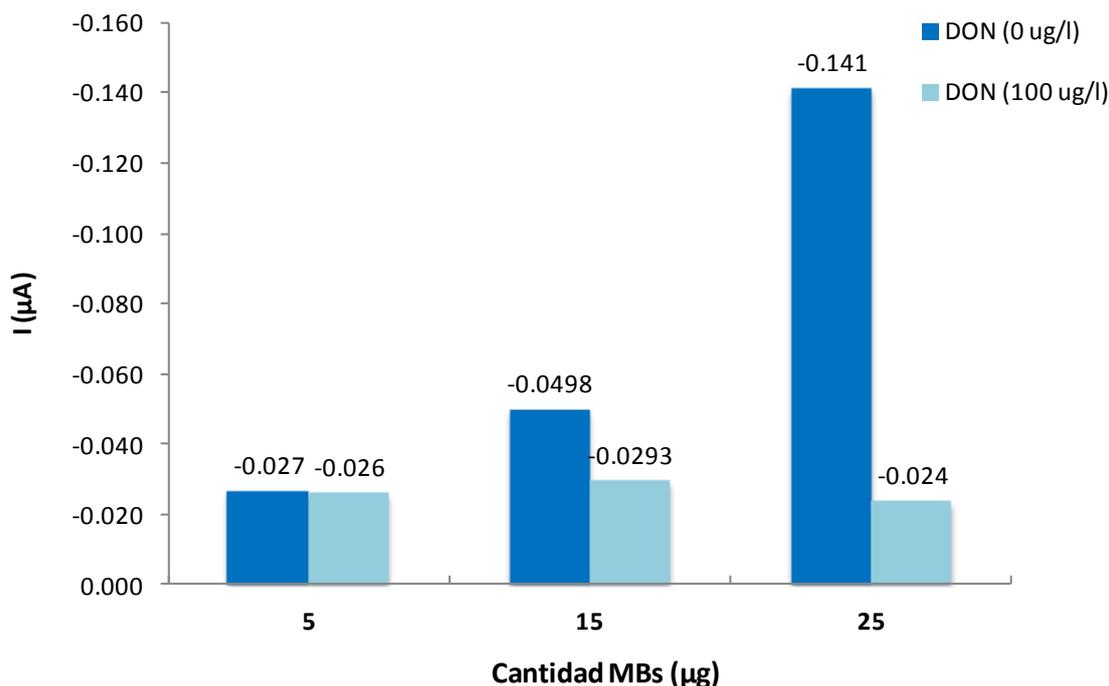
#### **4.3.3.1 Optimización de la cantidad de MBs-prG-mAbDON**

Para aumentar las señales electroquímicas, es necesaria una mayor cantidad de HRP que produzca una mayor oxidación enzimática del sustrato HQ (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Sin embargo, si se mantuvieran los sitios libres de unión del anticuerpo, esto significaría que serían necesarias mayores concentraciones de DON para producir los mismos porcentajes de inhibición en el calibrado, por lo que este cambio ha de suponer la variación de los sitios de anticuerpo disponibles. Estas concentraciones, a su vez, pueden modularse para que los inmunosensores resultantes respondan a las concentraciones adecuadas de la micotoxina, que normalmente serán aquellas de las aplicaciones finales o de los requerimientos de la legislación sobre su presencia en alimentos.

El número de sitios de unión del anticuerpo se modificó con la cantidad total de MBs modificadas, pues se mantuvo constante la concentración de mAbDON inmovilizado (5 mg l<sup>-1</sup> equivalente a 2,4 µg durante la inmovilización) ya que se demostró anteriormente (Figura 62) que concentraciones superiores de mAbDON no se inmovilizaron sobre las MBs-prG (al superar su capacidad de funcionalización).

Se ensayaron diferentes cantidades de MBs-prG (5, 15 y 25 µg) realizando reacciones competitivas de 60 minutos entre DON-HRP (10x) en 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4), para DON (0 y 100 µg l<sup>-1</sup>).

Los resultados se representan en la figura 72:



**Figura 72:** Unión competitiva entre DON-HRP ((10x) dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)) y DON (0 y 100 µg l<sup>-1</sup>) utilizando MBs-prG (5, 15 o 25 µg). Reacción HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), 10 minutos. ΔE<sub>CRA</sub> entre 0 y -0,25 V, sobre los CH8

Los resultados obtenidos concluyen que un aumento en la cantidad de las MBs-prG hasta 25 µg con respecto a la cantidad anteriormente optimizada (15 µg) produce un incremento de la señal máxima de un 65%, a la vez que 100 µg l<sup>-1</sup> de DON produce una inhibición apreciable con esta cantidad de MBs (inhibición por competición del 83%).

En la tabla 21 se comparan los porcentajes de disminución de la señal producidos por la competición de DON (0 y 100 µg l<sup>-1</sup>) para cada una de las tres cantidades estudiadas de MBs-prG y la relación señal/ruido (S/N) existente entre la máxima señal DON (0 µg l<sup>-1</sup>) y la mínima DON (100 µg l<sup>-1</sup>):

MBs (µg)	DON (µg/l)		% disminución	S/N
	0	100		
5	-0,027	-0,026	2,3	1,02
15	-0,049	-0,029	41,2	1,70
25	-0,141	-0,024	83,3	5,97

**Tabla 21:** Cálculo del porcentaje de disminución de señal y la relación S/N para diferentes cantidades de MBs-prG-mAbDON (5, 15 y 25 µg) para DON (0 y 100 µg l<sup>-1</sup>) ΔE<sub>CRA</sub> (0 a -0,25 V)

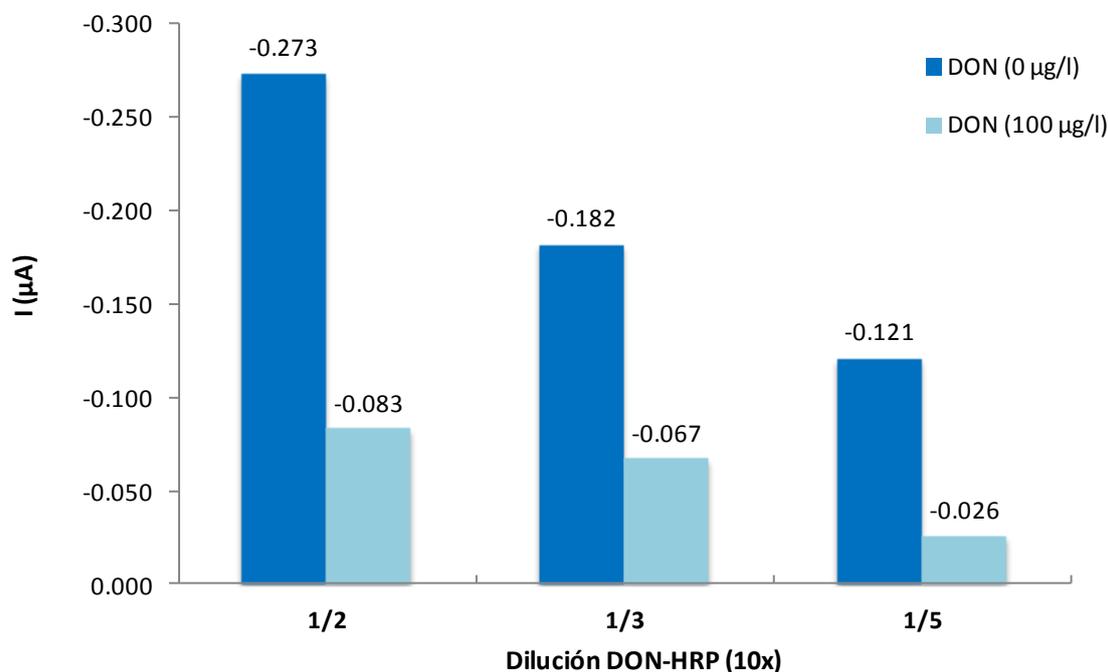
A la vista de los resultados de la tabla anterior se demuestra que la cantidad óptima de MBs-prG ( $\mu\text{g}$ ) necesaria para obtener la suficiente sensibilidad realizando la detección por la técnica *Multistep Amperometric* (0 a  $-0,25$  V durante 90 s), **utilizando CH8 es 25  $\mu\text{g}$  de MBs-prG. Se obtuvo una señal máxima de  $-0,141 \mu\text{A}$  y una disminución de la señal tras la competición del 83 % (relación S/N 5,97).**

Se observa que con menores cantidades de MBs-prG la competición también se produce satisfactoriamente (inhibición completa, corrientes residuales, con  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  de DON) pero las señales máximas son menores.

#### 4.3.3.2 Optimización de la dilución de DON-HRP (10x)

El cambio de concentración del anticuerpo y la comprobación de la inhibición del DON en alta concentración, ha de acompañarse con la **adecuación de la cantidad de conjugado enzimático (DON-HRP (10x))** frente al DON, que se describe en este apartado. Se midieron las corrientes producidas sobre la competición entre DON (0 y  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y DON-HRP (10x) con diferentes diluciones (1/2, 1/3 y 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4), utilizando en todos los casos  $25 \mu\text{g}$  de MBs-prG.

Los resultados se muestran en la figura 73:



**Figura 73: Corrientes debidas a la unión del DON-HRP (10x) dilución (1/2, 1/3 y 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)) para DON (0 y  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) Reacción HQ (1,8 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM), 10 minutos.  $\Delta E_{\text{CRA}}$  0 y  $-0,25$  V, sobre los electrodos CH8**

A medida que disminuye la concentración de DON-HRP disminuye la corriente medida. Se calcularon las relaciones existentes, obteniéndose una proporcionalidad directa entre el aumento de concentración de DON-HRP y el aumento de la corriente medida:

Relación concentración 1/5 y 1/2: 0,4 → Relación señales: 0,4

Relación concentración 1/5 y 1/3: 0,6 → Relación señales: 0,664

Esto significa además que con pequeñas concentraciones de DON-HRP los sitios de unión del anticuerpo se encuentran en exceso, pese a producirse la inhibición del DON libre al encontrarse éste en muy alta concentración ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

Los porcentajes de disminución de la señal producidos por la competición de DON ( $0$  y  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) para cada una de las tres diluciones estudiadas de DON-HRP y la relación señal/ruido (S/N) existente entre la máxima señal DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y la mínima DON ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) se presentan en la tabla 22:

DON-HRP	DON ( $\mu\text{g/l}$ )		% disminución	S/N
	0	100		
1/2	-0,273	-0,083	69,6	3,29
1/3	-0,182	-0,067	63,2	2,72
1/5	-0,121	-0,026	78,5	4,65

**Tabla 22: Cálculo del porcentaje de competición y de la relación S/N para 3 diluciones de DON-HRP (10x, 1/2, 1/3 y 1/5 (v/v))**

El aumento de la corriente es directamente proporcional al aumento de concentración de DON-HRP. Sin embargo, el mayor descenso de señal de inhibición con  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  de DON (y mayor relación señal-ruido) se encontró para la menor concentración de DON-HRP (dilución 1/5 (v/v)), por lo que se seleccionó dicha dilución como óptima.

Por lo tanto, aumentos de las corrientes debidos al incremento en la concentración de los biorreactivos, suponen en este caso disminuir la sensibilidad del inmunosensor (mayor concentración de DON libre necesaria para la mismo porcentaje de inhibición competitiva).

#### 4.3.3.3 Optimización de las concentraciones de HQ y $\text{H}_2\text{O}_2$

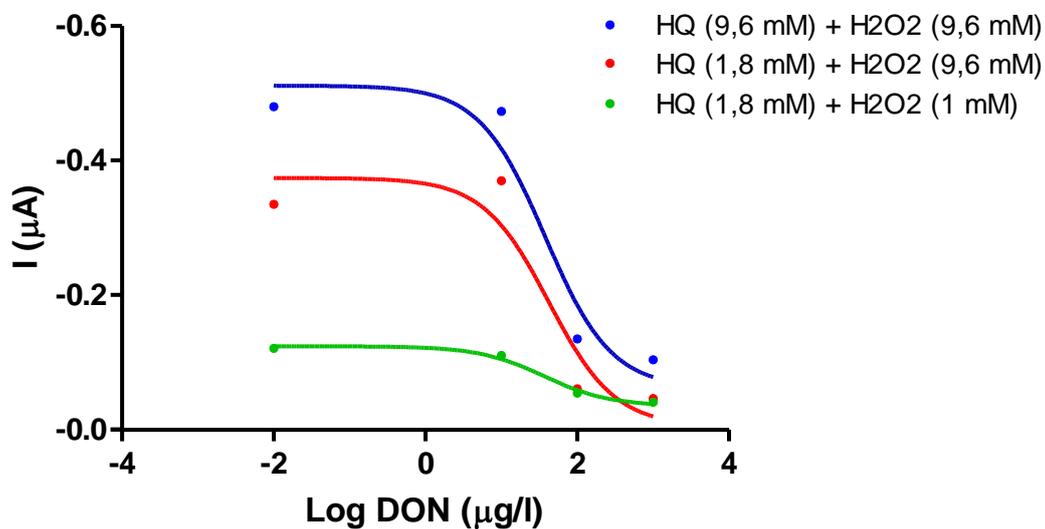
El objetivo de la re-optimización de las concentraciones de los sustratos enzimáticos fue la de aumentar las corrientes medidas máximas sin incrementar el gasto de reactivos. Una mayor cantidad de enzima HRP requiere mayores concentraciones de

sustrato enzimático (siempre en condiciones de exceso sobre el enzima), de tal manera que siguiendo la cinética enzimática (modelo teórico de Michaelis-Menten) las variaciones cinéticas de la señal son proporcionales a la concentración del enzima (y no de los sustratos). Es decir, que es necesario un exceso de sustrato (HQ) y de co-sustrato ( $H_2O_2$ ) enzimáticos, para que las corrientes medidas sean proporcionales a la cantidad de enzima del DON-HRP unido competitivamente sobre el anticuerpo de las MBs, a su vez dependiente competitivamente de la concentración de DON. La señal amperométrica medida con el inmunosensor además se encuentra amplificada por la propia reacción enzimática catalítica debida a la HRP.

Para el estudio de las concentraciones óptimas de HQ y  $H_2O_2$  se realizaron calibrados competitivos con DON-HRP (10x) dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4) y DON (0 – 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) utilizando MBs-prG (25  $\mu\text{g}$ ) con inmovilización de mAbDON (5  $\text{mg l}^{-1}$ ) (condiciones optimizadas anteriormente) con las concentraciones siguientes de sustratos enzimáticos:

- HQ (1,8 mM) y  $H_2O_2$  (1 mM)
- HQ (1,8 mM) y  $H_2O_2$  (9,6 mM)
- HQ (9,6 mM) y  $H_2O_2$  (9,6 mM)

Los calibrados se recogen en la figura 74:



**Figura 74:** Variaciones debidas a las concentraciones de sustratos enzimáticos HQ y  $H_2O_2$  en calibrados competitivos  $\Delta E_{\text{CRA}}$  0 y -0,25 V, sobre los electrodos CH8.  $t_m=90$  s.

En la figura 74 se observa que para la cantidad de enzima HRP utilizada en los ensayos, son necesarias cantidades de co-sustratos próximas a 10 mM, de tal manera que se encuentran en exceso y la catálisis enzimática viene limitada por la cantidad de enzima

y es dependiente de su concentración en defecto. Los resultados son satisfactorios, al cumplirse el objetivo de incrementar la señal máxima sin que esto suponga un mayor gasto de biorreactivos, dada la finalidad última de este inmunosensor que es la de su explotación comercial en forma de *kit*.

Utilizando DON-HRP (10x dilución 1/5 (v/v)) y los sustratos enzimáticos en concentraciones con HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,6 mM) se consiguió una señal máxima superior a la obtenida en el apartado anterior con DON-HRP (dilución 1/2 (v/v)) con HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), (señales de -0,335  $\mu$ A y -0,273  $\mu$ A, respectivamente).

Las corrientes máximas aumentaron desde -0,121  $\mu$ A a -0,335  $\mu$ A (aumento de señal del 64%) con un incremento únicamente de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (de 1 a 9,6 mM) y hasta -0,480  $\mu$ A (aumento de señal del 75%) con el aumento de ambos sustratos HQ (9,6 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,6 mM), en todos los casos utilizando DON-HRP (10x dilución 1/5 (v/v)) y MBs-prG-mAbDON (25  $\mu$ g).

	$I_{\text{máx}}$ ( $\mu$ A)	% Competición	S/N
HQ (9,6 mM) y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (9,6 mM)	-0,480	78,3	4,6
HQ (1,8 mM) y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (9,6 mM)	-0,335	86,3	7,3
HQ (1,8 mM) y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM)	-0,121	40,0	1,7

**Tabla 23: Cálculo del porcentaje de disminución de señal y la relación S/N para diferentes concentraciones de los sustratos enzimáticos HQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en calibrados competitivos**

Examinando los resultados anteriores de disminución de la señal en la competición y de la relación señal/ruido calculada, se comprobó que la señal aumenta notablemente si se aumentan ambas concentraciones de HQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta 9,6 mM, pero se observó que en ese caso el ruido de fondo era mucho mayor.

Viendo que la disminución de la señal debido a la competición (% disminución) así como la relación S/N entre la intensidad máxima y mínima son mayores para el caso en que las concentraciones son HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,6 mM), se decidió fijar dichas concentraciones para el sustrato y co-sustrato enzimáticos que además producen una disminución del ruido de fondo en las medidas con respecto al uso de HQ (9,6 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,6 mM). Por lo tanto puede concluirse que no es necesario aumentar el consumo de conjugado enzimático DON-HRP por ensayo, si se aumenta la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 9,6 mM (frente a 1 mM).

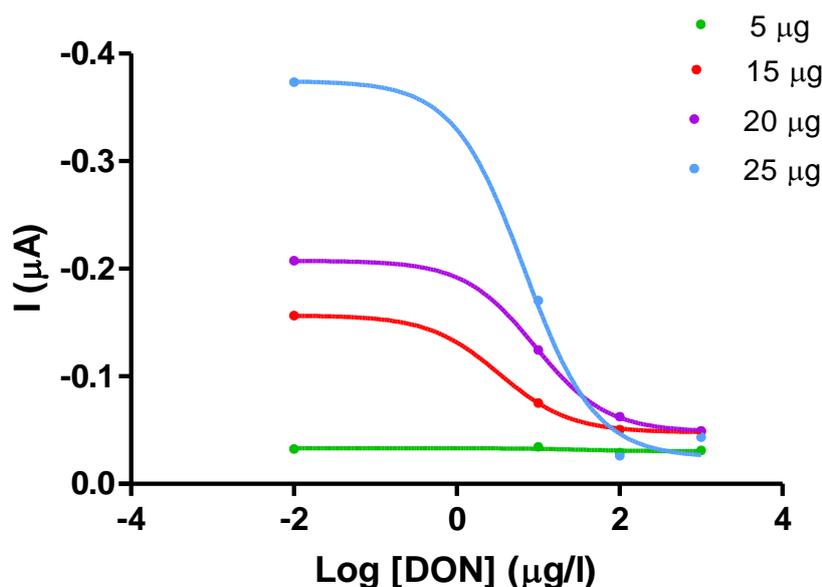
Con el aumento de señales producido debido al incremento de la concentración de co-sustrato enzimático, se decidió buscar un ahorro en la cantidad de MBs-prG-

mAbDON por lo que se re-optimizó la cantidad de MBs necesarias en cada ensayo, manteniendo constantes el resto de condiciones optimizadas previamente.

#### 4.3.3.4 Re-optimización de la cantidad de MBs-prG-mAbDON

Con las condiciones de los apartados anteriores (sustratos enzimáticos y DON-HRP), se reoptimizaron las cantidades de anticuerpo viendo el resultado de calibrados con diferentes cantidades de MBs-prG-mAbDON.

En la figura 75 se representan los calibrados competitivos que se obtuvieron utilizando diferentes cantidades de MBs-prG-mAbDON (la concentración de mAbDON no se modificó, siendo  $5 \text{ mg l}^{-1}$  en todas las experiencias), comprendidas entre 5 y 25  $\mu\text{g}$ . El resto de condiciones se mantuvieron constantes [DON-HRP (10x, dilución 1/5 (v/v), DON (0-1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), 60 minutos de competición], y con las concentraciones de sustratos fijas en HQ (1,8 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (9,6 mM).



**Figura 75:** Estudio de la cantidad óptima de MBs-prG-mAbDON (5, 15, 20 y 25  $\mu\text{g}$ )  $\Delta E_{\text{CRA}}$  0 y -0,25 V, sobre los CH8 durante 90 segundos HQ (1,8 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (9,6 mM)

Según estos resultados, con una cantidad de 5  $\mu\text{g}$  de MBs-prG-mAbDON no se produce inhibición competitiva al disponer de una cantidad de anticuerpo muy pequeña (0,2  $\mu\text{g}$ ).

Cantidades crecientes de MBs y anticuerpo producen mayores porcentajes de competición (disminución de corrientes), como se refleja en la tabla 24, indicando en

ésta los ajustes de los parámetros sigmoideos obtenidos con un modelo 3PL (se realizó la comparativa entre los modelos de ajuste 3PL y 4PL con el software del GradPhad, obteniéndose un mejor ajuste sigmoideo con un modelo 3PL en este caso):

Parámetros	5 µg	15 µg	20 µg	25 µg
Mínimo (µA)	-0,030	-0,048	-0,048	-0,024
Máximo (µA)	-0,033	-0,156	-0,207	-0,374
EC <sub>50</sub> (µg l <sup>-1</sup> )	34,63	3,33	9,18	6,76
Pendiente	1	1	1	1
R	0,6366	0,9998	1	0,9954
%Competición	9	69	77	94

**Tabla 24: Parámetros logísticos sigmoideos de los calibrados competitivos, con las cantidades de MBs-prG-mAbDON indicadas**

A la vista de los resultados de la tabla 24, puede decirse que para el resto de cantidades de MBs (15, 20 y 25 µg) ensayadas la competición se produce satisfactoriamente (coeficientes de regresión R > 0,99), pero la señal máxima no se consigue estabilizar con el aumento de las MB-prG-mAbDON, siendo en la experiencia con 25 µg en la que se consigue unas corrientes máximas mayores (-0,374 µA) y el mayor porcentaje de disminución de la señal producida por la competición (94%).

Los valores de EC<sub>50</sub>, en las experiencias ensayadas con 20 y 25 µg (9,18 y 6,76 µg l<sup>-1</sup>, respectivamente), son suficientes para la determinación de DON en muestras de cereales de acuerdo con la legislación. Una disminución en el factor EC<sub>50</sub> produce una mayor sensibilidad en el inmunosensor (interpolación de concentraciones de DON menores), y permiten que puedan realizarse mayores diluciones de los extractos con el objetivo de disminuir el porcentaje de disolventes orgánicos que pudieran provenir de la extracción a partir de los cereales (metanol por ejemplo).

Se observa que el aumento de señal existente entre el uso de 20 y 25 µg de MBs-prG-mAbDON supone un aumento de la señal de un 45%, aumentando tan solo 5 µg de MBs por experiencia. Además de las altas señales, comparando el factor EC<sub>50</sub> obtenido en las experiencias con 20 y 25 µg, se observó que es menor (mayor sensibilidad en las determinaciones) para el caso de MBs-prG-mAbDON (25 µg).

Un aspecto que hemos considerado importante es el **coste económico de los ensayos** con el objetivo final de la comercialización de los inmunosensores electroquímicos que desarrollamos. Para comprobar si es viable utilizar la cantidad máxima de MBs ensayada (25 µg), se calculó el gasto total de un inmunosensor diseñada para realizar 8

puntos de calibrado que supone el trabajo con 15 µg, 20 µg y 25 µg de MBs modificadas con el anticuerpo (Tabla 25). El cálculo se ha obtenido a partir del coste proporcional de los biorreactivos utilizados, incluyendo el coste de la placa ELISA y el de la batería de electrodos CH8.

	Cantidad MBs-prG-mAbDON/ensayo		
	15 µg	20 µg	25 µg
Gasto total (8 puntos calibrado)	12,93€	13,27€	13,63€

**Tabla 25: Cálculo del coste total (€) en el inmunosensor que supone el aumentar la cantidad de MBs-prG-mAbDON para un calibrado de 8 medidas**

La diferencia en euros (€) que supone aumentar la cantidad de MBs-prG-mAbDON de 20 µg a 25 µg es únicamente 0,36€, pero este incremento supone un aumento en la señal máxima del 45% (desde -0,207 a -0,374 µA). Evaluando el gasto que supone el aumento de la cantidad de MBs en cada ensayo, y llegando a una situación de compromiso con las ventajas que conlleva mejorar la sensibilidad (disminución del factor EC<sub>50</sub>) y trabajar con un alto porcentaje de disminución de la señal para la determinación de DON (94% en este caso), se estableció como **cantidad óptima de partículas 25 µg de MBs-prG-mAbDON en cada ensayo** bajo este criterio.

Se comprobó que la variable que más influye en el inmunosensor en cuanto al aumento de las corrientes es la cantidad de MBs utilizadas en cada ensayo (que es directamente proporcional a la cantidad disponible de mAbDON), ya que pudo verse que con un incremento en la concentración de los sustratos de la reacción enzimática fue posible reducir la concentración de DON-HRP manteniendo sin variaciones la señal máxima obtenida, pero no es posible reducir la cantidad de MBs-prG-mAbDON en cada ensayo ya que la señal máxima se reduce bruscamente (reducción de 25 µg a 20 µg, disminución señal máxima un 45%).

#### 4.3.3.5 Reproducibilidad de los inmunosensores electroquímicos de DON

En un proceso de optimización de un inmunosensor, y dada la complejidad de las reacciones que se producen, es frecuente que al modificar alguna de las variables afecte a las señales obtenidas y al resto de las otras variables. Por otro lado, algunos factores también influyen en gran medida, como por ejemplo la forma de preparación de la disolución de DON-HRP (dilución en PBS), la inmovilización del anticuerpo sobre las MBs a partir de diferentes alícuotas de mAbDON, diferentes electrodos serigrafiados CH8, mismas medidas realizadas en diferentes días, tiempo de análisis de los extractos desde la extracción de muestras de los alimentos, etc.

Con el objetivo de listar y evaluar la influencia que tiene cada uno de estos factores con los que se trabaja a diario y de aquellos que modifican las respuestas del inmunosensor, en este apartado se describen una serie de ensayos comparativos sobre cambios en estas variables (dejando constantes el resto). Las variables que se estudiaron estadísticamente (análisis de varianza) fueron:

1. Reproducibilidad entre 2 electrodos CH8 diferentes
2. Reproducibilidad entre diferentes preparaciones de MBs-prG-mAbDON
3. Reproducibilidad entre 8 medidas sin competición sobre un mismo electrodo
4. Reproducibilidad entre concentraciones replicadas con competición
5. Reproducibilidad entre las mismas medidas realizadas en días consecutivos

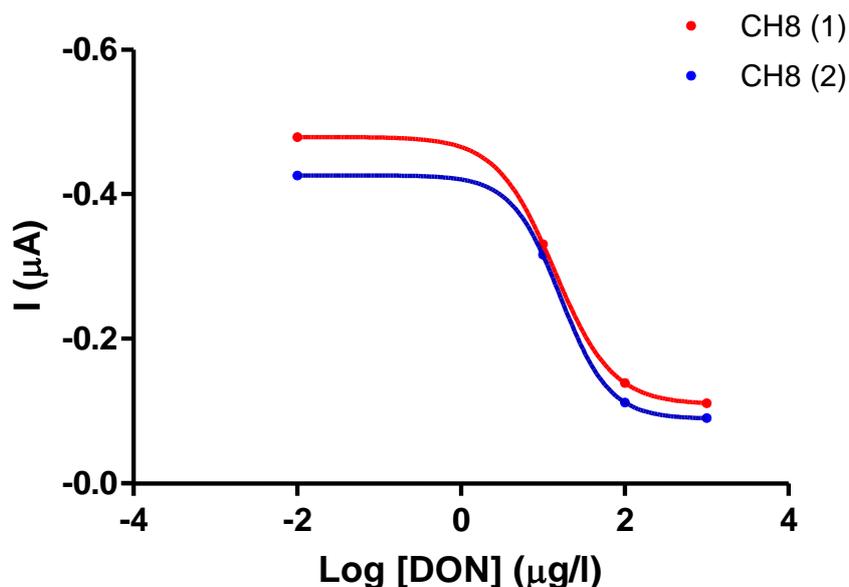
Para todas las experiencias se utilizaron las condiciones óptimas de competición: 25  $\mu\text{g}$  MBs-prG-mAbDON (mAbDON 5  $\text{mg l}^{-1}$ ), DON-HRP (10x, dilución 1/5 (v/v) en PBS 0,1 M, pH 7,4) y DON (0-1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en PBS (0,1M). Medidas por *Multistep Amperometric*, con HQ (1,8 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (9,6 mM),  $\Delta E_{\text{CRA}}$  de 0 a -0,25 V,  $t_m=90$  s (Potenciostato PalmSens).

La dilución realizada para el conjugado enzimático DON-HRP (10x, dilución 1/5 (v/v) en PBS 0,1 M, pH 7,4) se preparó en todos los casos inmediatamente antes de su uso, protegiendo la disolución de la exposición a la luz y evitando almacenarlo una vez diluido. Estas precauciones se tomaron como consecuencia de la posible disminución de la actividad del enzima HRP en disolución y expuesta a la luz.

### 1. Reproducibilidad entre electrodos CH8 diferentes

Los electrodos CH8 son elaborados en serie mediante el serigrafiado de las tintas necesarias (de grafito para ET y EA y de plata para el ER) sobre una superficie de poliéster y entre diferentes lotes no se han encontrado diferencias importantes en su comportamiento electroquímico (reproducibilidad en la determinación de  $\rho\text{BQ}$  por DPV).

Realizando medidas en el tiempo se observó que para alguno de ellos las señales obtenidas fueron ligeramente diferentes. Por ello se comparó la señal electroquímica inter-electrodos sobre dos CH8, realizándose dos calibrados competitivos replicados con las mismas disoluciones recién preparadas (para evitar así la variable del tiempo de preparación). La única variable distinta en las determinaciones fue el uso de dos electrodos CH8 diferentes. Los dos calibrados se representan en la figura 76:



**Figura 76: Reproducibilidad de calibrado sobre 2 CH8 diferentes,  $\Delta E_{\text{CRA}}$  (0 a -0,25 V)**

Aparentemente ambos calibrados son satisfactorios y semejantes entre sí. Comparando ambas curvas estadísticamente con el programa GradPhad se obtiene que el mejor ajuste fue el realizado con el ajuste de los 4 parámetros logísticos para ambas curvas, obteniéndose los parámetros recogidos en la tabla 26 a partir del ajuste de regresión no lineal:

Parámetros	CH8 (1)	CH8 (2)
Mínimo ( $\mu\text{A}$ )	-0,109	-0,089
Máximo ( $\mu\text{A}$ )	-0,479	-0,426
$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	13,89	16,46
Pendiente	1,232	1,452
R	1	1
%Competición	77,2	79

**Tabla 26: Parámetros obtenidos en el ajuste sigmoideo de los calibrados anteriores**

Mediante el programa GradPhad se compararon estadísticamente los parámetros de ajuste obtenidos para cada uno de los calibrados con un nivel de confianza del 95%, para calcular estadísticamente si pueden considerarse iguales entre sí.

El resultado encontrado fue que ninguno de los 4 parámetros del ajuste (máximo, mínimo,  $\text{EC}_{50}$  y pendiente) se puede considerar igual, son estadísticamente diferentes, por lo que pudo asegurarse que el uso de electrodos diferentes afecta significativamente en los resultados del calibrado, pese a utilizar los mismos reactivos.

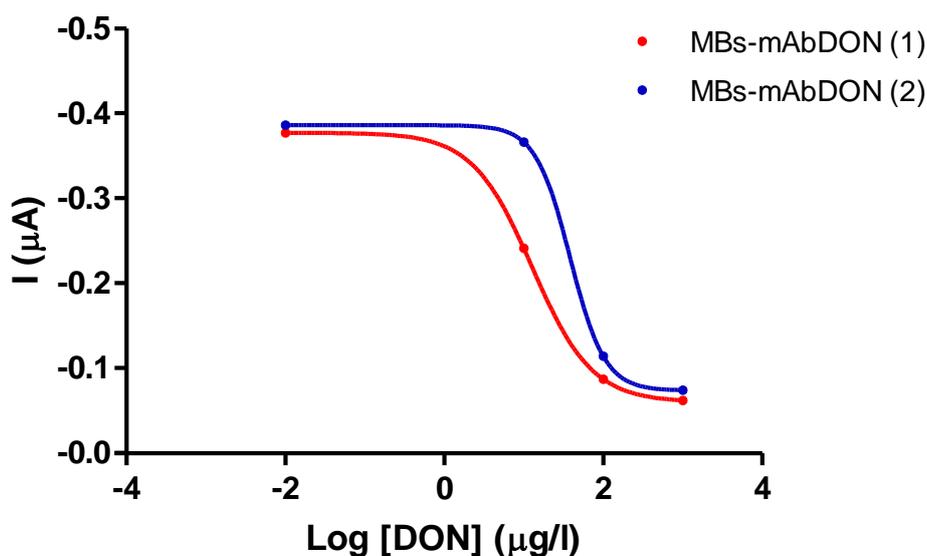
Esto corrobora la necesidad de efectuar calibrados frecuentes (y diarios) en este tipo de inmunosensores, por la facilidad de cambio de las señales analíticas obtenidas, en este caso, tan sólo utilizando un electrodo diferente. Viendo la influencia que el cambio de electrodo provoca en la señal y con el fin de evitar introducir variables externas que afecten a la medida se decidió **utilizar un único electrodo** a la largo de todo el proceso de optimización, teniendo en cuenta que su regeneración efectiva se consiguió con un simple lavado con abundante agua milliQ y secado con aire comprimido.

Cálculos estadísticos ANOVA (análisis de varianza) mostraron que para un mismo electrodo, simplemente lavado con agua de la forma descrita después de cada medida, las corrientes DPV obtenidas de 10 medidas voltamétricas replicadas de  $\rho$ BQ (1 mM) fueron significativamente comparables (nivel de confianza del 95%).

## **2. Reproducibilidad entre diferentes inmovilizaciones del mAbDON sobre MBs-prG**

La inmovilización del mAbDON sobre las MBs-prG es una etapa crucial en el desarrollo de un inmunosensor, ya que determina la cantidad de elemento de biorreconocimiento disponible. Para comprobar este efecto y su influencia en el inmunosensor, igualmente se efectuaron dos calibrados iguales (con los mismos biorreactivos recién preparados) y con dos inmovilizaciones en MBs-prG-mAbDON realizadas en el mismo tiempo en viales *eppendorf* diferentes, con dos alícuotas distintas del mismo mAbDON, por lo que no sólo se evaluó la inmovilización eficiente del mAbDON sino también las diferencias existentes entre alícuotas de anticuerpo almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Los dos calibrados se representan en la figura 77 y los ajustes logísticos (modelo 4PL) en la tabla 27.



**Figura 77:** Resultados del estudio de reproducibilidad realizando 2 inmobilizaciones de MBs-prG-mAbDON ( $m\text{AbDON } 5 \text{ mg l}^{-1}$ ), diferentes,  $\Delta E_{\text{CRA}}$  (0 a -0,25 V)

Parámetros	MBs (1)	MBs (2)
Mínimo ( $\mu\text{A}$ )	-0,0599	-0,0735
Máximo ( $\mu\text{A}$ )	-0,3771	-0,3860
$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	12,81	38,44
Pendiente	1,154	1,992
R	1	1
%Competición	84	81

**Tabla 27:** Parámetros obtenidos en el ajuste sigmoideo de los calibrados anteriores

Ambos calibrados se ajustan muy bien al modelo sigmoideo. Sin embargo, ninguno de los parámetros obtenidos en ambas curvas (máximo, mínimo,  $\text{EC}_{50}$  y pendiente) pueden considerarse comparables estadísticamente para una probabilidad del 95%. Por lo tanto, aunque ambas curvas son similares, estadísticamente los dos calibrados realizados con diferentes MBs-prG-mAbDON no son comparables. Es de destacar los valores de  $\text{EC}_{50}$ , que indican que la sensibilidad de ambos inmunosensores son significativamente diferentes.

Con el objetivo de evitar irreproducibilidades entre ensayos, provocadas por el uso de diferentes MBs-prG-mAbDON y diferentes alícuotas de anticuerpo (almacenado a  $-20^\circ\text{C}$ ) se prepararon en el futuro mayores volúmenes de MBs modificadas con el anticuerpo. Las proporciones utilizadas fueron las correspondientes a la capacidad de unión de las MBs-prG ( $8 \mu\text{g}$  de mAbDON por mg de MBs-prG), pero una vez realizada la

inmovilización en tres viales *ependorf* al mismo tiempo, se homogeneizaron en un único vial *falcon* consiguiendo un mayor volumen (aproximadamente 4 ml), y consiguiendo así un mayor número de medidas (superior a 80 medidas) con la misma dispersión de MB-prG-mAbDON (almacenada a 4 °C hasta su uso).

El tiempo de vida del mAbDON a 4 °C, según las recomendaciones del fabricante, Europroxima, es de 1 mes. Una vez inmovilizado sobre las MBs-prG, comprobamos que su actividad y afinidad se mantuvo un tiempo máximo de 25 días, desde el primer momento de su unión a las MBs (Apartado 4.5).

### 3. Reproducibilidad entre 8 medidas sin competición

Se comprobó la reproducibilidad de las medidas para un mismo punto de calibrado en situación de no competitividad ( $i_{max}$ ), con los mismos biorreactivos y en los diferentes electrodos de una placa CH8. Esta experiencia es importante para asegurar la repetitividad y robustez del inmunosensor.

Para ello se midió la reproducibilidad (%DSR) entre 8 réplicas a partir de una incubación en ausencia de competición (señal máxima para DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ )), en disoluciones de 25  $\mu\text{g}$  MBs-prG-mAbDON (mAbDON 5  $\text{mg l}^{-1}$ ) y DON-HRP (10x, dilución 1/5 (v/v) en PBS 0,1 M, pH 7,4) en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  con PBS (0,1M).

En la tabla 28 se resumen los resultados obtenidos.

PUNTOS DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ )							
1	2	3	4	5	6	7	8
-0,281	-0,265	-0,292	-0,260	-0,314	-0,330	-0,310	-0,329

**Tabla 28: Reproducibilidad de 8 medidas iguales del inmunosensor sin competición,**

La desviación estándar relativa DSR (%) (n=8 puntos) es del 9,2 %.

Este valor de %DSR (8 réplicas) es pequeño y aceptable, y engloba a las medidas electroquímicas realizadas sobre los diferentes electrodos del electrodo múltiple CH8 además de la varianza proveniente de todas las etapas previas y propias del inmunoensayo. El valor es comparable con la reproducibilidad inherente a medidas voltamétricas DPV entre los 8 electrodos, que es de %DSR = 8%, y teniendo en cuenta además que la adición de las MBs sobre los electrodos es un proceso manual en el que se debe asegurar que la totalidad de las MBs queden confinadas dentro de la

superficie del ET para así contribuir (de forma reproducible) a la medida de la corriente de los productos de la reacción enzimática de la peroxidasa.

Con las 8 réplicas anteriores el intervalo de confianza de la señal es:

$$I (\mu\text{A}) = -0,298 \pm 0,023 \text{ (probabilidad del 95\%)}$$

#### 4. Reproducibilidad entre réplicas de medidas con competición con DON

Se realizaron simultáneamente de forma replicada dos medidas de cuatro concentraciones de DON para evaluar la reproducibilidad entre los puntos de dos calibrados competitivos. En ambos calibrados se utilizaron los mismos reactivos.

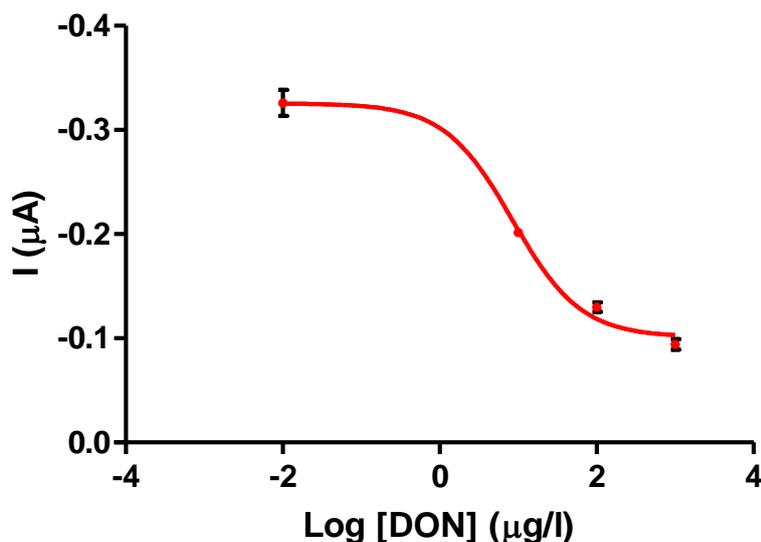
Los resultados se recogen en la tabla 29. Las condiciones son las mismas utilizadas en apartados anteriores y se resumen en el pie de la tabla (Tabla 29):

	DON ( $\mu\text{g/l}$ )			
	0,01	10	100	1000
<b>medida 1</b>	-0,313	-0,202	-0,134	-0,099
<b>medida 2</b>	-0,338	-0,200	-0,125	-0,089
<b>media</b>	-0,326	-0,201	-0,130	-0,094
<b>S</b>	0,018	0,001	0,006	0,007
<b>%DSR</b>	<b>5,4</b>	<b>0,7</b>	<b>4,9</b>	<b>7,5</b>

**Tabla 29: Reproducibilidad de réplicas con competición realizadas con DON (0-1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en PBS (0,1M). HQ (1,8 Mm) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (9,6 mM),  $\Delta E_{\text{CRA}}$  (0 a -0,25 V)**

Los resultados mostraron una reproducibilidad adecuada, con valores de %DSR pequeños y siempre inferiores al 8% ( $n=2$ ). De especial importancia es el punto correspondiente a una concentración de DON 0,01  $\mu\text{g l}^{-1}$  ( $i_{\text{max}}$ ) y de 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  ( $i_{\text{min}}$ ), que son los resultados con los que se calculan los parámetros logísticos del calibrado, además de valores %DSR muy pequeños en concentraciones de DON correspondientes al uso habitual de cuantificación de la micotoxina.

Los valores medios se utilizaron en el ajuste no lineal del calibrado. Los resultados se resumen en la tabla 30, y en la figura 78 se representa un calibrado conjunto promedio de los dos y los valores de incertidumbre asociados ( $\pm s$ ):



**Figura 78:** Reproducibilidad de réplicas de 2 puntos por concentración en el calibrado realizado en las condiciones habituales.

Los parámetros obtenidos en el ajuste sigmoideo con el modelo 3PL se recogen en la tabla 30:

Parámetros	
Mínimo (µA)	-0,101
Máximo (µA)	-0,325
EC <sub>50</sub> (µg l <sup>-1</sup> )	8,503
Pendiente	1
R	0,9935

**Tabla 30:** Parámetros logísticos del calibrado de la figura 78

El coeficiente de regresión del ajuste no lineal (GraphPad) indica la correcta correlación ajustada a una curva sigmoidea (R = 0,9935), y con pequeñas desviaciones estándar en cada punto (DSR < 8%). Por lo tanto, podemos concluir que las medidas replicadas de cada punto de concentración producen un buen ajuste del calibrado en el inmunosensor electroquímico.

### 5. Reproducibilidad de calibrados del inmunosensor entre días consecutivos

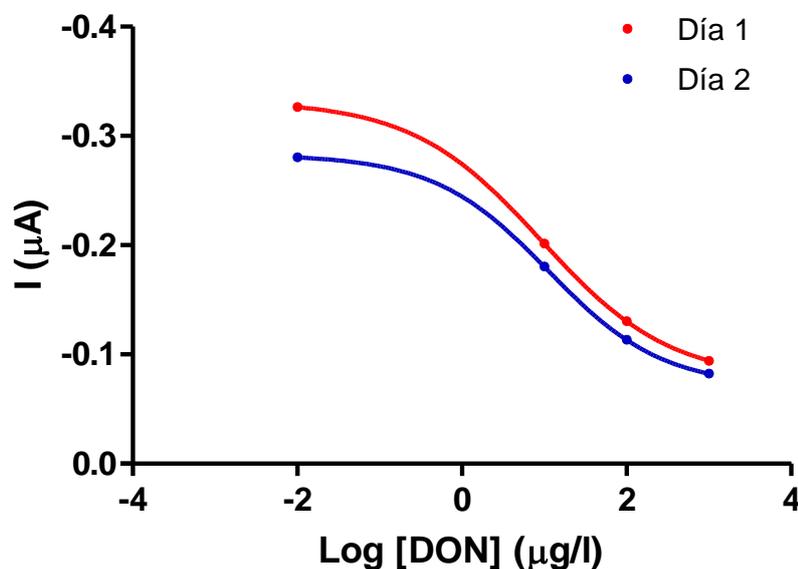
Otro de los factores importantes que pueden afectar a la reproducibilidad de los resultados es la comparación de dos calibrados realizados en las mismas condiciones y con los mismos biorreactivos (preparados el día 1), en días consecutivos. Para ello se compararon dos calibrados de 4 puntos en dos días diferentes.

Los resultados experimentales se presentan en la tabla 31:

	DON ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )			
	0,01	10	100	1000
<b>DIA 1</b>	-0,326	-0,201	-0,130	-0,094
<b>DIA 2</b>	-0,280	-0,180	-0,113	-0,082
<b>media</b>	-0,303	-0,191	-0,121	-0,088
<b>s</b>	0,032	0,015	0,012	0,009
<b>%DSR</b>	<b>10,6</b>	<b>7,8</b>	<b>9,6</b>	<b>9,6</b>

**Tabla 31: Medidas obtenidas de 2 calibrados efectuados con los mismos biorreactivos en 2 días consecutivos**

Los valores de DSR (%) son pequeños (entre 7,8 y 10,6%), aunque comparativamente algo mayores que en el apartado anterior, lo que indica diferencias mayores en el amplio conjunto de factores que afectan a la reproducibilidad del inmunoensayo, que ya varían de un día a otro, y que entre otros pueden ser debidos a la estabilidad y actividad de los biorreactivos (sobre todo de afinidad y el conjugado enzimático) utilizados.



**Figura 79: Reproducibilidad 2 calibrados en las condiciones habituales, realizados en días consecutivos**

Parámetros	Día 1	Día 2
Mínimo ( $\mu\text{A}$ )	-0,076	-0,070
Máximo ( $\mu\text{A}$ )	-0,332	-0,283
$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	9,18	11,19
Pendiente	0,5548	1,044
R	1	1

**Tabla 32: Parámetros del ajuste no lineal de los dos calibrados efectuados en días consecutivos**

Se estudió estadísticamente con el programa GradPhad si los dos calibrados son estadísticamente comparables con una probabilidad del 95%. Ninguno de los 4 parámetros ( $i_{\text{max}}$ ,  $i_{\text{min}}$ ,  $\text{EC}_{50}$  y pendiente) tuvo un valor comparable en los dos calibrados. Por lo tanto, aunque el ajuste individual al modelo de inhibición es correcto ( $R=1$ ), los calibrados son estadísticamente diferentes entre días consecutivos, lo que refuerza algo ya conocido del inmunoensayo como es la **necesidad de realizar el calibrado a diario** y simultáneamente a la medida de concentraciones en su aplicación analítica.

Lógicamente, para evitar errores en las determinaciones de DON siempre realizamos el calibrado competitivo y la etapa de competición de las muestras simultáneamente (en ningún caso reutilizamos el calibrado de un día para interpolar muestras medidas en un día diferente).

Como conclusión de los dos apartados anteriores, las mismas medidas efectuadas en el mismo momento son reproducibles ( $\% \text{DSR} < 7,5\%$ ), mientras que las mismas medidas realizadas en días sucesivos aumentan algo más la irreproducibilidad ( $\% \text{DSR} 8\text{-}11\%$ ).

#### **4.3.4 Inmunosensor electroquímico utilizando electrodos SPCEs múltiples (CH8): Amperometric Detection**

Para el desarrollo y las aplicaciones de los inmunosensores electroquímicos con el *array* de electrodos CH8 se utilizó un instrumento Palmsens, un potencióstato monocanal alimentado por baterías, de pequeño tamaño y gran portabilidad. A través de conexión USB, el *software* (PSTrace) permite medir con las técnicas voltamétricas más habituales (barrido lineal, impulsionales, voltametría cíclica, redisolución y las técnicas amperométricas de multi-pulso, cronoamperometría, fast-AD y *Amperometric Detection (AD)*).

De forma interesante, mediante la interfase denominada CH8 multiplexado, tal como se ha explicado anteriormente (apartado 3.4.6), es posible tomar simultáneamente hasta 8 medidas con este instrumento.

El instrumento es monopotenciostático, y en su conexión con la batería de los 8 electrodos posee dos opciones de detección amperométrica (AD):

- 1. Modo consecutivo:** se realizan medidas de un electrodo después del otro secuencialmente, hasta completar las 8 medidas. En este caso, en todos los electrodos se mide con control potenciostático de 3 electrodos (trabajo, auxiliar y referencia), lo que se escoge a través del cable de conexión adecuado e indicando al instrumento la forma de medida a través de la selección de una serie de *jumpers* o pines de conexión.
- 2. Modo alternado:** en este caso, se van midiendo en cada momento los 8 canales de forma multiplexada y simultánea, con una velocidad (máxima) de medida de los 8 canales cada 0,24 s (es decir, en cada medida de cada electrodo individual se utilizan 0,03 s, dejando a continuación el electrodo en circuito abierto un tiempo de 0,21 s hasta la próxima medida). En la práctica es como si se midieran simultáneamente los 8 canales del CH8 (lo que disminuye apreciablemente el tiempo total para estas medidas), si bien hay que tener en cuenta la posible aparición de una componente de corriente capacitativa al pasar de una situación de circuito abierto a otra de aplicación de un potencial eléctrico (que no es muy grande y ocurre en un tiempo pequeño).

En resumen, en el caso de realizar las medidas con la técnica “*Amperometric detection*” en modo consecutivo, las medidas se realizan en todos los casos sin el intervalo de 0,24 segundos entre medidas, lo que provoca que las señales se deban exclusivamente a la corriente faradaica recogida. Al contrario, con el modo alternado, se realizan las 8 medidas de forma multiplexada cada 0,24 s, es decir que para cada ET la aplicación de potencial dura un tiempo de 0,03 s y permanece en circuito abierto durante 0,21 s hasta la siguiente medida (aplicar potencial y medida de la corriente). Esto significa que al aplicar de nuevo el potencial aparece una componente capacitativa de la corriente, que se suma a la corriente faradaica, y como se ha estudiado y se describe más adelante no tuvo influencia en los parámetros analíticos de los calibrados del inmunoensayo (sensibilidad,  $EC_{50}$  y pendiente en las curvas de inhibición en donde se representa la corriente en función del logaritmo de la concentración de la micotoxina).

Podría parecer que, *a priori*, el modo alternado puede traer inconvenientes, pero en la práctica se demostró que los calibrados se realizaron correctamente, sobre todo por el

hecho de los pequeños tiempos de *gap* de potencial y pequeños valores del mismo (-0,25 V), y también al hecho de que a todos los electrodos se les aplica el mismo potencial eléctrico (conexión del *jumper* J6).

El multiconector (CH8 *multiplexer*) (Figura 24) puede usarse en 4 configuraciones diferentes, que vienen definidas por el número de *jumpers* o puentes conectados y el tipo de cable de conexión desde este multiplexor y la batería de electrodos. En el interior de este multiconector hay siete *jumpers* marcados desde J1 a J7.

La conexión de cada uno de los *jumpers* tiene diferentes efectos en las conexiones electrónicas, que se resumen en la tabla 33:

JUMPERS CONECTADOS	EFFECTOS ELECTRÓNICOS PRODUCIDOS
J1	Conecta ER y EA
J2	Sensor con más de un ET y un único ER/EA combinado
J3	Sensor con más de un ET y un único ER/EA combinado
J4	Cada sensor tiene su EA
J5	Cada sensor tiene su ER
J6	El potencial aplicado pasa por los 8 ET
J7	Generalmente en circuito abierto

**Tabla 33: Efectos electrónicos producidos con la conexión de diferentes jumpers en el instrumento Palmsens en formato multiplexado**

Las posibles configuraciones de medida, provocadas por la conexión o desconexión de los diferentes *jumpers* en cada caso son:

- 1. Configuración 1 (*jumpers* J4+J5):** consiste en *arrays* con hasta 8 electrodos de trabajo, 8 de referencia (ER) y 8 auxiliares (EA) independientes todos ellos. El potencial se aplica solamente en el canal elegido, estando el resto en circuito abierto, es decir no existe conexión entre ellos ni comparten ninguno de sus conexiones, consiguiendo así 8 electrodos independientes, cada uno con su electrodo de trabajo, auxiliar y de referencia diferenciados.
- 2. Configuración 2 (*jumpers* J1, J4, J5 y J6):** consiste en *arrays* con hasta 8 electrodos de trabajo y 8 electrodos combinados referencia/auxiliar (conexión simultánea de los *jumpers* J1+J4+J5). Si se ajusta el puente J6, el potencial (a través de la conexión conjunta ER/EA) se aplica continuamente a los 8

electrodos, y se produce la conexión eléctrica de los 8 electrodos auxiliares y los 8 de referencia, manteniendo sus 8 electrodos de trabajo independientes, formando en cada celda electroquímica un sistema de 2 electrodos y no de 3. Para que el potencial aplicado pase por todos los electrodos de trabajo es preciso conectar el jumper J6. En caso de no conectar J6 (configuración con J1, J4, J5) el potencial aplicado solo llega a los canales seleccionados, y los canales no seleccionados permanecerían en circuito abierto.

3. **Configuración 3** (*jumpers* J2+J3): *arrays* con 8 electrodos de trabajo compartiendo un solo electrodo de referencia y un solo electrodo auxiliar (J2+J3).
4. **Configuración 4:** *Sensor arrays* con 8 electrodos de trabajo compartiendo un electrodo combinado referencia /auxiliar

En todas las configuraciones, al tratarse de un instrumento mono-potenciostático se mide de forma multiplexada cada sensor individualmente, dejando los electrodos no seleccionados en circuito abierto. Las configuraciones de sensores 2, 3 y 4 tienen la posibilidad de dejar los sensores o las celdas no seleccionadas en circuito abierto o bien aplicar el mismo potencial a todos los sensores o celdas, siempre que se utilicen electrodos combinados ER/EA.

De las configuraciones descritas, se trabajó en detección amperométrica (AD) con la configuración 1 y con la configuración 2. La diferencia entre ambas son los diferentes *jumpers* utilizados (conectados) que producen diferentes señales y prestaciones analíticas dependiendo de la forma de medida que se desee.

Para las medidas electroquímicas de los productos de la reacción enzimática de la HRP se utilizó detección amperométrica (AD) con las condiciones expresadas en la tabla 34.

Amperometric Detection	
<b>E</b>	-0,25 V
<b>E cond</b>	0 V
<b>E dep</b>	0 V
<b>interv</b>	0,24 s
<b>t run</b>	90 s
<b>t cond</b>	0
<b>t dep</b>	0
<b>t eq</b>	0

**Tabla 34: Condiciones electroquímicas utilizadas para la técnica Amperometric Detection (-0,25V)**

Las condiciones que permite variar el potenciostato son: E (potencial de trabajo),  $E_{\text{cond}}$  (potencial de acondicionamiento),  $E_{\text{dep}}$  (potencial de deposición), *interv* (intervalo de tiempo entre electrodos),  $t_{\text{run}}$  (tiempo de medida)  $t_{\text{cond}}$  (tiempo de acondicionamiento),  $t_{\text{dep}}$  (tiempo de deposición),  $t_{\text{eq}}$  (tiempo de equilibrio).

Los parámetros que aparecen en la tabla anterior (Tabla 34) fueron seleccionados en el minipotenciostato de PalmSens (PSTrace) con el objetivo de utilizar las condiciones más parecidas a las utilizadas anteriormente con el potenciostato (Autolab PGSTAT12) y los SPCEs individuales. Para realizar la técnica AD no es necesario aplicar un potencial de acondicionamiento ( $E_{\text{cond}}$ ) ni de deposición ( $E_{\text{dep}}$ ).

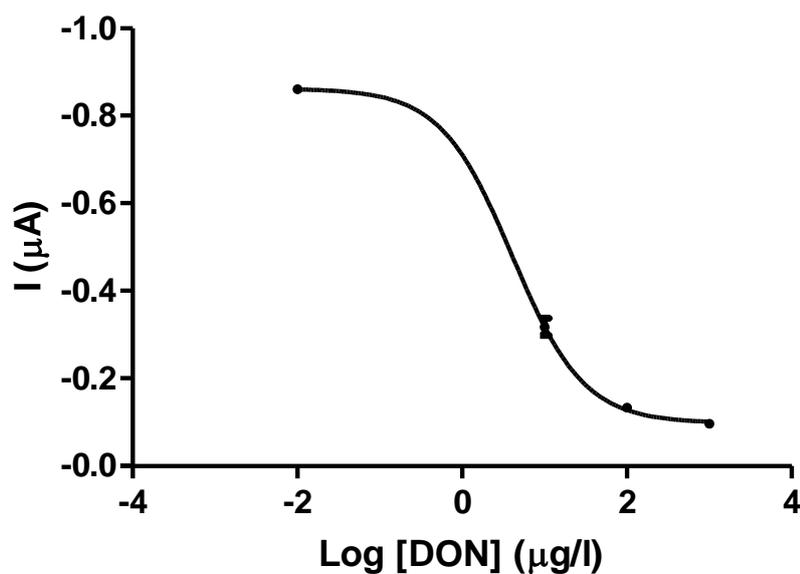
Se realizaron determinaciones por AD aplicando un potencial (E) de -0,25 V durante un tiempo total de medida ( $t_{\text{run}}$ ) de 90 s con un intervalo de tiempo entre electrodos de 0,24 s, el mínimo tiempo que permite el instrumento.

#### 4.3.4.1 Medidas del inmunosensor con configuraciones 1 y 2

Para comparar las posibilidades de medida del potenciostato Palmsens, se compararon las configuraciones 1 (J4+J5) y 2 (J1+J4+J5+J6) realizando 2 calibrados con el inmunosensor de DON con la técnica AD y las condiciones de la tabla anterior (Tabla 34). En ambos casos, tal como se ha explicado, la medida de los 8 electrodos se realiza de forma simultánea (*modo alternate*), con la consiguiente reducción del tiempo necesario para las 8 medidas (AD-a), simplemente modificando las configuraciones del cable conector en cada caso (*jumpers* conectados).

En el calibrado competitivo de 4 puntos replicados se utilizaron 25  $\mu\text{g}$  de MBs-prG-mAbDON (mAbDON 5  $\text{mg l}^{-1}$ ), 25  $\mu\text{l}$  de DON-HRP (10x, dilución 1/5 (v/v) y DON (0-1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), 60 minutos de tiempo de competición. La concentración de los sustratos enzimáticos utilizada fue de HQ (1,8 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (9,6 mM) aplicando un potencial de reducción de -0,25 V después de 10 minutos de reacción enzimática.

En la figura 80 se muestran los resultados obtenidos con la configuración 1.



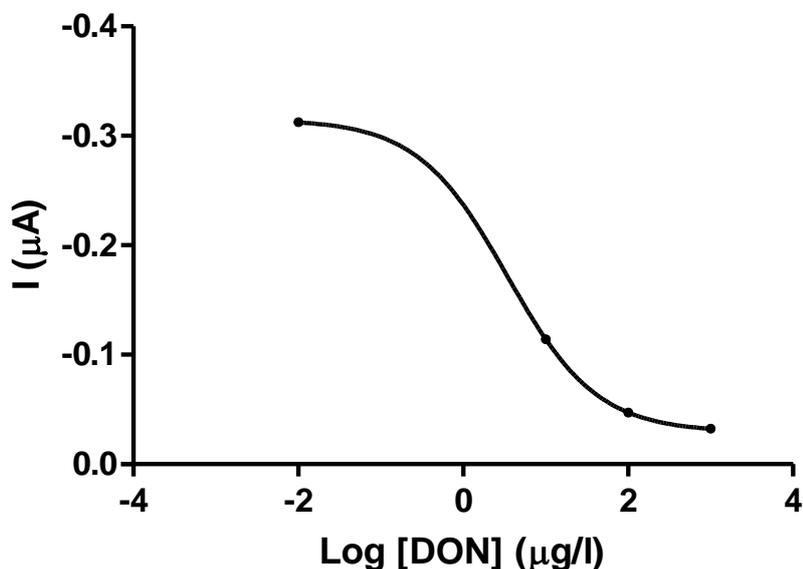
**Figura 80:** Calibrado por (AD-a) aplicando  $E = -0,25\text{V}$  con la configuración 1 (J1, J4).

Con la técnica “*Amperometric Detection*” (AD) en modo alternado (AD-*alternate*) se obtienen mayores señales que en el caso de la técnica anteriormente utilizada “*Multistep Amperometric*” (MA) ( $i_{\text{max}}$  desde -0,300  $\mu\text{A}$  a -0,860  $\mu\text{A}$ ), y además mejora la sensibilidad del inmunosensor, disminuyendo el factor  $\text{EC}_{50}$  de aproximadamente 9  $\mu\text{g l}^{-1}$  en MA a 3,6  $\mu\text{g l}^{-1}$  en AD-a, configuración 1. La disminución de señal producida por la reacción de competición ( $i_{\text{max}}$  vs  $i_{\text{min}}$ ) es de un 90% aproximadamente.

Con esta forma de medida se facilita enormemente la adición de los sustratos enzimáticos (HQ y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que se realizan al mismo tiempo, se evita controlar el tiempo de reacción en las 8 reacciones enzimáticas que ahora son simultáneas, y mejora notablemente la rapidez de las 8 medidas de corriente que se realiza en los 90 segundos de la toma del valor de la corriente para los 8 sensores. Al completar más rápidamente las 8 medidas, se disminuye el riesgo de oxidación de la HQ al estar menos tiempo expuesta al aire.

Con el fin de evaluar la influencia de las conexiones de los *jumpers* se realizó un segundo calibrado en las condiciones anteriores, utilizando como técnica

electroquímica “*Amperometric Detection*” con la configuración 2 (conexión J1+J4+J5+J6) y en modo AD-a (AD alternado).

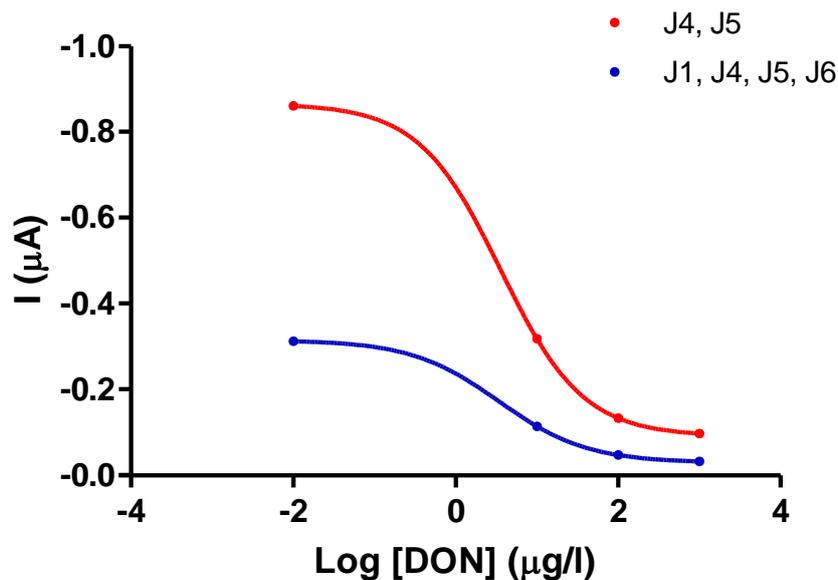


**Figura 81: Calibrado competitivo en modo AD-(a) y configuración 2. Mismas condiciones que en la figura 81**

En la comparativa realizada entre las señales obtenidas con la técnica “*Amperometric Detection*” utilizando la configuración 2 (conexión *jumpers* J1, J4, J5 y J6) con la técnica “*Multistep Amperometric*” puede decirse que las señales obtenidas son aproximadamente iguales (próximas a -0,310 µA).

Con respecto a los valores del factor  $EC_{50}$  obtenidos para las dos configuraciones (1 y 2) posibles en la técnica *Amperometric detection*, modo alternado se observó una mejora de la sensibilidad similar en ambos casos. Los  $EC_{50}$  obtenidos con AD-a tanto con configuración 1 como con configuración 2, son próximos a  $3,5 \mu\text{g l}^{-1}$  (Tabla 35), menores con respecto al  $EC_{50}$  obtenido por MA de aproximadamente  $9 \mu\text{g l}^{-1}$ . En cualquier caso, son valores  $EC_{50}$  lo suficientemente pequeños para permitir la determinación de DON con una sensibilidad muy alta, y suficiente para los objetivos de determinación por debajo de los límites legislados por la UE.

En la figura 82 se comparan los calibrados AD (modo alternado) con ambas configuraciones (configuración 1, J4 y J5, y configuración 2, J1, J4, J5 y J6 conectados), así como los parámetros de ajuste obtenidos en ambos calibrados (tabla 35):



**Figura 82:** Comparación de calibrados de DON realizados por AD-a con las configuraciones 1 y 2

El cambio de configuración 1 (J4 y J5) a configuración 2 (J1, J4, J5 y J6) con la técnica AD en modo alternado, produce menores corrientes para cada una de las concentraciones del DON con las mismas condiciones del inmunoensayo y el mismo potencial (-0,25 V), aproximadamente tres veces menores para la configuración 2. Sin embargo, la sensibilidad del calibrado no varía ( $EC_{50} = 3,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

En la tabla 35 se recogen los ajustes de ambos calibrados, observándose que lo importante es la reproducibilidad de estos calibrados para cada modo y que el valor del  $EC_{50}$  es el mismo, reflejando así el mismo comportamiento de porcentajes de inhibición producidos por las mismas concentraciones del DON.

Parámetros	J4 y J5	J1, J4, J5 y J6
Mínimo ( $\mu\text{A}$ )	-0,09087	-0,029
Máximo ( $\mu\text{A}$ )	-0,8649	-0,3147
$EC_{50}$ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	3,592	3,413
Pendiente	0,8583	0,7988
R	1	1
%Competición	89,5	90,7

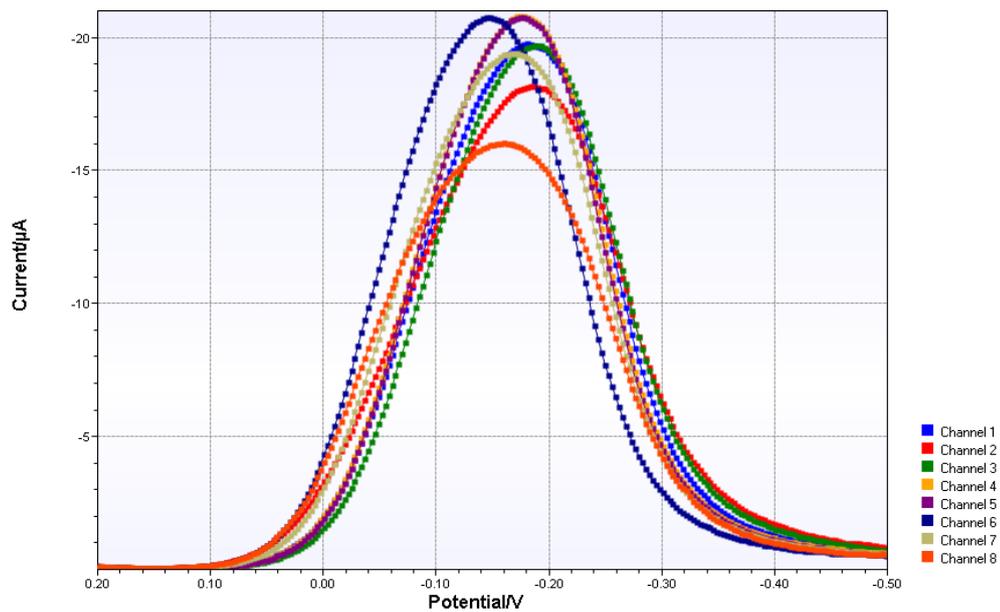
**Tabla 35:** Ajustes de los calibrados (modelo 3PL) con las configuraciones instrumentales indicadas

Se obtuvo aproximadamente el mismo valor de  $EC_{50}$  ( $3,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y un porcentaje de competición muy similar para ambas configuraciones, pero además se obtuvo un incremento de señales tanto en las máximas como en las mínimas aproximadamente del triple para la configuración 1 (J4 y J5).

Comparando los resultados obtenidos mediante “*Amperometric Detection*” en la configuración 2 y los resultados que se obtuvieron por “*Multistep Amperometric*” pueden considerarse similares ( $i_{\text{max}} = -0,310 \mu\text{A}$ ), realizando una mejora el modo de medida que pasa a ser simultánea en lugar de secuencial y una disminución positiva del factor  $EC_{50}$  hasta  $3,5 \mu\text{g l}^{-1}$ , frente al  $EC_{50}$  de  $9 \mu\text{g l}^{-1}$  para las determinaciones por *Multistep Amperometric*. En cualquier caso, la señal obtenida por “*Amperometric Detection*” en la configuración 1 es tres veces superior (a la obtenida con AD-a configuración 2 y en MA). Por lo tanto, después del estudio anterior, se seleccionó la configuración 1 para el desarrollo del sensor por su incremento en las señales máximas, manteniendo el resto de parámetros constantes.

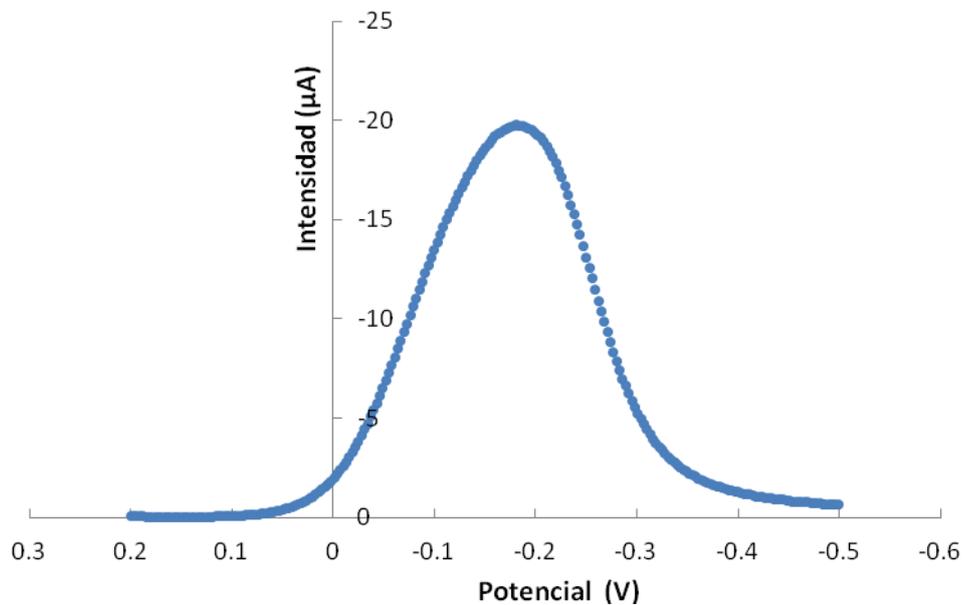
Para conocer el potencial de amperometría correcto con los nuevos modos de trabajo, en el que ocurre la reducción voltamétrica de la *pBQ* generada enzimáticamente, que depende de las tintas utilizadas en el serigrafiado de los electrodos del CH8 y de su estado superficial (es decir, de la constante estándar de intercambio de electrones y de la velocidad de la reacción electroquímica), se registraron voltagramas de pulso diferenciales (DPV) a una velocidad de barrido de potenciales de  $10 \text{ mV/s}$  una diferencia de potencial de  $\Delta E = 2 \text{ mV}$ , y un  $\Delta E_p = -25 \text{ mV}$  (Figura 83), de una disolución de *pBQ* ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) en tampón PBS  $0,1\text{M}$ , pH  $7,4$ .

La representación de los 8 voltagramas obtenidos por DPV de las 8 determinaciones de *pBQ* ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) en tampón PBS  $0,1\text{M}$ , pH  $7,4$ , se recogen en la figura 83:



**Figura 83:** Voltagramas DPV de una disolución pBQ ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ), 8 medidas. Condiciones instrumentales DPV:  $\Delta E = 2 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_p = -25 \text{ mV}$ ;  $V = 10 \text{ mV/s}$

De los 8 voltagramas medidos (Figura 84), se obtuvo un potencial de máxima corriente del pico de:  $E_p = -0,174 \pm 0,009 \text{ V}$ , %DSR = 8,0% (n=8), siendo  $i_p = -19,39 \pm 1,07 \mu\text{A}$ , %DSR = 8,2% (n=8).



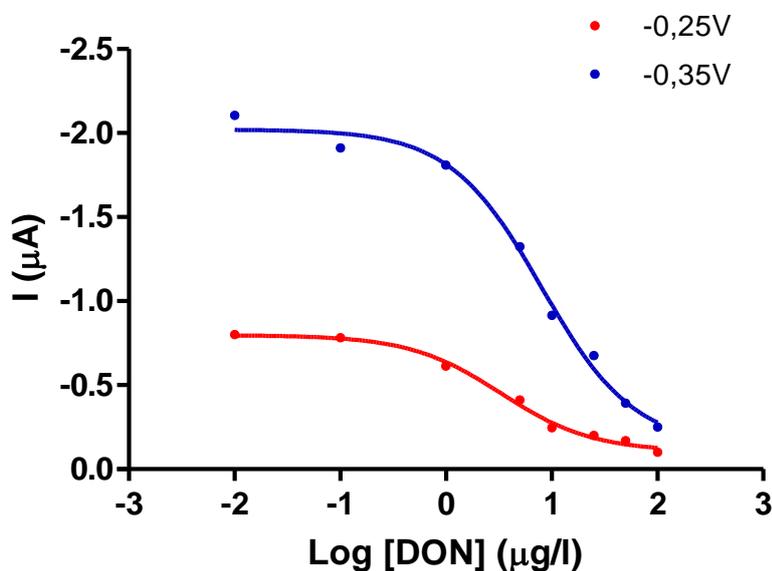
**Figura 84:** Voltagrama DPV de una disolución pBQ ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ). Señal media obtenida de 8 medidas consecutivas

La vuelta a la línea de base del voltagrama ocurre a un potencial aproximadamente de  $-0,35$  V. Si consideramos un potencial amperométrico del orden de  $-0,20$  V mayor que el correspondiente al  $E_p = -0,174$  V como potencial para la determinación amperométrica, entonces el potencial a aplicar sería aproximadamente de  $E_{amp} = -0,35$  V, menor (más reductor) que el utilizado en los electrodos SPCEs individuales ( $E_{amp} = -0,25$  V), en donde la velocidad de transferencia de carga sería menor. Este efecto puede verse en la figura 85, en donde se observan menores corrientes aplicando este último potencial amperométrico, frente a un potencial  $E_{amp} = -0,35$  V.

El desplazamiento de los voltagramas a potenciales algo más catódicos en arrays CH8 frente a electrodos SPCEs (Universidad de Florencia) puede deberse a la tinta del electrodo de referencia diferente, al procesado de estas tintas y por lo tanto a la diferente velocidad de transferencia de carga sobre el propio electrodo de trabajo.

Se evaluaron además las señales máximas obtenidas a un potencial de reducción de  $-0,25$  V y a  $-0,35$  V, utilizando AD modo alternado con la configuración 1, sobre los CH8 realizando 2 calibrados competitivos en las condiciones optimizadas para el inmunosensor.

En la figura 85 se muestran los resultados.



**Figura 85: Calibrado de DON con detección electroquímica (AD-a, configuración 1) utilizando los dos potenciales de  $-0,25$  V y  $-0,35$  V**

Parámetros	-0,25V	-0,35V
<b>Mínimo (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	-0,1026	-0,1360
<b>Máximo (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	-0,7957	-2,019
<b>EC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g l}^{-1}</math>)</b>	3,315	8,062
<b>Pendiente</b>	1	1
<b>R</b>	0,9965	0,9963
<b>%Competición</b>	87,1	93,3

**Tabla 36: Parámetros del ajuste logístico 3PL de los 2 calibrados con los potenciales de medida amperométrica indicados utilizando los dos potenciales de -0,25 V y -0,35 V.**

Pueden observarse valores del EC<sub>50</sub> muy diferentes, sin embargo el menor valor de señal máxima obtenido con un E<sub>amp</sub>=-0,25 V simplemente es debido a una insuficiente corriente máxima (para altas concentraciones de HRP) que hace que la disminución de la señal sea excesivamente pequeña en este caso.

Por esto, se decidió modificar **el potencial de trabajo en AD a -0,35 V** con el objetivo de realizar la reacción de reducción completa del pBQ generado enzimáticamente.

#### **4.3.4.2 Medidas del inmunosensor con modos de trabajo alternado (AD-a) y consecutivo (AD-c) con configuración 1**

El software del multipotenciostato (PSTrace) ofrece 2 modos de medida en detección amperométrica (AD), que son en modo consecutivo (AD-c) y en modo alternado (AD-a), tal como se ha explicado con anterioridad. Ya se ha explicado anteriormente que el modo AD-a es mucho más rápido y sencillo en la manipulación que el modo AD-c.

En este apartado se comparan ambos modos y su repercusión en las propiedades analíticas del inmunosensor. En modo AD-a, las 8 medidas se realizan de forma prácticamente simultánea en forma multiplexada, lo que facilita enormemente la forma de trabajo en la adición de los sustratos del enzima y se produce una importante reducción del tiempo de la medida amperométrica a los 90 segundos. Al contrario, en modo AD-c se realizan secuencialmente las medida amperométricas, lo que implica sincronizar los tiempos, de la adición de los sustratos de los 8 canales uno detrás del otro durante los 10 minutos de duración de la reacción enzimática de revelado, y las 8 medidas consecutivas en los tiempos de 90 s.

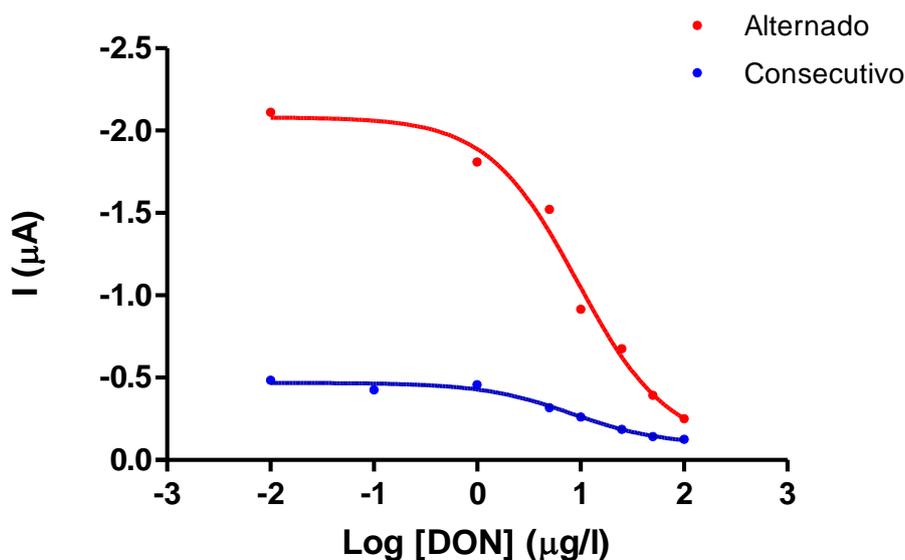
Las condiciones electroquímicas para ambos modo de trabajo son las indicadas en la tabla 37 siguiente:

Amperometric Detection Conf 1 ( J4, J5)	
E	-0,35 V
E cond	0 V
E dep	0 V
t run	90 s
t cond	0
t dep	0
t eq	0

**Tabla 37: Condiciones electroquímicas utilizadas para la técnica Amperometric Detection (-0,35 V) con configuración 1 en AD-a y AD-c**

Para evaluar las prestaciones analíticas que ofrecen ambos modo de trabajo (alternado y consecutivo) y buscando una mejora de las prestaciones analíticas, en el inmunosensor se realizaron 2 calibrados competitivos de 8 puntos utilizando las condiciones habituales de trabajo [25 µg de MBs-prG-mAbDON (mAbDON 5 mg l<sup>-1</sup>), 25 µl de DON-HRP (10x, dilución 1/5 (v/v) y DON (0-100 µg l<sup>-1</sup>), 60 minutos de tiempo de competición]. La reacción enzimática sobre los ET del array CH8 se realizó durante 10 minutos con HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,6 mM) aplicando finalmente un potencial de reducción de -0,35 V.

Los calibrados realizados en las condiciones descritas, con la técnica amperométrica en sus dos modos de trabajo (AD-a y AD-c) utilizando la configuración 1 se han representado en la figura 86, y los ajustes 3PL de los mismos se resumen en la tabla 38.



**Figura 86: Comparativa de calibrados de DON realizados en modo AD-a y AD-c ( $E_{amp}=-0,35V$ ), en las condiciones de trabajo habituales**

Parámetros	Alternado	Consecutivo
Mínimo ( $\mu\text{A}$ )	-0,082	-0,091
Máximo ( $\mu\text{A}$ )	-2,079	-0,466
$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	9,336	8,302
Pendiente	1	1
R	0,9925	0,9908
%Competición	96,0	80,4

**Tabla 38: Parámetros logísticos del calibrado de inhibición en los dos modos de medida amperométrica AD-a y AD-c ( $E_{amp}=-0,35\text{V}$ )**

Las corrientes en modo AD-a son mayores que en el modo AD-c (ambos con configuración 1), pero en el caso de las corrientes mínimas los valores son muy próximos y significativamente iguales (95% nivel de confianza). Además se han obtenidos mayores porcentajes de bajada de la señal de inhibición en el caso AD-a. Sin embargo, los valores de sensibilidad del inmunosensor, tomados como los valores del  $\text{EC}_{50}$ , son estadísticamente iguales para ambas formas de medida. En ambos casos, el ajuste no lineal proporciona coeficientes de correlación mayores que 0,9900, analíticamente aceptables para un buen ajuste al modelo teórico.

El aumento de señales con AD-a frente a las señales obtenidas con AD-c, es debido al tiempo de medida multiplexado cada 0,24 segundos para los 8 electrodos. El intervalo de tiempo en circuito abierto (0,21 s) de cada electrodo de trabajo aporta una corriente capacitativa al aplicar nuevamente el potencial, que siempre es constante ( $E=-0,35\text{ V}$ ). En el modo consecutivo, no existe este vacío de control potencioestático (no aparece la pequeña componente capacitativa), por lo tanto las corrientes medidas son únicamente debidas a la corriente faradaica y aparecen del orden de 3 veces inferiores.

Por el aumento obtenido en las señales máximas después de comprobar que el efecto de la corriente capacitativa no afecta a los resultados, por la facilidad y rapidez en las medidas electroquímicas mejorando la estabilidad de la HQ y la obtención de resultados, se seleccionó como **condiciones óptimas de medidas el modo alternado (Amperometric detection, alternado AD-a) en la configuración 1 (J4+J5) aplicando un potencial de reducción de -0,35 V.**

Los calibrados anteriores en modo AD-a configuración 1, con las mismas condiciones tanto químicas como electroquímicas optimizadas, se repitió a lo largo de diferentes días con el fin de comprobar su reproducibilidad y repetitividad. Como ejemplo concreto de todos los calibrados realizados, se representa en la figura 87 dos calibrados de días consecutivos, con los mismos biorreactivos y condiciones de trabajo

optimizadas para el inmunosensor, realizando la determinación por AD-a, configuración 1.

En la tabla 39 posterior se comparan estadísticamente los parámetros del calibrado, siendo todos ellos significativamente iguales para una probabilidad del 95%

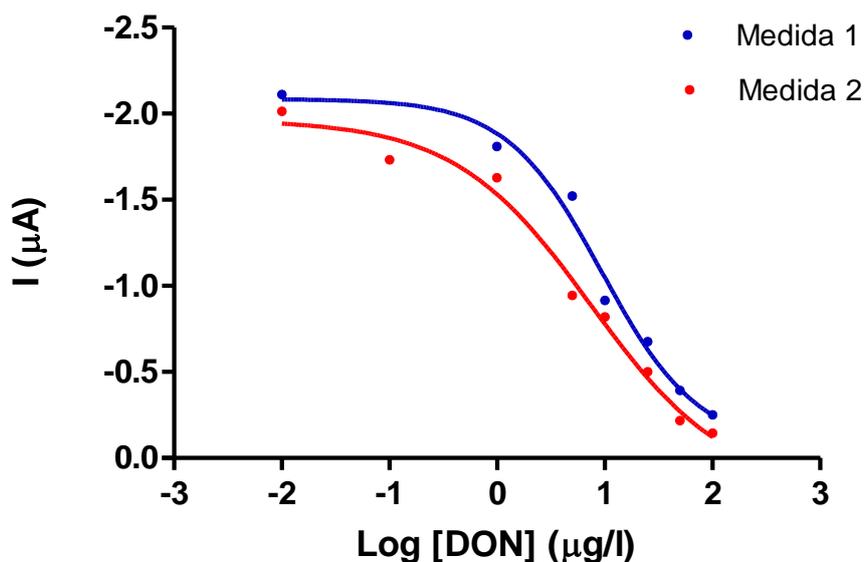


Figura 87: Calibrados en días consecutivos ( $E_{amp}=-0.35V$ ) en modo AD-a configuración 1

Parámetros	Medida 1	Medida 2	Comparativa estadística
Mínimo ( $\mu A$ )	-0,082	-0,188	Comparable (95% prob)
Máximo ( $\mu A$ )	-2,079	-1,962	Comparable (95% prob)
$EC_{50}$ ( $\mu g l^{-1}$ )	9,336	7,414	Comparable (95% prob)
Pendiente	0,7625	0,6873	Comparable (95% prob)
R	0,9925	0,9937	-
%Competición	96,0	90,4	-

Tabla 39: Comparación de los parámetros logísticos de los dos calibrados anteriores

En la comparativa estadística se concluye que los cuatro parámetros del ajuste sigmoideo (intensidad máxima, intensidad mínima, factor  $EC_{50}$  y pendiente obtenida con el ajuste) pueden considerarse comparables con una probabilidad del 95%. En la comparación de las curvas completas se ha obtenido que son estadísticamente iguales, por lo tanto puede asegurarse que todas las variables del inmunosensor, así como la técnica electroquímica seleccionada son adecuadas para el desarrollo del inmunosensor y que además los **calibrados obtenidos a los largo de los días son**

**reproducibles** trabajando con la técnica *Amperometric Detection*, modo alternado (AD-a) en la configuración 1.

Con todas las variables influyentes en el inmunosensor, se procedió a estimar la concentración mínima de DON que se puede determinar cuantitativamente. Se constata que en la curva sigmoidea no es conveniente la interpolación de las muestras en las zonas altas ni bajas (conocidas como mesetas), si no que la mejor zona para ello es la parte lineal de la curva, siendo el punto óptimo para la interpolación de una muestra corresponde con el  $EC_{50}$  situado en el punto central de la parte lineal de la sigmoidea. Por no corresponderse con un calibrado lineal no se puede hablar del límite de detección del inmunosensor propiamente dicho.

Por ello se utilizará como criterio, que la concentración mínima detectables con el inmunosensor se calcula como la concentración que se obtiene con el 10% de la señal máxima (10% de inhibición de la señal) dado que en ese punto comienza aproximadamente la zona lineal de la curva sigmoidea y es la zona más apropiada y con la que se mejora la exactitud de los resultados.

Con esto, la **concentración mínima de DON que se va a poder determinar con el inmunosensor se trata de  $3,07 \mu\text{g l}^{-1}$** , concentración calculada en el volumen del pocillo donde se realizan los ensayos (100  $\mu\text{l}$ ).

## 4.4 INTERFERENCIAS Y REACTIVIDAD CRUZADA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL (mAbDON) CON OTRAS MICOTOXINAS

### 4.4.1 Interferencias producidas por disolventes orgánicos

Las micotoxinas son comúnmente extraídas de cereales finamente triturados o de harinas utilizando agua (tamponada a un cierto pH, por ejemplo con aniones fosfato) o con mezclas de agua con otros disolventes polares orgánicos, dependiendo de la estructura química de la micotoxina, sus propiedades químicas o del método de análisis que se vaya a aplicar posteriormente [276]. Dependiendo de la polaridad de la micotoxina y del procedimiento utilizado de limpieza se usan diferentes disolventes de extracción [57].

Muchos autores proponen extracciones de DON con disolventes orgánicos especialmente MeOH o ACN en porcentajes superiores al 80 % en agua debido a los altos porcentajes de recuperación obtenidos, además de que su uso garantiza un extracto más limpio, especialmente en los casos de determinaciones mediante técnicas de cromatografía líquida HPLC [57; 277; 278]. En la bibliografía científica consultada se recogen diferentes procedimientos de extracción, siendo para el DON los disolventes de extracción más comunes el agua, PBS (0,1 M, pH 7,4), MeOH/H<sub>2</sub>O (84:16, v/v), ACN/H<sub>2</sub>O (84:16, v/v) [18; 58; 257], o ACN/H<sub>2</sub>O/HAc (79:20:1 v/v/v) [279; 280]. En los piensos de trigo, maíz y productos relacionados, se probó una mezcla de ácido fórmico (0,1 %)/ACN (43:57 v/v) para dar una mejor recuperación de DON, en comparación con otras mezclas de disolventes ensayados, tal como metanol/acetato de etilo/agua (20: 70:10) , MeOH/H<sub>2</sub>O (40:60 v/v, con HCl 0,1 M , pH 4) , y MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40 v/v, con HCl 0,1 M , pH 4). Se encontró que las recuperaciones de DON en las tres mezclas están por debajo de 50 % [281].

Según la bibliografía los disolventes de extracción más utilizados en la extracción del DON son mezclas en diferentes proporciones de MeOH/H<sub>2</sub>O (inmunosensores) y ACN/H<sub>2</sub>O (HPLC), u otros como ACN/H<sub>2</sub>O acidificado con acetona y AcEt/ACN/H<sub>2</sub>O [282]. La incorporación de agua en el disolvente de extracción provoca que los granos de cereales se hinchen, lo cual beneficia el proceso de extracción del analito de la matriz correspondiente [66].

Al contrario, el uso de este tipo de disolventes orgánicos en los inmunoensayos puede producir interferencias en la determinación posterior o perjudicar la reacción de afinidad entre el antígeno y el anticuerpo, así como disminuir la actividad enzimática de la HRP. En la mayoría de los casos en los que la extracción de DON se llevó a cabo

en MeOH o en ACN (o en cualquiera de las mezclas de disolventes indicadas), la determinación de DON se realizó por técnicas espectrofotométricas o cromatográficas en los que no intervienen anticuerpos [153; 283] o realizando una dilución previa que disminuya la concentración de disolvente orgánico al mínimo antes de la etapa de reconocimiento con el anticuerpo.

Debido al carácter marcadamente polar del DON, cabe esperar que es posible su extracción completa con disolventes acuosos o con el propio tampón de fosfatos (PBS) que comúnmente se utiliza durante las etapas de incubación, competición y lavados del inmunosensor, así como en la etapa final de la reacción enzimática y la detección electroquímica [66]. En la bibliografía se muestran excelentes resultados de recuperación de DON en el extracto superiores al 97% [18] por lo que para evitar problemas posteriores y tras un estudio realizado con los disolventes orgánicos recomendados se decidió realizar la **extracción en PBS (0,1 M, pH 7,4)** disminuyendo así las interferencias y evitando la introducción de otros reactivos o disolventes en el procedimiento del inmunosensor.

La mayoría de los métodos inmunoquímicos para la determinación de micotoxinas se basan en procedimientos de extracción de muestras adquiridos de otras técnicas de análisis, y a menudo implican el uso de disolventes orgánicos. Después de la extracción y con el objetivo de eliminar las partículas sólidas, por lo general el extracto se filtra a través de un filtro de papel o un microfiltro, antes de realizar el ensayo. Este procedimiento general es satisfactorio en muestras de cereales o de harinas de cereales, pero podría dar una sobreestimación de toxinas o incluso resultados falsos positivos para matrices alimentarias más complejas como en el vino [105]. El problema principal es la influencia del disolvente orgánico sobre los reactivos bioquímicos de afinidad (anticuerpo) o catalíticos (enzima HRP).

La determinación de la concentración de las micotoxinas, requiere un tratamiento previo de la muestra, que puede ser más o menos sencillo dependiendo del tipo de matriz. La mayoría de las extracciones (alimentos, cereales, piensos) se realizan utilizando columnas de fase sólida o sobre todo extracciones en agua o mezclas con disolventes orgánicos [66]. También es frecuente en técnicas instrumentales como HPLC o en procedimientos oficiales, etapas de limpieza de la matriz, eliminación de interferencias o de preconcentración de la(s) micotoxina(s), por ejemplo utilizando columnas de inmunoafinidad (IACs) [65; 276]. Estas columnas de inmunoafinidad tienen el inconveniente de su elevado coste y que son de un solo uso.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se ensayaron diferentes posibilidades de extracción indicadas más adelante. Previamente, se evaluó la posible interferencia de diferentes porcentajes de dos de estos disolventes orgánicos más utilizados: metanol y

acetonitrilo, en un intervalo de porcentajes en volumen acuoso desde 0 a 100%, llevando a cabo la reacción de competición en presencia de los mismos, utilizando medidas de absorbancia ELISA. El objetivo fue comprobar si existe variación de señal de absorbancia en presencia del disolvente orgánico o si no influye significativamente en las reacciones del inmunoensayo.

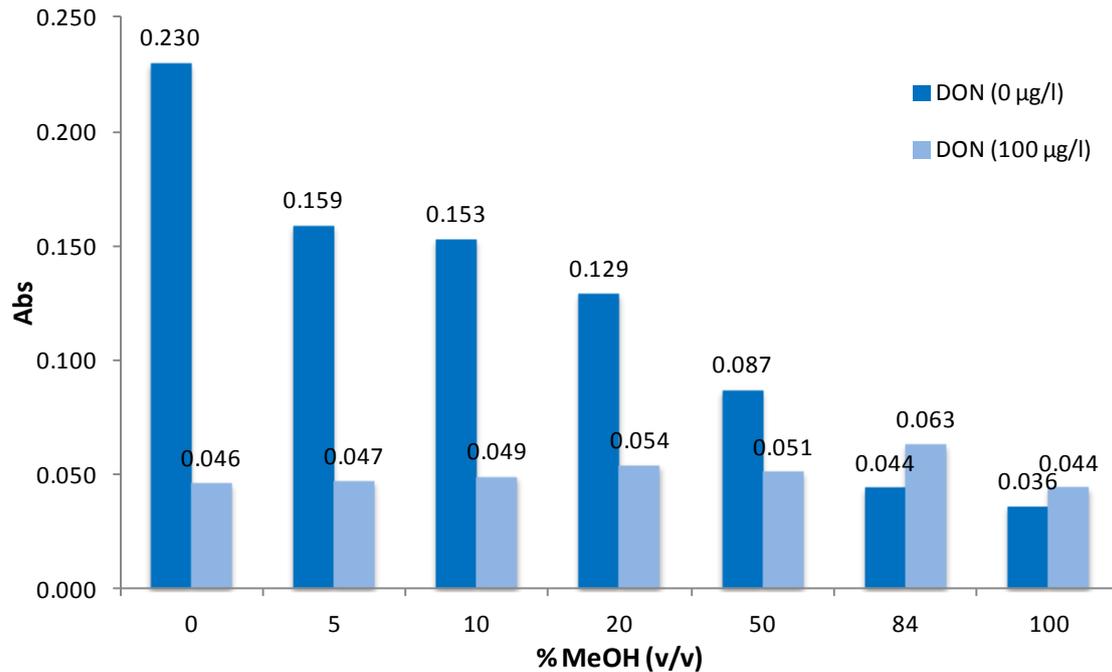
El intervalo de porcentajes de disolvente orgánico se refiere en todos los casos al porcentaje de disolvente que queda en el pocillo en el momento de la competición, simulando la cantidad de disolvente de extracción que llegaría al inmunosensor después de las diluciones en los extractos de las muestras antes de la determinación.

#### **4.4.1.1 Influencia del metanol sobre el inmunosensor:**

Para este estudio se prepararon disoluciones de DON de 0 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  en un intervalo de porcentajes entre 0 y 100% (v/v) de metanol en agua para comprobar si la competición se produce en igual extensión para cualquier porcentaje de metanol presente en el ensayo.

Después de homogeneización mecánica de la mezcla de las muestras con el disolvente de extracción, en todos los casos se llevó a cabo una centrifugación para tomar el sobrenadante. Recientemente se ha comparado en la bibliografía las recuperaciones obtenidas después de una única extracción y de múltiples etapas de extracción de DON en el maíz, y encontraron que una extracción de dos etapas produce una recuperación de aproximadamente el 90% de DON [284]. También se ha investigado el tiempo de contacto de muestras con disolventes de extracción a temperatura ambiente utilizando un procedimiento de extracción de un solo paso, y encontraron que una incubación de 30 minutos ofrecía mejores resultados que ambos períodos de tiempo [62].

Los absorbancias obtenidas se recogen en la figura 88:



**Figura 88: Influencia del MeOH en la reacción competitiva entre DON y DON-HRP (10x, Europroxima) sobre el mAbDON**

Las señales obtenidas para DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y DON ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) en presencia de cada concentración de MeOH así como los porcentajes de disminución de señales obtenidos con respecto a la señal obtenida para un porcentaje de 0% de metanol ( $\text{Abs} = 0,203$ ) en las experiencias realizadas en ausencia de DON (para DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ )) se muestran en la tabla 40.

MeOH (v/v) (% en agua)	DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ )	DON ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ )	% Disminución señal DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ )
0	0,230	0,046	0,0
5	0,159	0,047	30,9
10	0,153	0,049	33,5
20	0,129	0,054	43,9
50	0,087	0,051	62,2
84	0,044	0,063	80,9
100	0,036	0,044	84,3

**Tabla 40: Influencia del uso de MeOH y porcentajes de disminución de señal obtenidos entre DON y DON-HRP (Europroxima) sobre el mAbDON**

A la vista de los resultados se concluye que la presencia de metanol influye significativamente en la reacción de competición del mAbDON con el DON y DON-HRP

(Europroxima). Se observa una pronunciada disminución de la absorbancia para DON ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) a medida que el porcentaje de metanol utilizado aumenta, llegando a una disminución de señal de 84,3% para metanol puro (porcentaje 100%).

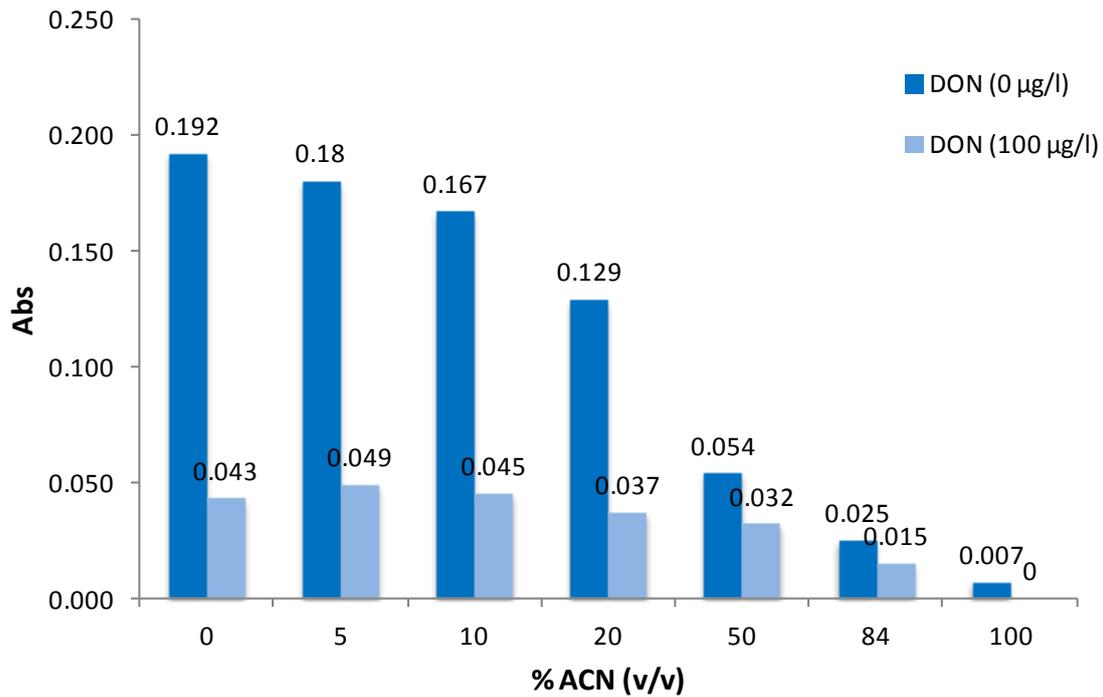
Se concluye que la presencia de metanol durante la etapa de competición a partir de porcentajes del 5% (v/v) provoca disminuciones progresivas de la absorbancia máxima en el inmunosensor con el aumento del porcentaje de disolvente. Estas menores señales, podrían interpretarse erróneamente como menores concentraciones de DON dando lugar en la práctica a posibles falsos positivos de DON.

Por lo tanto, utilizando MeOH para extraer DON, lo que se hizo por ejemplo en la extracción conjunta de DON y FB1, es preciso diluir el extracto con PBS de tal forma que en la etapa de competición el porcentaje de MeOH no supere el 5% (v/v). Esto no supone problema, dado que la gran sensibilidad del inmunosensor de DON permite esta dilución del extracto.

#### **4.4.1.2 Influencia del acetonitrilo sobre el inmunosensor:**

El acetonitrilo (ACN) se utiliza sobretodo en la extracción del DON previa a su determinación por cromatografía líquida HPLC, y no se ha descrito su uso en inmunosensores para esta micotoxina. Se estudió la influencia del ACN sobre el inmunoensayo, del mismo modo que para el metanol en el apartado anterior, para comprobar la posibilidad de usarlo para el inmunosensor. Para ello se prepararon disoluciones de DON de 0 y  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  en un intervalo de porcentajes entre 0 y 100% (v/v) de acetonitrilo en agua. Los comportamientos sobre las reacciones del inmunoensayo se midieron con ELISA espectrofotométrico.

Los resultados obtenidos se resumen en la figura 89:



**Figura 89: Influencia del ACN en la reacción competitiva entre DON y DON-HRP (Europroxima) sobre el mAbDON**

En la tabla 41 se muestran los porcentajes de disminución de señales obtenidos con respecto a la absorbancia obtenida para un porcentaje de 0% de acetonitrilo (Abs = 0,192) para los casos en ausencia de DON (para DON (0 µg l<sup>-1</sup>)).

ACN (v/v) (% en agua)	DON (0 µg l <sup>-1</sup> )	DON (100 µg l <sup>-1</sup> )	% Disminución señal DON (0 µg l <sup>-1</sup> )
0	0,192	0,043	0,0
5	0,180	0,049	6,3
10	0,167	0,045	13,0
20	0,129	0,037	32,8
50	0,054	0,032	71,9
84	0,025	0,015	87,0
100	0,007	0	96,4

**Tabla 41: Influencia del uso de ACN y porcentajes de disminución de señal obtenidos entre DON y DON-HRP (Europroxima) sobre el mAbDON**

Un aumento del porcentaje de acetonitrilo durante la etapa de competición provoca una disminución de la señal máxima de forma progresiva pero esta disminución (interferencia) se produce de manera más suave que en el caso de usar metanol como

disolvente. Por el contrario, se deben controlar muy bien los porcentajes altos de acetonitrilo ya que la señal se llega a suprimir con un 100% ACN debido a la completa inhibición producida sobre el anticuerpo. Porcentajes de ACN del 50% ya producen una disminución estadísticamente significativa de la absorbancia comparada con la ausencia del disolvente orgánico.

A la vista de los resultados se concluye que no sería apropiado utilizar porcentajes de acetonitrilo superiores al 5% (v/v) donde la corriente comienza a disminuir de forma significativa.

La presencia de los **disolventes MeOH y ACN durante la etapa de competición afecta significativamente a la absorbancia máxima medida**, al dificultar la reacción de afinidad antígeno-anticuerpo, y posiblemente también influye negativamente en la actividad enzimática de la HRP, por lo que su uso en procedimientos de extracción del DON debería de limitarse, haciendo que el porcentaje final de disolvente orgánico en el momento de la competición sea muy inferiores al 5% una vez diluidos con tampón PBS.

#### 4.4.1.3 Comparativa de curvas de calibrado de DON en presencia de MeOH y ACN

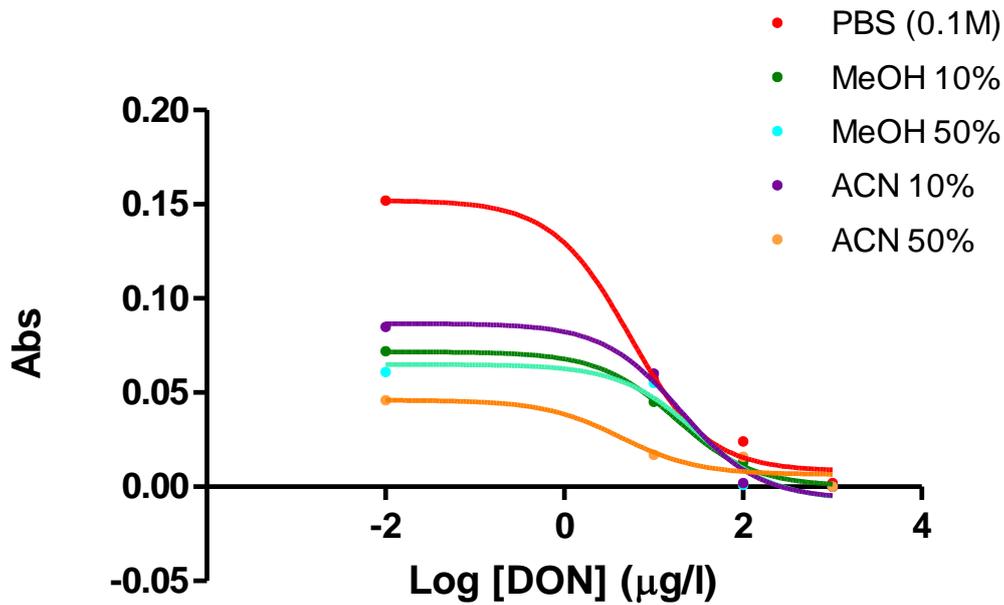
Para profundizar en el estudio de la interferencia de los 2 disolventes orgánicos durante la etapa de competición del DON y DON-HRP (10x, Europroxima) frente al anticuerpo (mAbDON) se realizaron curvas de calibrado en presencia de las siguientes proporciones de disolvente orgánico: MeOH (10%), MeOH (50%), ACN (10%), ACN (50%) y comparación con la ausencia de los mismos (PBS (0,1M)).

Los resultados se resumen en la tabla 42:

	DON ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )			
	0,01	10	100	1000
<b>PBS (0,1M)</b>	0,152	0,057	0,024	0,002
<b>MeOH 10%</b>	0,072	0,045	0,013	0
<b>MeOH 50%</b>	0,061	0,055	0,001	0
<b>ACN 10%</b>	0,085	0,06	0,002	0
<b>ACN 50%</b>	0,046	0,017	0,016	0

**Tabla 42: Absorbancias de los calibrados de DON utilizando diferentes porcentajes de MeOH y ACN, y comparación con las señales obtenidas en PBS 0,1 M (ausencia de estos disolventes orgánicos)**

Las absorbancias se ajustaron a una curva sigmoidea siguiendo el modelo 4PL:



**Figura 90:** Ajustes sigmoideos obtenidos en los calibrados de DON utilizando diferentes disolventes de extracción

Parámetros	PBS (0,1M)	MeOH 10%	MeOH 50%	ACN 10%	ACN 10%
Mínimo ( $\mu A$ )	0,0082	0,0001	-0,0071	-0,0066	0,0065
Máximo ( $\mu A$ )	0,152	0,0717	0,0649	0,0867	0,0459
$EC_{50}$ ( $\mu g l^{-1}$ )	7,397	17,92	30,67	20,25	4,294
Pendiente	1	1	1	1	1
R	0,9953	0,9988	0,9729	0,9914	0,9495
%Competición	94,6	99,9	100	100	100

**Tabla 43:** Parámetros de ajuste (modelo 3PL) obtenidos en los calibrados anteriores

A la vista de los resultados puede afirmarse que los disolventes orgánicos afectan significativamente a las medidas del inmunosensor en la forma descrita y para los porcentajes (superiores al 5% v/v) estudiados. Comparando las absorbancias máximas para DON ( $0 \mu g l^{-1}$ ) en presencia de los disolventes orgánicos, con las obtenidas en PBS (0,1 M, pH 7,4) se observa que con un porcentaje del 10% (v/v) de ambos disolventes la señal se reduce aproximadamente 2 veces, y en el caso de utilizar porcentajes del 50% (v/v) la señal máxima se reduce aproximadamente 3 veces, con lo que se concluye que para la determinación de DON en las muestras de cereales se produce una **interferencia importante para porcentajes de los disolventes orgánico superiores al 10% (v/v)**.

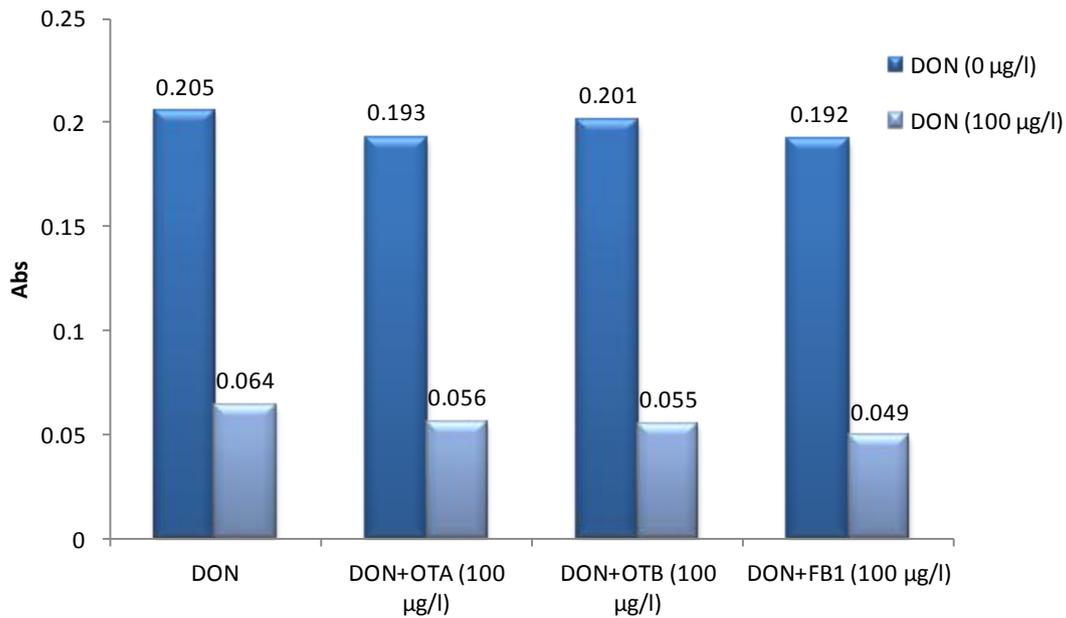
Dado que extracciones con PBS (0,1 M) en muestras de cereales producen rendimientos de extracción próximos al 100% según reportan otros autores [278], y tal como hemos comprobado en este trabajo (validaciones con otras técnicas instrumentales, explicado posteriormente), se escogió este tipo de extracción para el DON, en donde el extracto tiene una composición salina igual a la utilizada en las reacciones del inmunoensayo si bien en la extracción conjunta de la FB1 (descrita en la parte final de esta memoria), las pequeñas proporciones finales de MeOH no provocaron interferencia en la determinación del DON.

#### **4.4.2 Interferencias de otras micotoxinas en la muestra: reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales del DON y la FB1**

En una misma muestra de cereales se pueden desarrollar diferentes micotoxinas metabolizadas a partir de hongos de la misma familia, por lo que en una determinación más completa de contaminación de micotoxinas, o en la determinación individual del DON, es necesario comprobar si otras micotoxinas capaces de desarrollarse en cereales de forma natural influyen en la determinación con el inmunosensor selectivo para el DON.

Para este estudio se ha determinado DON (0 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en presencia de otras micotoxinas: ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB) o FB1 (concentración añadida 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) para estudiar si su presencia es influyente en la etapa de competición y en la detección final.

Este estudio persigue además evaluar la reactividad cruzada del anticuerpo (mAbDON) frente al resto de las micotoxinas estudiadas. Los resultados de las medidas de absorbancia obtenidas en este estudio para las micotoxinas y en las concentraciones indicadas se muestran en la figura 91:



**Figura 91: Evaluación de las interferencias producidas por la presencia de OTA, OTB o FB1 junto con el DON en un extracto de cereales**

Las micotoxinas OTA, OTB y FB1 no producen interferencia sobre el anticuerpo de DON, ya que tanto las absorbancias máximas y mínimas (inhibición del 0% y 100%) se mantienen constantes (se han comprobado que estas medidas son estadísticamente comparables con una probabilidad del 95%) por lo que el mAbDON es capaz de reconocer de forma selectiva al DON en presencia de estas micotoxinas que no afectan a su afinidad frente al DON.

Además, como uno de los objetivos de este trabajo de investigación se centra en la determinación simultánea de DON y FB1 (ambas procedentes de *Fusarium*) se realizaron un conjunto de experiencias seriadas para evaluar la reactividad cruzada de cada micotoxina con los anticuerpos correspondientes (mAbDON y mAbFB1).

En esta experiencia se combinaron las reacciones de competición de ambas micotoxinas individualmente (0 o 10 µg l<sup>-1</sup>) y de las 2 micotoxinas en una misma disolución (10 µg l<sup>-1</sup>), con el conjunto MBs-mAbDON/DON-HRP o MBs-mAbFB1/FB1-HRP utilizando los anticuerpos de R-Biopharm y los 2 correspondientes conjugados enzimáticos con HRP de Europroxima.

Las absorbancias obtenidas se muestran en la tabla 44:

		DON (0 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	DON (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	FB1 (0 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	FB1 (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	DON + FB1 (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ )
<b>MBs-mAbDON + DON-HRP</b>	<b>Abs</b>	0,445	0,143	0,198	0,189	0,136
		0,470	0,150	0,200	0,180	0,153
	<b>Media</b>	<b>0,458</b>	<b>0,147</b>	<b>0,199</b>	<b>0,185</b>	<b>0,145</b>
	<b>s</b>	0,018	0,005	0,001	0,006	0,012
	<b>%DSR</b>	3,864	3,379	0,711	3,449	8,319
<b>MBs-mAbFB1 + FB1-HRP</b>	<b>Abs</b>	0,307	0,300	0,217	0,056	0,055
		0,316	0,286	0,212	0,055	0,057
	<b>Media</b>	<b>0,312</b>	<b>0,293</b>	<b>0,215</b>	<b>0,056</b>	<b>0,056</b>
	<b>s</b>	0,006	0,010	0,004	0,001	0,001
	<b>%DSR</b>	2,043	3,379	1,648	1,274	2,525

**Tabla 44: Estudio de interferencias y de reactividad cruzada entre DON y FB1**

En los casos en los que la competición se ha realizado en presencia del anticuerpo y el conjugado enzimático correspondiente a la micotoxina en estudio, la competición se produce de forma correcta, mientras que cuando se pone en contacto una micotoxina con el conjugado enzimático y el anticuerpo no selectivo a ella, la competición no se produce, dando absorbancias máximas de 0,312 en el caso de DON (0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) y de 0,199 en el caso de FB1 (0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

Además en la experiencia en la que intervienen ambas micotoxinas (DON+FB1 (10  $\mu\text{g l}^{-1}$ )) la competición sólo se produce con la micotoxina correspondiente y no con la interferente, ya que las señales de absorbancia son iguales (nivel de confianza del 95% en las réplicas) en presencia y en ausencia de la inferencia (señales de absorbancia de 0,145 con anticuerpo y conjugado enzimático de DON y señales de absorbancia de 0,056 con anticuerpo y conjugado enzimático de FB1).

Se estudió también la interferencia producida por la unión de uno de los conjugado enzimáticos de una de las micotoxina con el anticuerpo no selectivo a ella (DON-HRP frente a mAbFB1 y FB1-HRP frente a mAbDON) obteniéndose una absorbancia obtenida de 0 aproximadamente, por lo que no hay unión inespecífica de ese tipo. Es decir, no existe reactividad cruzada entre DON-HRP y el anticuerpo específico a FB1 (mAbFB1) y tampoco entre el conjugado FB1-HRP y el anticuerpo específico mAbDON.

Se ha calculado el **porcentaje de reactividad cruzada** existente entre cada uno de los anticuerpos mediante el cálculo del porcentaje de competición (disminución de señal) obtenido por la micotoxina (0  $\mu\text{g l}^{-1}$  y 10  $\mu\text{g l}^{-1}$ , ausencia de micotoxina y una concentración próxima al  $EC_{50}$ ) para la que el anticuerpo no es selectivo. A partir de las

experiencias en las que se ha evaluado la posible competición se obtuvo una **reactividad cruzada del mAbDON con FB1 de 7% y una reactividad cruzada del mAbFB1 con DON de 6%.**

#### 4.5 TIEMPO DE VIDA DEL INMUNOSENSOR

El trabajo con biorreactivos tiene la principal desventaja de su corta vida útil aún en el caso de almacenarse en las condiciones apropiadas (habitualmente a temperaturas de 4 °C y de -20 °C). Para los anticuerpos usados en este trabajo, y en general para todos los anticuerpos utilizados analíticamente, la recomendación general es de su almacenamiento a una temperatura -20 °C y en el caso de mantenerse a 4 °C la vida útil es como máximo de 30 días en la mayoría de los casos.

En este apartado, se estudió el tiempo de vida del mAbDON, una vez inmovilizadas en las MBs-prG y almacenadas a 4 °C. Para ello se tomaron medidas de absorbancia diarias con estos anticuerpos inmovilizados sobre las MBs-prG, tomando cada día una parte alícuota.

Es importante conocer la vida útil del anticuerpo inmovilizado sobre las MBs-prG, comprobando que la señal no disminuye a lo largo del tiempo, bajo un punto de vista práctico. Para controlar el tiempo máximo de uso de este inmunosensor se realizó a lo largo de 38 días un ensayo mELISA donde se midió la absorbancia producida por la reacción de MBs-mAbDON con DON-HRP (dilución 1/5 (v/v), PBS (0,1 M pH 7,4), en ausencia de DON.

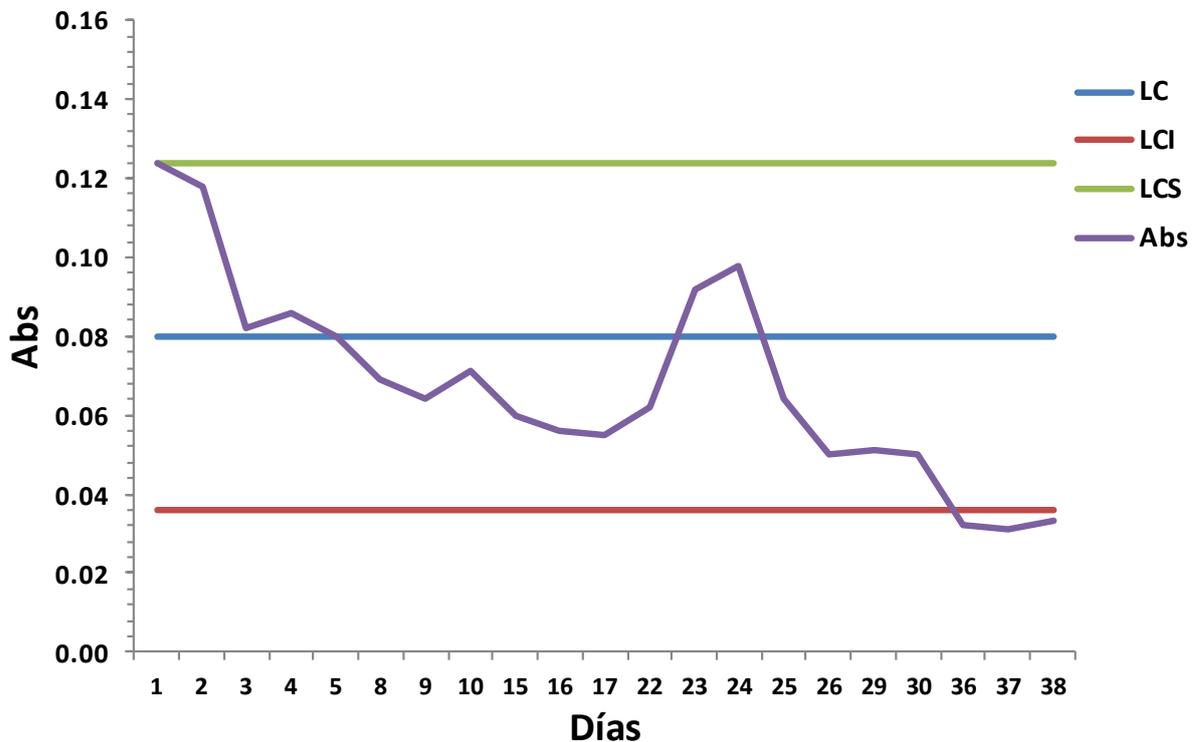
Tanto la inmovilización del anticuerpo sobre las MBs como la dilución del DON-HRP en PBS se realizaron el día 1 de este estudio, manteniéndose el conjugado enzimático aislado de la luz con el fin de prevenir su degradación y evitar esta variable y almacenados ambos a 4 °C a lo largo de los días.

Para el tratamiento de las señales analíticas obtenidas se realizó un gráfico de control de Shewhart [285]. El fundamento de los gráficos de control se basa en la afirmación de que cuando se lleva a cabo algún proceso de forma sistemática, es decir, bajo las mismas fuentes de influencia o variación, el proceso se verá afectado únicamente por errores aleatorios que conducirán a una distribución normal de los resultados (Teorema del límite central). Por lo tanto, se considera que el método analítico está bajo control si los resultados obtenidos siguen las características de una distribución normal y los resultados se encuentran dentro de los límites aceptados. Cuando los resultados de los análisis de la muestra de control a lo largo del tiempo se encuentran

dentro de los límites aceptados, se dice que el sistema se encuentra bajo control estadístico [285].

Para comprobar la vida útil del inmunosensor para DON se han considerado como límites aceptados los que corresponden al hecho de que aproximadamente el 95% de los resultados han de encontrarse dentro del intervalo del mismo valor de absorbancia (valor de la muestra de control  $\pm 2s$ ).

El gráfico de control obtenido se muestra en la figura 92:



**Figura 92: Diagrama de control del tiempo de vida útil de MBs-prG-mAbDON**

Según el diagrama anterior la señal va disminuyendo ligeramente con el tiempo, pero hasta el día 33 después de la inmovilización del anticuerpo sobre las MBs-prG se ha calculado que el método analítico está bajo control, es decir, que las únicas diferencias obtenidas entre resultados en días sucesivos son producidas exclusivamente por errores aleatorios.

Sin embargo, a partir del día 25 la señal decae bruscamente produciendo una disminución apreciable de la sensibilidad en la determinación de DON. Por este motivo, el tiempo máximo de uso del conjugado MBs-mAbDON una vez llevada a cabo la inmovilización del anticuerpo mAbDON sobre las partículas magnéticas MBs-prG se

**fijó en 25 días**, siempre que se almacenen correctamente a una temperatura de 4 °C. Para una aplicación práctica, este tiempo es suficientemente alto y se acerca al tiempo de vida genérico de un anticuerpo que de forma libre es almacenado en las mismas condiciones de temperatura.

#### 4.6 DETERMINACIÓN DE DON EN MUESTRAS DE ORIGEN CEREAL

Una vez optimizadas las condiciones (Tabla 45) del magneto-inmunoensayo y su transducción óptica (mELISA) y electroquímica, los inmunosensores desarrollados se aplicaron en muestras certificadas de cereales y en muestras de harinas comerciales, además de proceder a su validación con las técnicas oficiales de cromatografía líquida.

Las condiciones óptimas que se fijaron para el inmunosensor de DON de forma común para ambos tipos de transducción se resumen en la Tabla 45:

VARIABLE OPTIMIZADA	PARÁMETRO FIJADO
Cantidad MBs-prG	25 µg
mAbDON inmovilizado	5 mg l <sup>-1</sup>
DON-HRP 10x (5121DONCO)	Dilución 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M pH 7,4)
Tiempo competición	60 min
Temperatura competición	25 °C

**Tabla 45: Condiciones optimizadas del inmunosensor (con transducción óptica y electroquímica)**

El objetivo es la determinación de los valores de concentración de la micotoxina DON por debajo de las exigencias de la legislación europea y española (Reglamento 1126/2007, de 28 de Septiembre de 2007) en las que se marcan unas concentraciones máximas permitidas entre 200 µg kg<sup>-1</sup> para alimentos infantiles hasta 1750 µg kg<sup>-1</sup> para cereales no procesados [272].

Las propiedades analíticas de estos inmunosensores, se recogieron en la tabla 46:

Parámetros ajuste	mELISA	Electroquímico
Mínimo (Abs/µA)	-0,0323	0,106 µA
Máximo (Abs/µA)	0,292	-3,01 µA
EC <sub>50</sub> (µg l <sup>-1</sup> )	8,3	10,0
Pendiente	1	1
% Competición	>90	>90
R	>0,99	>0,99

**Tabla 46: Parámetros de ajuste obtenidos de los calibrados competitivos**

El factor  $EC_{50}$  **se relaciona con la sensibilidad**, tanto mayor cuanto menor es su valor. Para el ajuste de las curvas de calibrado se realizó una regresión no lineal (*software* GraphPad v.6) ponderando los puntos estadísticamente para un nivel de confianza del 95%, y dando este mismo programa las concentraciones obtenidas de las muestras medidas también con la misma probabilidad (Apartado 3.5).

Bajo un punto de vista práctico, esta interpolación de las medidas de las muestras conviene que se produzcan en la parte intermedia de la curva sigmoidea, en la zona más próxima al valor del  $EC_{50}$  obtenido en el calibrado (porcentajes de inhibición apropiados podrían estar entre el 10% y el 80%), sin embargo, medidas próximas a las zonas de baja pendiente de la curva en su parte alta o baja no son apropiadas, al ser mayor la irreproducibilidad y encontrarnos cerca de una inhibición completa o inexistente respectivamente en estos dos casos extremos. La interpolación de las muestras en **la zona más próxima al  $EC_{50}$**  produce además una disminución del error y por consiguiente un incremento de la exactitud del ensayo.

El factor  $EC_{50}$ , aunque en general aparece en una zona concreta comprendida entre un intervalo pequeño de concentraciones, es normal que varíe ligeramente de un día a otro. Para evitar errores, es preferible en primer lugar realizar el calibrado competitivo y la reacción competitiva con la muestra contaminada al mismo tiempo y con los mismos biorreactivos consiguiendo así que la extensión de la competición se produzca en igual medida para el DON de los patrones y para el DON de la muestra. Por otro lado, también es recomendable **realizar varias diluciones de la muestra** de concentración desconocida consiguiendo así la interpolación en puntos diferentes de la curva sigmoidea para poder seleccionar finalmente la señal analítica que produzca la interpolación en la zona más cercana del  $EC_{50}$  obtenido en cada momento.

Para la extracción del DON a partir de las matrices de cereales se valoraron diferentes disolventes de extracción (Apartado 3.4.8) [282]. En la bibliografía consultada acerca de la extracción de DON de las matrices de origen cereal se comprobó el uso destacado de MeOH [57; 286] y ACN [278; 287] en agua en diferentes concentraciones [257], y H<sub>2</sub>O o PBS [66; 77; 257] dado el alto carácter polar de la molécula de DON. El uso de disolventes orgánicos en agua proporciona altos valores de recuperación de DON [18], y la presencia de agua provoca que la muestra se hinche produciendo así que la salida del DON de la matriz sea más eficiente [66]. Por el contrario el uso de disolventes orgánicos en las reacciones de inmunoensayo provoca una disminución notable en la actividad enzimática y puede afectar a la efectividad de la reacción antígeno-anticuerpo, disminuyendo la señal medida, y por lo tanto la sensibilidad [288], tal y como se demostró en el apartado 4.4.1, por lo que es aconsejable que el

porcentaje de disolvente orgánico en el inmunosensor sea mínimo durante la etapa de competición.

No obstante, se ha documentado ampliamente que el DON puede extraerse eficientemente en muestras de cereales (con un elevado rendimiento de extracción próximo al 100%) con disoluciones acuosas sin el uso de disolventes orgánicos, debido a la alta polaridad de la molécula de DON [77; 105] por lo que con frecuencia se ha llevado a cabo esta extracción por ejemplo con tampones acuosos neutros, como los tampones fosfato muy utilizados en inmunoensayos y en biosensores enzimáticos [59; 289].

#### 4.6.1 Determinación de DON en muestras de cereales

Debido a que el DON y sus derivados son compuestos de naturaleza polar, por lo general **son extraídos por disolventes polares** o mezclas de varios disolventes polares tales como metanol, etanol, acetonitrilo, y agua. La proporción de cada disolvente en una mezcla se determina por las características físicas y químicas de DON y dependiendo de los sistemas analíticos seleccionados [62]. Dadas sus propiedades polares es posible su extracción en agua, manteniendo una proporción de 5 ml de agua por gramo de muestra, aunque en ocasiones se utiliza una baja proporción de un disolvente polar orgánico como el MeOH si se comprueba previamente que su presencia no afecta al ensayo.

En los casos en los que los extractos son más claros y menos contaminados se utiliza también el ACN en agua por su alto poder de extracción, aunque es un disolvente menos utilizado por ser menos volátil que el MeOH [57], y su uso queda casi circunscrito a procedimientos HPLC (no inmunosensores o inmunoensayo).

En cualquier caso, el método de extracción del DON, incluyendo los disolventes, la proporción de los mismos, los tiempos de agitación, etc. deberán ser estudiados para cada tipo de alimento o matriz y para la técnica analítica con la que se vaya a determinar esta micotoxina [290]. Para una matriz de trigo sin procesar puede extraerse eficazmente simplemente con agua o con un tampón neutro [72], pero para una matriz basada en cereales de desayuno formados por mezclas de diferentes especies de cereales, se recomienda utilizar disolventes orgánicos polares para aumentar la sensibilidad [65], al igual que ocurre en los alimentos infantiles basados en cereales, que cumplen una legislación más estricta ( $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) por lo que se necesitaría además una etapa previa de pre-concentración [77].

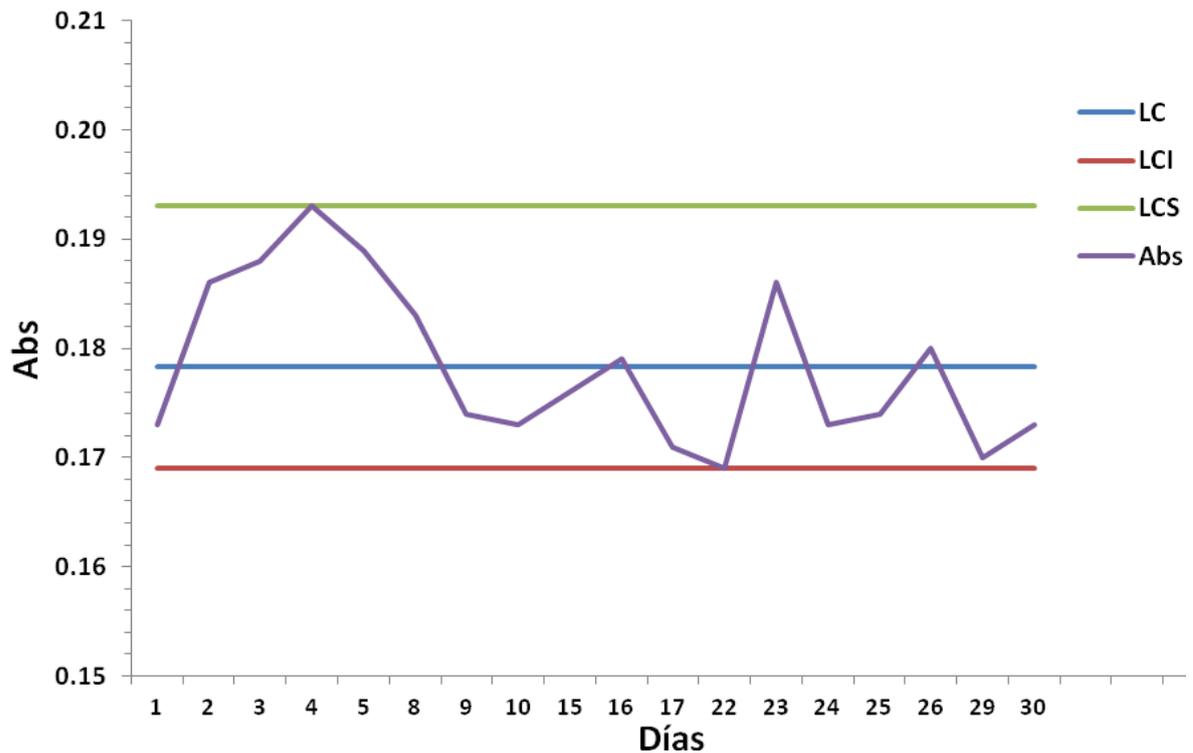
La extracción de DON de la muestra certificada (TR-D100, Lote D-W-158), y en harinas comerciales de trigo y de maíz para el consumo humano (Haricaman para supermercados El Árbol), se llevó a cabo para la determinación individual de DON con disolución tampón de fosfato PBS (0,1 M, pH 7,4), para su determinación cuantitativa tanto con el biosensor espectrofotométrico (mELISA) como con el biosensor con detección amperométrica, para comparar así ambos resultados. El CRM utilizado de **DON (TR-D100, Lote D-W-158) se trata de una harina de trigo cuya concentración de DON son  $1400 \pm 200 \mu\text{g kg}^{-1}$ .**

El DON fue extraído de las matrices cereales siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.4.8.1, y se utilizaron los procedimientos de trabajo del inmunosensor descritos en el apartado 3.4.4 (detección óptica) y apartado 3.4.6 (detección electroquímica con electrodos CH8).

Las reacciones competitivas de los estándares de DON para la realización de los calibrados así como del DON de los extractos, se realizaron simultáneamente para la correcta obtención de las concentraciones. Debido a que la extracción se ha llevado a cabo con PBS, simplemente se diluyeron los extractos con el volumen adecuado del mismo tampón para la medida con los dos inmunosensores, sin el problema comentado de la presencia de otros disolventes no acuosos.

Se demostró que el extracto del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) en PBS es válido durante al menos 20 días desde el momento de su extracción almacenado a 4 °C, comprobando las señales obtenidas a lo largo un mes, sobre un mismo extracto con dilución 1/10 (v/v). Para su evaluación, se realizó un diagrama de control (diagrama de Shewhart) [285] con las absorbancias tomadas sobre un mismo extracto del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) según el procedimiento de extracción en PBS (0,1 M, pH 7,4) establecido en el apartado 3.4.8.1.

El extracto fue almacenado a 4 °C y medido por el inmunosensor mELISA durante días consecutivos desde el día de su extracción. Los resultados obtenidos se representaron en el diagrama de control siguiente (Figura 93):



**Figura 93: Absorbancias obtenidas sobre un mismo extracto del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) con dil (1/10 v/v) en días consecutivos desde el momento de la extracción**

Tras analizar el diagrama de control se concluyó que todas las medidas tomadas a lo largo de 30 días se encontraron entre los límites de control estipulados con lo que el extracto podría ser utilizado durante al menos 30 días si se mantiene almacenado a 4 °C.

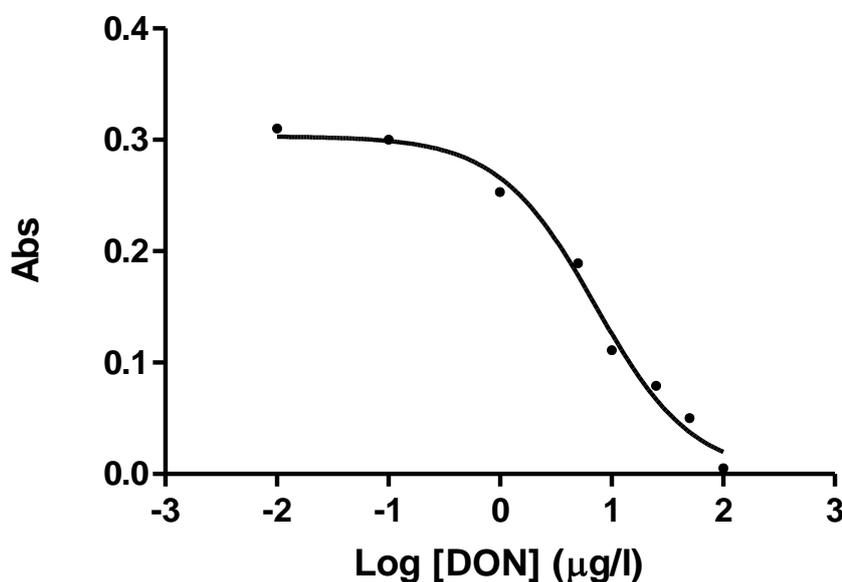
En la práctica, el extracto se utilizó un máximo de 20 días contados desde el momento de su extracción porque a partir de ahí se observó una mayor turbidez en la disolución. En ocasiones se encontró además la presencia de materia sólida en suspensión (mohos) pese a permanecer almacenado a 4 °C. Por todo esto **la vida útil de los extractos del CRM almacenados en PBS (0,1 M) a 4° C se fijó en 20 días.**

#### 4.6.1.1 ELISA inmunomagnético (mELISA)

Para la determinación de DON en los extractos de harinas es preciso realizar simultáneamente un calibrado de estándares de DON en las mismas condiciones para la interpolación de las señales (para ello se utilizó el programa GraphPad Prism v.6.0).

En la figura 94 se muestra un calibrado típico del DON con detección óptica (mELISA) del que se han calculado los parámetros de ajuste de la curva. Estos parámetros

logísticos se ajustan mediante el software GraphPad y regresión no lineal siguiendo un modelo 3PL o 4PL para un nivel de confianza del 95%.



**Figura 94: Calibrado competitivo típico de DON con el inmunosensor mELISA**

En la Tabla 47 se recogen los parámetros de ajuste del calibrado de la Figura 94. En general con ligeras variaciones, los calibrados son similares en días diferentes, aunque no estadísticamente iguales.

Parámetros	
Mínimo (Abs)	-0,0003
Máximo (Abs)	0,320
EC <sub>50</sub> (µg l <sup>-1</sup> )	7,144
Pendiente	1
%Competición	98,4
R	0,9944

**Tabla 47: Parámetros logísticos de un calibrado típico de mELISA**

Calibrados efectuados en días diferentes pueden hacer cambiar estos valores, debido a las variaciones propias del inmunoensayo y de los múltiples factores que afectan a la señal, sobre todo en los valores de absorbancia de los dos extremos (falta de inhibición e inhibición competitiva del 100%). Sin embargo, los valores del EC<sub>50</sub>, se mantienen

muy similares o incluso estadísticamente iguales, como lo demuestran los obtenidos en la Tabla 48 en diferentes días y a lo largo de 2 meses.

EC <sub>50</sub> obtenidos (µg l <sup>-1</sup> )	
	6,63
	8,15
	8,2
	8,86
	6,15
	9,26
	10,14
	7,14
	7,46
<b>MEDIA</b>	8,00
<b>s</b>	1,29
<b>%DSR</b>	16,12
<b>Intervalo</b>	0,99

**Tabla 48: Valores de EC<sub>50</sub> µg l<sup>-1</sup> obtenidos en diferentes calibrados por mELISA**

Como puede observarse en la tabla 48, el valor medio de EC<sub>50</sub> es **8,00 ± 0,99 µg l<sup>-1</sup> de DON para el sensor mELISA**, aunque los valores de EC<sub>50</sub> pueden variar entre 6-10 µg l<sup>-1</sup> de DON (Tabla 48). Por este motivo, en la práctica es recomendable medir diluciones diferentes de los extractos de las muestras para coincidir lo más cerca posible de estos valores del EC<sub>50</sub>.

Realizando el procedimiento de extracción de DON para el CRM (TR-D100, Lote D-W-158) la dilución óptima fue 1/10 (v/v) para que la concentración final a interpolar en la curva de calibrado sigmoidea de DON sea de aproximadamente 8 µg l<sup>-1</sup>. En la mayoría de los casos estudiados esta dilución ha sido la óptima para realizar la interpolación y obtener errores inferiores al 10%, pero ante la previsión de que el factor EC<sub>50</sub> se desplace se ha trabajado con diluciones del extracto de 1/8, 1/10 y 1/12 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4) en cada experiencia.

Además, como se ha indicado anteriormente, es necesario realizar el calibrado y la reacción de competición de la muestra en el mismo momento y con los mismos biorreactivos consiguiendo así que la reacción se produzca en las mismas condiciones, evitando variables en las medidas que generen irreproducibilidad o inexactitud en las determinaciones de DON.

Las concentraciones obtenidas en cada caso proceden de la media de 4 réplicas (n=4).

Dilución aplicada	[DON] <sub>exp</sub> (µg kg <sup>-1</sup> )	%Error
<b>1/10</b>	1521,4 ± 124,5	8,7
<b>1/10</b>	1486,8 ± 57,8	6,2
<b>1/8</b>	1257,4 ± 86,3	-10,2
<b>1/10</b>	1197,0 ± 283,1	-14,5
<b>1/10</b>	1350,2 ± 97,4	-3,4
<b>1/8</b>	1408,9 ± 92,2	0,6
<b>1/10</b>	1331,2 ± 42,5	-4,9

**Tabla 49: Concentraciones de DON en extractos procedentes de CRM (TR-D100, Lote D-W-158) por un ensayo mELISA (4 réplicas)**

Los errores cometidos en las determinaciones de DON se encuentran en un intervalo entre 0,6 y 14,5% (en valor absoluto).

Las concentraciones de DON medidas en diferentes días, con diferentes lotes de MBs-mAbDON, extractos del CRM, etc. se reflejan en la Tabla 50, y se comparan a través del test t de *Student* con el valor de referencia certificado (1400 ± 200 µg kg<sup>-1</sup>).

	CRM ELISA
	1521,4
	1486,8
	1257,4
	1197,0
	1350,2
	1409,0
	1331,2
<b>Media</b>	1364,7
<b>s</b>	117,2
<b>%DSR</b>	8,6
<b>Valor certif.</b>	1400,0
<b>t<sub>calc</sub></b>	-0,114
<b>t<sub>crit</sub></b>	2,47

**Tabla 50: Comparativa estadística de las concentraciones de DON obtenidas con el valor certificado 1400,0 µg kg<sup>-1</sup>**

El cálculo de la t de Student crítica para (n-1) = 6 se calculó según la ecuación siguiente (Ecuación 5):

$$t_{calc} = \frac{(\mu_0 - \bar{X})}{s/\sqrt{n}}$$

**Ecuación 5: Cálculo del factor  $t_{calc}$**

Donde:

- $\mu_0$  es el valor certificado respecto al que se compara
- $\bar{X}$  es el valor medio de la serie de datos
- $s$  es la desviación estándar de la serie de datos
- $n$  es el número de datos

Según los valores presentados en la tabla 50, donde se ha obtenido que  $t_{crit} > t_{calc}$ , se puede asegurar que las concentraciones de DON determinadas mediante el inmunosensor óptico mELISA pueden considerarse **estadísticamente iguales con una probabilidad del 95% al valor certificado en el material de referencia TR-D100 (Lote TD-W-158)**.

La concentración media de DON determinada por mELISA en el CRM TR-D100 a lo largo de días diferentes fue de:  $1364,7 \pm 108,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Error -2,5%), con una desviación estándar relativa %DSR ( $n=7$ ) 8,6%.

Además, mediante el método mELISA optimizado y desarrollado, se realizó la determinación de la concentración de DON de 2 harinas comerciales (Haricaman, Valladolid), una de trigo y otra de maíz. En la tabla 51 se indican las concentraciones halladas en las harinas comerciales estudiadas, tomadas de medidas replicadas ( $n=4$ ).

Harina trigo	Harina maíz
$[\text{DON}]_{\text{exp}} (\mu\text{g kg}^{-1})$	$[\text{DON}]_{\text{exp}} (\mu\text{g kg}^{-1})$
$68,9 \pm 9,4$	$64,8 \pm 5,9$
$70,4 \pm 4,1$	$79,0 \pm 17,8$
$74,6 \pm 12,2$	$72,4 \pm 11,3$
$65,2 \pm 9,3$	-

**Tabla 51: Concentraciones de DON determinadas en extractos procedentes de harinas de trigo y maíz comerciales (Haricaman)**

Estos resultados obtenidos (tabla 51) demuestran que las concentraciones de la micotoxina se encuentran por debajo de los límites legales de DON establecidos en la legislación europea [272] y por lo tanto son aptas para el consumo humano sin

entrañar ningún riesgo de toxicidad o aporte en la ingesta máxima diaria recomendada (concentración DON legislada en harinas son  $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

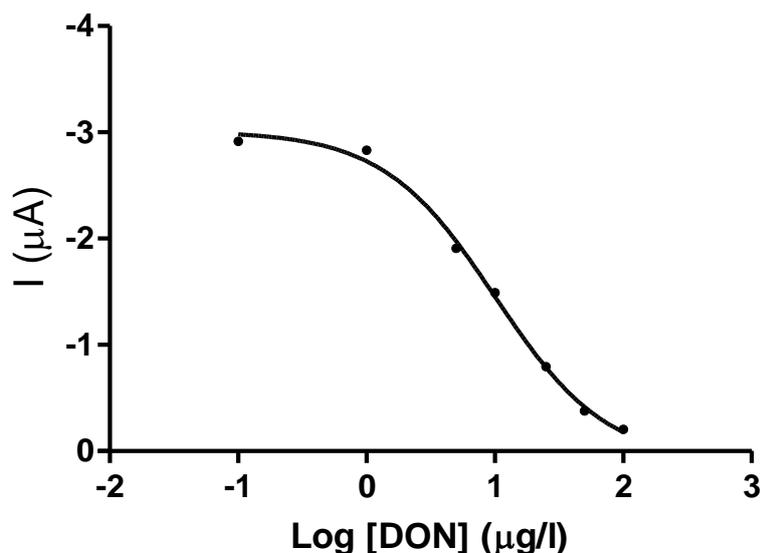
En ambas harinas que proceden de la misma empresa los resultados de concentración de DON son similares, próximos a  $70 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Aunque a estos niveles no seas tóxicas para el consumo humano, sin embargo podrían considerarse un punto de riesgo necesario de controlar (APPCC) [7].

#### 4.6.1.2 Inmunosensor electroquímico

Del mismo modo que en el apartado anterior, se procedió a la determinación de la concentración de DON con el inmunosensor electroquímico (*Amperometric Detection*) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.3.

En primer lugar se realizó el procedimiento habitual de extracción de muestra en PBS (0,1 M, pH 7,4) y posteriormente se llevó a cabo un calibrado competitivo en el intervalo de concentraciones de DON ( $0\text{-}100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) así como la reacción competitiva entre el DON-HRP y el DON extraído de las muestras.

A continuación se representa una curva de calibrado sigmoidea (figura 95) típica obtenida con detección amperométrica (AD-a), sobre las que se llevaron a cabo la determinación de DON a partir de los extractos.



**Figura 95:** Calibrado competitivo estándar típico con el inmunosensor DON electroquímico (AD-a)

Parámetros	
Mínimo ( $\mu\text{A}$ )	0,1087
Máximo ( $\mu\text{A}$ )	-3,004
EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	10,04
Pendiente	1
%Competición	93,3
R	0,9984

**Tabla 52: Parámetros logísticos del calibrado competitivo del inmunosensor electroquímico**

El factor EC<sub>50</sub> en el inmunosensor electroquímico tiene usualmente valores próximos a 10  $\mu\text{g l}^{-1}$ , siendo habitual valores entre 7 y 12  $\mu\text{g l}^{-1}$ . En la Tabla 53 se presentan valores de EC<sub>50</sub> obtenidos en diferentes días (a lo largo de 2 meses) a partir de calibrados AD-a.

EC <sub>50</sub> obtenidos ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	
	11,43
	10,74
	10,04
	7,16
	11,45
	10,26
	8,29
	10,21
	10,42
<b>MEDIA</b>	10,00
<b>s</b>	1,41
<b>%DSR</b>	14,13
<b>Intervalo</b>	1,09

**Tabla 53: Valores de EC<sub>50</sub>  $\mu\text{g l}^{-1}$  obtenidos en diferentes calibrados por AD**

El valor de EC<sub>50</sub> medio obtenido para el inmunosensor electroquímico, es **10,00  $\pm$  1,09  $\mu\text{g l}^{-1}$  de DON**, aunque apareció una oscilación de valores entre el intervalo 7-11  $\mu\text{g l}^{-1}$  de DON (Tabla 53).

Tal y como se comentó para el mELISA, para asegurar una interpolación en la zona más próxima al EC<sub>50</sub>, se realizaron en todos los casos varias diluciones en PBS (0,1 M, pH 7,4) del extracto de las harinas. En la tabla 54 pueden observarse las concentraciones obtenidas, así como los errores obtenidos en función de las diluciones (1/6, 1/10 y 1/12 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)) seleccionando el resultado que pueda interpolarse en la zona más próxima al EC<sub>50</sub> obtenido en cada curva de calibrado.

Dilución aplicada	[DON] <sub>exp</sub> (µg kg <sup>-1</sup> )	%Error
<b>1/10</b>	1279,7± 110,4	-8,6
<b>1/6</b>	1450,8 ± 59,7	3,6
<b>1/10</b>	1409,3 ± 61,9	0,7
<b>1/6</b>	1559,9 ± 121,2	11,5
<b>1/6</b>	1414,9 ± 96,3	1,1
<b>1/12</b>	1390,6 ± 96,3	-0,7
<b>1/10</b>	1513,0 ± 101,3	7,7
<b>1/10</b>	1239,9 ± 86,2	-11,4

**Tabla 54: Concentraciones de DON obtenidas con en el inmunosensor electroquímico en función de la dilución del extracto CRM (TR-D100, Lote D-W-158)**

En los resultados de la tabla se obtuvieron errores relativos siempre inferiores al 12% (intervalo entre 0,7-11,4%), valores que son del mismo orden que en el caso del procedimiento mELISA para los mismos tipos de extractos.

En la mayoría de los casos los errores son por exceso, indicando que la extracción es correcta (no hay pérdidas del analito durante la extracción de muestra y la realización del ensayo), y se observa una dependencia del error según la zona de interpolación en la curva sigmoidea.

Un error por exceso produciría un falso positivo, es decir una muestra no contaminada podría considerarse contaminada por error. Las ventajas de errores por exceso demasiado altos hipotéticamente significaría que no puede llegar a ser ingerida por el consumidor, pero por el contrario puede suponer una pérdida económica elevada para el productor, ya que debería realizar sobre él una determinación confirmatoria que si se demuestra haría retirar del mercado un producto que está por encima de los límites de concentración legislados. Los errores, no obstante, son pequeños para el rango de concentraciones en el que se trabaja.

Las concentraciones de DON obtenidas con el inmunosensor electroquímico (tabla 55) se compararon con el valor certificado a través del cálculo t de Student para n=7 utilizando la ecuación 5.

	CRM AD-a
	1279,7
	1450,8
	1409,3
	1559,9
	1414,9
	1390,6
	1513,0
	1239,9
<b>Media</b>	1407,3
<b>s</b>	107,6
<b>%DSR</b>	7,6
<b>Valor certif</b>	1400,0
<b>t calc</b>	0,024
<b>t crit</b>	2,365

**Tabla 55: Concentraciones de DON obtenidas y comparativa con el valor certificado**

En los cálculos incluidos en la tabla 55 se ha obtenido que  $t_{crit} > t_{calc}$ , por lo que las concentraciones de DON determinadas mediante el inmunosensor electroquímico **no difieren estadísticamente del valor certificado en el patrón de referencia TR-D100 (Lote TD-W-158) con una probabilidad del 95%**.

La concentración media de DON determinada por el inmunosensor electroquímico en el CRM TR-D100 a lo largo de días diferentes fue de:  $1407,3 \pm 89,8 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Error 0,5%), obteniendo una desviación estándar relativa %DSR (n=8) 7,6%.

Además de la determinación de DON sobre el CRM se llevó a cabo el análisis sobre harinas comerciales de trigo y de maíz (Haricaman, Valladolid) con el inmunosensor electroquímico (AD-a).

Las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla 56, y son el resultado de la medida de 4 réplicas. Los extractos no se diluyeron por la concentración baja de DON en este tipo de harina.

TRIGO	MAIZ
$[\text{DON}]_{exp} (\mu\text{g kg}^{-1})$	$[\text{DON}]_{exp} (\mu\text{g kg}^{-1})$
$58,0 \pm 7,4$	$69,2 \pm 8,9$
$70,2 \pm 12,3$	$59,6 \pm 11,5$

**Tabla 56: Concentraciones de DON en harinas de trigo y maíz comerciales (Haricaman, Valladolid) obtenidas con el inmunosensor electroquímico**

Del mismo modo que con el mELISA (Tabla 51) los resultados obtenidos (Tabla 56) se encuentran muy por debajo de los límites legales de DON (concentración DON legislada en harinas son  $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

#### 4.6.2 Comparativa de resultados obtenidos por mELISA y AD-a

En este apartado se comparan estadísticamente los resultados obtenidos por ambas técnicas (mELISA y inmunosensor electroquímico) para los extractos procedentes del CRM (TR-D100 Lote D-W-158) así como de la harina de trigo y de la harina de maíz (Haricaman).

##### 4.6.2.1 Comparativa estadística para CRM:

En la tabla 57 se resumen las concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) obtenidas por el inmunosensor desarrollado realizando las medidas por mELISA y por AD-a provenientes de los apartados 4.6.1.1 para mELISA y 4.6.1.2 par AD-a.

CRM mELISA	CRM AD-a
1521,4	1279,7
1486,8	1450,8
1257,4	1409,3
1197,0	1559,9
1350,2	1414,9
1409,0	1390,6
1331,2	1513,0
-	1239,9

**Tabla 57: Concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) sobre el CRM TR-D100 medidas por mELISA y por AD-a**

En primer lugar se comprobó si la varianza de las 2 series de datos se considera estadísticamente igual o diferente, mediante el estudio de varianzas con la prueba de test-F (Ecuación 6):

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

**Ecuación 6: Test F, relación de varianzas**

**Prueba F para varianzas de dos muestras**

	CRM mELISA	CRM AD-a
Media	1364,71	1407,26
Varianza	13732,48	11570,95
Observaciones	7	8
Grados de libertad	6	7
F	<b>1,19</b>	
P(F<=f) una cola	0,41	
Valor crítico para F (una cola)	<b>3,86</b>	

*Tabla 58: Prueba F para el cálculo de varianzas*

El valor calculado de F ( $F_{\text{calc}} = 1,18$ ) es inferior al valor crítico ( $F_{\text{crit}} = 3,86$ ), por lo tanto para  $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$  se considera que las varianzas de las series de datos son estadísticamente iguales (probabilidad 95%), por lo tanto se realizó el test de contraste t para muestra suponiendo varianzas iguales:

**Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales**

	CRM mELISA	CRM AD-a
Media	1364,71	1407,26
Varianza	13732,48	11570,95
Observaciones	7	8
Varianza agrupada	12568,58	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	<b>-0,73</b>	
P(T<=t) una cola	0,24	
Valor crítico de t (una cola)	1,77	
P(T<=t) dos colas	0,48	
Valor crítico de t (dos colas)	<b>2,16</b>	

*Tabla 59: Prueba t para 2 muestras con varianzas iguales para comparar la concentración del CRM por mELISA y por AD-a*

Después de aplicar el test t para comparar estadísticamente las concentraciones determinados de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) con los 2 tipos de detección desarrollados, se obtuvo que  $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$  por lo que se pueden considerar comparables los resultados obtenidos por mELISA y por AD-a, con una probabilidad del 95%.

Se concluye que la reacción de inmunoensayo que se ha optimizado produce valores de **concentración de DON consistentes por los dos tipos de transducción** espectrofotométrica y electroquímica.

#### 4.6.2.2 Comparativa estadística para la harina de trigo (Super para Haricaman):

Del mismo modo, se realizaron las comparaciones de concentraciones obtenidas en los extractos de la harina de trigo (Haricaman) por el sensor óptico mELISA y por el inmunosensor con detección AD-a.

Los resultados a comparar (obtenidos en el apartado 4.6.1.1) se han recogido en la tabla 60:

TRIGO mELISA	TRIGO AD-a
68,9	58
70,4	70,2
74,6	
65,2	

**Tabla 60: Concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de la harina de trigo obtenidas con medidas mELISA y AD-a.**

La prueba F realizada para comprobar si las varianzas de las series de datos son iguales concluyó que las varianzas son diferentes con una probabilidad del 95% ( $F_{\text{crit}} < F_{\text{calc}}$ ).

#### Prueba F para varianzas de dos muestras

	TRIGO mELISA	TRIGO AD-a
Media	69,78	64,1
Varianza	15,12	74,42
Observaciones	4	2
Grados de libertad	3	1
F	<b>0,20</b>	
P(F<=f) una cola	0,11	
Valor crítico para F (una cola)	<b>0,10</b>	

**Tabla 61: Prueba F para el cálculo de varianzas**

Como consecuencia de la prueba F realizada se realizó el test t suponiendo varianzas desiguales (tabla 62):

**Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales**

	TRIGO mELISA	TRIGO AD-a
Media	69,78	64,1
Varianza	15,12	74,42
Observaciones	4	2
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	<b>0,89</b>	
P(T<=t) una cola	0,27	
Valor crítico de t (una cola)	6,31	
P(T<=t) dos colas	0,54	
Valor crítico de t (dos colas)	<b>12,71</b>	

**Tabla 62: Prueba t para 2 muestras con varianzas desiguales para comparar la concentración obtenida en la harina de trigo por mELISA y por AD-a**

A la vista de los resultados puede confirmarse que el inmunosensor mELISA y el electroquímico dieron **concentraciones de DON estadísticamente comparables (probabilidad 95%) sobre la harina de trigo.**

**4.6.2.3 Comparativa estadística para la harina de maíz (Haricaman):**

Para los resultados obtenidos en los extractos de la harina de maíz (Haricaman) con ambos tipos de transducción, se comparó de igual modo que en los casos anteriores.

Las concentraciones se recogen en la tabla 63 (apartados 4.6.1.1 y 4.6.1.2):

MAIZ mELISA	MAIZ AD
64,8	69,2
79,0	59,6
72,4	

**Tabla 63: Concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) obtenidas en la harina de maíz a partir de las medidas por mELISA y por AD-a.**

En la tabla 64 se ha incluido el cálculo del factor estadístico F:

**Prueba F para varianzas de dos muestras**

	MAIZ mELISA	MAIZ AD
Media	72,07	64,4
Varianza	50,49	46,08
Observaciones	3	2
Grados de libertad	2	1
F	<b>1,09</b>	
P(F<=f) una cola	0,56	
Valor crítico para F (una cola)	<b>199,5</b>	

*Tabla 64: Prueba F para el cálculo de varianzas*

De la tabla 64 se extrae que las varianzas obtenidas entre las 2 series de datos se consideran estadísticamente iguales ( $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$ ) con una probabilidad del 95%.

Por lo tanto se procedió a realizar el test estadístico para el cálculo de t en muestras con varianzas iguales (tabla 65):

**Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales**

	MAIZ ELISA	MAIZ AD-a
Media	72,01	64,4
Varianza	50,49	46,08
Observaciones	3	2
Varianza agrupada	49,02	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	<b>1,20</b>	
P(T<=t) una cola	0,16	
Valor crítico de t (una cola)	2,35	
P(T<=t) dos colas	0,32	
Valor crítico de t (dos colas)	<b>3,18</b>	

*Tabla 65: Prueba t para 2 muestras con varianzas iguales en la comparación de la concentración en la harina de maíz por mELISA y por AD-a*

Al igual que en los casos anteriores, no existen diferencias significativas entre las concentraciones de DON determinadas por mELISA y por AD-a.

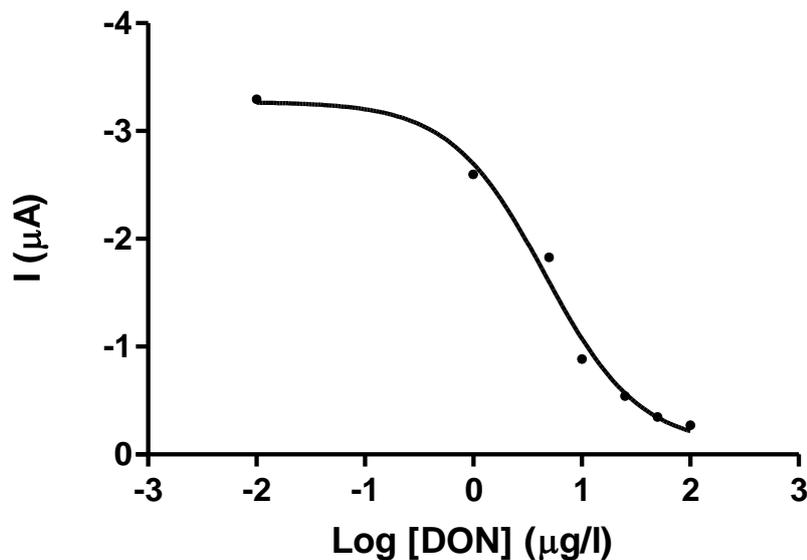
Como conclusión final, en las tres muestras de harina estudiadas (CRM, harina comercial de trigo y de maíz) **tanto la transducción espectrofotométrica como**

electroquímica proporciona iguales resultados de concentración de DON, con una probabilidad del 95%. Por lo tanto los inmunosensores desarrollados pueden considerarse métodos exactos y analíticamente robustos para la determinación de DON en harinas de maíz y de trigo.

#### 4.6.3 Reproducibilidad entre determinaciones realizadas sobre diferentes extractos del CRM TR-D100.

En este apartado se estudia la reproducibilidad de la determinación de DON sobre 4 extractos diferentes del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) obtenidos en cuatro extracciones independientes realizadas de forma simultánea. Las concentraciones de las señales se interpolaron en un único calibrado realizado simultáneamente. En todos los casos, las disoluciones de DON-HRP (10x, dilución 1/5 (v/v), PBS (0,1 M pH 7,4) y las MBs-prG-mAbDON fueron las mismas con el fin de evitar los cambios de estas variables que influyan en la DSR.

El calibrado se muestra en la Figura 96:



*Figura 96: Calibrado de DON utilizado en el estudio de reproducibilidad*

Los parámetros del ajuste no lineal (modelo 3PL óptimo en este caso) se recogen en la Tabla 66.

Parámetros	
Mínimo ( $\mu\text{A}$ )	-0,074
Máximo ( $\mu\text{A}$ )	-3,267
EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	7,57
Pendiente	1
%Competición	91,9
R	0,9940

**Tabla 66: Parámetros logísticos (modelo 3PL) del calibrado de la figura 96 (AD-a).**

El ajuste es satisfactorio ( $R=0,9940$ ), y los parámetros encontrados son los habituales. Se obtuvo un EC<sub>50</sub> de  $7,57 \mu\text{g l}^{-1}$  valor que se encuentra dentro del intervalo de EC<sub>50</sub> obtenido en calibrados anteriores en las mismas condiciones (comprendidos entre  $7$  y  $11 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

Las extracciones de DON del CRM se realizaron en PBS ( $0,1 \text{ M pH } 7,4$ ) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.8.1. Para la correcta interpolación se realizó una dilución  $1/10$  en PBS ( $0,1 \text{ M pH } 7,4$ ) para que la concentración final quede en la zona central de la curva sigmoidea (la dilución del extracto  $1/10$  fue estimada según el valor de EC<sub>50</sub> esperado, ya que el calibrado y la reacción competitiva del extracto se realizaron al mismo tiempo, sin conocer previamente el factor EC<sub>50</sub>).

Las 4 determinaciones, así como el calibrado, se realizaron utilizando el mismo *array* de electrodos CH8, siendo reutilizados una vez lavados con agua milliQ y secados con una corriente de aire a presión.

Se realizaron 8 réplicas de cada uno de los extractos de DON diferentes ( $4 \times 8$  medidas). Las señales obtenidas en los cuatro extractos se interpolaron en la curva de calibración de la figura 96, obteniéndose las concentraciones ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  DON) indicadas en la Tabla 67.

Los errores que aparecen en la tabla 67 se han calculado con respecto al valor certificado del CRM (TR-D100, Lote D-W-158),  $1400 \pm 200 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

[DON]obtenida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )							
Réplicas	Extracto 1	Extracto 2	Extracto 3	Extracto 4	Media	%DSR	%Error
1	1127,7	1589,7	1475,0	1726,6	1479,7	17,3	5,7
2	1481,6	2318,4	1461,4	1660,9	1730,6	23,2	23,6
3	1394,3	1318,5	2007,7	1959,6	1670,0	20,8	19,3
4	1773,1	1567,9	1518,9	1458,9	1579,7	8,6	12,8
5	1578,1	1683,3	1733,7	1437,7	1608,2	8,1	14,9
6	1705,5	1815,8	1371,8	2138,3	1757,9	18,0	25,6
7	1860,1	1620,4	1975,8	1876,2	1833,1	8,2	30,9
8	1645,7	1409,2	1393,6	1439,6	1472,0	8,0	5,1
<b>Media</b>	1570,8	1665,4	1617,2	1712,2			
<b>%DSR</b>	14,9	18,3	15,8	15,4			
<b>%Error</b>	12,2	19,0	15,5	22,3			

**Tabla 67: Concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) obtenidas de los 4 extractos del CRM 8 réplicas de cada extracto.**

El porcentaje de DSR obtenido para las 8 determinaciones realizadas sobre un mismo electrodo son muy próximas al 15% (intervalo entre 14,9 y 18,3%). Los errores en la determinación de DON en los 4 extractos son comparables entre si y todos ellos son inferiores al 22%, por exceso.

En el caso de los 8 electrodos de un mismo *array* CH8 se observó que la %DSR encontrada en las 8 medidas varía en un intervalo más amplio que en el caso de los 4 extractos. Se obtuvo una variación de %DSR comprendida entre 8% (para los electrodos número 4, 5, 7 y 8) y 23% (para el electrodo 2). Igualmente los errores calculados se encuentran en un intervalo amplio, desde 5,1 a 30,9%.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para evaluar si existen diferencias significativas (con una 95% de probabilidad) entre los resultados obtenidos entre diferentes extractos y entre diferentes electrodos.

#### ANOVA para los 4 extractos:

Se estudió la existencia de diferencias significativas entre los 4 extractos independientes de DON, tomando las medias de las 8 medidas realizadas sobre el *array* CH8 para cada extracto:

RESUMEN				
<i>Extractos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
EXTRACTO 1	8	12566,13	1570,77	54849,50
EXTRACTO 2	8	13323,31	1665,41	93239,27
EXTRACTO 3	8	12937,95	1617,24	65574,08
EXTRACTO 4	8	13697,82	1712,23	69471,97

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen variaciones</i>	<i>Suma cuadrados</i>	<i>Grados libertad</i>	<i>Promedio cuadrados</i>	<i>F<sub>calc</sub></i>	<i>Prob.</i>	<i>F<sub>crit</sub></i>
Entre grupos	89326,77	3	29775,59	<b>0,42</b>	0,74	<b>2,95</b>
Dentro de grupos	1981943,79	28	70783,71			
<b>Total</b>	<b>2071270,57</b>	<b>31</b>				

**Tabla 68: ANOVA de un factor aplicada sobre las concentraciones de los 4 extractos independientes del CRM**

Del cálculo ANOVA anterior se concluye que **no existen diferencias estadísticas entre los 4 extractos estudiados** ( $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ ), luego las concentraciones determinadas pueden considerarse iguales. Por lo tanto la extracción de muestra es reproducible, considerando que el resto de variables y el propio procedimiento de medida no introduce variaciones sobre los resultados al haberse realizado en el mismo día y con los mismos biorreactivos.

#### ANOVA de un mismo extracto medido sobre 8 electrodos:

En este caso se comparan las concentraciones de un mismo extracto replicado en los 8 electrodos de la placa serigrafiada CH8. Se comparan las medias de las 4 medidas obtenidas sobre cada uno de los 8 electrodos de cada placa sensora CH8.

RESUMEN				
<i>Electrodos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<b>1</b>	4	5918,95	1479,74	65669,88
<b>2</b>	4	6922,32	1730,58	161634,89
<b>3</b>	4	6680,10	1670,03	132501,28
<b>4</b>	4	6318,83	1579,71	18617,79
<b>5</b>	4	6432,87	1608,23	17119,43
<b>6</b>	4	7031,53	1757,8	99952,99
<b>7</b>	4	7332,50	1833,13	22722,16
<b>8</b>	4	5888,11	1472,03	13768,054

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados libertad</i>	<i>Promedio cuadrado s</i>	<i>F<sub>calc</sub></i>	<i>Prob</i>	<i>F<sub>crit</sub></i>
<b>Entre grupos</b>	475311,18	7	67901,60	<b>1,02</b>	0,44	<b>2,42</b>
<b>Dentro de grupos</b>	1595959,4	24	66498,31			
<b>Total</b>	2071270,6	31				

**Tabla 69: ANOVA de un factor aplicada sobre los resultados de los 8 electrodos del array CH8**

Tal y como se muestra en la tabla 69, no hay evidencia de la existencia de diferencias significativas entre las medidas obtenidas entre los 8 electrodos ( $F_{calc} < F_{crit}$ ). Por lo tanto, pese a los amplios intervalos de %DSR y %error obtenidos en la tabla 67, estadísticamente las **concentraciones determinadas a lo largo de los 8 electrodos del array pueden considerarse iguales**.

Así pues, se concluye que la determinación de las concentraciones de DON de los cuatro extractos diferentes realizados sobre la misma muestra, así como de las medidas realizadas sobre los 8 electrodos de un mismo *array* CH8 pueden considerarse iguales entre sí con una probabilidad del 95%, asegurando medidas estadísticamente reproducibles en todos los casos al haberse obtenido valores pequeños de %DSR.

## 4.7 VALIDACIÓN DE LOS INMUNOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE DON

Después de las comparaciones estadísticas de concentraciones de DON en las muestras de harinas (mELISA e inmunosensor electroquímico), procedimos a validar los inmunosensores con otras técnicas y procedimientos analíticos, utilizando un *kit* ELISA comercial y un método de referencia según la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) cromatográfico de determinación de DON en cereales mediante HPLC-UV-Vis [71].

El *kit* ELISA utilizado procede de la casa comercial Europroxima (Referencia 5121DON) y utiliza el mismo conjugado enzimático de nuestro trabajo experimental. Para la comparación de los resultados por ELISA se realizó el ensayo con todos los biorreactivos suministrados en el *kit* de Europroxima y se siguió el procedimiento y las

condiciones indicadas en el manual de instrucciones de este *kit* comercial (Apartado 3.4.10).

Además en los apartados posteriores se describe la validación de los inmunosensores mediante el método oficial mencionado (HPLC-UV-Vis), utilizando el CRM (TR-D100, Lote D-W-158) y midiendo la concentración de DON en una harina comercial de trigo y otra de maíz (Haricaman para supermercados “El Árbol”, ambas con concentraciones de DON desconocidas) para su comparación con los resultados obtenidos con el mELISA y con el inmunosensor electroquímico. El procedimiento recomendado por Vicam que se detalla en el apartado 3.4.8.4, incluye la extracción de la muestra, la limpieza de la matriz y preconcentración con una columna de inmovilización, la dilución del eluido con los disolventes de la fase móvil y la separación y determinación cromatográfica con el HPLC. Puesto que el DON produce una baja intensidad de fluorescencia intrínseca, se utilizó un detector UV-Visible (Waters 996), para su detección y se siguió el procedimiento indicado en el apartado 3.4.9.[71; 291].

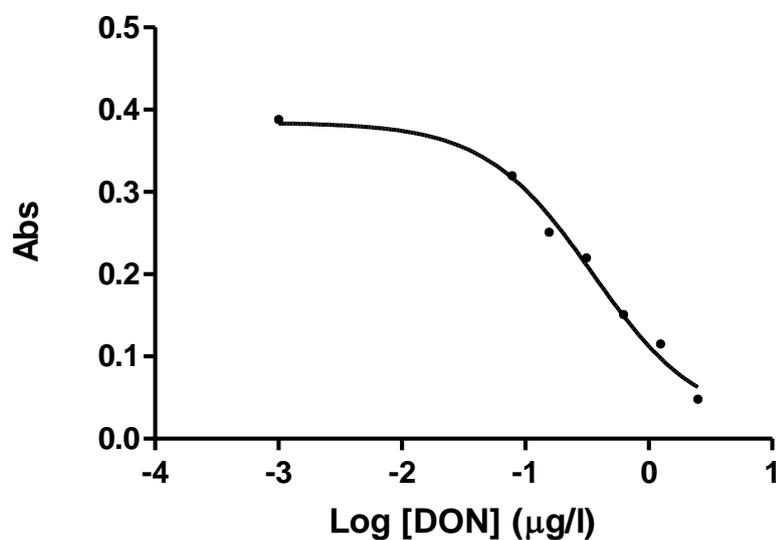
#### **4.7.1 Comparación de resultados con un *kit* ELISA comercial (Europroxima)**

Para la comparación de los resultados obtenidos se utilizó el *kit* ELISA comercial (5121DON) de Europroxima para la determinación de DON. En las recomendaciones del *kit* se recoge que puede ser utilizado para la determinación cuantitativa de DON hasta concentraciones de  $50 \mu\text{g l}^{-1}$  para la mayoría de las matrices.

El *kit* comercial incluye una placa ELISA de 96 pocillos (12x8), un bote de tampón “*Dilution Buffer*” para las diluciones realizadas sobre los biorreactivos y otro de tampón “*Rinsing Buffer*” para los lavados realizados después de las incubaciones, un vial con anticuerpo (no se indica si es policlonal o monoclonal ni su concentración) selectivo y específico a DON en formato sólido, un vial de conjugado DON-HRP también en formato sólido (tanto el anticuerpo como el DON-HRP fueron diluidos en 4 ml de “*Dilution Buffer*” tal y como se indica en las instrucciones del *kit*, con concentraciones propietarias no conocidas) y 8 estándares preparados de DON en un intervalo de concentraciones entre 0 y  $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$  (0 y  $2,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Además el *kit* incluye un vial de TMB preparado para el revelado de la señal y un vial de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,5 M) para parar la reacción enzimática después de la etapa de incubación durante 30 min a  $4^\circ\text{C}$  en ausencia de luz. El protocolo definido por Europroxima (apartado 3.4.10) consiste en un ensayo competitivo directo sobre un anticuerpo específico para DON utilizando un conjugado enzimático de DON-HRP (5121DONCO/NN6994). De ninguno de ambos reactivos se proporciona ninguna información que los caracterice (tipos de biorreactivos, inmunógenos utilizados, concentraciones, etc).

Para la extracción de la muestra, se siguió el procedimiento recomendado en las especificaciones del *kit* (Europroxima). Sobre 1 g de muestra del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) se extrajo la micotoxina en 19 ml de agua milliQ con agitación por volteo (agitador Heidolph Reax 2) utilizando la velocidad de agitación 2 (velocidad máxima 10) durante 5 minutos en un vial tipo *Falcon* para conseguir la homogeneización y la puesta en contacto del disolvente de extracción con la harina sólida. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de 2000 x g, y finalmente el sobrenadante se separó por filtración. Este último paso se modificó utilizando un microfiltro de 0,22  $\mu\text{m}$  en lugar del filtro de papel indicado, con el fin de facilitar la manipulación, aumentar la velocidad de filtración y disminuir los riesgos de toxicidad dada la alta concentración de DON en el extracto. En las indicaciones del *kit* se recomienda una dilución 1/5 (v/v) del extracto obtenido con "*Dilution Buffer*".

Después de la incubación competitiva durante 60 minutos siguiendo en protocolo establecido, la posterior etapa de revelado con TMB durante 30 minutos (parada de la reacción con 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,5 M)) y la medida de la absorbancia producida a 450 nm, se obtuvo la curva de calibración recogida en la figura 97. Los parámetros de ajuste de regresión no lineal de este calibrado se recogen en la tabla 70:



**Figura 97: Curva de calibración de DON obtenida con el kit comercial Europroxima (5121DON)**

Parámetros	
Mínimo (Abs)	0,017
Máximo (Abs)	0,384
EC <sub>50</sub> (µg l <sup>-1</sup> )	0,350
Pendiente	1
% Disminución	87,6
R	0,9939
Ajuste	3PL

**Tabla 70: Parámetros de ajuste no lineal del calibrado con el kit comercial de Europroxima (5121DON)**

La sensibilidad de los inmunosensores podemos caracterizarla mediante el valor del EC<sub>50</sub>, que coincide con el punto de inflexión de la curva sigmoidea. Como se ha comentado anteriormente, la dilución de las muestras para tener concentraciones próximas a este valor, mejora la precisión y la exactitud de estos valores de concentración. Por este motivo, los extractos del CRM de DON se prepararon de concentraciones finales próximas al valor de EC<sub>50</sub> (0,3 µg l<sup>-1</sup>), realizando una dilución previa del extracto de 1/15 (v/v) en "Dilution Buffer", además de la dilución 1/5 (v/v) en "Dilution Buffer" recomendada por las instrucciones del kit. En el pocillo se produce una dilución de concentración de 1/4 (v/v) al añadir 25 µl de muestra y diluir en un volumen final de 100 µl.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 71, siendo las absorbancias finales el valor medio de 2 réplicas. La concentración certificada en el CRM (TR-D100, Lote D-W-158) es 1400 ± 200 µg kg<sup>-1</sup>.

CRM	Abs	[DON] (interpolado)	[DON] µg l <sup>-1</sup>	[DON] µg kg <sup>-1</sup>	%ERROR
<b>Dil 1/15</b>	0,238	0,232	69,75	1315,7	-6,0
	0,242	0,222	66,63	1256,9	-10,2
<b>MEDIA</b>	<b>0,240</b>	<b>0,227</b>	<b>68,19</b>	<b>1286,3</b>	<b>-8,10</b>
<b>s</b>	0,003	0,007	2,203	41,6	-
<b>Interv</b>				373,7	
<b>[DON]<sub>certif</sub></b>	-	-	-	<b>1400,0</b>	-

**Tabla 71: Concentraciones de DON del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) obtenidas con el kit ELISA Europroxima.**

La concentración de DON obtenida mediante el *kit* ELISA de Europroxima, en el extracto del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) cuyo valor de concentración certificada es  $1400 \pm 200 \mu\text{g kg}^{-1}$  ha sido de  $1286,3 \pm 373,7 \mu\text{g kg}^{-1}$  (%DSR(n=2) = 3,2%), por lo que se ha cometido un error relativo en la determinación de -8,10%.

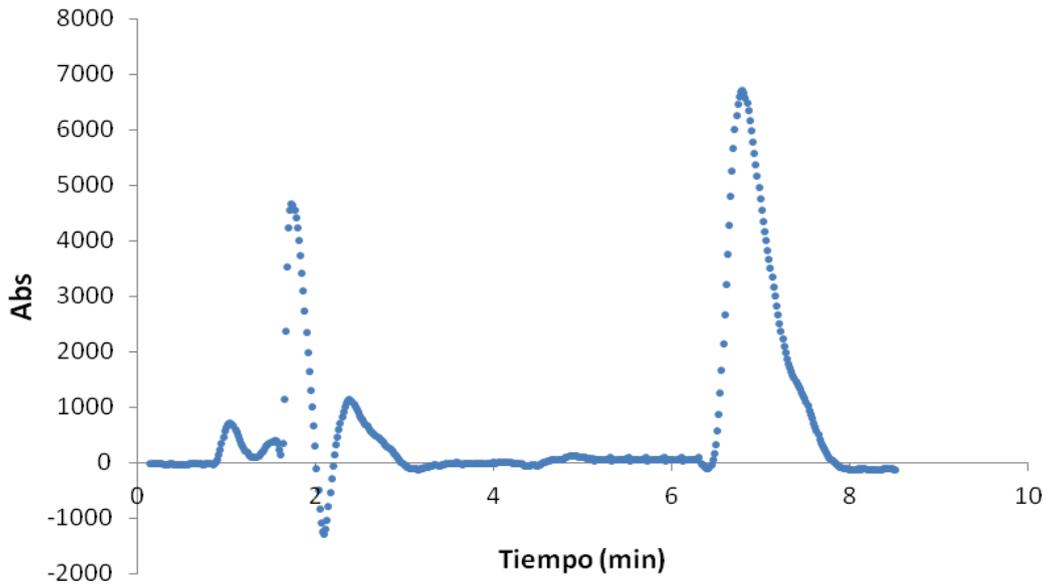
Los intervalos de confianza se calcularon según el criterio:  $\pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$

#### 4.7.2 Validación de resultados por HPLC-UV-Vis

El HPLC-UV-Vis o HPLC-FD dependiendo de las características espectroscópicas de la micotoxina, es actualmente la técnica más utilizada para el análisis de las principales micotoxinas en cereales. Aflatoxinas (AF), ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FB) y zearalenona (ZEA) son rutinariamente analizado por HPLC-FD, mientras que el DON que produce baja fluorescencia es analizado mediante HPLC-UV-Vis con una buena exactitud y precisión [18; 276].

La cromatografía líquida de alta resolución con detección UV-visible (HPLC-UV-Vis) es una técnica de referencia AOAC para la determinación de DON en extractos procedentes de cereales contaminados [71]. El DON tiene la capacidad de absorber a una longitud de onda de 218 nm y produce un pico cromatográfico para cuantificar su concentración en muy pocos minutos de tiempo de elución (tiempo de retención aproximadamente 7 minutos) utilizando una columna C18.

El procedimiento de separación en el HPLC se realizó a través de una columna cromatográfica en fase reversa [C18, 4,6x75 mm (3,5  $\mu\text{m}$ )]. Se realizaron inyecciones de las disoluciones tanto en los puntos de los calibrados como en los extractos de 50  $\mu\text{l}$  con una velocidad de flujo de  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ , utilizando ACN/H<sub>2</sub>O (10:90, (v/v)) como fase móvil. El tiempo de retención del pico de DON en las condiciones indicadas (tipo de columna y fase móvil) ( $t_r$ ) es de 6,79 min (Figura 98).



**Figura 98: Cromatograma HPLC-UV-Vis típico de una disolución de DON (3 mg l<sup>-1</sup>)**

Se realizó un calibrado con estándares de DON comprendidos entre 0 y 3 mg l<sup>-1</sup> en fase móvil midiendo tanto el área como la altura de los picos del cromatograma.

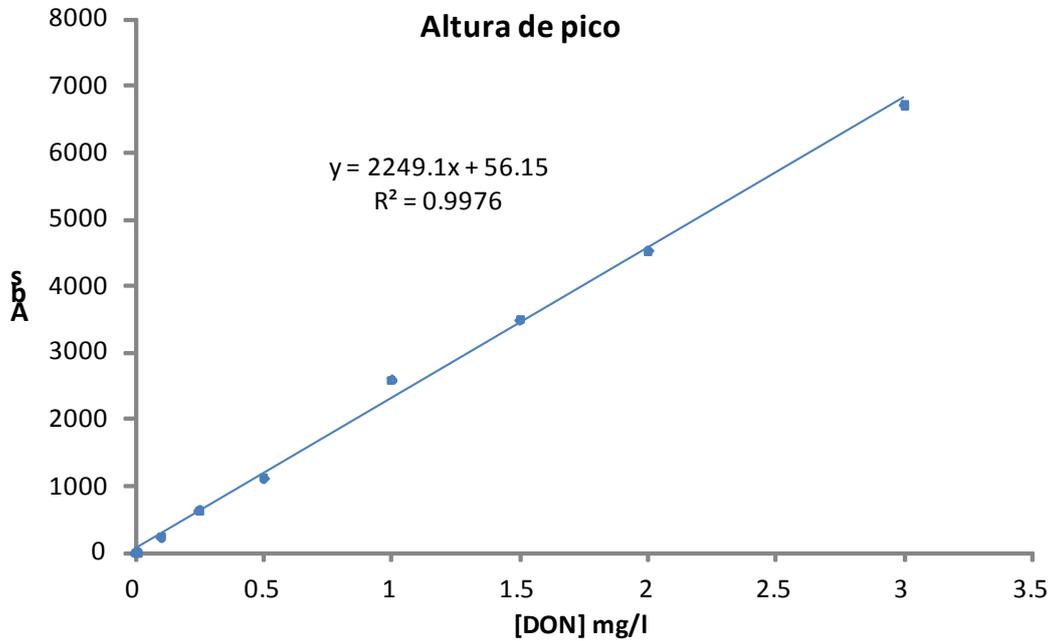
Los resultados se resumen en la tabla 72:

CALIBRADO			
[DON] mg l <sup>-1</sup>	t <sub>r</sub>	Altura pico	Área pico
0	6,78	0	0
0,01	6,78	9	0,58
0,1	6,78	236	100,78
0,25	6,78	628	261,0
0,5	6,79	1121	546,5
1	6,78	2592	1373,5
1,5	6,79	3488	1753,27
2	6,78	4524	2262,22
3	6,79	6710	3716,07

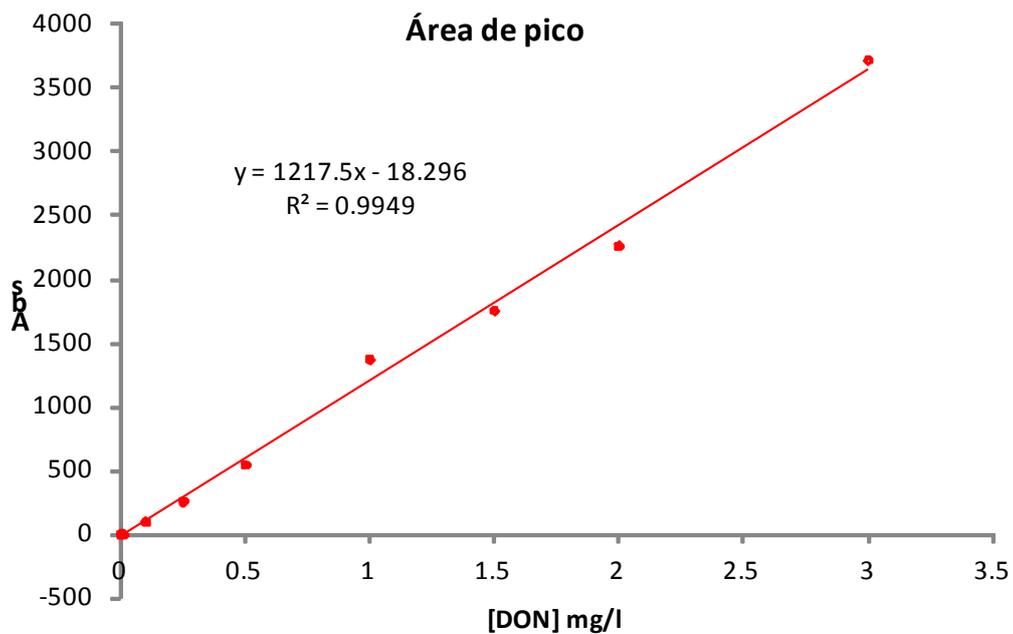
**Tabla 72: Calibrado de DON (0 y 3 mg l<sup>-1</sup>) en ACN/H<sub>2</sub>O (10:90, (v/v) por HPLC-UV-Vis**

Con las señales de la altura y del área de pico obtenidas se calibraron las concentraciones de DON independientemente. Las señales obtenidas de las muestras se interpolaron en ambas rectas de calibrado, para comparar los resultados.

Las curvas de calibrado (lineal) obtenidas y los parámetros de regresión del ajuste lineal se representan en las figuras 99 y 100:



**Figura 99:** Curva de calibrado para DON (0 y 3 mg l<sup>-1</sup> en ACN/H<sub>2</sub>O (10:90, (v/v)) obtenida por HPLC-UV-Vis a partir de las medidas en alturas de pico



**Figura 100:** Curva de calibrado para DON (0 y 3 mg l<sup>-1</sup> en ACN/H<sub>2</sub>O (10:90, (v/v)) obtenida por HPLC-UV-Vis a partir de las áreas de pico

Ambos calibrados se ajustan a una ecuación lineal con ( $R > 0,99$ ), para todo el rango de concentraciones ensayado.

La extracción de muestra para el HPLC se describe en el apartado 3.4.8.4. De forma resumida se realizó la extracción del DON de las harinas mediante la agitación por volteo (agitador Heidolph reax 2) a una velocidad 2 (velocidad máxima 10) con una disolución de agua/PEG y el correspondiente filtrado (microfiltro 0,22  $\mu\text{m}$ ). A continuación se realizó una separación de 2 ml del extracto procedente de las harinas, con una IAC (*DONtest HPLC Columns* de Vicam) eluyendo finalmente la micotoxina con 1 ml de MeOH. El disolvente MeOH se evaporó hasta sequedad con una corriente continua de  $\text{N}_2$  y finalmente se reconstituyó en 300  $\mu\text{l}$  de fase móvil (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (10:90, (v/v)), consiguiendo la purificación y preconcentración del extracto de DON previamente a su inyección en la HPLC [71].

Previamente a la determinación por HPLC en los extractos de las muestras se realizaron dos estudios con los que se evaluó la separación en la columna de inmunoafinidad (IAC) y la influencia del proceso de evaporación del disolvente y secado del extracto mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de DON en ausencia de matriz de origen cereal.

Para **estudiar la preconcentración en la columna** y la correcta separación y recuperación de DON después de su elución se utilizó una disolución de DON (0,35  $\text{mg l}^{-1}$ ) en agua, concentración calculada semejante a la esperada en la muestra certificada antes de su preconcentración en la IAC, y para que en el momento de la inyección en el HPLC sea  $[\text{DON}] = 1,4 \text{ mg l}^{-1}$ , (similar concentración al CRM). Esta disolución preparada de DON se pasó a través de la IAC siguiendo el mismo procedimiento de lavados y extracción recomendado por la casa comercial (Vicam) para los extractos de cereales (ver procedimiento 3.4.8.4).

A continuación se inyectó en el HPLC y se tomó el pico (altura y área) en el tiempo el retención del DON ( $t_r = 6,79$  minutos).

Las unidades de las concentraciones de DON recogidas en las tablas son  $\text{mg l}^{-1}$ .

ALTURA DE PICO					
TIEMPO	ALTURA	[DON] <sub>exp</sub>	[DON] <sub>prep</sub>	%error	%Recuperación
6,79	2863	1,248	1,4	-10,9	89,1
6,79	2822	1,230	1,4	-12,2	87,8
	<b>MEDIA</b>	1,239		-11,5	88,5
	<b>s</b>	0,01			
	<b>%DSR</b>	1,04			
	<b>Int conf</b>	0,114			

**Tabla 73:** % Recuperación de una disolución acuosa de DON,  $[DON]_{final}=1,4 \text{ mg l}^{-1}$  después de su paso por columna IAC.

Los porcentajes de recuperación de DON diluido en agua tras su preconcentración en la columna de inmunoafinidad ( $[DON]=0,35 \text{ mg l}^{-1}$ ) fueron 88,5%. Este porcentaje de recuperación es adecuado, y significa la retención y elución de la columna con un error en la concentración de DON del 11,5% por defecto.

Se evaluó así mismo los porcentajes de recuperación obtenidos a partir del calibrado en función del área de pico (Tabla 74):

ÁREA DE PICO					
TIEMPO	ÁREA	[DON] <sub>exp</sub>	[DON] <sub>prep</sub>	%error	%Recuperación
6,79	1886,1	1,564	1,4	11,7	111,7
6,79	1819,5	1,509	1,4	7,8	107,8
	<b>MEDIA</b>	1,537		9,8	109,8
	<b>s</b>	0,039			
	<b>%DSR</b>	2,52			
	<b>Int conf</b>	0,350			

**Tabla 74:** % Recuperación de DON ( $[DON]_{final}=1,4 \text{ mg l}^{-1}$ ) de la IAC. Interpolación en la recta en función del área de pico

Tomando el calibrado de DON en áreas de pico, los porcentajes de recuperación son mayores (recuperación media del 109,8%) y los errores en la determinación de DON eluído de la IAC tienen un valor medio de error por exceso del 9,8%.

Se concluye que utilizando un calibrado en función de las áreas de pico los errores son por exceso (al contrario que tomando la medida del área de pico), mientras que el porcentaje de error es menor. El motivo es debido al diferente ensanchamiento de los picos procedentes de disoluciones acuosas (calibrado con estándares acuosos) o provenientes de la elución con metanol de la IAC (muestras eluídas de la columna de inmunoafinidad) y con posterior evaporación del disolvente. Sin embargo, en todos los casos los errores son pequeños y menores del 12% aproximadamente.

En la segunda experiencia se evaluó **la influencia del secado de la muestra**. Para ello se procedió a evaporar el disolvente de extracción del DON (de una disolución de 1,4 mg l<sup>-1</sup> preparada en 1 ml de MeOH simulando la disolución de DON que se extrae de la columna) con una corriente de N<sub>2</sub>. Una vez evaporado el disolvente en su totalidad, se reconstituyó en fase móvil y se procedió a su determinación en el HPLC-UV-Vis con el procedimiento cromatográfico habitual.

En esta experiencia se pretende evaluar la etapa de secado a través del cálculo del porcentaje de recuperación de DON de una disolución preparada de concentración conocida. Las unidades de las concentraciones de DON indicadas en las tablas son mg l<sup>-1</sup>.

ALTURA DE PICO					
TIEMPO	ALTURA	[DON] <sub>exp</sub>	[DON] <sub>prep</sub>	%error	%Recuperación
6,80	3202,6	1,399	1,4	-0,1	99,9
6,79	3186,9	1,392	1,4	-0,6	99,4
	<b>MEDIA</b>	1,396		-0,3	99,7
	s	0,005			
	%DSR	0,355			
	Int conf	0,044			

**Tabla 75: % Recuperación obtenidos en la evaluación del proceso de secado de [DON]=1,4 mg l<sup>-1</sup> en MeOH. Interpolación en función de la altura de pico**

La evaporación del disolvente se produce de forma satisfactoria, obteniéndose recuperaciones próximas al 100%, lo que indica que no hay pérdidas del analito durante el proceso de secado y evaporación del MeOH. Es un proceso que hay que realizar con sumo cuidado y controlando la presión del N<sub>2</sub>, para evitar que la disolución se proyecte, lo que produciría importantes pérdidas de analito y errores en la determinación de DON.

Se evaluó también los porcentajes de recuperación obtenidos a partir de la recta de calibrado en función del área de pico (Tabla 76):

ÁREA DE PICO					
TIEMPO	ÁREA	[DON] <sub>exp</sub>	[DON] <sub>prep</sub>	%error	%Recuperación
6,80	1688,6	1,402	1,4	0,1	100,1
6,79	1687,4	1,401	1,4	0,1	100,1
	<b>MEDIA</b>	1,402		0,1	100,1
	<b>s</b>	0,001			
	<b>%DSR</b>	0,050			
	<b>Int conf</b>	0,006			

**Tabla 76: Porcentajes de recuperación obtenidos en la evaluación del proceso de secado de [DON]<sub>final</sub>=1,4 mg l<sup>-1</sup> en MeOH. Interpolación en función del área de pico**

Los resultados obtenidos interpolando a partir del área de pico son muy similares a los obtenidos tomando la altura de pico, consiguiendo recuperaciones del 100% que indican el correcto proceso de secado. Puede concluirse que realizar la evaporación del disolvente con una corriente de N<sub>2</sub> hasta sequedad total no produce pérdidas del analito, consiguiendo una **recuperación completa del DON (próxima al 100%)**.

Comprobado que el proceso de preconcentración en la columna, recuperación del DON retenido y evaporación del disolvente son correctos y que no suponen pérdidas significativas de analito, se procedió a la determinación de las concentraciones de DON en tres muestras: en el CRMs de DON (TR-D100, Lote D-W-158) harina de trigo certificada con  $1400 \pm 200 \mu\text{g kg}^{-1}$ , en una harina comercial de trigo y en otra harina comercial de maíz (Haricaman), estas 2 últimas de concentración no conocida de DON en un principio.

El procedimiento de extracción de DON y preparación de las muestras para su inyección en el HPLC es el indicado en el apartado 3.4.8.4. Se ha realizado el proceso de extracción completo (pesada, filtrado, purificación en columna DON test y preconcentración) sobre el CRM (TR-D100, Lote D-W-158) y sobre las harinas comerciales de trigo y maíz.

El CRM se inyectó en el HPLC en una concentración final de  $1,4 \text{ mg l}^{-1}$  a partir de la concentración inicial de DON en el sólido ( $1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ):

$$1,4 \text{ mg kg}^{-1} \rightarrow 1 \text{ g en } 4 \text{ ml (PEG/Agua)} \rightarrow \text{Pasar } 2 \text{ ml por IAC} \rightarrow \text{evaporar y reconstituir en } 500 \mu\text{l de fase móvil} \rightarrow 1,4 \text{ mg l}^{-1}$$

En la tabla 77 se han recogido las absorbancias obtenidas tanto en la medida de la altura del pico del cromatograma como en las áreas correspondientes para los tiempos de retención de 6,80 min aproximadamente. Las unidades de las concentraciones de DON recogidas en las tablas de resultados son  $\text{mg l}^{-1}$ .

MUESTRAS							
mg l <sup>-1</sup>	t <sub>r</sub>	Altura pico	[DON] <sub>exp</sub>	Int conf	Área pico	[DON] <sub>exp</sub>	Int conf
CRM	6,78	2836	1,236		1680,2	1,395	
	6,78	2700	1,176		1636,6	1,359	
		<b>MEDIA</b>	<b>1,206</b>		<b>MEDIA</b>	<b>1,377</b>	
		<b>s</b>	<b>0,04</b>	<b>0,384</b>	<b>s</b>	<b>0,03</b>	<b>0,228</b>
		<b>%DSR</b>	<b>3,55</b>		<b>%DSR</b>	<b>1,84</b>	
Trigo	6,80	22	-0,015		1,3	0,016	
	6,78	19	-0,017		1,25	0,016	
		<b>MEDIA</b>	<b>-0,016</b>		<b>MEDIA</b>	<b>0,016</b>	
		<b>s</b>	<b>0,001</b>	<b>0,0085</b>	<b>s</b>	<b>0,00003</b>	<b>0,0003</b>
		<b>%DSR</b>	<b>5,95</b>		<b>%DSR</b>	<b>0,18</b>	
Maíz	6,90	48	-0,004		9,63	0,023	
	6,79	57	0,0004		8,85	0,022	
		<b>MEDIA</b>	<b>-0,002</b>		<b>MEDIA</b>	<b>0,023</b>	
		<b>s</b>	<b>0,003</b>	<b>0,025</b>	<b>s</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,004</b>
		<b>%DSR</b>	<b>174,4</b>		<b>%DSR</b>	<b>2,00</b>	

**Tabla 77: Concentraciones de DON (mg l<sup>-1</sup>) obtenidas para el CRM (TR-D100, Lote D-W-158) y las harinas comerciales de trigo y maíz por HPLC-UV-Vis**

En la tabla 77 se han recogido las concentraciones de DON obtenidas en los extractos del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) así como de las dos harinas comerciales estudiadas, obteniéndose resultados más reproducibles para la determinación en función del área del pico. Se ha observado que en ocasiones es más fiable y reproducible tomar el área de pico como señal analítica ya que resulta proporcional a la concentración de analito, mientras que si el máximo del pico (altura) se desvía del centro del pico unos segundos (unidad de medida en el eje de abscisas) puede dar lugar a diferencias en la altura, lo que supone aumentos en la irreproducibilidad de los resultados.

Las conclusiones más relevantes son que en el caso de las harinas comerciales de trigo y de maíz la determinación de la concentración de DON con HPLC no es posible, al no disponer la técnica de la sensibilidad suficiente y a las bajas concentraciones de DON en ambas harinas, **por debajo del límite de detección del método HPLC-UV-Vis (LOD = 100 ng g<sup>-1</sup> (o 100 µg kg<sup>-1</sup>) [71].**

Por lo tanto puede decirse a partir de la determinación por HPLC que las concentraciones de DON en estas muestras son inferiores a 0,1 mg l<sup>-1</sup> (inferiores a 100 µg kg<sup>-1</sup>, similar a lo obtenido por el mELISA y el inmunosensor electroquímico en los que se encontraron concentraciones de DON en la harina de trigo y de maíz comerciales (Haricaman) próximas a 70 µg kg<sup>-1</sup>).

Se calcularon además los errores cometidos en la determinación de la concentración de DON (concentraciones en  $\text{mg kg}^{-1}$ ) con respecto al CRM certificado interpolando en ambas rectas de calibrado (tabla 78).

$\text{mg kg}^{-1}$	ALTURAS PICO				AREAS PICO			
	$[\text{DON}]_{\text{exp}}$	$[\text{DON}]_{\text{cert}}$	%Error	%Rec	$[\text{DON}]_{\text{exp}}$	$[\text{DON}]_{\text{cert}}$	%Error	%Rec
<b>Medida 1</b>	1,236	1,401	-11,8	88,2	1,395	1,401	-0,4	99,6
<b>Medida 2</b>	1,176	1,401	-16,1	83,9	1,359	1,401	-3,0	97,0

**Tabla 78: Errores en la determinación de DON por HPLC-UV-Vis en 2 réplicas del mismo extracto del CRM (TR-D100, Lote D-W-158)**

De nuevo se pone de manifiesto que los resultados obtenidos en función de las áreas de pico son mejores que los obtenidos con las alturas de pico. La determinación de la concentración de DON en el CRM (TR-D100, Lote D-W-158) por HPLC-UV-Vis para 2 réplicas realizadas sobre el mismo extracto de muestra, ha dado los resultados que se representan a continuación:

$$[\text{DON}]_{\text{CRM}} = 1,377 \pm 0,228 \text{ mg kg}^{-1} \quad (\% \text{DSR (n=2)} = 1,84\%)$$

$$\% \text{Error } -1,7\% \quad \% \text{Recuperación } 98,3\%$$

Los intervalos de confianza se calcularon según el criterio:  $\pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$

#### 4.7.3 Comparación estadística de los resultados frente a HPLC-UV-Vis y frente al *kit* comercial ELISA (Europroxima).

Para la validación de los dos tipos de inmunosensores mELISA y electroquímico se compararon las concentraciones que se obtuvieron con el método de referencia HPLC-UV-Vis y frente al *kit* comercial ELISA (Europroxima).

En el apartado 4.6.2 se evalúan posibles diferencias significativas entre las concentraciones de DON del CRM (TR-D100, Lote D-W-158) halladas por mELISA y por detección electroquímica, obteniéndose que pueden considerarse estadísticamente iguales con una probabilidad del 95%.

En la tabla 79 se han recogido las concentraciones obtenidas sobre el CRM con los diferentes procedimientos llevados a cabo y con las distintas técnicas analíticas utilizadas:

[DON] ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )					
HARINA TRIGO	HPLC-UV-Vis	ELISA (kit comercial)	mELISA	Inmunosensor electroquímico AD-a	[DON] certificado
TR-D100	1377,1 $\pm$ 288,2	1286,3 $\pm$ 373,7	1364,7 $\pm$ 108,5	1407,3 $\pm$ 89,8	1400 $\pm$ 200
%Error	-1,7	-8,1	-2,5	0,5	
%DSR	20,9	3,2	8,6	7,6	

**Tabla 79: Concentraciones de DON en el CRM y errores cometidos con las distintas técnicas y procedimientos**

A la vista de los resultados puede decirse que los inmunosensores desarrollados han ofrecido unos resultados de gran exactitud y precisión. Los errores obtenidos tanto para el mELISA como para el inmunosensor electroquímico han sido inferiores al 3%.

Con respecto a la precisión se puede decir que es aproximadamente 8% con ambos modos de detección (mELISA y AD-a) en el inmunosensor desarrollado (8,6% y 7,6% respectivamente) y que son inferiores a los %DSR obtenidos con el HPLC-UV-Vis.

Para comparar las concentraciones obtenidas con los sensores desarrollados frente al HPLC-UV-Vis como método oficial y frente al *kit* ELISA de Europroxima (5121DON), se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor para evaluar la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones halladas en los inmunosensores desarrollados (Tabla 50 mELISA y Tabla 55 para electroquímico) en comparación con el método oficial de determinación de DON (HPLC-UV-Vis), como se resume en la Tabla 80:

#### **Análisis de varianza de un factor**

##### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
HPLC	2	2754,7	1377,4	644,4
ELISA	7	9553	1364,7	13732,5
AD-a	8	11258,1	1407,3	11570,9

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	$F_{calc}$	<i>Prob</i>	$F_{crit}$
<b>Entre grupos</b>	6937,11	2	3468,6	<b>0,29</b>	0,75	<b>3,74</b>
<b>Dentro de los grupos</b>	164035,9	14	11716,9			
<b>Total</b>	170973,1	16				

**Tabla 80: ANOVA de un factor aplicada para comparar las concentraciones obtenidas por HPLC, mELISA y AD-a**

Se ha obtenido  $F_{crit} > F_{calc}$  por lo que puede decirse que estadísticamente no existen diferencias significativas entre las concentraciones halladas con los inmunosensores mELISA y electroquímico (AD-a) en comparación con las concentraciones determinadas con el HPLC.

Con estos resultados se concluye que tanto **el inmunosensor con detección óptica (mELISA) como con detección electroquímica (AD-a) son robustos** en sus resultados analíticos, ya que no se han encontrado diferencias en las concentraciones determinadas el método de referencia AOAC basado en HPLC-UV-Vis.

Además se realizó un ANOVA de un factor para la comparación de las concentraciones de los inmunosensores con las obtenidas en el *kit* ELISA comercial. *A priori* se vio que los métodos mELISA y AD-a basados en partículas magnéticas producen errores menores que el ELISA convencional en donde el anticuerpo se inmoviliza sobre la pared sólida de los pocillos.

**Análisis de varianza de un factor****RESUMEN**

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<b>kit</b>	2	2572,6	1286,3	1728,7
<b>ELISA</b>	7	9553	1364,71	13732,5
<b>AD-a</b>	8	11258,1	1407,3	11570,9

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F<sub>calc</sub></i>	<i>Prob</i>	<i>F<sub>crit</sub></i>
Entre grupos	24798,5	2	12399,2	<b>1,05</b>	0,38	<b>3,74</b>
Dentro de los grupos	165120,3	14	11794,3			
Total	189918,7	16				

**Tabla 81: ANOVA de un factor aplicada para comparar las concentraciones obtenidas por el kit de Europroxima, mELISA y AD-a**

En el ANOVA realizado se ha obtenido que  $F_{crit} > F_{calc}$  lo que indica que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de DON determinadas por mELISA y por AD-a con las obtenidas con el *kit* de Europroxima. **Las concentraciones determinadas con los inmunosensores desarrollados no difieren significativamente de las halladas con el *kit* comercial de Europroxima.**

En todos los casos, las concentraciones de DON se encuentran dentro del intervalo del valor certificado por el CRM (TR-D100, Lote D-W-158).

Con los resultados expuestos en los apartados anteriores, así como en validación realizada en el apartado 4.7.3 frente a otras técnicas, obteniendo resultados estadísticamente comparables, puede decirse que el inmunosensor de DON desarrollado con transducción espectrofotométrica y electroquímica es capaz de detectar DON en matrices de origen cereal, en concentraciones inferiores a las que permite el HPLC-UV por su límite de detección. Los resultados obtenidos demuestran que **se ha desarrollado una técnica reproducible, sensible y selectiva para la determinación de DON en cereales**, y que permite determinar concentraciones muy pequeñas y muy por debajo de las limitadas por la legislación Europea y Española.

De acuerdo a estos objetivos generales, una de las finalidades del trabajo de investigación reflejado en esta Memoria de Tesis Doctoral es la plasmación del trabajo de investigación en nuevos inmunosensores disponibles para el control de la micotoxina en alimentos, y su posterior comercialización en forma de un nuevo producto que contribuya a su control analítico, partiendo de la base de los dispositivos diseñados, optimizados y validados a lo largo de las experiencias que se han expuesto.

El inmunosensor electroquímico desarrollado junto con los protocolos de trabajo necesarios se encuentra plasmado en forma de patente en la Oficina española de

Patentes y Marcas (OEPM), bajo título “INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA MICOTOXINA DEOXINIVALENOL (DON)” con el número de registro ES1510.105b (Anexo I). Los términos de autoría y titularidad corresponden 50% a la Universidad de Zaragoza y 50% a la empresa Capher IDI SL (Zaragoza).

## **4.8 DETERMINACIÓN CONJUNTA DE DON Y FB1 EN MUESTRAS DE HARINA DE CEREALES**

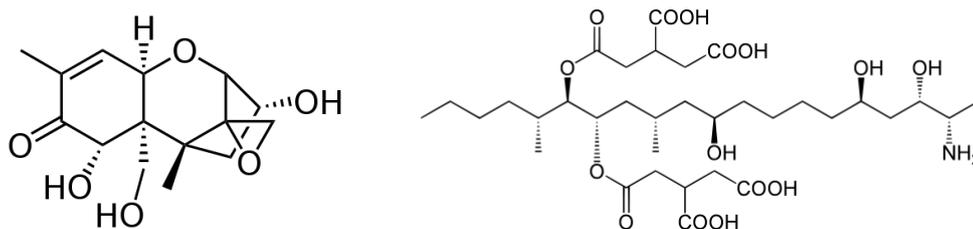
En la última parte de esta memoria, se muestran los resultados iniciales de la determinación conjunta de DON con la micotoxina FB1, ambas procedentes del mismo hongo (*Fusarium*), y que usualmente co-existen en una misma muestra. El objetivo es comprobar la posibilidad de determinación conjunta en un mismo extracto de ambas micotoxinas con los dos inmunosensores que hemos desarrollado individualmente para cada una de ellas: inmunosensor para la determinación del DON en este trabajo de Tesis y para la FB1 con las condiciones óptimas (Apartado 3.4.7) de un inmunosensor que están estudiadas en un trabajo previo realizado dentro de nuestro grupo de investigación.

La contaminación en alimentos derivados de maíz y/o trigo con ambas micotoxinas (FB1 y DON), es bastante frecuente, ya que ambas provienen de hongos de la misma familia *Fusarium*, por lo que se planteó este objetivo sobre la extracción conjunta de las dos micotoxinas y su posterior determinación con los dos inmunosensores individuales optimizados. El objetivo en un futuro próximo, es el desarrollo de un dispositivo capaz de determinar cuantitativamente varias micotoxinas de forma simultánea minimizando el tiempo con respecto al uso de inmunosensores individuales. Este apartado pretende tan sólo ser un primer paso para el diseño de este dispositivo y ver las dificultades que se presentan antes de su desarrollo completo. El primer paso es la extracción conjunta de las dos micotoxinas con un buen rendimiento de extracción.

### **4.8.1 Extracción conjunta de DON y FB1 de las muestras**

La **extracción individual de ambas micotoxinas** se estudió previamente, optimizando procedimientos diferentes dadas las diferentes propiedades químicas del DON y de la FB1. El DON (Figura 101) es una molécula muy polar con varios sustituyentes –OH, capaz de disolverse en disolvente (orgánico o inorgánico) de origen polar o incluso en agua. Su extracción individual se realizó en este trabajo utilizando también fosfato

(PBS), sin la presencia de ningún disolvente orgánico y en el mismo tampón utilizado en las etapas del inmunosensor (Apartado 3.4.8.1). Por el contrario, la FB1 (Figura 101) es una molécula lineal compuesta por un grupo amino, grupos metilo y grupos COOH, por lo que es necesario el uso de un disolvente orgánico para su extracción, normalmente mezclas de metanol con agua en proporciones mayores del 70% (v/v) de MeOH, y en algunos casos poniendo una pequeña proporción de ácido acético para asegurar la forma protonada (extraíble) de las dos moléculas [58; 223; 257].



**Figura 101: Estructuras químicas del DON y de la FB1**

En la bibliografía se describe una amplia variedad de tipos de extracción tanto para el DON (PBS, MeOH, acetonitrilo, mezclas acuosas) como para la FB1 (lo más frecuente mezclas acuosas de metanol o de acetonitrilo en diferentes proporciones) [58; 258]. Estos procedimientos son también dependientes del tipo de determinación instrumental posterior, por ejemplo el acetonitrilo es muy frecuente en extracciones previas a la determinación con cromatografía líquida. Para nuestro estudio en este apartado, realizamos ensayos previos de recuperación de ambas micotoxinas DON y FB1 de la misma muestra, utilizando diferentes porcentajes en volumen de MeOH/H<sub>2</sub>O (se ensayaron 60:40, 70:30 y 80:20 (v/v)).

Se obtuvieron buenos porcentajes de recuperación conjunta de FB1 y de DON provenientes de la misma muestra de cereal con una **extracción única utilizando como disolvente MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v)** (Apartado 4.8.1). El procedimiento coincide con el utilizado habitualmente para la FB1, mientras que los porcentajes de recuperación del DON fueron analíticamente comparables (ANOVA, 95% nivel de confianza) a los obtenidos con el inmunosensor utilizando para la extracción PBS 0,1 M, pH=7,4. No es posible utilizar PBS como disolvente en la extracción conjunta (procedimiento habitual para la extracción de DON) debido a la naturaleza química de la FB1, que hace necesario utilizar un disolvente orgánico.

Para rendimientos de extracción próximos al 100% de ambas micotoxinas no fue necesario un mayor porcentaje de metanol del 70% (v/v), que haría necesaria una mayor dilución posterior con tampón PBS para disminuir en lo posible su presencia en

las disoluciones competitivas del inmunoensayo. El procedimiento de extracción conjunta de DON+FB1 de una matriz de origen cereal (harina) se describe en el apartado 3.4.8.3. En las condiciones indicadas, el porcentaje final de MeOH es menor del 5% (v/v), no afectando negativamente sobre todo a la unión del DON con su anticuerpo.

La determinación conjunta de DON+FB1 se realizó sobre una mezcla de los patrones de referencia certificada (CRMs: TR-F100 (Lote F-C-433) y TR-D100 (Lote D-W-158)) procediendo a su extracción según el procedimiento optimizado que se ha descrito en el apartado 3.4.8.3, utilizando como disolvente de extracción **MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v)**.

#### **4.8.2 Determinación simultánea de DON y FB1 en los CRMs**

En los patrones de referencia certificada utilizados, una harina de trigo (TR-D100 [DON]<sub>cert</sub> = 1400±200 µg kg<sup>-1</sup>), y una harina de maíz (TR-F100 [FB1]<sub>cert</sub>=1500±400 µg kg<sup>-1</sup>) solo certifica la concentración de una sola micotoxina (Ver Anexo II y Anexo III), pero se desconoce la existencia y concentración de otras que pueden co-existir en el mismo CRM, procedentes del mismo (o de diferentes) hongo(s).

Con el objeto de utilizar estos CRMs en esta parte del trabajo, en primer lugar, para cada CRM se comprobó la existencia y se midieron las concentraciones de DON y FB1 no certificadas. Los procedimientos utilizados fueron los procedimientos que se optimizaron para cada una de las micotoxinas individualmente (Apartado 3.4.8.1 para la extracción de DON y Apartado 3.4.8.2 para la extracción de FB1).

Para esta caracterización de los dos CRMs se utilizó mELISA y el inmunosensor electroquímico. Los resultados se describen en los apartados posteriores.

##### **4.8.2.1 Determinación de DON en TR-F100 y de FB1 en TR-D100 por mELISA:**

Las extracciones individuales realizadas para estos ensayos previos fueron una extracción de DON del CRM TR-F100 (Lote F-C-433) que se realizó en PBS (0,1 M, pH 7,4) siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la extracción del DON de muestras de origen cereal (Apartado 3.4.8.1), y de la FB1 del TR-D100 (Lote D-W-158) en MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) siguiendo un procedimiento recogido en el Apartado 3.4.8.2.

Las determinaciones se realizaron por mELISA utilizando los calibrados individuales respectivos para FB1 y de DON, que se representan en la Figura 102.

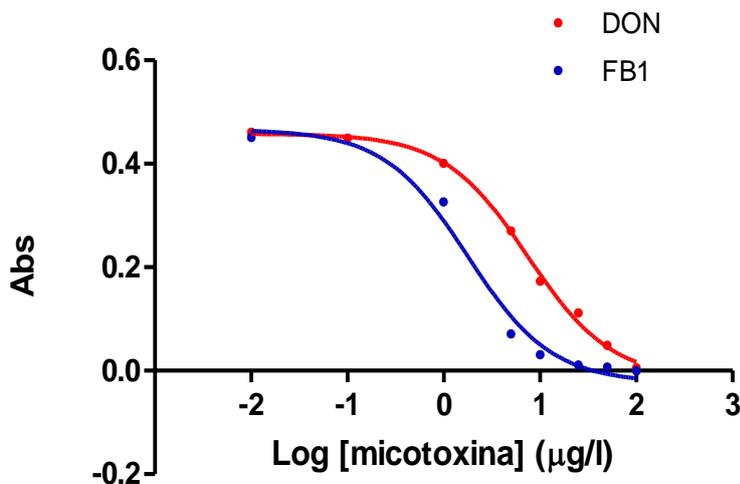


Figura 102: Calibrado competitivo del DON y de FB1 mediante mELISA

Los parámetros del ajuste no lineal con el modelo 3PL, se presentan en la tabla 82:

Parámetros	DON	FB1
Mínimo (Abs)	-0,016	-0,023
Máximo (Abs)	0,458	0,466
EC <sub>50</sub> (µg l <sup>-1</sup> )	7,465	1,775
Pendiente	1	1
%Competición	98,7	100
R	0,9985	0,9915

Tabla 82: Parámetros de ajuste (modelo 3PL) obtenidos de los calibrados de DON y FB1

Se realizaron varias medidas durante días consecutivos (con un nuevo calibrado en cada día), utilizando los inmunosensores individuales e interpolando en la curva correspondiente, dependiendo de la micotoxina extraída en cada caso.

La tabla siguiente (Tabla 83) resume las concentraciones encontradas en días diferentes y con extractos distintos para comprobar estadísticamente si los resultados difieren o no:

DON en TR-F100 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	FB1 en TR-D100 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
325,8 $\pm$ 50,0	31,2 $\pm$ 5,5
307,2 $\pm$ 86,5	31,5 $\pm$ 10,4
352,9 $\pm$ 73,5	38,0 $\pm$ 4,1
212,2 $\pm$ 20,2	39,4 $\pm$ 2,6

**Tabla 83: Concentraciones de DON y FB1 determinadas sobre los CRMs en los que no están certificadas**

Se realizó un test t para muestras con varianzas iguales obteniéndose que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en las 4 experiencias para cada micotoxina, por lo que pueden considerarse iguales, con una probabilidad del 95%.

Se obtuvo aproximadamente una concentración de DON ( $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en la harina de maíz (TR-F100), mientras que se determinó una concentración para la FB1 ( $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en la harina de trigo (TR-D100):

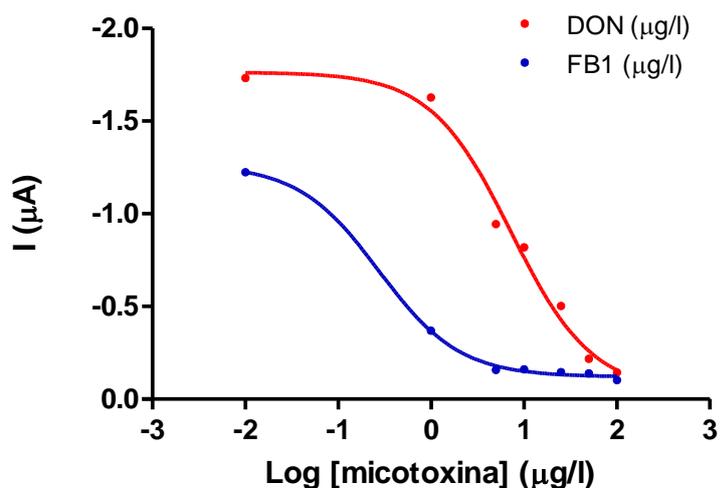
$$[\text{DON}]_{\text{TR-F100}} = 299,5 \pm 97,3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 20,4\%}$$

$$[\text{FB1}]_{\text{TR-D100}} = 35,0 \pm 6,8 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 12,2\%}$$

#### 4.8.2.2. Determinación de DON en TR-F100 y de FB1 en TR-D100 con el inmunosensor electroquímico (AD-a)

Los mismos extractos de ambos CRMs siguiendo los procedimientos de extracción optimizados (apartado 3.4.8.1 para el DON en TR-F100 y apartado 3.4.8.2 para la FB1 en TR-D100), se analizaron con el inmunosensor electroquímico (AD-a) desarrollado para cada micotoxina (condiciones recogidas en los apartados 3.4.6 para el DON y 3.4.7 para la determinación de FB1).

Los calibrados se representan en la figura 103, y en la tabla 84 los parámetros logísticos (3PL) de estos calibrados.



**Figura 103:** Calibrado competitivo en función de DON y de FB1 con el inmunosensor electroquímico (AD-a)

	DON	FB1
Mínimo (µA)	-0,03937	-0,1184
Máximo (µA)	-1,762	-1,264
EC <sub>50</sub> (µg l <sup>-1</sup> )	7,254	0,2735
Pendiente	1	1
%Disminución	91,7	91,7
R	0,9938	0,9993

**Tabla 84:** Parámetros del ajuste no lineal de los calibrados de DON y FB1. Inmunosensor electroquímico (AD-a)

Las concentraciones de DON en TR-F100 (harina de maíz con valor certificado de FB1 de  $1500 \pm 400 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), realizando 4 réplicas de medidas sobre el mismo extracto, se resumen en la tabla 85:

DON	I ( $\mu\text{A}$ )	$[\text{DON}]_{\text{exp}}$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
<b>TR-F100</b>	-0,586	311,6
	-0,517	377,5
	-0,537	356,5
	-0,517	377,5
<b>MEDIA</b>	-0,539	355,8
<b>s</b>	0,033	31,1
<b>Interv.</b>		49,4
<b>%DSR</b>	6,1	8,7

**Tabla 85: Concentración de DON obtenida del extracto del CRM (TR-F100) con 4 réplicas. Inmunosensor electroquímico (AD-a).**

Por lo tanto la concentración de DON determinada en el CRM TR-F100 es:

$$[\text{DON}]_{\text{TR-F100}} = 355,8 \pm 49,4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 8,7\%}$$

En la tabla 86 se han recopilado las concentraciones de DON (CRM TR-F100) con ambos inmunosensores (4 réplicas) en una de las determinaciones **realizadas sobre el mismo extracto**, por mELISA y con el inmunosensor electroquímico AD-a sobre el mismo extracto.

	AD-a	mELISA
	311,6	388,3
	377,5	294,0
	356,5	305,9
	377,5	315,1
<b>MEDIA</b>	<b>355,8</b>	<b>325,8</b>
<b>s</b>	31,1	42,5
<b>interv</b>	49,4	50,0

**Tabla 86: Comparativa de concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) obtenidas por el inmunosensor electroquímico y mELISA (n=4)**

Las concentraciones de DON obtenidas en el patrón certificado TR-F100 (Lote F-C-433, fueron (concentraciones determinadas en uno de los días sobre el mismo extracto):

$$[\text{DON}]_{\text{mELISA}} = 325,8 \pm 50,0 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 13\%}$$

$$[\text{DON}]_{\text{AD-a}} = 355,8 \pm 49,4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 8,7\%}$$

Para la comparativa de las concentraciones de DON por ambos métodos, se realizaron las pruebas estadísticas que se indican a continuación:

Prueba F para varianzas de dos muestras

DON	AD-a	mELISA
Media	355,78	325,83
Varianza	965,30	1809,33
Observaciones	4	4
Grados de libertad	3	3
F	<b>0,53</b>	
P(F<=f) una cola	0,31	
Valor crítico para F (una cola)	<b>0,11</b>	

*Tabla 87: Prueba F para el cálculo de varianzas*

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

DON	AD-a	mELISA
Media	355,78	325,83
Varianza	965,30	1809,33
Observaciones	4	4
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	<b>1,14</b>	
P(T<=t) una cola	0,15	
Valor crítico de t (una cola)	2,02	
P(T<=t) dos colas	0,31	
Valor crítico de t (dos colas)	<b>2,57</b>	

*Tabla 88: Test t realizado para la comparativa de las concentraciones de DON obtenidas por el inmunosensor AD-a y mELISA*

Con un test t para muestras con varianzas desiguales **no se vieron diferencias significativas** (probabilidad del 95%) entre los resultados obtenidos sobre un mismo extracto en las dos técnicas desarrolladas (detección por mELISA y por amperometría), por lo que se pueden considerar iguales. Es decir, la concentración de DON determinada en la harina de maíz TR-F100 (Lote F-C-433, harina con FB1 certificada) por el inmunosensor electroquímico es comparable estadísticamente a la concentración obtenida por mELISA.

De una forma similar, se procedió a la determinación del contenido de **FB1 sobre el CRM TR-D100** (harina de trigo, valor certificado  $1400 \pm 200 \mu\text{g kg}^{-1}$  DON), con el inmunosensor electroquímico (calibrado en la Figura 103).

FB1	I ( $\mu\text{A}$ )	[FB1] <sub>exp</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
<b>TR-D100</b>	-0,397	33,9
	-0,271	51,0
	-0,359	41,4
	-0,315	52,7
<b>MEDIA</b>	-0,335	44,8
<b>s</b>	0,055	8,8
<b>Interv.</b>		13,9
<b>%DSR</b>	16,3	19,6

**Tabla 89: Concentración de DON obtenida de un extracto del CRM (TR-F100) con 4 réplicas**

La concentración de FB1 determinada a partir de cuatro réplicas del extracto del CRM (TR-D100) es por lo tanto:

$$[\text{FB1}]_{\text{TR-D100}} = 44,8 \pm 13,9 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 19,6\%}$$

Las concentraciones de FB1 determinadas en el CRM TR-D100 (4 medidas replicadas) con el mELISA y el inmunosensor electroquímico AD-a en una de las determinaciones realizadas (n=4) sobre el mismo extracto, se recopilan en la Tabla 90:

	AD-a	mELISA
	33,9	40,1
	51,0	37,1
	41,4	40,9
	52,7	39,4
<b>MEDIA</b>	<b>44,8</b>	<b>39,4</b>
<b>s</b>	8,8	1,6
<b>interv</b>	13,9	2,6

**Tabla 90: Comparativa de concentraciones ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de FB1 obtenidas por el inmunosensor AD-a y mELISA con las 4 medidas replicadas.**

Las concentraciones de FB1 encontradas experimentalmente sobre el mismo el patrón certificado TR-D100 (Lote D-W-158), con los dos tipos de detección fueron:

$$[\text{FB1}]_{\text{mELISA}} = 39,4 \pm 2,6 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 4,0\%}$$

$$[\text{FB1}]_{\text{AD-a}} = 44,8 \pm 13,9 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 19,6\%}$$

Para comprobar si los resultados obtenidos por ambos modos de detección (amperométrica y mELISA) para la FB1 son iguales estadísticamente, se realizó un test estadístico t para los dos modos de detección del inmunosensor desarrollado:

Prueba F para varianzas de dos muestras

FB1	AD-a	mELISA
<b>Media</b>	44,65	39,38
<b>Varianza</b>	78,00	2,67
<b>Observaciones</b>	4	4
<b>Grados de libertad</b>	3	3
<b>F</b>	<b>29,2</b>	
<b>P(F&lt;=f) una cola</b>	0,01	
<b>Valor crítico para F (una cola)</b>	<b>9,28</b>	

*Tabla 91: Prueba F para el cálculo de varianzas*

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

FB1	AD-a	mELISA
<b>Media</b>	44,65	39,38
<b>Varianza</b>	78,00	2,67
<b>Observaciones</b>	4	4
<b>Diferencia hipotética de las medias</b>	0	
<b>Grados de libertad</b>	3	
<b>Estadístico t</b>	<b>1,17</b>	
<b>P(T&lt;=t) una cola</b>	0,16	
<b>Valor crítico de t (una cola)</b>	2,35	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	0,33	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	<b>3,18</b>	

*Tabla 92: Test t realizado para la comparativa de las concentraciones de FB1 obtenidas por el inmunosensor AD-a y mELISA*

El test t, calculado para muestras con varianzas desiguales, indica que **no hay diferencias significativas con una probabilidad del 95%** entre las concentraciones de

FB1 obtenidas por los 2 modos de detección optimizados, por lo que puede decirse que ambos han ofrecido las mismas concentraciones.

En conclusión, la concentración de FB1 obtenida en la harina de trigo TR-D100 (Lote D-W-158, harina con DON certificado) por el inmunosensor electroquímico es estadísticamente comparable a la concentración obtenida por mELISA, con un valor de concentración próximo a  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  FB1, determinada sobre el mismo extracto.

#### 4.8.3 Validación de resultados por HPLC-UV-Vis

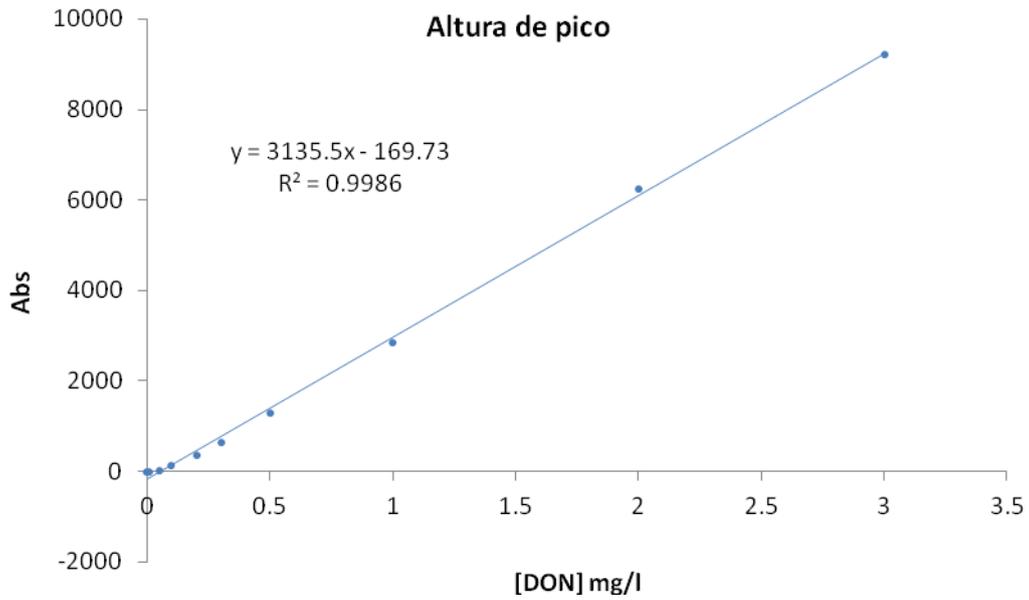
Como confirmación de los resultados anteriores, se utilizó la técnica oficial de determinación de DON en el CRM TR-F100 por HPLC con detección UV-Vis (HPLC-UV-Vis).

Para la validación de los resultados se procedió a realizar la extracción de DON en el CRM TR-F100 siguiendo el procedimiento del apartado 3.4.8.4, con  $\text{H}_2\text{O}/\text{PEG8000}$  utilizando las columnas IAC (Vicam) DON-Test [71; 261].

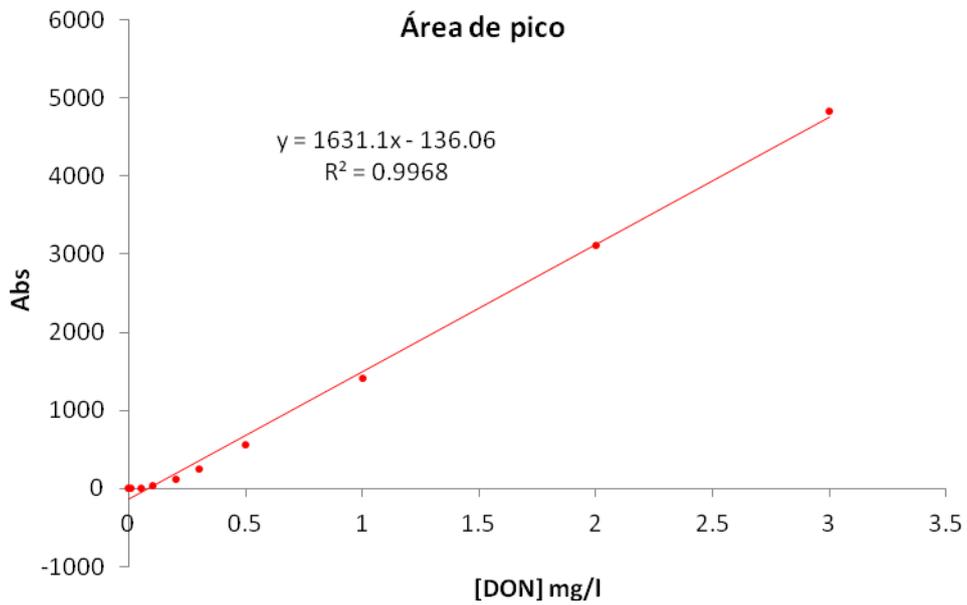
El calibrado de DON con estándares comprendidos entre 0 y  $3 \text{ mg l}^{-1}$  en la fase móvil ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (10:90) obtuvo los resultados de la Tabla 93. Las curvas de calibrado (altura y área de pico) se han representado en las figuras 104 y 105.

CALIBRADO			
[DON] $\text{mg l}^{-1}$	TIEMPO	ALTURA	AREA
0	6,98	0	0
0,01	6,98	4	0,08
0,05	7	10	0,67
0,1	7	134	37,8
0,2	6,93	351	125,6
0,3	6,95	631	248,2
0,5	6,95	1299	554,52
1	6,91	2863	1408,42
2	6,94	6256	3115,73
3	6,9	9205	4827,03

**Tabla 93: Resultados del calibrado realizado con DON ( $0-3 \text{ mg l}^{-1}$ ) en función de la altura y del área de pico del cromatograma**



**Figura 104:** Curva de calibrado de DON (0-3 mg l<sup>-1</sup>) realizada en función de la altura de pico del cromatograma



**Figura 105:** Curva de calibrado de DON (0-3 mg l<sup>-1</sup>) realizada en función del área de pico del cromatograma

Ambos tipos de calibrados fueron satisfactorios ( $R > 0,9990$ ). La determinación de la concentración de DON contenido en el patrón de FB1 (TR-F100, Lote F-C-433), se llevó

a cabo por HPLC-UV-Vis ( $\lambda = 218$  nm). Los resultados obtenidos para un  $t_R \approx 7$  min se muestran en la tabla 94:

MUESTRAS							
	TIEMPO	ALTURA	[DON] mg l <sup>-1</sup>	Int conf	AREA	[DON] mg l <sup>-1</sup>	Int conf
TR-F100	7,31	1467	0,522		980,27	0,684	
	7,30	1338	0,481		892,3	0,630	
		<b>MEDIA</b>	0,501		<b>MEDIA</b>	0,657	
		<b>s</b>	0,03	0,261	<b>s</b>	0,04	0,343
		<b>%DSR</b>	5,80		<b>%DSR</b>	5,80	

**Tabla 94: Resultados obtenidos en función de las alturas y de las áreas de pico integradas a  $t_r = 7$  min**

Las concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) calculadas teniendo en cuenta las diluciones aplicadas durante el proceso se resumen en la tabla 95 (altura de pico) y en tabla 96 (áreas de pico):

ALTURAS PICO				
	[DON]mg l <sup>-1</sup>	[DON]mg kg <sup>-1</sup>	[DON] $\mu\text{g kg}^{-1}$	Int. Conf
TR-F100	0,522	0,416	416,1	
	0,481	0,383	383,3	
	<b>MEDIA</b>	0,400	<b>399,7</b>	
	<b>s</b>	0,023	23,2	208,4
	<b>%DSR</b>	5,8	5,8	

**Tabla 95: Concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en función de la altura de pico**

Las concentraciones obtenidas después de la extracción de DON en el CRM TR-F100:

$$[\text{DON}]_{\text{TR-F100}} = 399,7 \pm 208,4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con } \% \text{DSR (n=2)} = 5,8\%$$

La concentración de DON hallada en la harina de maíz certificada CRM TR-F100 es próxima a las encontradas por los inmunosensores con detección por mELISA y AD-a.

Igualmente se realizó la determinación de DON a partir de los datos obtenidos en función del área de pico. Los resultados encontrados se recogen en la tabla 96:

AREAS PICO				
	[DON]mg/l	[DON]mg kg <sup>-1</sup>	[DON]µg kg <sup>-1</sup>	Int. Conf
TR-F100	0,684	0,546	545,6	
	0,630	0,503	502,6	
	<b>MEDIA</b>	0,524	<b>524,1</b>	
	<b>s</b>	0,030	30,4	273,2
	<b>%DSR</b>	5,8	5,8	

**Tabla 96: Concentraciones de DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en función del área de pico**

Los resultados de la tabla 96 resultaron ser algo mayores que los obtenidos en la tabla 95:

$$[\text{DON}]_{\text{TR-F100}} = 524,1 \pm 273,2 \mu\text{g kg}^{-1}$$

A la vista de los resultados obtenidos, se va a considerar como mejores los resultados hallados a partir de la altura de pico ya que la concentración de DON obtenida en la extracción individual ha producido resultados satisfactorios (más cercanos a los obtenidos por mELISA y AD-a).

Por lo tanto, para validar los resultados determinados con el inmunosensor mELISA y amperométrico, se realizó una comparativa estadística con los valores determinados por HPCL-UV-Vis (Tabla 97):

DON en TR-F100			
	AD-a	mELISA	HPLC-UV-Vis
	311,6	388,3	416,1
	377,5	294,0	383,3
	356,5	305,9	
	377,5	315,1	
<b>MEDIA</b>	<b>355,8</b>	<b>325,8</b>	<b>399,7</b>
<b>s</b>	31,1	42,5	23,2
<b>%DSR</b>	8,73	13,05	5,8

**Tabla 97: Concentraciones de DON obtenidas por AD-a, mELISA y HPLC-UV-Vis (alturas pico a  $t_r = 7$  min)**

Se realizó un ANOVA de un factor para comparar la concentración de DON determinada en un extracto de harina certificada (TR-F100, Lote F-C-433) por el

inmunosensor con detección por AD-a, por mELISA y por HPLC-UV-Vis siguiendo los procedimientos establecidos. El estudio estadístico se resume en la tabla 98:

#### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
AD-a	4	1423,10	355,78	965,30
mELISA	4	1303,31	325,83	1809,33
HPLC-UV-Vis	2	799,42	399,71	537,92

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen variaciones</i>	<i>Suma cuadrados</i>	<i>Grados libertad</i>	<i>Promedio cuadrados</i>	<i>F<sub>calc</sub></i>	<i>Prob</i>	<i>F<sub>crit</sub></i>
Entre grupos	7344,74	2	3672,37	<b>2,90</b>	0,12	<b>4,73</b>
Dentro grupos	8861,82	7	1265,97			
<b>Total</b>	<b>16206,56</b>	<b>9</b>				

*concentraciones de DON obtenidas por AD-a, mELISA y HPLC-UV-Vis (alturas pico a  $t_r = 7$  min) en el CRM (TR-F100)*

El análisis de la varianza (ANOVA) realizado sobre las concentraciones de DON determinadas en el patrón certificado TR-F100, en el cual se desconocía la concentración de DON ha demostrado que no existen diferencias significativas (probabilidad 95%) sobre los valores determinados, concluyendo que la concentración de DON contenido en esta harina de maíz corresponde a un concentración inferior a  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$  (concentraciones exactas recogidas en la tabla 97).

La **validación de la concentración de FB1 determinada en el patrón certificado TR-D100** fue realizada dentro de nuestro grupo de investigación, para evaluar los resultados obtenidos con el mELISA y el inmunosensor electroquímico.

Se siguió el procedimiento oficial para la determinación de FB1 en harinas por cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente (HPLC-FD). La extracción de la muestra se realiza en acetonitrilo (100%) y se utilizan columnas de inmunoafinidad específicas para la extracción de FB1 (FumuniTest, de Vicam). Debido a que la FB1 no posee grupos funcionales que le permitan ser detectada con un detector por absorción o por fluorescencia, es preciso derivatizarla previamente con el reactivo OPA (o-ftaldehído), una amina primaria con propiedades fluorescentes [292].

En la comparativa estadística realizada (ANOVA con el 95% de probabilidad) entre los resultados obtenidos con el HPLC-FD y los determinados en los apartados 4.8.2.1 (mELISA) y 4.8.2.2 (electroquímico) de esta Tesis, no se encontraron diferencias significativas para una concentración de FB1 próxima a  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  determinada con los inmunosensores electroquímicos y mELISA.

Las concentraciones determinadas con las diferentes técnicas analíticas utilizadas se resumen en la Tabla 99:

FB1 en TR-D100			
	AD-a	mELISA	HPLC-FD
	33,9	40,1	41,3
	51,0	37,1	39,8
	41,4	40,9	-
	52,7	39,4	-
<b>MEDIA</b>	<b>44,7</b>	<b>39,4</b>	<b>40,6</b>
<b>s</b>	8,8	1,6	1,06
<b>%DSR</b>	19,9	4,1	2,6

**Tabla 99: Concentraciones de FB1 obtenidas por AD-a, mELISA y HPLC-FD**

#### **4.8.4 Determinación de DON y FB1 por mELISA en una muestra conjunta de harina de maíz y de trigo (TR-F100 + TR-D100)**

La determinación cuantitativa simultánea de varias micotoxinas en un único ensayo reduce el tiempo y los costes de cada análisis, y por lo tanto se convierte en un método mucho más práctico y atractivo [293]. En la bibliografía se han descrito numerosos procedimientos de determinación de micotoxinas provenientes de *Fusarium*, donde la gran mayoría utilizan cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y sobre todo con detección por espectrometría de masas (HPLC-MS), y en donde las extracciones se realizan habitualmente utilizando mezclas acuosas del disolvente acetonitrilo coincidente en su composición con la fase móvil HPLC [294].

La importancia de la determinación en un sólo ensayo de las micotoxinas seleccionadas (FB1 y DON) recae en el hecho de que ambas proceden del mismo tipo de hongo *Fusarium* y pueden contaminar simultáneamente una misma muestra de cereales. Se produce además una toxicidad sinérgica provocada por su presencia conjunta en la misma muestra [36; 295].

El desarrollo de un posible **inmunosensor múltiple para la determinación simultánea** requiere una planificación previa de las experiencias reduciendo en lo posible etapas con respecto al uso de sensores individuales para cada micotoxina [293]. Inicialmente, ensayamos la posibilidad de un inmunoensayo conjunto, para obtener una concentración que sería la suma de DON+FB1, con la única finalidad de comprobar que la suma de concentraciones se encontrara por debajo del límite individual legislado (screening). Sin embargo, dado que el etiquetado enzimático de los conjugados FB1-HRP y DON-HRP es el mismo, no es posible separar en un inmunoensayo conjunto las señales provenientes de una u otra micotoxina, por lo tanto, lo que hemos estudiado son las bases iniciales de la **extracción conjunta y determinación individual de DON y FB1 sobre este extracto**.

Con mayor detalle, los problemas que nos encontramos inicialmente son los siguientes:

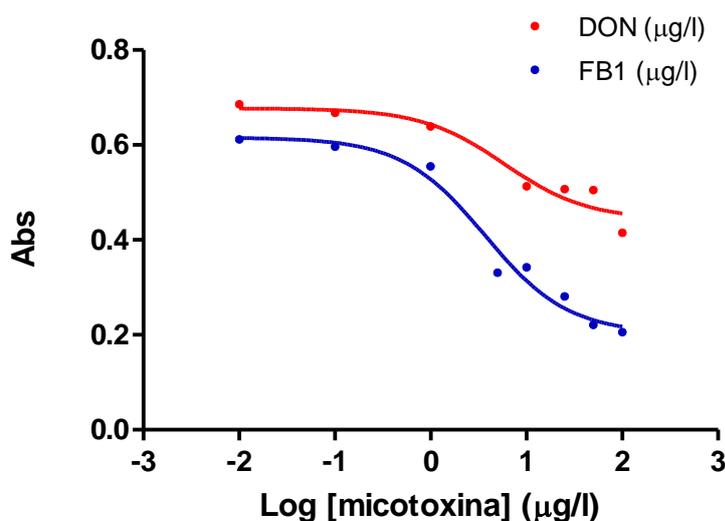
1. El procedimiento único de extracción debe de tener un rendimiento lo suficientemente alto y próximo al 100% para ambas micotoxinas. El problema inicial surge de las diferentes propiedades químicas de ambas micotoxinas. En el caso del DON, mucho más polar, se ha visto que es suficiente su extracción en tampón acuoso PBS. Sin embargo, en el caso de la FB1 es preciso un disolvente orgánico; usualmente es suficiente con una proporción de metanol en agua superior al 70% (v/v). Se ha visto que un porcentaje en exceso de MeOH podría influir muy negativamente en la afinidad del anticuerpo de DON (Apartado 4.4.1).
2. La presencia del DON y FB1 en cereales, se produce de forma natural mayoritariamente en determinados tipos de harinas, pero muy escasamente en otras. Por ejemplo, la FB1 se encuentra mayoritariamente en harina de maíz (así se encuentra legislada), pero es muy escasa en otros tipos de harinas. En el caso del DON, en situación natural su presencia es mayoritaria en harinas de trigo. Adicionalmente, la propia matriz puede interferir de diferente manera tanto en la estabilidad de la micotoxina como en la extracción y en las determinaciones analíticas posteriores [258; 296].

Por ambos motivos, la determinación conjunta no es tan sólo una suma de determinaciones individuales. De hecho, un término que cada vez se le da más importancia en trabajos de presencia de micotoxinas, es el de “micotoxinas enmascaradas”, que se consideran aquellas que no son detectadas por los procedimientos analíticos propuestos o que se encuentran complejadas (con hidratos de carbono por ejemplo) y no responden a la metodología analítica utilizada. En nuestra opinión, y después de la experiencia de nuestro trabajo en el DON y en otras

micotoxinas (ocratoxina A y fumonisina B1), lo que se indica como micotoxinas enmascaradas no es debido a una falta de sensibilidad analítica del método propuesto, sino más bien a un deficiente y con muy bajo rendimiento procedimiento de extracción [297].

Una de las opciones previas que se ensayaron fueron dos calibrados diferentes de DON y FB1 en los intervalos de DON (0 -100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) y FB1 (0 -100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), pero realizando en ambos casos incubaciones en presencia de los 2 anticuerpos (mAbDON y mAbFB1) inmovilizados sobre las MBs-prG y los dos conjugados enzimáticos (DON-HRP y FB1-HRP), siguiendo a continuación las etapas propias de los inmunoensayos individuales. Es decir, se realizaron dos calibrados diferentes de DON y FB1 en presencia de los dos anticuerpos y conjugados. Para la cuantificación suma de ambas micotoxinas se realizó la interpolación de un único extracto de la muestra contaminada.

Los calibrados realizados según este esquema de trabajo, en función de DON y de FB1 se representan en la Figura 106:



**Figura 106: Calibrados múltiples para DON y FB1 realizados de modo simultáneo**

Como es lógico, y tal como se previó, en cada calibrado con su micotoxina, el otro conjugado no compite más allá de su reactividad cruzada y siempre **se obtiene una señal mínima que se suma a la competitiva de la otra micotoxina**, tal como se observa en la figura anterior (Figura 106). Es decir, el conjugado que no compite actúa como una interferencia aditiva, a la vez que las disminuciones en la inhibición de las absorbancias debidas a la competición de cada micotoxina con su propio conjugado (y reconocido con cada anticuerpo) disminuyen el 45% aproximadamente (Figura 106). Si bien podrían separarse ambas señales multivariantes, no sería muy adecuado bajo un

punto de vista práctico, sobre todo por el hecho que en cada calibrado, incluso si se realizaran el mismo día, pueden variar las señales obtenidas.

Adicionalmente, en la interpolación de la muestra se produce la competición de las 2 micotoxinas presentes en la muestra con sus respectivos conjugados enzimáticos, lo que hace que la señal sea muy pequeña, menor a la obtenida en el punto más concentrado de los calibrados, por lo que no es posible el cálculo de las concentraciones (Tabla 100).

DON/FB1	Abs
<b>8 réplicas</b>	0,180
	0,192
	0,171
	0,166
	0,190
	0,169
	0,203
	0,189
<b>MEDIA</b>	0,183
<b>s</b>	0,013
<b>%DSR</b>	7,2

**Tabla 100: Absorbancias obtenidas en la interpolación de una muestra contaminada con DON y FB1 a partir de un calibrado conjunto en presencia de los dos anticuerpos y de los dos conjugados de ambas micotoxinas.**

Se consideró otra alternativa similar (aunque *a priori* poco factible), que consistió en la **determinación suma de ambas micotoxinas** con un único calibrado suma de las concentraciones de ambas. En el calibrado se incluyeron los dos anticuerpos y conjugados enzimáticos, pero la curva de calibrado se obtuvo con concentraciones de una disolución que contenía ambas micotoxinas (DON+FB1). En la misma situación se obtuvieron las señales del extracto. Los resultados previos de este planteamiento se unieron a los datos obtenidos con calibrados individuales, con la idea de separarlos en un análisis multifactorial.

Los datos no se muestran, pero los resultados no fueron satisfactorios, pues calibrados efectuados en condiciones algo diferentes variaron significativamente los valores de  $Abs_{max}$ ,  $Abs_{min}$  y  $EC_{50}$ , con lo cual el análisis multifactorial no fue posible. En la bibliografía se describen inmunoensayos multifactoriales, aunque suelen provenir de

un mismo anticuerpo que tiene afinidad para varios analitos diferentes [217; 293; 298; 299].

Otro aspecto que hay que tener en cuenta es la reactividad cruzada de cada anticuerpo con la otra micotoxina, que complica todavía más la situación de partida. Por los motivos anteriores, la determinación conjunta FB1 y DON se abordó con una misma extracción conjunta (que se optimizó previamente), pero la posterior **determinación se llevó a cabo en dos inmunosensores individuales previamente optimizados.**

Para ello se prepararon dos calibrados independientes para cada una de las micotoxinas, de la misma forma y en las mismas condiciones optimizadas para los sensores individuales [241; 300]. Se han descrito en la bibliografía inmunoensayos realizados sobre membranas poliméricas [301; 302] en las que se inmovilizan los anticuerpos de las micotoxinas en dos superficies diferentes y se realiza la competición independiente de cada micotoxina objeto de estudio con el correspondiente conjugado enzimático [303]. En este caso los calibrados son comparables a los obtenidos en los sensores individuales [300].

Para determinar FB1 y DON hemos diseñado un procedimiento similar, efectuando sobre el extracto dos inmunoensayos competitivos separados físicamente cada uno de ellos con un único anticuerpo y un conjugado enzimático (MBs-mAbDON/DON-HRP y mAbFB1/FB1-HRP respectivamente) en cada caso.

Las determinaciones de DON y FB1 pueden realizarse tanto por mELISA como con el sensor electroquímico en las condiciones optimizadas previamente para cada tipo ensayo. El biosensor individual para la determinación de FB1 en cereales fue desarrollado y optimizado en nuestro laboratorio dentro de nuestro grupo de investigación (las condiciones se resumen en el Apartado 3.4.7).

Para la determinación conjunta de FB1 y DON se utilizó una mezcla de los dos patrones certificados (TR-D100  $[\text{DON}]_{\text{cert}} = 1400 \pm 200 \mu\text{g kg}^{-1}$  y TR-F100  $[\text{FB1}]_{\text{cert}} = 1500 \pm 400 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) de los cuales se conoce además la concentración que contienen de la micotoxina no certificada, determinada en los apartados 4.8.2.1 (mELISA) y 4.8.2.2 (inmunosensor electroquímico) y validado por HPLC-UV-Vis en el apartado 4.8.3.

La finalidad de esta experiencia es evaluar la correcta extracción de las 2 micotoxinas (DON y FB1) sobre una mezcla de las dos matrices de harinas, además de comprobar la influencia de matrices diferentes de cereales en una misma muestra en las concentraciones obtenidas. Para ello se trabajó con los extractos obtenidos

(MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30 v/v) de la mezcla de harinas provenientes de los dos CRMs estudiados en apartados anteriores, y las determinaciones se realizaron con mELISA.

**- Determinación de DON en la mezcla de los dos CRM (TR-F100 + TR-D100) mediante mELISA**

Al objeto de tomar como referencia una mezcla de diferentes harinas, se tomaron mezclas por pesada de ambos CRMs sólidos y se procedió a extraer ambas micotoxinas con MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v), para realizar la determinación de FB1 y DON sobre dos alícuotas de este extracto.

En las experiencias de este apartado se tomó un peso de 1,2525 g de la mezcla de las dos harinas (1,0022 g del CRM TR-D100 y 0,2503 g del CRM TR-F100) y se llevó a cabo la extracción en 5 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) durante 30 minutos con agitación por volteo. A continuación se realizó una centrifugación a 2000 x g durante 30 minutos y por último se filtró el sobrenadante sobre un filtro de 0,22 µm (los detalles se muestran en el apartado 3.4.8.3).

La concentración teórica de DON de la mezcla (1184,2 µg kg<sup>-1</sup>) se ha calculado a partir de las concentraciones medias de DON de ambos CRMs y teniendo en cuenta la masa de cada CRM en la mezcla:

$$[DON]_{esperada} = \frac{(1400 \mu\text{g}/\text{Kg} \cdot 1,0022 \text{ g}) + (320 \mu\text{g}/\text{Kg} \cdot 0,2503 \text{ g})}{(1,0022 \text{ g} + 0,2503 \text{ g})} = 1184,2 \mu\text{g}/\text{Kg}$$

En la tabla 101 se recogen las concentraciones de DON de dos extractos diferentes obtenidos en las mismas condiciones por el procedimiento de inmunoensayo magnético mELISA.

DON	Extracto 1		Extracto 2	
	Abs	[DON] µg kg <sup>-1</sup>	Abs	[DON] µg kg <sup>-1</sup>
TR-D100 + TR-F100	0,160	1393,18	0,186	1020,06
	0,175	1176,13	0,190	974,80
	0,192	970,32	0,199	879,49
	0,179	1124,26	0,207	801,60
<b>MEDIA</b>	<b>0,177</b>	<b>1165,97</b>	<b>0,196</b>	<b>918,99</b>
<b>S</b>	0,013	174,88	0,009	97,76
<b>Interv.</b>		278,06		155,44
<b>%DSR</b>	7,47	15,00	4,81	10,64
<b>%Error</b>		-1,5%		-22,4%

**Tabla 101: Concentraciones de DON total determinadas en el extracto de TR-D100+TR-F100**

La concentración de DON calculada en la mezcla en cada una de las extracciones es:

$$[\text{DON}]_{\text{Extracto conjunto 1}} = 1165,97 \pm 278,06 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 15\%}$$

$$[\text{DON}]_{\text{Extracto conjunto 2}} = 918,99 \pm 155,44 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 10,6\%}$$

El error de este resultado frente al calculado anteriormente es tan sólo del -1,5% en el extracto 1 y de -22,4% en el extracto, lo que significa que la extracción sobre esta mezcla tiene un alto rendimiento de extracción y la determinación en presencia de las dos matrices de trigo y de maíz no producen interferencia en el procedimiento de mELISA.

Para comprobar la reproducibilidad de dos extracciones diferentes, los resultados de concentración de DON se compararon estadísticamente como se indica a continuación.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<b>Extracto 1</b>	<b>Extracto 2</b>
<b>Media</b>	1165,97	989,74
<b>Varianza</b>	30582,19	22127,19
<b>Observaciones</b>	4	4
<b>Grados de libertad</b>	3	3
<b>F</b>	<b>1,38</b>	
<b>P(F&lt;=f) una cola</b>	0,39	
<b>Valor crítico para F (una cola)</b>	<b>9,28</b>	

**Tabla 102: Prueba F realizada sobre los resultados de los dos extractos**

**Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales**

	<i>Extracto 1</i>	<i>Extracto 2</i>
<b>Media</b>	1165,97	989,74
<b>Varianza</b>	30582,19	22127,19
<b>Observaciones</b>	4	4
<b>Varianza agrupada</b>	26354,69	
<b>Diferencia hipotética de las medias</b>	0	
<b>Grados de libertad</b>	6	
<b>Estadístico t</b>	<b>1,54</b>	
<b>P(T&lt;=t) una cola</b>	0,09	
<b>Valor crítico de t (una cola)</b>	1,94	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	0,18	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	<b>2,45</b>	

**Tabla 103: Test t realizado para comparar la similitud de las concentraciones de DON determinadas en la mezcla de los dos CRMs**

En el test t realizado se obtuvo que  $t_{exp} < t_{crit}$  por lo que se asegura de la no existencia de diferencias significativas en los resultados determinados en cada una de las dos extracciones, por lo tanto **las concentraciones de DON determinadas en dos extractos diferentes son iguales**, con un 95% de probabilidad.

A la vista de los resultados puede decirse que la extracción conjunta de DON con MeOH (70%) realizada sobre una mezcla de dos harinas diferentes (una de trigo y una de maíz) es capaz de extraer la totalidad de DON contenido en una muestra que contiene varias micotoxinas, con un rendimiento próximo al 100%. Se muestra como un **primer punto de partida para la determinación conjunta de varias micotoxinas** disminuyendo el tiempo de análisis ya que únicamente se realiza una sola extracción para las dos determinaciones.

**-Determinación de FB1 en la mezcla de los dos CRM (TR-F100 + TR-D100) mediante mELISA**

Con los mismos extractos utilizados en el apartado anterior (1,2525 g de la mezcla de harinas (1,0022 g del CRM TR-D100 y 0,2503 g del CRM TR-F100) con 5 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v), se procedió a la determinación de FB1 con mELISA.

La concentración de FB1 suma de las encontradas en cada CRM se calcula a partir de la masa aportada por cada harina y teniendo en cuenta la masa total:

$$[FB1]_{esperada} = \frac{(40 \mu g/Kg \cdot 1,0022 g) + (1500 \mu g/Kg \cdot 0,2503 g)}{(1,0022 g + 0,2503 g)} = 331,8 \mu g/Kg$$

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 104:

FB1	Extracto 1		Extracto 2	
	Abs	[FB1] $\mu\text{g kg}^{-1}$	Abs	[FB1] $\mu\text{g kg}^{-1}$
TR-D100 + TR-F100	0,113	359,25	0,126	264,48
	0,116	336,81	0,125	270,65
	0,121	301,75	0,102	443,97
	0,117	329,57	0,113	352,79
<b>MEDIA</b>	<b>0,117</b>	<b>331,85</b>	<b>0,117</b>	<b>332,97</b>
s	0,003	23,71	0,01	84,24
Interv.		37,70		133,9
%DSR	7,47	15,00	9,72	25,30
%Error		0,015%		0,35%

**Tabla 104: Concentraciones de FB1 total determinadas en el extracto de TR-D100+TR-F100**

$$[\text{FB1}]_{\text{Extracto conjunto 1}} = 331,85 \pm 37,70 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 15,0\%}$$

$$[\text{FB1}]_{\text{Extracto conjunto 2}} = 332,97 \pm 139,9 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ con \%DSR (n=4) = 25,3\%}$$

Los resultados coinciden prácticamente sin error con el valor teórico calculado (Error 0,015% para el extracto 1 y de 0,35% en el extracto 2), indicando al igual que para el DON que el rendimiento de extracción es adecuado y que la mezcla de matrices no interfiere en el inmunoensayo del mELISA.

Sobre ambos extractos, se evaluó si pueden considerarse estadísticamente comparables:

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<i>Extracto 1</i>	<i>Extracto 2</i>
<b>Media</b>	331,85	332,97
<b>Varianza</b>	562,255	7096,40
<b>Observaciones</b>	4	4
<b>Grados de libertad</b>	3	3
<b>F</b>	<b>0,08</b>	
<b>P(F&lt;=f) una cola</b>	0,03	
<b>Valor crítico para F (una cola)</b>	<b>0,11</b>	

**Tabla 105: Prueba F realizada sobre los resultados de los dos extractos**

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Extracto 1</i>	<i>Extracto 2</i>
<b>Media</b>	331,85	332,97
<b>Varianza</b>	562,25	7096,40
<b>Observaciones</b>	4	4
<b>Varianza agrupada</b>	3829,33	
<b>Diferencia hipotética de las medias</b>	0	
<b>Grados de libertad</b>	6	
<b>Estadístico t</b>	<b>-0,03</b>	
<b>P(T&lt;=t) una cola</b>	0,49	
<b>Valor crítico de t (una cola)</b>	1,94	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	0,98	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	<b>2,45</b>	

*Tabla 106: Test t realizado para comparar la similitud de las concentraciones de FB1 determinadas en la mezcla de los dos CRMs*

A partir del test t se demuestra que no hay diferencias significativas (probabilidad del 95%) sobre los resultados determinados en los dos extractos de las harinas. **Por lo tanto, podría concluirse que la extracción realizada en las mismas condiciones no influye en los resultados para ambas micotoxinas.**

Como conclusión final, la extracción con MeOH 70% (v/v) de una mezcla de harinas (de trigo y de maíz) que contiene las dos micotoxinas DON y FB1 produce rendimientos de extracción adecuados para ambas en su extracción conjunta próximos al 100%, y tanto la propia extracción como las determinaciones del inmunoensayo mELISA no vienen influenciadas por la propia matriz de la harina de trigo y de maíz, lo que significa la inexistencia de interferencias sobre los anticuerpos o el enzima de etiquetado (HRP) siguiendo el procedimiento que se ha desarrollado.

La extracción conjunta supone tan sólo **un primer paso hacia un sensor múltiple**, en donde se busca reducir el tiempo de las determinaciones, basado en este caso en reducir el tiempo de extracción, el ahorro de reactivos y la facilidad y rapidez en la obtención de resultados cuantitativos.

Este aporte ha abierto a nuestro grupo una siguiente línea de trabajo en donde estamos integrando **sensores conjuntos** de FB1, DON y ocratoxina A sobre la base de calibrados individuales, que se integrarán en un futuro **dispositivo de microfluídica** que automatice todas las etapas de los inmunoensayos a la vez que se reduzcan los volúmenes de los biorreactivos utilizados, aspecto muy importante sobre todo para el caso de los anticuerpos y conjugados enzimáticos de estas micotoxinas.





---

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**

---



## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

En esta Tesis Doctoral se ha desarrollado paralelamente un **inmunosensor de DON** con transducción **espectrofotométrica** (mELISA) y **electroquímica** (inmunosensor amperométrico), utilizando partículas magnéticas como soporte de biorreconocimiento. Los inmunosensores se validaron con muestras certificadas y técnicas oficiales de cromatografía líquida, y se han dado los primeros pasos en la **extracción conjunta** de DON y FB1 (*Fusarium*) y su determinación simultánea con estos biosensores.

A continuación se resumen **las conclusiones más relevantes** del trabajo de esta Tesis Doctoral:

- I.** La **afinidad** entre un anticuerpo policlonal pAbDON (D01F-1) y el DON-HRP sintetizado con los reactivos SATA y PMPI (SATA-HRP + DON-PMPI) **no fue suficiente** para el desarrollo de un inmunosensor con la sensibilidad requerida para la determinación de DON. Se obtuvieron fuertes uniones inespecíficas de este conjugado DON-HRP sobre las MBs con diferentes funcionalizaciones que impidieron un comportamiento óptimo del inmunosensor.
- II.** Se seleccionó un nuevo **anticuerpo** (mAbDON IB12, R-Biopharm) y un **conjugado enzimático** DON-HRP (Europroxima, 5121DON) purificados, que mostraron **una alta afinidad** entre sí que fue evaluada por ELISA espectrofotométrico convencional y sobre inmunosensores con MBs (detección espectrofotométrica y electroquímica). Se concluyó que las uniones producidas entre el mAbDON y el DON-HRP son producidas únicamente por el biorreconocimiento antígeno-anticuerpo, y permite una adecuada competitividad del DON libre (disminuciones de señal superiores al 90% en presencia de  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  de DON).
- III.** Las partículas magnéticas óptimas, seleccionadas como superficie sólida de inmovilización del mAbDON y para las etapas del inmunoensayo y transducción, fueron las **partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G (MBs-prG)**. Con ellas se obtuvieron inmovilizaciones eficientes y orientadas hacia los epítomos del DON (alta afinidad), y bajas adsorciones inespecíficas de los biorreactivos utilizados (especialmente del conjugado DON-HRP). El tiempo de vida del mAbDON una vez inmovilizado sobre las MBs-prG es de al menos 25 días almacenado a 4 °C.
- IV.** Se optimizaron inicialmente las etapas del inmunoensayo utilizando **mELISA**, siendo las mejores condiciones experimentales:

- MBS-prG-mAbDON (15  $\mu\text{g}$ ) con mAbDON (5  $\text{mg l}^{-1}$ )
- DON-HRP (10x) con dilución de 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)
- DON (0-100  $\mu\text{g l}^{-1}$ )
- Tiempo de competición: 60 min

Con estas condiciones y trabajando a Tª ambiente se obtuvieron porcentajes de competición del 76%. El uso de MBs evita la necesidad de agentes bloqueantes para eliminar adsorciones inespecíficas, una vez realizados los lavados en las etapas del inmunoensayo dos veces con el tensoactivo tween-20 (0,1% m/v en PBS 0,1 M pH 7,4) seguido de un último lavado con PBS (0,1 M pH 7,4), eliminando así cualquier exceso de biorreactivos que no han reaccionado.

- V. A partir de las condiciones óptimas del inmunoensayo mELISA, se fijaron las condiciones de **transducción electroquímica** utilizando detección amperométrica. Los electrodos SPCEs individuales produjeron mayores corrientes que los de un array de 8 electrodos serigrafados CH8 ( $i_{\text{max}}$  de -0,185 frente a -0,077  $\mu\text{A}$  respectivamente), debido al mayor diámetro de su ET y diferente velocidad de transferencia de carga (composición de la tinta). Sin embargo, los electrodos CH8 disminuyeron el tiempo y simplificaron las medidas en el inmunosensor electroquímico, mejorando el modo de trabajo y la reproducibilidad.
- VI. Se han propuesto dos posibles formas de medida electroquímica utilizando **detección amperométrica (AD)**: **AD-a** (AD en modo alterno) y **AD-c** (AD en modo consecutivo). En la primera (AD-a) se toman las corrientes de los 8 sensores cada 0,24 s durante los 90 s de medida, y en la segunda se mide 90 s cada sensor uno detrás del otro (tiempo de medida total unos 12 min). Los calibrados obtenidos tuvieron una sensibilidad similar en ambos casos ( $\text{EC}_{50}$  8,5  $\mu\text{g l}^{-1}$  DON), utilizando un potencial de reducción  $E=-0,35$  V, aunque las corrientes medidas aumentan en AD-a debido a una corriente capacitativa que no influyó en los resultados de concentración.

Al realizarse las medidas de los 8 canales con AD-a en un **tiempo inferior** al modo AD-c (90 s frente a aproximadamente 12 min), se simplifica el trabajo experimental (necesidad de controlar el tiempo de la reacción enzimática) y sobre todo se evita la fácil oxidación de la HQ recién preparada y en contacto con el aire, lo que mejora la reproducibilidad, por lo que AD-a fue el modo escogido. Se optimizaron las diferentes configuraciones de medida de las que dispone el conector electrónico utilizado, **seleccionando la configuración 1**, que consiste en *arrays* de 8 electrodos independientes todos ellos (*jumpers* J4+J5 conectados).

Las **condiciones óptimas** del inmunosensor electroquímico fueron:

- MBS-prG-mAbDON (25 µg) con mAbDON (5 mg l<sup>-1</sup>)
- DON-HRP (10x) con dilución de 1/5 (v/v) en PBS (0,1 M, pH 7,4)
- Tiempo de competición: 60 min
- HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,6 mM)
- Potencial -0,35 V con *Amperometric Detection* en modo alternado (AD-a) configuración 1

**VII.** El anticuerpo mAbDON es muy **selectivo** para el DON y no presenta gran afinidad frente a otras micotoxinas. La **reactividad cruzada** del mAbDON con FB1 es del 7%. El anticuerpo mAbFB1 utilizado en la determinación conjunta de DON+FB1 tiene una reactividad cruzada con el DON del 6%.

**VIII.** La **extracción** del DON a partir de las muestras sólidas de cereales, debido a su carácter fuertemente polar, se llevó a cabo con un rendimiento próximo al 100% utilizando tampón de fosfatos (PBS 0,1 M, pH=7,4). Este extracto mantiene constante la concentración de DON durante al menos 20 días almacenado a 4 °C. La extracción del DON con otros disolventes orgánicos (en proporción con agua) es también posible, pero la presencia de un porcentaje superior al 5% (v/v) de **acetonitrilo** o de **metanol** interfieren en la acción del anticuerpo y del enzima sobre los inmunosensores de DON, por lo que estos extractos deben de diluirse en la proporción adecuada con tampón PBS, previamente a la etapa competitiva.

**IX.** Los estudios de la **reproducibilidad** de ambos inmunosensores indicaron desviaciones estándares relativas (%DSR) en la determinación de DON (0,01-100 µg l<sup>-1</sup>) del orden de %DSR < 8% en mELISA y %DSR=8-11% con el inmunosensor electroquímico, con medidas realizadas en un mismo día (n=8). Si bien calibrados realizados en diferentes días muestran pequeñas variaciones de sensibilidad, las diferencias fueron estadísticamente significativas (análisis de varianza para un nivel de confianza del 95%), por lo que es necesario un calibrado diario realizado a la vez que las medidas de las muestras para su interpolación correcta, situación que es habitual en general en inmunoanálisis dada la gran cantidad de variables que influyen en la extensión de las reacciones antígeno-anticuerpo.

**X.** Se ha efectuado una comparativa de **réplicas de extractos** (4 extracciones diferentes y 8 réplicas de medidas de concentración de DON en cada extracto) sobre un CRM de DON (TR-D100, lote D-W-158, 1400 ± 200 µg kg<sup>-1</sup> DON), utilizando el **inmunosensor electroquímico** (AD-a). Las 8 medidas de concentración de DON replicadas sobre un mismo *array* CH8 mostraron

aproximadamente un %DSR=15%. Los errores relativos de las concentraciones obtenidas con respecto al valor certificado fueron del  $17,25 \pm 5,13$  % en las 4 extracciones, considerándose iguales significativamente (probabilidad 95%). Las concentraciones de los cuatro extractos, y 8 medidas de una misma concentración en cada electrodo individual dentro de un mismo CH8, no tuvieron diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza del 95%).

- XI.** Ambos inmunosensores de DON (mELISA y electroquímico) se han validado con muestras de contenido certificado (TR-D100, lote D-W-158,  $1400 \pm 200$   $\mu\text{g kg}^{-1}$  DON). Los errores relativos de las concentraciones de DON fueron similares con ambos inmunosensores mELISA (0,6 - 14,5%) e inmunosensor electroquímico AD-a (0,7 - 11,4%). Las concentraciones de DON obtenidas en diferentes días fueron significativamente **iguales entre sí e iguales a la concentración certificada** en el CRM (ANOVA, 95% nivel de confianza), en los dos inmunosensores tanto espectrofotométrico como electroquímico. Ambos inmunosensores permiten la medida de concentraciones de DON muy por debajo de los límites máximos establecidos por la legislación Europea en alimentos.
- XII.** Sobre este mismo CRM (TR-D100, Lote D-W-158) se utilizó un **kit ELISA comercial** (Europroxima, 5121DON) para la determinación de DON, obteniéndose un error relativo de -8,1% (%DSR(n=2) = 3,2%) sobre el valor certificado. Los resultados de concentración del CRM que se obtuvieron con este ELISA comercial se han comparado también con los obtenidos por los dos inmunosensores que hemos desarrollado para el DON (mELISA e inmunosensor electroquímico), no encontrándose diferencias significativas en ambos casos (ANOVA, probabilidad 95%)
- XIII.** Se utilizaron dos **harinas comerciales** (Haricaman) con matriz de trigo y de maíz respectivamente, para la extracción y determinación del DON con los inmunosensores que se han desarrollado. Las concentraciones obtenidas con mELISA en ambas harinas fueron próximas a  $70$   $\mu\text{g kg}^{-1}$  de DON. Con el inmunosensor AD-a se determinó una concentración de DON de  $64,1$   $\mu\text{g kg}^{-1}$  (harina de trigo) y de  $64,4$   $\mu\text{g kg}^{-1}$  de DON (harina de maíz). Las concentraciones de DON obtenidas por ambos inmunosensores (**mELISA y electroquímico**) fueron estadísticamente comparables, no encontrándose diferencias significativas (nivel de confianza del 95%).
- XIV.** En la **validación** de resultados, se utilizó una **técnica de referencia AOAC basada en HPLC-UV** para la determinación de DON en cereales (extracción con agua/PEG, columna de inmunoafinidad para la limpieza del extracto, y cuantificación con **HPLC-UV**). El valor obtenido para el CRM TR-D100 con este

procedimiento ( $1,377 \pm 0,228 \text{ mg kg}^{-1}$  DON, (%DSR(n=2) = 1,84%) es el que se tomó como referencia de comparación con los inmunosensores desarrollados, obteniéndose resultados estadísticamente iguales en todos los casos. En las harinas comerciales, no pudo determinarse de forma cuantitativa la concentración de DON por el método AOAC, por ser las concentraciones de estas harinas inferiores al límite de detección de este método cromatográfico HPLC-UV (LOD= $100 \text{ ng g}^{-1}$  ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de DON).

- XV.** Se ha determinado la concentración no certificada de DON contenida de forma natural en el CRM de FB1 (TR-F100, lote F-C-433,  $1500 \pm 400 \mu\text{g kg}^{-1}$  de FB1 certificado, harina de maíz), así como la concentración natural de FB1 (valor no certificado) sobre el CRM de DON (TR-D100, lote D-W-158,  $1400 \pm 200 \mu\text{g kg}^{-1}$  de DON certificado, harina de trigo), utilizando una **extracción única de ambas micotoxinas con una mezcla optimizada de disolventes MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v)**.

Con esta extracción se han determinado las dos micotoxinas individualmente en los dos **CRMs** indicados, obteniéndose valores de concentración significativamente iguales tanto con **mELISA**, como por el **inmunosensor electroquímico AD-a (ANOVA, 95% nivel de confianza)**. **Las concentraciones encontradas y las precisión obtenidas (%DSR) fueron:**  $[\text{DON}]_{\text{TR-F100}} = 299,5 \pm 97,3 \mu\text{g l}^{-1}$  (%DSR(n=4)=20,4%) y de  $[\text{FB1}]_{\text{TR-D100}} = 35,0 \pm 6,8 \mu\text{g l}^{-1}$  (%DSR(n=4)=12,2%) por **mELISA** y de  $[\text{DON}]_{\text{TR-F100}} = 355,8 \pm 49,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  (%DSR(n=4)= 8,7%) y  $[\text{FB1}]_{\text{TR-D100}} = 44,8 \pm 13,9 \mu\text{g kg}^{-1}$  (%DSR(n=4)= 19,6%) por el **inmunosensor electroquímico (AD-a)**.

- XVI.** La concentración de DON contenido de forma natural en el material certificado de referencia TR-F100 (lote F-C-433) que se obtuvo por el **método AOAC** (HPLC-UV) fue estadísticamente comparable con las concentraciones obtenidas mediante los dos inmunosensores desarrollados en esta Tesis para el DON, para un nivel de confianza del 95%.

- XVII.** Llevando a cabo la **extracción conjunta** de **DON** y **FB1** a partir de una mezcla de harinas de trigo y de maíz, utilizando MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) como disolvente de extracción, las concentraciones de DON y FB1 determinadas en dos extractos diferentes de la mezcla no mostraron diferencias significativas (95% nivel de confianza) utilizando los dos procedimientos desarrollados mELISA e inmunosensor electroquímico. Estos resultados significan que la presencia de ambas matrices (trigo y maíz) en una misma muestra no interfiere en los inmunoensayos magnéticos que hemos desarrollado ni en el rendimiento de la extracción conjunta optimizada para ambas micotoxinas. Las concentraciones

obtenidas y las precisiones de estas determinaciones fueron  $[\text{DON}]_{\text{Extracto conjunto}} = 1165,97 \pm 278,06 \mu\text{g kg}^{-1}$  (error relativo = -1,54%, %DSR(n=4)=15%) y  $[\text{FB1}]_{\text{Extracto conjunto}} = 331,85 \pm 37,70 \mu\text{g kg}^{-1}$  (error relativo = +0,015%, %DSR(n=4)=15%)

**XVIII.** Los resultados y conclusiones de esta Tesis Doctoral se han plasmado en una patente denominada: “INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL (DON)” (solicitud P201331357), que se encuentra registrada (referencia ES1510.105b) en la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) con fecha 18 de Septiembre de 2013 (Anexo I).

La tramitación de esta patente no ha permitido la difusión previa de los resultados del trabajo, sin embargo, resultados parciales y algunas cuestiones del trabajo desarrollado en esta Tesis ya han sido presentadas en comunicaciones a Congresos nacionales e internacionales, tal y como se ha recopilado en una lista que se ha incluido como anexo adjunto a esta memoria (Anexo IV).





---

## **CAPÍTULO 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## **CAPÍTULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] M.O. Moss, Fungal Metabolites. Encyclopedia of Life Sciences (2011).
- [2] J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerro, S. Hernandez, J.R. Bertolin, C. Cubel, and J.R. Castillo, Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors & Bioelectronics* 49 (2013) 146-158.
- [3] M.O. Moss, Centenary review - Mycotoxins. *Mycological Research* 100 (1996) 513-523.
- [4] G.S. Shephard, E. Berthiller, P.A. Burdaspal, C. Crews, M.A. Jonker, R. Krska, S. MacDonald, R.J. Malone, C. Maragos, M. Sabino, M. Solfrizzo, H.P. Van Egmond, and T.B. Whitaker, Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011. *World Mycotoxin Journal* 5 (2012) 3-30.
- [5] J.L. Richard, Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119 (2007) 3-10.
- [6] J.C. Larsen, J. Hunt, I. Perrin, and P. Ruckebauer, Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicology Letters* 153 (2004) 1-22.
- [7] M. Piñeiro, M. Nagler, R. Coker, L. Nicolaidis, P. Wareing, and R. Myhara, Manual sobre la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y el control de las micotoxinas.
- [8] H.P. van Egmond, R.C. Schothorst, and M.A. Jonker, Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 147-157.
- [9] E. Anklam, J. Stroka, and A. Boenke, Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control* 13 (2002) 173-183.
- [10] Comisión Reguladora (EC) 1881/2006 del 19 de Diciembre de 2006. Establece los niveles máximos de ciertos contaminantes en productos alimenticios.
- [11] Reglamento 401/2006 del 23 de febrero de 2006. Establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en productos alimentarios.
- [12] R. Krska, and A. Molinelli, Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 145-148.
- [13] R. Koeppen, M. Koch, D. Siegel, S. Merkel, R. Maul, and I. Nehls, Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (2010) 1595-1612.
- [14] G.S. Shephard, Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (2009) 1215-1224.

- [15] D. Yang, Z.M. Geng, J.B. Yao, X. Zhang, P.P. Zhang, and H.X. Ma, Simultaneous determination of deoxynivalenol, and 15-and 3-acetyldeoxynivalenol in cereals by HPLC-UV detection. *World Mycotoxin Journal* 6 (2013) 117-125.
- [16] N.W. Turner, S. Subrahmanyam, and S.A. Piletsky, Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta* 632 (2009) 168-180.
- [17] N. Ndube, L. van der Westhuizen, and G.S. Shephard, Determination of fumonisins in maize by HPLC with ultraviolet detection of o-phthaldialdehyde derivatives. *Mycotoxin research* 25 (2009) 225-8.
- [18] M. Muscarella, M. Iammarino, D. Nardiello, C. Palermo, and D. Centonze, Determination of deoxynivalenol and nivalenol by liquid chromatography and fluorimetric detection with on-line chemical post-column derivatization. *Talanta* 97 (2012) 145-149.
- [19] M.Z. Zheng, J.L. Richard, and J. Binder, A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161 (2006) 261-273.
- [20] T. Yoshizawa, H. Kohno, K. Ikeda, T. Shinoda, H. Yokohama, K. Morita, O. Kusada, and Y. Kobayashi, A practical method for measuring deoxynivalenol, nivalenol and T-2+HT-2 toxin in foods by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68 (2004) 2076-2085.
- [21] C.M. Maragos, Emerging technologies for mycotoxin detection. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 23 (2004) 317-344.
- [22] F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, and G. Palleschi, A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta* 605 (2007) 111-129.
- [23] B. Prieto-Simon, and M. Campas, Immunochemical tools for mycotoxin detection in food. *Monatshefte Fur Chemie* 140 (2009) 915-920.
- [24] C. dos Santos Riccardi, P.I. da Costa, and H. Yamanaka, Amperometric immunosensor. *Quimica Nova* 25 (2002) 316-320.
- [25] L. Bone, J.C. Vidal, P. Duato, and J.R. Castillo, Ochratoxin A nanostructured electrochemical immunosensors based on polyclonal antibodies and gold nanoparticles coupled to the antigen. *Analytical Methods* 2 (2010) 335-341.
- [26] T.R.J. Holford, F. Davis, and S.P.J. Higson, Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors & Bioelectronics* 34 (2012) 12-24.
- [27] I.Y. Goryacheva, S. De Saeger, S.A. Eremin, and C. Van Peteghem, Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 24 (2007) 1169-1183.
- [28] I. Palchetti, and M. Mascini, Electrochemical nanomaterial-based nucleic acid aptasensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 3103-3114.

- [29] J.A. Cruz-Aguado, and G. Penner, Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 10456-10461.
- [30] M. McKeague, C.R. Bradley, A. De Girolamo, A. Visconti, J.D. Miller, and M.C. DeRosa, Screening and Initial Binding Assessment of Fumonisin B-1 Aptamers. *International Journal of Molecular Sciences* 11 (2010) 4864-4881.
- [31] <http://neovertures.ca/>.
- [32] L. Bonel, J.C. Vidal, P. Duato, and J.R. Castillo, An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer. *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2011) 3254-3259.
- [33] J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerro, and J.R. Castillo, Books of abstract, In: *Proceeding of the NanoSpain Conference 2012*, isbn bi-401-2012,, Santander, España.
- [34] [aptamer.icmb.utexas.edu/](http://aptamer.icmb.utexas.edu/).
- [35] F. Arduini, I. Errico, A. Amine, L. Micheli, G. Palleschi, and D. Moscone, Enzymatic spectrophotometric method for aflatoxin B detection based on acetylcholinesterase inhibition. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 3409-3415.
- [36] B. van der Gaag, S. Spath, H. Dietrich, E. Stigter, G. Boonzaaijer, T. van Osenbruggen, and K. Koopal, Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control* 14 (2003) 251-254.
- [37] M.C. Blanco-Lopez, M.J. Lobo-Castanon, A.J. Miranda-Ordieres, and P. Tunon-Blanco, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 36-48.
- [38] C. Baggiani, L. Anfossi, and C. Giovannoli, Molecular imprinted polymers as synthetic receptors for the analysis of myco- and phyco-toxins. *Analyst* 133 (2008) 719-730.
- [39] J.C. Vidal, P. Duato, L. Bonel, and J.R. Castillo, Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction coupled with fluorescence detection for the determination of ochratoxin a in wheat samples. *Analytical Letters* 45 (2012) 51-62.
- [40] J.C.C. Yu, and E.P.C. Lai, Determination of ochratoxin A in red wines by multiple pulsed elutions from molecularly imprinted polypyrrole. *Food Chemistry* 105 (2007) 301-310.
- [41] J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerro, P. Duato, and J.R. Castillo, An electrochemical immunosensor for ochratoxin A determination in wines based on a monoclonal antibody and paramagnetic microbeads. *Analytical and bioanalytical chemistry* 403 (2012) 1585-93.
- [42] R. Weiss, M. Freudenschuss, R. Krska, and B. Mizaikoff, Improving methods of analysis for mycotoxins: molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone. *Food Additives and Contaminants* 20 (2003) 386-395.

- [43] J. Jodlbauer, N.M. Maier, and W. Lindner, Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 945 (2002) 45-63.
- [44] C. Xiujuan, H. Yukun, D. Nuo, W. Shijia, M. Xiaoyuan, X. Yu, Z. Changqing, J. Yuan, and W. Zhouping, Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405 (2013) 6573-6581.
- [45] L. Barthelmebs, A. Hayat, A.W. Limiadi, J.-L. Marty, and T. Noguer, Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles. *Sensors and Actuators B-Chemical* 156 (2011) 932-937.
- [46] I.E. Tothill, Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Computers and Electronics in Agriculture* 30 (2001) 205-218.
- [47] K.A. Shaikh, K.S. Ryu, E.D. Goluch, J.M. Nam, J.W. Liu, S. Thaxton, T.N. Chiesl, A.E. Barron, Y. Lu, C.A. Mirkin, and C. Liu, A modular microfluidic architecture for integrated biochemical analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 9745-9750.
- [48] J.R. Collett, E.J. Cho, J.F. Lee, M. Levy, A.J. Hood, C. Wan, and A.D. Ellington, Functional RNA microarrays for high-throughput screening of antiprotein aptamers. *Analytical Biochemistry* 338 (2005) 113-123.
- [49] I.E. Tothill, Biosensors and nanomaterials and their application for mycotoxin determination. *World Mycotoxin Journal* 4 (2011) 361-374.
- [50] J.C. Vidal, P. Duato, L. Bonel, and J.R. Castillo, Use of polyclonal antibodies to ochratoxin A with a quartz-crystal microbalance for developing real-time mycotoxin piezoelectric immunosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (2009) 575-582.
- [51] S. Laschi, Centi, S., Mascini, M., *Electrochemical arrays coupled with magnetic separators for immunochemistry*, 2011, pp. 11-25.
- [52] S. Tombelli, M. Mascini, B. Scherm, G. Battacone, and Q. Migheli, DNA biosensors for the detection of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* and *A-parasiticus*. *Monatshefte Fur Chemie* 140 (2009) 901-907.
- [53] I. Palchetti, and M. Mascini, Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 455-471.
- [54] D. Grieshaber, V. de Lange, T. Hirt, Z. Lu, and J. Voeroes, Vesicles for Signal Amplification in a Biosensor for the Detection of Low Antigen Concentrations. *Sensors* 8 (2008) 7894-7903.
- [55] F. Bensassi, C. Zaied, S. Abid, M.R. Hajlaoui, and H. Bacha, Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control* 21 (2010) 281-285.

- [56] P. Koch, State of the art of trichothecenes analysis. *Toxicology Letters* 153 (2004) 109-112.
- [57] R. Krska, E. Welzig, and H. Boudra, Analysis of Fusarium toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137 (2007) 241-264.
- [58] W. Langseth, and T. Rundberget, Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A* 815 (1998) 103-121.
- [59] C.M. Maragos, and S.P. McCormick, Monoclonal antibodies for the mycotoxins deoxynivalenol and 3-acetyl-deoxynivalenol. *Food and Agricultural Immunology* 12 (2000) 181-192.
- [60] C.M. Hazel, and S. Patel, Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* 153 (2004) 51-59.
- [61] A. Visconti, and M. Pascale, An Overview on Fusarium Mycotoxins in the Durum Wheat Pasta Production Chain. *Cereal Chemistry* 87 (2010) 21-27.
- [62] R. Ran, C. Wang, Z. Han, A. Wu, D. Zhang, and J. Shi, Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. *Food Control* 34 (2013) 138-148.
- [63] B.K. Tacke, and H.H. Casper, Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Aoac International* 79 (1996) 472-475.
- [64] M.W. Trucksess, S.W. Page, G.E. Wood, and T.H. Cho, Determination of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran by solid-phase extraction liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal of Aoac International* 81 (1998) 880-886.
- [65] M. Klotzel, S. Schmidt, U. Lauber, G. Thielert, and H.U. Humpf, Comparison of different clean-up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal-based food and validation of a reliable HPLC method. *Chromatographia* 62 (2005) 41-48.
- [66] J.P. Meneely, F. Ricci, H.P. van Egmond, and C.T. Elliott, Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011) 192-203.
- [67] L. Schneider, H. Pichler, and R. Krska, An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367 (2000) 98-100.
- [68] S. Folloni, G. Bellocchi, D.-M. Kagkli, S. Pastor-Benito, M. Aguilera, A. Mazzeo, M. Querci, G. Van den Eede, and M. Ermolli, Development of an ELISA Reverse-Based Assay to Assess the Presence of Mycotoxins in Cereal Flour. *Food Analytical Methods* 4 (2011) 221-227.

- [69] R. Bolduan, W. Becker, and W. Kessler, Determination of infection of single wheat kernels with fusaria and their content of deoxynivalenol by means of reflection spectroscopy in the UV-, visible and near IR-range: examinations w.r.t. single kernel fluorescence. *Getreidetechnologie* 62 (2008) 93-100.
- [70] A.J. Tudos, E.R. Lucas-van den Bos, and E.C.A. Stigter, Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 5843-5848.
- [71] S.J. MacDonald, D. Chan, P. Brereton, A. Damant, and R. Wood, Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal of Aoac International* 88 (2005) 1197-1204.
- [72] L.M. Cahill, S.C. Kruger, B.T. McAlice, C.S. Ramsey, R. Prioli, and B. Kohn, Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 859 (1999) 23-28.
- [73] A. Lermo, S. Fabiano, S. Hernandez, R. Galve, M.P. Marco, S. Alegret, and M.I. Pividori, Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors. *Biosensors & Bioelectronics* 24 (2009) 2057-2063.
- [74] E. Usleber, E. Martlbauer, R. Dietrich, and G. Terplan, DIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS FOR THE DETECTION OF THE 8-KETOTRICHOTHECENE MYCOTOXINS DEOXYNIVALENOL, 3-ACETYLDEOXYNIVALENOL, AND 15-ACETYLDEOXYNIVALENOL IN BUFFER SOLUTIONS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (1991) 2091-2095.
- [75] N.S. Hill, P. Schwarz, L.S. Dahleen, S.M. Neate, R. Horsley, A.E. Glenn, and K. O'Donnell, ELISA analysis for *Fusarium* in barley: Development of methodology and field assessment. *Crop Science* 46 (2006) 2636-2642.
- [76] Z.L. Wei, X.L. Sun, Z.J. Li, Y.J. Fang, G.X. Ren, Y.R. Huang, and J.K. Liu, Highly sensitive deoxynivalenol immunosensor based on a glassy carbon electrode modified with a fullerene/ferrocene/ionic liquid composite. *Microchimica Acta* 172 (2011) 365-371.
- [77] D. Romanazzo, F. Ricci, G. Volpe, C.T. Elliott, S. Vesco, K. Kroeger, D. Moscone, J. Stroka, H. Van Egmond, M. Vehniainen, and G. Palleschi, Development of a recombinant Fab-fragment based electrochemical immunosensor for deoxynivalenol detection in food samples. *Biosensors & Bioelectronics* 25 (2010) 2615-2621.
- [78] X.Y. Luo, *Fusarium* toxins contamination of cereals in China. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology* (1988) 97-98.
- [79] R.V. Bhat, S.R. Beedu, Y. Ramakrishna, and K.L. Munshi, Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir Valley, India. *Lancet I* (1989) 35-37.
- [80] B.A. Rotter, D.B. Prelusky, and J.J. Pestka, Toxicology of deoxynivalenol (vomitin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48 (1996) 1-34.

- [81] J.J. Pestka, Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology* 84 (2010) 663-679.
- [82] D. Parent-Massin, Haematotoxicity of trichothecenes. *Toxicology Letters* 153 (2004) 75-81.
- [83] G.J.A. Speijers, and M.H.M. Speijers, Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters* 153 (2004) 91-98.
- [84] R.C. Schothorst, and H.P. van Egmond, Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states" - Subtask: trichothecenes. *Toxicology Letters* 153 (2004) 133-143.
- [85] Reglamento 1126/2007, de 28 de Septiembre de 2007. Fija el contenido máximo de determinados contaminantes alimenticios por lo que se refiere a toxinas de Fusarium en maíz y en productos de maíz.
- [86] Recomendación 2006/583/CE del 17 de Agosto 2006. Prevención y reducción de la toxina Fusarium en los cereales y en los productos a base de cereal.
- [87] H. Schnerr, R.F. Vogel, and L. Niessen, A biosensor-based immunoassay for rapid screening of deoxynivalenol contamination in wheat. *Food and Agricultural Immunology* 14 (2002) 313-321.
- [88] Directiva 2005/38/CE del 6 de Junio de 2005. Métodos de muestreo y métodos de análisis para el control oficial de los niveles de toxinas Fusarium en productos alimentarios.
- [89] Recomendación 2006/576/CE, de 17 de Agosto de 2006. Presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina, T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal.
- [90] M.K.A. Kadir, and I.E. Tothill, Development of an electrochemical immunosensor for fumonisins detection in foods. *Toxins* 2 (2010) 382-98.
- [91] C.M. Maragos, and M. Busman, Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 27 (2010) 688-700.
- [92] Recomendación de la Comisión de 27 de marzo de 2013 sobre la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en los cereales y los productos a base de cereales.
- [93] C.A.K. Borrebaeck, Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunology Today* 21 (2000) 379-382.
- [94] S.A. Soper, K. Brown, A. Ellington, B. Frazier, G. Garcia-Manero, V. Gau, S.I. Gutman, D.F. Hayes, B. Korte, J.L. Landers, D. Larson, F. Ligler, A. Majumdar, M. Mascini, D. Nolte, Z. Rosenzweig, J. Wang, and D. Wilson, Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosensors & Bioelectronics* 21 (2006) 1932-1942.

- [95] C. Maragos, M. Busman, and Y. Sugita-Konishi, Production and characterization of a monoclonal antibody that cross-reacts with the mycotoxins nivalenol and 4-deoxynivalenol. *Food Additives and Contaminants* 23 (2006) 816-825.
- [96] E.K. Tangni, J.-C. Motte, A. Callebaut, and L. Pussemier, Cross-Reactivity of Antibodies in Some Commercial Deoxynivalenol Test Kits against Some Fusariotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 12625-12633.
- [97] <http://scyknness.wordpress.com/category/biologia-celular-molecular/>.
- [98] L. Santos, S. Marin, V. Sanchis, and A.J. Ramos, Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (2009) 1802-1807.
- [99] T. Kadota, Y. Takezawa, S. Hirano, O. Tajima, C.M. Maragos, T. Nakajima, T. Tanaka, Y. Kamata, and Y. Sugita-Konishi, Rapid detection of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using surface plasmon resonance immunoassay. *Analytica Chimica Acta* 673 (2010) 173-178.
- [100] F. Ricci, G. Adornetto, and G. Palleschi, A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta* 84 (2012) 74-83.
- [101] S.-H. Wang, X.-Y. Du, Y.-M. Huang, D.-S. Lin, P.L. Hart, and Z.-H. Wang, Detection of deoxynivalenol based on a single-chain fragment variable of the antideoxynivalenol antibody. *Fems Microbiology Letters* 272 (2007) 214-219.
- [102] A. Lupo, C. Roebuck, K. Settimo, A. Quain, J. Kennedy, and M. Abouzied, Validation Study of a Rapid ELISA for Detection of Deoxynivalenol in Wheat, Barley, Malted Barley, Corn, Oats, and Rice. *Journal of Aoac International* 93 (2010) 600-610.
- [103] A. Zhang, Y. Ma, L. Feng, Y. Wang, C. He, X. Wang, and H. Zhang, Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control* 22 (2011) 1723-1728.
- [104] K. Schmitt, E. Martlbauer, E. Usleber, R. Gessler, J. Lepschy, and D. Abramson, Detection of acetylated deoxynivalenol by enzyme-linked immunosorbent assay. in: R.C. Beier, and L.H. Stanker, (Eds.), *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety*, 1996, pp. 314-321.
- [105] E. Schneider, V. Curtui, C. Seidler, R. Dietrich, E. Usleber, and E. Martlbauer, Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicology Letters* 153 (2004) 113-121.
- [106] M. Pascale, V. Lippolis, C.M. Maragos, and A. Visconti, Recent Developments in Trichothecene Analysis. *Food Contaminants: Mycotoxins and Food Allergens* 1001 (2008) 192-210.
- [107] K. Bonroy, F. Frederix, G. Reekmans, E. Dewolf, R. De Palma, G. Borghs, P. Declerck, and B. Goddeeris, Comparison of random and oriented immobilisation of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers. *Journal of Immunological Methods* 312 (2006) 167-181.

[108] <http://caracasthyroidinstitute.wikispaces.com/>.

[109] E. Usleber, V. Renz, E. Martlbauer, and G. Terplan, STUDIES ON THE APPLICATION OF ENZYME IMMUNOASSAYS FOR THE FUSARIUM MYCOTOXINS DEOXYNIVALENOL, 3-ACETYLDEOXYNIVALENOL, AND ZEARELENONE. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 39 (1992) 617-627.

[110] E. Usleber, E. Schneider, E. Martlbauer, and G. Terplan, 2 Formats of enzyme-immunoassay for 15-acetyldeoxynivalenol applied to wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (1993) 2019-2023.

[111] R.C. Sinha, M.E. Savard, and R. Lau, Production of monoclonal-antibodies for the specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (1995) 1740-1744.

[112] P.J. Doyle, M. Arbabi-Ghahroudi, N. Gaudette, G. Furzer, M.E. Savard, S. Gleddie, M.D. McLean, C.R. Mackenzie, and J.C. Hall, Cloning, expression, and characterization of a single-domain antibody fragment with affinity for 15-acetyl-deoxynivalenol. *Molecular Immunology* 45 (2008) 3703-3713.

[113] Y. Li, W. Shi, J. Shen, S. Zhang, L. Cheng, and Z. Wang, Development of a rapid competitive indirect ELISA procedure for the determination of deoxynivalenol in cereals. *Food and Agricultural Immunology* 23 (2012) 41-49.

[114] Z. Radova, J. Hajslova, J. Kralova, L. Papouskova, and S. Sykorova, Analysis of zearalenone in wheat using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and/or enzyme-linked immunosorbent assay. *Cereal Research Communications* 29 (2001) 435-442.

[115] T. Casulschi, A. Toma, I. Vatuiu, V. Codreanu, A. Laudoni, E. Baron, and E. Balauta, Qualitative detection of food pathogens, mycotoxins and allergens using alternative methods. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 14 (2008) 203-207.

[116] W.L. Casale, J.J. Pestka, and L.P. Hart, Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay employing monoclonal-antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36 (1988) 663-668.

[117] E. N. Clare Millsa, Sandra M. Alcockab, H.A. Leea, and M.R.A. Morgana, An enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat, utilizing novel hapten derivatization procedures, *Food and Agricultural Immunology* 1990, pp. 109-118.

[118] M. Fox, G. Gray, K. Kavanagh, C. Lewis, and S. Doyle, Detection of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins: immunogen synthesis and immunoassay development. *Journal of Microbiological Methods* 56 (2004) 221-230.

[119] M. Zachariasova, J. Hajslova, M. Kostelanska, J. Poustka, A. Krplova, P. Cuhra, and I. Hochel, Deoxynivalenol and its conjugates in beer: A critical assessment of data

obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 625 (2008) 77-86.

[120] E. Delibato, G. Volpe, D. Romanazzo, D. De Medici, L. Toti, D. Moscone, and G. Palleschi, Development and Application of an Electrochemical Plate Coupled with Immunomagnetic Beads (ELIME) Array for *Salmonella enterica* Detection in Meat Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 7200-7204.

[121] <http://www.dropsens.com/>.

[122] D. Romanazzo, F. Ricci, S. Vesco, S. Piermarini, G. Volpe, D. Moscone, and G. Palleschi, ELIME (enzyme linked immuno magnetic electrochemical) method for mycotoxin detection. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2009).

[123] J.P. Meneely, F. Ricci, S. Vesco, M. Abouzied, M. Sulyok, R. Krska, and C.T. Elliott, A comparative study of qualitative immunochemical screening assays for the combined measurement of T-2/HT-2 in cereals and cereal-based products. *World Mycotoxin Journal* 4 (2011) 385-394.

[124] F. Ricci, P. Flavio, M. Abagnale, M.C. Messia, E. Marconi, G. Volpe, D. Moscone, and G. Palleschi, Direct electrochemical detection of trichothecenes in wheat samples using a 96-well electrochemical plate coupled with microwave hydrolysis. *World Mycotoxin Journal* 2 (2009) 239-245.

[125] N. Starodub, Biosensors in the system of express control of chemicals, regularly used as terrorist means, to prevent non-desirable consequences. in: A.M. Bahadir, and G. Duca, (Eds.), *Role of Ecological Chemistry in Pollution Research and Sustainable Development*, 2009, pp. 275-284.

[126] K. Majer-Baranyi, A. Szekacs, I. Szendro, A. Kiss, and N. Adanyi, Optical waveguide lightmode spectroscopy technique-based immunosensor development for deoxynivalenol determination in wheat samples. *European Food Research and Technology* 233 (2011) 1041-1047.

[127] C.M. Maragos, Signal amplification using colloidal gold in a bilayer interferometry-based immunosensor for the mycotoxin deoxynivalenol. *Food Additives and Contaminants: Part A -- Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 29 (2012) 1108-1117.

[128] V. Hodnik, and G. Anderluh, Toxin Detection by Surface Plasmon Resonance. *Sensors* 9 (2009) 1339-1354.

[129] J. Meneely, T. Fodey, L. Armstrong, M. Sulyok, R. Krska, and C. Elliott, Rapid Surface Plasmon Resonance Immunoassay for the Determination of Deoxynivalenol in Wheat, Wheat Products, and Maize-Based Baby Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 8936-8941.

[130] W. Mullett, E.P.C. Lai, and J.M. Yeung, Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor. *Analytical Biochemistry* 258 (1998) 161-167.

- [131] S.J. Daly, G.J. Keating, P.P. Dillon, B.M. Manning, R. O'Kennedy, H.A. Lee, and M.R.A. Morgan, Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 5097-5104.
- [132] G. Cepriá, Nuevo detector para cromatografía líquida de alta resolución basado en el efecto de resonancia de plasmón superficial, Universidad de Zaragoza, Zaragoza (España), 1993.
- [133] G. Cepria, and J.R. Castillo, Surface plasmon resonance-based detection - An alternative to refractive index detection in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 759 (1997) 27-35.
- [134] J.R. Castillo, G. Cepria, S. Demarcos, J. Galban, J. Mateo, and E.G. Ruiz, Surface-Plasmon Resonance sensor as a detector in hplc and specific lactate determination. *Sensors and Actuators a-Physical* 37-8 (1993) 582-586.
- [135] A.V. Nabok, A. Tsargorodskaya, A.K. Hassan, and N.F. Starodub, Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins. *Applied Surface Science* 246 (2005) 381-386.
- [136] Y. Li, X. Liu, and Z. Lin, Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs. *Food Chemistry* 132 (2012) 1549-1554.
- [137] D. Dorokhin, W. Haasnoot, M.C.R. Franssen, H. Zuilhof, and M.W.F. Nielen, Imaging surface plasmon resonance for multiplex microassay sensing of mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 3005-3011.
- [138] S.-W. Choi, H.-J. Chang, N. Lee, and H.S. Chun, A Surface Plasmon Resonance Sensor for the Detection of Deoxynivalenol Using a Molecularly Imprinted Polymer. *Sensors* 11 (2011) 8654-8664.
- [139] N. Paniel, A. Radoi, and J.-L. Marty, Development of an Electrochemical Biosensor for the Detection of Aflatoxin M(1) in Milk. *Sensors* 10 (2010) 9439-9448.
- [140] Y. Liu, Z. Qin, X. Wu, and H. Jiang, Immune-biosensor for aflatoxin B-1 based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode. *Biochemical Engineering Journal* 32 (2006) 211-217.
- [141] L.-G. Zamfir, I. Geana, S. Bourigua, L. Rotariu, C. Bala, A. Errachid, and N. Jaffrezic-Renault, Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection. *Sensors and Actuators B-Chemical* 159 (2011) 178-184.
- [142] S. Rameil, P. Schubert, P. Grundmann, R. Dietrich, and E. Maertlbauer, Use of 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid as electron donating compound in a potentiometric aflatoxin M-1-immunosensor. *Analytica Chimica Acta* 661 (2010) 122-127.
- [143] I. Kwon, H.-H. Lee, J. Choi, J.-K. Shin, S.-H. Seo, S.-W. Choi, and H.S. Chun, Extended-Gate Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor-Based Biosensor for Detection of Deoxynivalenol. *Japanese Journal of Applied Physics* 50 (2011).

- [144] J. Zhang, L. Gao, B. Zhou, L. Zhu, Y. Zhang, and B.A. Huang, Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91 (2011) 193-197.
- [145] B. Prieto-Simon, T. Noguera, and M. Campas, Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade. *Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 689-702.
- [146] C. Klinglmayr, K. Noebauer, E. Razzazi-Fazeli, and M. Cichna-Markl, Determination of deoxynivalenol in organic and conventional food and feed by sol-gel immunoaffinity chromatography and HPLC-UV detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878 (2010) 187-193.
- [147] S.C. Cunha, and J.O. Fernandes, Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for determination of deoxynivalenol and its metabolites in human urine. *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012) 1019-1026.
- [148] J.J. Park, and F.S. Chu, Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *Journal of Aoac International* 79 (1996) 465-471.
- [149] A.P. Snyder, Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. *Journal of Food Protection* 49 (1986) 544-569.
- [150] Shotwell, *Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins*, Academic Press, 1986, pp. 51-94.
- [151] C. Bohm, M. Cichna-Markl, Z. Brenn-Struckhoffova, and E. Razzazi-Fazeli, Development of a selective sample clean-up method based on immuno-ultrafiltration for the determination of deoxynivalenol in maize. *Journal of chromatography. A* 1202 (2008) 111-7.
- [152] F. Soleimany, S. Jinap, A. Rahmani, and A. Khatib, Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 28 (2011) 494-501.
- [153] M. Ibanez-Vea, E. Lizarraga, and E. Gonzalez-Penas, Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC-MS. *Food Control* 22 (2011) 1428-1434.
- [154] H.H. Jelen, and E. Wasowicz, Determination of trichothecenes in wheat grain without sample cleanup using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1215 (2008) 203-207.
- [155] S. De Baere, J. Goossens, A. Osselaere, M. Devreese, V. Vandenbroucke, P. De Backer, and S. Croubels, Quantitative determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in animal body fluids using LC-MS/MS detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879 (2011) 2403-2415.

- [156] F. Soleimany, S. Jinap, and F. Abas, Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 130 (2012) 1055-1060.
- [157] L. Chee Wei, T. Siew Hoon, L. Lin Min, and C. Sheot Harn, Analytical method for the accurate determination of tricothecenes in grains using LC-MS/MS: a comparison between MRM transition and MS 3 quantitation. *Analytical and bioanalytical chemistry* 403 (2012) 2801-2806.
- [158] Z. Zou, Z. He, H. Li, P. Han, J. Tang, C. Xi, Y. Li, L. Zhang, and X. Li, Development and application of a method for the analysis of two tricothecenes: Deoxynivalenol and T-2 toxin in meat in China by HPLC-MS/MS. *Meat Science* 90 (2012) 613-617.
- [159] Z. Han, X. Liu, Y. Ren, L. Luan, and Y. Wu, A rapid method with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of five type B tricothecenes in traditional Chinese medicines. *Journal of Separation Science* 33 (2010) 1923-1932.
- [160] F.M. Valle-Algarra, E.M. Mateo, R. Mateo, J.V. Gimeno-Adelantado, and M. Jimenez, Determination of type A and type B tricothecenes in paprika and chili pepper using LC-triple quadrupole-MS and GC-ECD. *Talanta* 84 (2011) 1112-1117.
- [161] V.M.T. Lattanzio, S. Della Gatta, M. Godula, and A. Visconti, Quantitative analysis of mycotoxins in cereal foods by collision cell fragmentation-high-resolution mass spectrometry: performance and comparison with triple-stage quadrupole detection. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 28 (2011) 1424-1437.
- [162] C. Juan, A. Ritieni, and J. Manes, Determination of tricothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 134 (2012) 2389-2397.
- [163] A. Sano, S. Matsutani, M. Suzuki, and S. Takitani, High-Performance Liquid-Chromatographic method for determining tricothecene mycotoxins by post-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography* 410 (1987) 427-436.
- [164] B. Romagnoli, M. Ferrari, and C. Bergamini, Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 45 (2010) 1075-1080.
- [165] R. Krska, S. Baumgartner, and R. Josephs, The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B tricothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371 (2001) 285-299.
- [166] A. Santini, R. Ferracane, M.C. Somma, A. Aragon, and A. Ritieni, Multitoxin extraction and detection of tricothecenes in cereals: an improved LC-MS/MS approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (2009) 1145-1153.
- [167] A. Logrieco, D.W.M. Arrigan, K. Brengel-Pesce, P. Siciliano, and I. Tothill, DNA arrays, electronic noses and tongues, biosensors and receptors for rapid detection of

toxigenic fungi and mycotoxins: A review. *Food Additives and Contaminants* 22 (2005) 335-344.

[168] H. Lu, M.P. Kreuzer, K. Takkinen, and G.G. Guilbault, A recombinant Fab fragment-based electrochemical immunosensor for the determination of testosterone in bovine urine. *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007) 1756-1763.

[169] M. Campas, D. Garibo, and B. Prieto-Simon, Novel nanobiotechnological concepts in electrochemical biosensors for the analysis of toxins. *Analyst* 137 (2012) 1055-1067.

[170] M.S. Thakur, and K.V. Ragavan, Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 50 (2013) 625-641.

[171] C.M. Maragos, Recent advances in the development of novel materials for mycotoxin analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (2009) 1205-1213.

[172] P. Li, Q. Zhang, and W. Zhang, Immunoassays for aflatoxins. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 1115-1126.

[173] F.S. Chu, Recent studies on immunoassays for mycotoxins. in: R.C. Beier, and L.H. Stanker, (Eds.), *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety*, 1996, pp. 294-313.

[174] C.M. Maragos, L. Li, and D. Chen, Production and characterization of a single chain variable fragment (scFv) against the mycotoxin deoxynivalenol. *Food and Agricultural Immunology* 23 (2012) 51-67.

[175] G.S. Zhang, S.W. Li, and F.S. Chu, Production and characterization of antibody against deoxynivalenol triacetate. *Journal of Food Protection* 49 (1986) 336-339.

[176] Academia Biomédica digital VITAE, [caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeSiete/Articulos/Inmunologia/ArchivosHTML/PriGenera.htm](http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeSiete/Articulos/Inmunologia/ArchivosHTML/PriGenera.htm).

[177] J.C. Vidal, L. Bonel, P. Duato, and J.R. Castillo, Improved electrochemical competitive immunosensor for ochratoxin A with a biotinylated monoclonal antibody capture probe and colloidal gold nanostructuring. *Analytical Methods* 3 (2011) 977-984.

[178] M.J. Nicol, D.R. Lauren, C.O. Miles, and W.T. Jones, Production of a monoclonal antibody with specificity for deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol. *Food and Agricultural Immunology* 5 (1994) 199-209.

[179] Y.C. Xu, G.S. Zhang, and F.S. Chu, Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay for deoxynivalenol in corn and wheat. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 71 (1988) 945-949.

[180] W.J. Yu, F.Y. Yu, D.J. Undersander, and F.S. Chu, Immunoassays of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed. *Food and Agricultural Immunology* 11 (1999) 307-319.

- [181] S. Baumgartner, M. Fuehrer, and R. Krska, Comparison of monoclonal antibody performance characteristics for the detection of two representatives of A- and B-trichothecenes: T-2 toxin and deoxynivalenol. *World Mycotoxin Journal* 3 (2010) 233-238.
- [182] E.N.C. Mills, S.M. Alcock, H.A. Lee, and M.L.A. Morgan, An enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat utilizing novel hapten derivatization procedures, *Food Agricultural Immunology*, 1990, pp. 109-118.
- [183] M. Farre, L. Kantiani, S. Perez, and D. Barcelo, Sensors and biosensors in support of EU Directives. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 170-185.
- [184] <http://www.invitrogen.com.ar/>.
- [185] <http://www.piercenet.com/>.
- [186] <http://www.millipore.com/>.
- [187] <http://www.promega.es/>.
- [188] S. Laschi, S. Centi, and M. Mascini, Electrochemical arrays coupled with magnetic separators for immunochemistry, 2011, pp. 11-25.
- [189] E. Zacco, M.I. Pividori, and S. Alegret, Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Analytical Chemistry* 78 (2006) 1780-1788.
- [190] M. Hervas, M. Angel Lopez, and A. Escarpa, Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food: An anticipated analytical tool for food safety. *Analytica Chimica Acta* 653 (2009) 167-172.
- [191] R. Danczyk, B. Krieder, A. North, T. Webster, H. HogenEsch, and A. Rundell, Comparison of antibody functionality using different immobilization methods. *Biotechnology and Bioengineering* 84 (2003) 215-223.
- [192] M. Fuentes, C. Mateo, J.M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente, Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2005) 1380-1387.
- [193] A. Ambrosi, M.T. Castaneda, A.J. Killard, M.R. Smyth, S. Alegret, and A. Merkoci, Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 5232-5240.
- [194] E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.P. Marco, S. Alegret, and M.I. Pividori, Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007) 2184-2191.
- [195] D. Babu, and P.M. Muriana, Immunomagnetic bead-based recovery and real time quantitative PCR (RT iq-PCR) for sensitive quantification of aflatoxin B-1. *Journal of Microbiological Methods* 86 (2011) 188-194.

- [196] G. Adornetto, G. Volpe, A. De Stefano, S. Martini, G. Gallucci, A. Manzoni, S. Bernardini, M. Mascini, and D. Moscone, An ELIME assay for the rapid diagnosis of coeliac disease. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 1191-1194.
- [197] S. Piermarini, L. Micheli, N.H.S. Ammida, G. Palleschi, and D. Moscone, Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B-1 detection. *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007) 1434-1440.
- [198] M. Moreno-Guzman, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, and J.M. Pingarron, A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles. *Analytica Chimica Acta* 692 (2011) 125-130.
- [199] M. Eguilaz, M. Moreno-Guzman, S. Campuzano, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, and J.M. Pingarron, An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes. *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2010) 517-522.
- [200] M. Moreno-Guzman, M. Eguilaz, S. Campuzano, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, and J.M. Pingarron, Disposable immunosensor for cortisol using functionalized magnetic particles. *Analyst* 135 (2010) 1926-1933.
- [201] Y.-Y. Lin, G. Liu, C.M. Wai, and Y. Lin, Magnetic beads-based bioelectrochemical immunoassay of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Electrochemistry Communications* 9 (2007) 1547-1552.
- [202] S. Centi, A.I. Stoica, S. Laschi, and M. Mascini, Development of an Electrochemical Immunoassay Based on the Use of an Eight-Electrodes Screen-Printed Array Coupled with Magnetic Beads for the Detection of Antimicrobial Sulfonamides in Honey. *Electroanalysis* 22 (2010) 1881-1888.
- [203] H. Wang, J. Wang, C. Timchalk, and Y. Lin, Magnetic Electrochemical Immunoassays with Quantum Dot Labels for Detection of Phosphorylated Acetylcholinesterase in Plasma. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 8477-8484.
- [204] Q. Gai, F. Qu, T. Zhang, and Y. Zhang, Integration of carboxyl modified magnetic particles and aqueous two-phase extraction for selective separation of proteins. *Talanta* 85 (2011) 304-309.
- [205] G. Chen, Y. Ma, P. Su, and B. Fang, Direct binding glucoamylase onto carboxyl-functioned magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal* 67 (2012) 120-125.
- [206] P. Sarkar, D. Ghosh, D. Bhattacharyay, S.J. Setford, and A.P.F. Turner, Electrochemical immunoassay for free prostate specific antigen (f-PSA) using magnetic beads. *Electroanalysis* 20 (2008) 1414-1420.
- [207] A. Zani, S. Laschi, M. Mascini, and G. Marrazza, A New Electrochemical Multiplexed Assay for PSA Cancer Marker Detection. *Electroanalysis* 23 (2011) 91-99.

- [208] A. Hayat, L. Barthelmebs, and J.-L. Marty, Enzyme-linked immunosensor based on super paramagnetic nanobeads for easy and rapid detection of okadaic acid. *Analytica Chimica Acta* 690 (2011) 248-252.
- [209] S. Qu, J. Liu, J. Luo, Y. Huang, W. Shi, B. Wang, and X. Cai, A rapid and highly sensitive portable chemiluminescent immunosensor of carcinoembryonic antigen based on immunomagnetic separation in human serum. *Analytica Chimica Acta* 766 (2013) 94-99.
- [210] S.V. Kergaravat, L. Beltramino, N. Garnero, L. Trotta, M. Wagener, S.N. Fabiano, M. Isabel Pividori, and S.R. Hernandez, Magneto immunofluorescence assay for diagnosis of celiac disease. *Analytica Chimica Acta* 798 (2013) 89-96.
- [211] K.-Y. Lien, L.-Y. Hung, T.-B. Huang, Y.-C. Tsai, H.-Y. Lei, and G.-B. Lee, Rapid detection of influenza A virus infection utilizing an immunomagnetic bead-based microfluidic system. *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2011) 3900-3907.
- [212] T. Aytur, J. Foley, M. Anwar, B. Boser, E. Harris, and P.R. Beatty, A novel magnetic bead bioassay platform using a microchip-based sensor for infectious disease diagnosis. *Journal of Immunological Methods* 314 (2006) 21-29.
- [213] C.-P. Jia, X.-Q. Zhong, B. Hua, M.-Y. Liu, F.-X. Jing, X.-H. Lou, S.-H. Yao, J.-Q. Xiang, Q.-H. Jin, and J.-L. Zhao, Nano-ELISA for highly sensitive protein detection. *Biosensors & Bioelectronics* 24 (2009) 2836-2841.
- [214] C.-Y. Hong, and Y.-C. Chen, Selective enrichment of ochratoxin A using human serum albumin bound magnetic beads as the concentrating probes for capillary electrophoresis/electrospray ionization-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* 1159 (2007) 250-255.
- [215] M.A. Fernandez-Baldo, F.A. Bertolino, G. Fernandez, G.A. Messina, M.I. Sanz, and J. Raba, Determination of Ochratoxin A in apples contaminated with *Aspergillus ochraceus* by using a microfluidic competitive immunosensor with magnetic nanoparticles. *Analyst* 136 (2011) 2756-2762.
- [216] P. Aqai, J. Peters, A. Gerssen, W. Haasnoot, and M.W.F. Nielen, Immunomagnetic microbeads for screening with flow cytometry and identification with nano-liquid chromatography mass spectrometry of ochratoxins in wheat and cereal. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 3085-3096.
- [217] J. Wu, Z. Zhang, Z. Fu, and H. Ju, A disposable two-throughput electrochemical immunosensor chip for simultaneous multianalyte determination of tumor markers. *Biosensors & Bioelectronics* 23 (2007) 114-120.
- [218] M. Hervas, M. Angel Lopez, and A. Escarpa, Electrochemical microfluidic chips coupled to magnetic bead-based ELISA to control allowable levels of zearalenone in baby foods using simplified calibration. *Analyst* 134 (2009) 2405-2411.
- [219] M. Hervas, M. Angel Lopez, and A. Escarpa, Simplified calibration and analysis on screen-printed disposable platforms for electrochemical magnetic bead-based

immunosensing of zearalenone in baby food samples. *Biosensors & Bioelectronics* 25 (2010) 1755-1760.

[220] M. Hervas, M.A. Lopez, and A. Escarpa, Integrated electrokinetic magnetic bead-based electrochemical immunoassay on microfluidic chips for reliable control of permitted levels of zearalenone in infant foods. *Analyst* 136 (2011) 2131-2138.

[221] N.V. Panini, E. Salinas, G.A. Messina, and J. Raba, Modified paramagnetic beads in a microfluidic system for the determination of zearalenone in feedstuffs samples. *Food Chemistry* 125 (2011) 791-796.

[222] Z. Zhang, M. Lin, S. Zhang, and B. Vardhanabhuti, Detection of Aflatoxin M1 in Milk by Dynamic Light Scattering Coupled with Superparamagnetic Beads and Gold Nanoprobes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 4520-4525.

[223] H.-M. Lee, S.-O. Song, S.-H. Cha, S.-B. Wee, K. Bischoff, S.-W. Park, S.-W. Son, H.-G. Kang, and M.-H. Cho, Development of a monoclonal antibody against deoxynivalenol for magnetic nanoparticle-based extraction and an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Science* 14 (2013) 143-150.

[224] O. Dominguez Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, and M.J. Arcos Martinez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* 73 (2007) 202-219.

[225] A.-P. Deng, and H. Yang, A multichannel electrochemical detector coupled with an ELISA microtiter plate for the immunoassay of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Sensors and Actuators B-Chemical* 124 (2007) 202-208.

[226] S. Liu, Q. Lin, X. Zhang, X. He, X. Xing, W. Lian, and J. Huang, Electrochemical immunosensor for salbutamol detection based on CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAMAM-GNPs nanocomposites and HRP-MWCNTs-Ab bioconjugates for signal amplification. *Sensors and Actuators B-Chemical* 156 (2011) 71-78.

[227] K.J. Cash, F. Ricci, and K.W. Plaxco, An Electrochemical Sensor for the Detection of Protein-Small Molecule Interactions Directly in Serum and Other Complex Matrices. *Journal of the American Chemical Society* 131 (2009) 6955-+.

[228] M.P. Chatrathi, J. Wang, and G.E. Collins, Sandwich electrochemical immunoassay for the detection of Staphylococcal enterotoxin B based on immobilized thiolated antibodies. *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007) 2932-2938.

[229] H.M. Nassef, M.C.B. Redondo, P.J. Ciclitira, H.J. Ellis, A. Frago, and C.K. O'Sullivan, Electrochemical Immunosensor for Detection of Celiac Disease Toxic Gliadin in Foodstuff. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 9265-9271.

[230] A.-E. Radi, X. Munoz-Berbel, M. Cortina-Puig, and J.-L. Marty, An electrochemical immunosensor for ochratoxin A based on immobilization of antibodies on diazonium-functionalized gold electrode. *Electrochimica Acta* 54 (2009) 2180-2184.

- [231] D. Tang, R. Yuan, and Y. Chal, Ultrasensitive electrochemical immunosensor for clinical immunoassay using thionine-doped magnetic gold nanospheres as labels and horseradish peroxidase as enhancer. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1582-1588.
- [232] S. Liebana, A. Lermo, S. Campoy, M. Pilar Cortes, S. Alegret, and M. Isabel Pividori, Rapid detection of Salmonella in milk by electrochemical magneto-immunosensing. *Biosensors & Bioelectronics* 25 (2009) 510-513.
- [233] K. Liu, J.-J. Zhang, C. Wang, and J.-J. Zhu, Graphene-assisted dual amplification strategy for the fabrication of sensitive amperometric immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2011) 3627-3632.
- [234] R.O. Kadara, N. Jenkinson, and C.E. Banks, Characterization and fabrication of disposable screen printed microelectrodes. *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 1377-1380.
- [235] J. Wang, Decentralized electrochemical monitoring of trace-metals - from disposable strips to remote electrodes - plenary lecture. *Analyst* 119 (1994) 763-766.
- [236] J.P. Hart, and S.A. Wring, Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 16 (1997) 89-103.
- [237] A. Cagnini, I. Palchetti, I. Lioni, M. Mascini, and A.P.F. Turner, Disposable ruthenized screen-printed biosensors for pesticides monitoring. *Sensors and Actuators B-Chemical* 24 (1995) 85-89.
- [238] J. Wang, B.M. Tian, V.B. Nascimento, and L. Angnes, Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochimica Acta* 43 (1998) 3459-3465.
- [239] V.B. Nascimento, and L. Angnes, Screen-printed electrodes. *Quimica Nova* 21 (1998) 614-629.
- [240] M.E.B. Calvo, O.D. Renedo, and A.J.A. Martinez, Determination of lamotrigine by adsorptive stripping voltammetry using silver nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Talanta* 74 (2007) 59-64.
- [241] V. Escamilla-Gomez, D. Hernandez-Santos, M. Begona Gonzalez-Garcia, J. Manuel Pingarron-Carrazon, and A. Costa-Garcia, Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. *Biosensors & Bioelectronics* 24 (2009) 2678-2683.
- [242] S. Campuzano, B. Esteban-Fernandez de Avila, J. Yuste, M. Pedrero, J. Luis Garcia, P. Garcia, E. Garcia, and J. Manuel Pingarron, Disposable amperometric magnetoimmunosensors for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2010) 1225-1230.
- [243] J. Wang, P.V.A. Pamidi, and D.S. Park, Screen-printable sol-gel enzyme-containing carbon inks. *Analytical Chemistry* 68 (1996) 2705-2708.

- [244] D. Martin-Yerga, M. Begona Gonzalez-Garcia, and A. Costa-Garcia, Biosensor array based on the in situ detection of quantum dots as electrochemical label. *Sensors and Actuators B-Chemical* 182 (2013) 184-189.
- [245] R.M. Pemberton, R. Pittson, N. Biddle, G.A. Drago, and J.P. Hart, Studies towards the development of a screen-printed carbon electrochemical immunosensor array for mycotoxins: A sensor for aflatoxin B-1. *Analytical Letters* 39 (2006) 1573-1586.
- [246] N.H.S. Ammida, L. Micheli, S. Piermarini, D. Moscone, and G. Palleschi, Detection of aflatoxin B-1 in barley: Comparative study of immunosensor and HPLC. *Analytical Letters* 39 (2006) 1559-1572.
- [247] H.-Y. Hsieh, C.-L. Shyu, C.-W. Liao, R.-J. Lee, M.-R. Lee, T.W. Vickroy, and C.-C. Chou, Liquid chromatography incorporating ultraviolet and electrochemical analyses for dual detection of zearanol and zearalenone metabolites in mouldy grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (2012) 1230-1237.
- [248] A. Rhouati, A. Hayat, D.B. Hernandez, Z. Meraihi, R. Munoz, and J.-L. Marty, Development of an automated flow-based electrochemical aptasensor for on-line detection of Ochratoxin A. *Sensors and Actuators B-Chemical* 176 (2013) 1160-1166.
- [249] A. Hayat, W. Haider, M. Rolland, and J.-L. Marty, Electrochemical grafting of long spacer arms of hexamethyldiamine on a screen printed carbon electrode surface: application in target induced ochratoxin A electrochemical aptasensor. *Analyst* 138 (2013) 2951-2957.
- [250] S.H. Alarcon, L. Micheli, G. Palleschi, and D. Compagnone, Development of an electrochemical immunosensor for ochratoxin A. *Analytical Letters* 37 (2004) 1545-1558.
- [251] S.H. Alarcon, G. Palleschi, D. Compagnone, M. Pascale, A. Visconti, and I. Barna-Vetro, Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat. *Talanta* 69 (2006) 1031-1037.
- [252] <http://www.heidolph.es/>.
- [253] <https://www.biocore.com/>.
- [254] <http://www.palmsens.com>.
- [255] H.G. T., *Bioconjugate techniques*, San Diego, USA, 2008.
- [256] C. Valat, B. Limoges, D. Huet, and J.L. Romette, A disposable Protein A-based immunosensor for flow-injection assay with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta* 404 (2000) 187-194.
- [257] A. Hallier, F. Celette, and C. David, Effects of sampling and extraction on deoxynivalenol quantification. *Food Chemistry* 127 (2011) 303-307.
- [258] J.M. Yeung, D.B. Prelusky, M.E. Savard, B.D.M. Dang, and L.A. Robinson, Sensitive immunoassay for fumonisin B-1 in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996) 3582-3586.

[259] G.A. Bennett, and J.L. Richard, Liquid-chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *Journal of Aoac International* 77 (1994) 501-506.

[260] <http://www.vicam.com.es/>.

[261] M.M. Abouzied, and J.J. Pestka, Simultaneous screening of fumonisin b-1, aflatoxin b-1, and zearalenone by line immunoblot - a computer-assisted multianalyte assay system. *Journal of Aoac International* 77 (1994) 495-501.

[262] <http://europroxima.com/>.

[263] P.G. Gottschalk, and J.R. Dunn, The five-parameter logistic: A characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Analytical Biochemistry* 343 (2005) 54-65.

[264] J.W.A. Findlay, and R.F. Dillard, Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *Aaps Journal* 9 (2007) E260-E267.

[265] D. Rodbard, P.L. Rayford, J.A. Cooper, and G.T. Ross, Statistical quality control of radioimmunoassays. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 28 (1968) 1412-+.

[266] [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

[267] E. Zubritsky, New choices for SPR. *Analytical Chemistry* 72 (2000) 289A-292A.

[268] W. Haasnoot, P. Stouten, G. Cazemier, A. Lommen, J.F.M. Nouws, and H.J. Keukens, Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney. *Analyst* 124 (1999) 301-305.

[269] C.P.-y. Chan, Y.-c. Cheung, R. Renneberg, and M. Seydack, New trends in immunoassays. *Biosensing for the 21st Century* 109 (2008) 123-154.

[270] H. Xiao, J.R. Clarke, R.R. Marquardt, and A.A. Frohlich, Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (1995) 2092-2097.

[271] J.F. Grove, A.J. McAlees, and A. Taylor, PREPARATION OF 10-G QUANTITIES OF 15-O-ACETYL-4-DEOXYNIVALENOL. *Journal of Organic Chemistry* 53 (1988) 3860-3862.

[272] Reglamento 1126/2007, de 28 de Septiembre de 2007.

[273] F. Traunmuller, I. Haslinger, H. Lagler, W. Graninger, M.A. Zeitlinger, and H.A.A. Salam, Influence of the washing buffer composition on the sensitivity of an enzyme-linked immunosorbent assay using mycobacterial glycolipids as capture antigens. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry* 26 (2005) 179-188.

[274] Z.U. Haque, and S.B. Pruet, Development of an enzyme linked immunoassay for beta-lactoglobulin in dairy products. *Cultured Dairy Products Journal* 28 (1993) 23-24.

- [275] E. Julian, M. Cama, P. Martinez, and M. Luquin, An ELISA for five glycolipids from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: Tween 20 interference in the assay. *Journal of Immunological Methods* 251 (2001) 21-30.
- [276] M.N. Pascale, Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (2009) 15-25.
- [277] J. He, R. Yang, T. Zhou, R. Tsao, J.C. Young, H. Zhu, X.-Z. Li, and G.J. Boland, Purification of deoxynivalenol from *Fusarium graminearum* rice culture and mouldy corn by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1151 (2007) 187-192.
- [278] A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, R. Romero-Gonzalez, and M. del Mar Aguilera-Luiz, Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 117 (2009) 705-712.
- [279] F. Berthiller, C. Dall'asta, R. Corradini, R. Marchelli, M. Sulyok, R. Krska, G. Adam, and R. Schuhmacher, Occurrence of deoxynivalenol and its 3--D-glucoside in wheat and maize. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 26 (2009) 507-511.
- [280] M. Sulyok, F. Berthiller, R. Krska, and R. Schuhmacher, Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (2006) 2649-2659.
- [281] E. Ates, K. Mittendorf, J. Stroka, and H. Senyuva, Determination of fusarium mycotoxins in wheat, maize and animal feed using on-line clean-up with high resolution mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 30 (2013) 156-165.
- [282] R. Schuhmacher, R. Krska, J. Weingaertner, and M. Grasserbauer, Interlaboratory comparison study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 359 (1997) 510-515.
- [283] Y. Onji, Y. Aoki, N. Tani, K. Umebayashi, Y. Kitada, and Y. Dohi, Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 815 (1998) 59-65.
- [284] E. Numanoglu, U. Uygun, V. Gokmen, and H. Koxsel, Multiple-stage extraction strategy for the determination of deoxynivalenol in maize. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 28 (2011) 80-85.
- [285] J. Riu, *Gráficos de control de Shewhart*, 2005.

- [286] M.M. Ngundi, S.A. Qadri, E.V. Wallace, M.H. Moore, M.E. Lassman, L.C. Shriver-Lake, F.S. Ligler, and C.R. Taitt, Detection of deoxynivalenol in foods and indoor air using an array biosensor. *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 2352-2356.
- [287] A. Pacin, E.C. Bovier, G. Cano, D. Taglieri, and C. Hernandez Pezzani, Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. *Food Control* 21 (2010) 492-495.
- [288] L. Pussemier, J.Y. Pierard, M. Anselme, E.K. Tangni, J.C. Motte, and Y. Larondelle, Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* 23 (2006) 1208-1218.
- [289] C.M. Maragos, and R.D. Plattner, Rapid fluorescence polarization immunoassay for the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002).
- [290] M. Cichna-Markl, New strategies in sample clean-up for mycotoxin analysis. *World Mycotoxin Journal* 4 (2011) 203-215.
- [291] Z. Brenn-Struckhofova, M. Cichna-Markl, C. Boehm, and E. Razzazi-Fazeli, Selective sample cleanup by reusable sol-gel immunoaffinity columns for determination of deoxynivalenol in food and feed samples. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 710-717.
- [292] E.W. Sydenham, G.S. Shephard, P.G. Thiel, S. Stockenstrom, P.W. Snijman, and D.J. vanSchalkwyk, Liquid chromatographic determination of fumonisins B-1, B-2, and B-3 in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *Journal of Aoac International* 79 (1996) 688-696.
- [293] A.C. Mak, S.J. Osterfeld, H. Yu, S.X. Wang, R.W. Davis, O.A. Jejelowo, and N. Pourmand, Sensitive giant magnetoresistive-based immunoassay for multiplex mycotoxin detection. *Biosensors & Bioelectronics* 25 (2010) 1635-1639.
- [294] M. Sulyok, R. Krska, and R. Schuhmacher, Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry* 119 (2010) 408-416.
- [295] W. Xichun, Z. Haibin, L. Haiming, H. Chenghua, Z. Aihua, M. Jinrong, M. Yanna, W. Wenda, and Z. Hao, An immunoarray for the simultaneous detection of two mycotoxins, ochratoxin A and fumonisin B 1. *Journal of Food Safety* 31 (2011) 408-416.
- [296] Y.-Q. Du, R.-Y. Zhang, P. Su, Y.-H. Ma, H. Shan, G.-Y. Chen, G.-H. Zhang, and H.-T. Wu, Determination of deoxynivalenol in wheat. *Journal of Henan University of Technology Natural Science Edition* 33 (2012) 61-65.
- [297] X.-H. Wang, and S. Wang, Sensors and biosensors for the determination of small molecule biological toxins. *Sensors* 8 (2008) 6045-6054.

- [298] C. Nistor, J. Christensen, N. Ocio, L. Norgaard, and J. Emneus, Multivariate analysis to separate the signal given by cross-reactants in immunoassay with sample matrix dilution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380 (2004) 898-907.
- [299] Y. Li, P. Li, X. Luo, Z. Hao, Z. Wang, J. Shen, X. Cao, and S. Zhang, Mixed immunoassay design for multiple chemical residues detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 3307-3312.
- [300] D. Saha, D. Acharya, D. Roy, D. Shrestha, and T.K. Dhar, Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B-1 and ochratoxin A in chili samples. *Analytica Chimica Acta* 584 (2007) 343-349.
- [301] Q.-H. He, Y. Xu, D. Wang, M. Kang, Z.-B. Huang, and Y.-P. Li, Simultaneous multiresidue determination of mycotoxins in cereal samples by polyvinylidene fluoride membrane based dot immunoassay. *Food Chemistry* 134 (2012) 507-512.
- [302] M. Kang, Y. Xu, Q.-H. He, and D. Wang, Simultaneous Detection of Fumonisin B-1 and Deoxynivalenol in Corn Samples Using a Polyvinylidene Fluoride Membrane-based Immunoassay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 40 (2012) 457-461.
- [303] E. Schneider, E. Usleber, E. Martlbauer, R. Dietrich, and G. Terplan, Multimycotoxin dipstick enzyme-immunoassay applied to wheat. *Food Additives and Contaminants* 12 (1995) 387-393.





---

## **ANEXOS**

---





## Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201331357	
Fecha de recepción:	18 septiembre 2013, 16:26 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1510.105b	
Solicitante:	UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (50%)	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (41 p.) Reivindicaciones-1.pdf (3 p.) Dibujos-1.pdf (15 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	18 septiembre 2013, 16:26 (CEST)	
Codificación del envío:	D8:89:82:8D:F3:A1:A9:72:52:92:31:C6:94:62:59:4C:77:E7:22:6E	

/Madrid, Oficina Receptora/



ANEXO II: PATRÓN DE REFERENCIA CERTIFICADA DEL  
DEOXINIVALENOL (TR-D100, D-W-158)

# TRILOGY<sup>®</sup> REFERENCE MATERIAL CERTIFICATE



Certification Date: November 2010  
Manufacture date: June 2010  
Expiration Date: June 2015  
Product Number: TR-D100 Lot # D-W-158  
Sample Weight: 100 grams  
Description: Wheat Naturally Contaminated with Deoxynivalenol

Analysis Compound	Detection Limits	Mean ppm	Mean SI units	1 sd range	2 sd range	3 sd range
Deoxynivalenol	0.1 ppm	1.4	(mg/kg)	1.3 to 1.5	1.2 to 1.6	1.1 to 1.7

Total 1.4 ppm  
Std dev 0.1 ppm  
% CV or %RSD 8.6 %

ND=None Detected

Method Reference – JAOAC Vol 88, No 4, 2005 McDonald with modifications  
Expanded measurement of uncertainty (k=2) = 20.0 % or ± 0.3 (ppm or mg/kg)  
Range of product incorporating uncertainty ranges = 1.1 to 1.7 ( ppm or mg/kg)  
Storage conditions : Recommended Storage of this product is less than 8°C.

To obtain the results above, 30 different extracts were prepared on a minimum of 6 different analyses dates. These were extracted with 84/16 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O for 1 hour on an Eberbach shaker. Samples were analyzed by HPLC using JAOAC Vol 88, No4, 2005 McDonald with modifications. This result represents the results you would find from one laboratory performing one specific method repeatedly over the course of several weeks. The standard deviation ranges notes above represent results you would anticipate with 66% (1 sd range), 95% (2 sd range) and 99% (3 sd range) confidence with the method specifics listed above. Additionally, uncertainty has been calculated and the range is also reported above. These ranges will allow you, the end user to determine which range best suits your individual requirements. Results of this sample may vary with methodology and extraction procedures utilized in your laboratory. These results relate only to the sample material listed above. The certified value is the best estimate of the true value based on these multiple analyses.

Certificate Approved by:



Bruce Malone  
Vice President of Technical Services

Trilogy Analytical laboratory  
870 Vossbrink Drive  
Washington, MO 63090  
636-239-1521  
www.trilogylab.com



ANEXO III: PATRÓN DE REFERENCIA CERTIFICADA DE  
LA FUMONISINA B1 (TR-F100, F-C -433)

# TRILOGY<sup>®</sup> REFERENCE MATERIAL CERTIFICATE



Certification Date: October 2010  
Manufacture Date: July 2010  
Expiration Date: July 2015  
Product Number: TR-F100      Lot # F-C-433  
Sample Weight: 100 grams  
Description: Corn Naturally Contaminated with Fumonisin

Analysis Compound	Detection Limits	Mean ppm	Mean SI units	1 sd range	2 sd range	3 sd range
Fumonisin B1	0.1 ppm	1.2	(mg/kg)	1.3 to 1.7	1.1 to 1.9	0.9 to 2.1
Fumonisin B2	0.1 ppm	0.3	(mg /kg)			
Fumonisin B3	0.1 ppm	ND				

Total 1.5 ppm  
Std dev 0.2 ppm  
% CV or %RSD 15 %

ND=None Detected

Method Reference – AOAC 995.15

Expanded measurement of uncertainty (k=2) = 33.4 % or  $\pm 0.5$  (ppm or mg /kg)

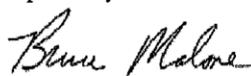
Range of product incorporating uncertainty ranges = 1.0 to 2.0 ( ppm or mg /kg)

Storage conditions: Recommended Storage of this product between 4°C and 8°C.

To obtain the results above, 30 different extracts were prepared on a minimum of 6 different analyses dates. These were extracted with 3/1 MeOH/H<sub>2</sub>O for 1 hour on an eberbach shaker. Samples were analyzed by HPLC using AOAC method 995.15. This result represents the results you would find from one laboratory performing one specific method repeatedly over the course of several weeks. The standard deviation ranges notes above represent results you would anticipate with 66% (1 sd range) , 95% (2 sd range) and 99% (3 sd range) confidence with the method specifics listed above.

Additionally, uncertainty has been calculated and the range is also reported above. These ranges will allow you, the end user to determine which range best suits your individual requirements. Results of this sample may vary with methodology and extraction procedures utilized in your laboratory. These results relate only to the sample material listed above. The certified value is the best estimate of the true value based on these multiple analyses.

Certificate Approved by:



Bruce Malone  
Vice President of Technical Services

Trilogy Analytical laboratory  
870 Vossbrink Drive  
Washington, MO 63090  
636-239-1521  
www.trilogylab.com



ANEXO IV: Listado de comunicaciones a congresos

	<b>An electrochemical competitive biosensor for Deoxynivalenol based on paramagnetic microparticle beads functionalized with protein A</b>
Congreso	IMAGENANO
Tipo comunicación	Póster
Ciudad	Bilbao (España)
Fecha	Del 11 al 14 de Abril de 2011
Ámbito del congreso	Internacional
	<b>An electrochemical competitive biosensor for Deoxynivalenol based on paramagnetic microparticle beads functionalized with Tosyl</b>
Congreso	V Workshop on Analytical Nanoscience and Nanotechnology
Tipo comunicación	Póster
Ciudad	Toledo (España)
Fecha	Del 21 al 23 de Septiembre de 2011
Ámbito del congreso	Nacional
	<b>Design of a competitive electrochemical biosensor based on affinity reaction between deoxinivalenol and its polyclonal antibody</b>
Congreso	NanoSpain
Tipo comunicación	Póster y ponencia
Ciudad	Santander (España)
Fecha	Del 27 de Febrero al 1 de Marzo de 2012
Ámbito del congreso	Nacional
	<b>Design of a competitive electrochemical biosensor based on affinity reaction between deoxinivalenol and its polyclonal antibody</b>
Congreso	14 International Conference on Electroanalysis
Tipo comunicación	Ponencia
Ciudad	Portoroz (Eslovenia)
Fecha	Del 3 al 7 de Junio de 2012
Ámbito del congreso	Internacional
	<b>A novel immunosensor specific and selective to Deoxynivalenol using magnetic nanoparticles modified with protein G</b>
Congreso	Trobada Transfronterera de sensors i biosensors
Tipo comunicación	Póster
Ciudad	Tarragona (España)
Fecha	Del 20 al 21 de Septiembre de 2012
Ámbito del congreso	Autonómico (Cataluña)
	<b>Determinación de deoxinivalenol mediante un magnetoinmunosensor competitivo electroquímico</b>
Congreso	5ª Jornada de Jóvenes Investigadores de Química y Física en Aragón
Tipo comunicación	Póster
Ciudad	Zaragoza (España)
Fecha	4 de Diciembre de 2012
Ámbito del congreso	Universidad de Zaragoza

ANEXO IV: Listado de comunicaciones a congresos

	<b>Mycotoxins in cereals and wine samples: determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection</b>
Congreso	XVIII Reunión de la Sociedad española de química Analítica
Tipo comunicación	Póster
Ciudad	Úbeda, Jaén (España)
Fecha	Del 17 al 19 de Junio de 2013
Ámbito del congreso	Nacional
	<b>Improvement Of The Time Of Measuring In An Electrochemical Immunosensor For Deoxynivalenol Mycotoxin</b>
Congreso	XVIII Reunión de la Sociedad española de química Analítica
Tipo comunicación	Póster
Ciudad	Úbeda, Jaén (España)
Fecha	Del 17 al 19 de Junio de 2013
Ámbito del congreso	Nacional
	<b>Improvement Of The Time Of Measuring In An Electrochemical Immunosensor For Deoxynivalenol Mycotoxin</b>
Congreso	VI Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas
Tipo comunicación	Póster
Ciudad	Álcala de Henares, Madrid (España)
Fecha	Del 8 al 9 de Julio de 2013
Ámbito del congreso	Nacional
	<b>Electrochemical Magnetoimmunosensors For Simultaneous Determination Of Deoxynivalenol, Fumonisin B1 And Ochratoxin A</b>
Congreso	VI Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas
Tipo comunicación	Ponencia
Ciudad	Álcala de Henares, Madrid (España)
Fecha	Del 8 al 9 de Julio de 2013
Ámbito del congreso	Nacional
	<b>Inmunosensor magnético competitivo basado en un ensayo ELISA espectrofotométrico para la determinación de deoxinivalenol en cereales</b>
Congreso	II Simposio Jóvenes Investigadores en Espectroscopia
Tipo comunicación	Ponencia
Ciudad	Granada (España)
Fecha	Del 17 al 20 de Julio de 2013
Ámbito del congreso	Nacional

