

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 703**

21 Número de solicitud: 201330976

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**28.06.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.01.2015**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (100.0%)  
Campus Pza. San Francisco (Edif.  
Interfacultades) C/ Pedro Cerbuna, 12  
50009 Zaragoza ES**

72 Inventor/es:

**CASTILLO SUÁREZ, Juan Ramón;  
VIDAL IBAÑEZ, Juan Carlos;  
EZQUERRA ESCARTIN, Alba y  
BONEL SANMARTÍN, Laura**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DELA MICOTOXINA FB1**

57 Resumen:

Inmunosensor electroquímico para la determinación cuantitativa de la micotoxina FB1.

La presente invención se refiere a un kit que comprende un inmunosensor electroquímico para la determinación cuantitativa de la fumonisina B1. Se trata de un inmunosensor electroquímico competitivo directo, donde se utilizan anticuerpos específicos de la micotoxina FB1 inmovilizados sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G. La fumonisina B1 procedente de la muestra a analizar competirá con una fumonisina B1 marcada con peroxidasa de rábano picante (conjugado FB1-HRP) por un elemento de biorreconocimiento, que es el anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas. La etapa de la reacción enzimática y la detección electroquímica tienen lugar sobre un electrodo múltiple, preferiblemente de 8 electrodos serigrafiados de carbono, detectándose electroquímicamente los electrones generados tras la reacción enzimática. Además, la invención se refiere al método de detección y cuantificación electroquímico de la micotoxina fumonisina B1 (FB1) utilizando el kit y a su uso para la detección y cuantificación en cereales y productos derivados.

**ES 2 527 703 A2**

INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE  
LA MICOTOXINA FB1

**DESCRIPCIÓN**

La presente invención se refiere a un kit que comprende un inmunosensor electroquímico  
5 para la determinación cuantitativa de la fumonisina B1.

Además, la invención se refiere al método de detección y cuantificación electroquímico de la  
micotoxina fumonisina B1 (FB1) utilizando el kit y a su uso para la detección y cuantificación  
en cereales y productos derivados.

Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la química analítica y/o química  
10 de los alimentos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Los métodos desarrollados para la detección y determinación de la micotoxina fumonisina  
B1 (FB1), generalmente suelen emplear técnicas tales como la cromatografía en capa fina,  
cromatografía en capa fina de alta resolución, cromatografía líquido-líquido de alta  
15 resolución, cromatografía de gases y finalmente los métodos de inmunoensayo [Ellen S.  
Kulisek and Jan P. Hazebroek, Comparison of Extraction Buffers for the Detection of  
Fumonisin B1 in Corn by Immunoassay and High-Performance Liquid Chromatography, J.  
Agric. Food Chem., 48, 65-69, 2000.]. También se han empleado varias técnicas de  
espectrometría de masas (EM) con este fin.

20 Uno de los aspectos a tener en cuenta en la determinación cromatográfica de la FB1 es la  
necesidad de utilizar sistemas de revelado para su detección, lo que dificulta y alarga el  
procedimiento analítico.

El análisis por cromatografía de gases implica una hidrólisis inicial de la FB1. Una vez  
hidrolizada se han determinado los ácidos tricarbóxicos formados una vez esterificados con  
25 isobutanol, si bien esto no permite la distinción entre los distintos tipos de fumonisinas.  
También se han analizado los aminopolióles de la hidrólisis, una vez formados sus  
derivados trimetilsililados (TMS) o trifluoroacetilados (TFA). En estos casos el aminopentol y  
aminotetraol originados respectivamente a partir de la FB1y FB2 pueden ser identificados  
muy bien por cromatografía de gases (CG) utilizando una columna capilar y un detector de

ionización de llama, existiendo variaciones con acoplamiento con un EM. De todas maneras, los derivados de TMS de la FB2 y de la FB3, dos aminotetraoles no han sido separados, mientras que los derivados de TFA, sólo se separan unos pocos segundos.

La espectrometría de masas (EM) y su acoplamiento con otro espectrómetro de masas (EM/EM), han sido también utilizados para la identificación de la FB1, previamente separados por cromatografía líquido-líquido [Aberg, Annica Tevell; Solyakov, Alexey; Bondesson, Ulf, Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the quantification of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxin, ochratoxin A and fumonisin B1 and B2 in vegetable animal feed, Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 30, 3, 541-549, 2013].

Cabe citar aquí también que se han desarrollado mediante ensayos enzimáticos de inmunoabsorción directa o indirecta, utilizando anticuerpos con una cierta reactividad sobre la FB1. El compuesto formado, basándose en anticuerpos monoclonales, se vio que servía para la realización de "screening" de piensos contaminados con una cantidad >5 µg/g de FB1 [Deng, Guozhe; Xu, Kun; Sun, Yue; et al, High Sensitive Immunoassay for Multiplex Mycotoxin Detection with Photonic Crystal Microsphere Suspension Array, ANALYTICAL CHEMISTRY, 85, 5, 2833-2840, 2013].

Sin duda el método más empleado hasta la fecha para el análisis y cuantificación de la FB1 es la cromatografía líquido-líquido de alta resolución (HPLC). Ahora bien, como la FB1 no absorbe en la zona del espectro ultravioleta ni en la zona del visible, para su análisis por estos métodos, son necesarias técnicas de derivatización de las muestras que contengan esta micotoxina, lo que supone un encarecimiento del análisis, un aumento del tiempo de realización y también su coste económico [Kong, Weijun; Xie, Tingting; Li, Junyuan; et al, Analysis of fumonisins B-1 and B-2 in spices and aromatic and medicinal herbs by HPLC-FLD with on-line post-column derivatization and positive confirmation by LC-MS/MS, ANALYST, 137, 13, 3166-3174, 2012.].

La primera determinación cuantitativa de FB1 mediante HPLC comprendía una detección en el espectro de UV a 230 nm de los correspondientes derivados maléicos, y a pesar de que esta técnica da buenos resultados en el análisis de cultivos de hongos, no es suficientemente sensible para el análisis de las muestras contaminadas naturalmente.

Para mejorar esta sensibilidad se optó por la preparación de derivados fluorescentes.

Uno de los primeros reactivos empleados con este objetivo fue la fluorescamina. Este reaccionaba con el grupo  $\text{NH}_2$  de la FB1 produciendo dos picos como resultado de la formación de una mezcla en equilibrio entre los derivados ácido/alcohol y los lactónicos.

Un segundo reactivo introducido fue el o-ftaldialdehído (OPA). Este reactivo forma benzoderivados fluorescentes sobre la amina libre, los cuales presentan el inconveniente de que se degrada rápidamente con el tiempo ( $< 2$  min). A pesar de esto es el reactivo actualmente más utilizado para este tipo de análisis. Se utiliza en estudios comparativos con métodos como el ELISA y CG-EM y también en estudios de puesta a punto de método de análisis oficiales a nivel internacional [Cun Li; Yin-Liang Wu; Ting Yang; et al, Rapid determination of fumonisins B1 and B2 in corn by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasonic extraction, Journal of Chromatographic Science, 50, 1, 57-63, 2012].

Otro reactivo usado es el naftalen-2,3-dicarboxialdehído (NDA), éste constituye una buena alternativa al OPA, siendo sus derivados significativamente más estables y con una mayor fluorescencia, propiedades muy útiles a la hora de automatizar las inyecciones de los derivados. Este compuesto reacciona con la amina primaria de la FB1 en presencia del ion cianuro para procurar la formación de benzoderivados. El principal inconveniente deriva de la necesidad de trabajar con KCN.

El uso de 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBF-F) para el análisis de FB1, con un tiempo de reacción de 1 min a  $60^\circ\text{C}$  mejoró significativamente la sensibilidad del método permitiendo la detección de hasta 1 ng de FB1. La estabilidad depende de la calidad del reactivo mientras que su vida media es de sólo 20 min. En un estudio comparativo con derivados de naftalen-2,3-dicarboxialdehído (NDA-KCN) se obtuvieron respuestas muy similares en un mismo material contaminado naturalmente. Dando valores de FB1 y FB2 de 1,7 y 0,50  $\mu\text{g/g}$  y de 1,8 y 0,35  $\mu\text{g/g}$  para (NBF-F) y (NDA-KCN) respectivamente.

En este tipo de métodos se aprovecha la presencia del grupo amino en la micotoxina FB1, al igual que ocurre en los métodos desarrollados para el análisis de aminoácidos. De ahí que la utilización de estos reactivos derivatizantes se haga imprescindible en los métodos cromatográficos, lo cual dificulta notablemente el análisis, debido, sobretodo, a su elevada inestabilidad, además también alarga el tiempo del ensayo.

La disponibilidad de anticuerpos para la FB1 hace posible el desarrollo de inmunosensores para esta micotoxina, si bien su número es todavía muy escaso. Los inmunosensores más

empleados se basan en la resonancia de plasmón superficial (SPR), con límites de detección (LODs) del orden de 50 ng/g y  $EC_{50}=720$  ng/g, puede realizarse la medida en 15 minutos sin contar con el tratamiento de la muestra y el procedimiento analítico, y muestra buena correlación con GC-MS o HPLC-MS. Sin embargo, son necesarias columnas de inmutofinidat previamente a la determinación por SPR, y la instrumentación es compleja [Mullett, W; Lai, EPC; Yeung, JM, Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 258, 2, 161-167, 1998].

También se han descrito baterías de microsensors basados en la fluorescencia evanescente, con LODs para la FB1 de 0,2 a 50 ng/g, polímeros de impresión molecular (MIPs) para FB1, o dispositivos de flujo lateral [Lamberti, Ilaria; Tanzarella, Caterina; Solinas, Isabella; et al., An antibody-based microarray assay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and fumonisin B1, Mycotoxin research, 25, 4, 193-200, 2009]. Este tipo de dispositivos suelen tener una baja especificidad y una elevada reactividad cruzada con compuestos químicos semejantes que puedan estar presentes en la misma muestra.

Recientemente se ha descrito un biosensor quimiluminiscente para la determinación de FB1 en maíz, con un límite de detección de 2,5 ng/ml. La instrumentación de este biosensor es muy compleja [Mirasoli, Mara; Buragina, Angela; Dolci, Luisa Stella; et al., Chemiluminescence-based biosensor for fumonisins quantitative detection in maize samples, BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, 32, 1, 283-287, 2012].

Por tanto, para superar todos los problemas técnicos mencionados es necesario desarrollar un nuevo inmunosensor para la determinación cuantitativa de la micotoxina FB1.

#### DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un kit que comprende un inmunosensor electroquímico para la determinación cuantitativa de la fumonisina B1. Se trata de un inmunosensor electroquímico competitivo directo, donde se utilizan anticuerpos específicos de la micotoxina FB1 inmovilizados sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G.

Los anticuerpos específicos de FB1 no han sido modificados en la invención, por lo que el biorreconocimiento es muy alto en este inmunosensor.

La funcionalización de la micropartícula magnética de la invención con proteína G es la forma más adecuada de orientar la región Fc de unión al anticuerpo de FB1 hacia el antígeno.

5 El tamaño de esta partícula magnética hace que aumente el número de anticuerpos específicos de la micotoxina FB1 que se pueden unir a la partícula magnética, por lo que la densidad de grupos Fc que pueden unirse al antígeno también es mayor.

10 La fumonisina B1 procedente de la muestra a analizar competirá con una fumonisina B1 marcada con peroxidasa de rábano picante (conjugado FB1-HRP) por un elemento de biorreconocimiento, que en este caso es el anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas. Esta reacción de competición se lleva a cabo en los pocillos de una placa de valoración ELISA, y tan sólo la etapa de la reacción enzimática y la detección electroquímica tienen lugar sobre un electrodo múltiple, preferiblemente de 8 electrodos serigrafiados de carbono, detectándose electroquímicamente los electrones generados tras la reacción enzimática.

15 La utilización de partículas magnéticas como superficie sólida para llevar a cabo las etapas de inmovilización de los anticuerpos y la competición entre la fumonisina B1 de una muestra y la fumonisina marcada con HRP supone una elevada reproducibilidad, precisión y fiabilidad.

20 El dispositivo de medida del inmunosensor de la invención es autónomo y portable y consiste en la unión de un potencióstato portable y un electrodo múltiple, preferiblemente de 8 electrodos serigrafiados de carbono.

25 El uso de 8 electrodos serigrafiados de carbono múltiples permite la calibración simultánea en 8 puntos, aumentando por tanto la reproducibilidad y sensibilidad del inmunosensor, y mejorar la rapidez del análisis. Además, estos electrodos no requieren de un acondicionamiento previo, físico-químico y/o electroquímico, antes de cada medida.

30 El inmunosensor de la invención tiene un límite de detección menor de 0,1 ng/ml y una sensibilidad de  $EC_{50}=0,5-1$  ng/ml con un rango dinámico lineal de 0-100 ng/ml. La muestra se puede diluir para su análisis y se puede disminuir el porcentaje de disolvente orgánico durante la etapa de competición, favoreciéndose la reacción de afinidad antígeno-anticuerpo.

La medida electroquímica es amperométrica, se realiza a un potencial reductor de -0,35 V durante un corto periodo de tiempo (0,03 s cada 0,24 s), evitando la oxidación electroquímica de la hidroquinona y reduciendo el riesgo de oxidación de la propia disolución expuesta al aire, en consecuencia, reduciendo las interferencias en la detección electroquímica (el ruido de fondo).

Si se compara la invención con la técnica ELISA, el número de falsos positivos se reduce drásticamente, puesto que el uso de partículas magnéticas para la inmovilización de los anticuerpos específicos de la fumonisina B1 disminuye la unión no específica sobre por ejemplo una microplaca de valoración ELISA, donde tiene lugar la etapa de competición.

Además, el inmunosensor de la invención disminuye el tiempo de análisis, de dos horas por la técnica ELISA se reduce a una hora utilizando el inmunosensor de la invención.

También, cabe mencionar el menor consumo de biorreactivos, sobretodo del anticuerpo monoclonal de la fumonisina B1, ya que en la presente invención el anticuerpo se encuentra inmovilizado sobre partículas magnéticas y no sobre el pocillo de la microplaca de valoración ELISA.

Si se compara la presente invención con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cantidad de disolventes orgánicos que se utiliza disminuye drásticamente. En la presente invención sólo son necesarios pequeños volúmenes durante el proceso de extracción de la muestra.

Además, otra ventaja de la presente invención es que no es necesario derivatizar la muestra con reactivos fluorescentes.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende un anticuerpo monoclonal de FB1 inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G, un conjugado (FB1-HRP) que comprende la micotoxina FB1 unida a una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), un sustrato y un cosustrato enzimáticos de la enzima HRP que comprende hidroquinona y peróxido de hidrógeno, disolución tampón y un inmunosensor electroquímico que comprende un potencióstato portable, un electrodo múltiple, preferiblemente de 8 electrodos serigrafados de carbono, un soporte y un sistema de imanes.

El límite de detección del inmunosensor, es menor de 0,1 ng/ml y una sensibilidad de  $EC_{50}=0,5-1$  ng/ml con un rango dinámico lineal de 0-100 ng/ml.

5 En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal FB1 inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G está en forma de suspensión en disolución tampón. Preferiblemente, tiene una concentración de entre 5 y 15 mg/l. Más preferiblemente una concentración de 10 mg/l.

En otra realización preferida, el conjugado (FB1-HRP) que comprende la micotoxina FB1 unida a una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) está diluido en la disolución tampón en una proporción 1 a 200.

10 En otra realización preferida, la cantidad de micropartículas magnéticas necesarias está en un rango comprendido entre 5 y 10  $\mu$ g. Más preferiblemente, la cantidad de micropartículas magnéticas necesarias es de 5  $\mu$ g.

Preferiblemente, las micropartículas magnéticas tienen un diámetro de entre 2,5  $\mu$ m y 3  $\mu$ m. Más preferiblemente, las micropartículas magnéticas tienen un diámetro de 2,8  $\mu$ m.

15 En otra realización preferida, la disolución tampón es una disolución fosfato salina que se selecciona de la lista que comprende PBS, PBST o cualquiera de sus combinaciones.

Preferiblemente, la disolución tampón está a una concentración de 0,1 M.

Preferiblemente, la disolución tampón se encuentra a un pH de entre 6,5 y 7,5.

20 En la presente invención, el soporte es conocido para cualquier experto en la materia para estas técnicas. En una realización preferida, el soporte se selecciona de la lista que comprende una placa de microvaloración ELISA o soporte de plástico o cuentas. Más preferiblemente, el soporte es una microplaca de valoración ELISA. Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para determinar y cuantificar electroquímicamente la micotoxina fumonisina B1 (FB1) en una muestra utilizando el kit descrito anteriormente que  
25 comprende las siguientes etapas:

a) poner en contacto una muestra a analizar, diluida en disolución tampón, con una disolución de un conjugado enzimático (FB1-HRP) que comprende la micotoxina FB1 unida a una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP),

b) añadir una suspensión del anticuerpo monoclonal de FB1 inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G en disolución tampón sobre la disolución obtenida en la etapa a),

c) agitar y aplicar un campo magnético mediante un sistema de imanes

5 d) añadir la suspensión de la etapa c) sobre un electrodo múltiple, preferiblemente de 8 electrodos serigrafiados de carbono,

f) añadir una disolución de un sustrato y cosustrato enzimáticos de la enzima HRP que comprende hidroquinona y peróxido de hidrógeno, sobre la suspensión de la etapa d),

f) realizar la medida electroquímica.

10 En una realización preferida, la muestra a analizar procede de muestras de cereales o productos derivados.

Preferiblemente, las etapas (a), (b) y (c) se llevan a cabo sobre un soporte. El soporte es conocido para cualquier experto en la materia para estas técnicas. En una realización preferida, el soporte se selecciona de la lista que comprende una placa de microvaloración ELISA o soporte de plástico o cuentas. Más preferiblemente, el soporte es una placa de microvaloración ELISA.

En la etapa (c) se ha de aplicar un campo magnético, preferiblemente mediante un sistema de imanes. Dicho sistema de imanes debe ser capaz de retener al conjunto formado por un anticuerpo monoclonal de FB1 inmovilizado sobre unas micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G para poder desechar fácilmente los residuos no retenidos. Normalmente la etapa (c) es una etapa de lavado.

En otra realización preferida, la medida electroquímica es una medida amperométrica. La medida electroquímica se realiza con la técnica de amperometría, aplicando un potencial constante de reducción durante un determinado tiempo.

25 En otra realización preferida, la etapa (f) se realiza a un potencial reductor de -0.35V.

Por último, el tercer aspecto de la invención se refiere al uso del kit descrito anteriormente para determinar y cuantificar electroquímicamente la micotoxina fumonisina B1 (FB1) en cereales y sus productos derivados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Absorbancia medida en presencia o ausencia de FB1 en la etapa de competición al trabajar directamente sobre la superficie del pocillo de la placa.

10 Figura 2. Efecto de la concentración de FB1 durante la etapa de competición, detección espectrofotométrica a 450 nm. [FB1] = 0-1000 ng/ml.

Figura 3. Separador magnético para viales *ependorf*.

Figura 4. Optimización de la concentración de conjugado enzimático FB1-HRP a utilizar en el ELISA magnético espectrofotométrico. Medida de Abs en función de la concentración de FB1-HRP (0, 1/100, 1/1000 y 1/10000).

Figura 5. Absorbancia medida a 280 nm frente a la concentración de anticuerpo monoclonal libre en la suspensión de partículas magnéticas ( $R=0,9978$ ).

Figura 6. Inmunoensayo directo competitivo sobre partículas magnéticas modificadas con proteína G realizado sobre pocillos de placa de poliestireno.

20 Figura 7. Separador magnético para las placas de inmunoensayo de 96 pocillos.

Figura 8. Estudio de la unión específica e inespecífica durante la etapa de competición sobre las partículas magnéticas modificadas con proteína G. [mAbFB1] = 5 mg/l; [FB1-HRP] = 1/100 ; [FB1] = 0, 5, 50 y 100 ng/ml.

Figura 9. Optimización del tiempo de la reacción enzimática en el ELISA magnético espectrofotométrico. Tiempos estudiados: 15, 30, 45 y 60 minutos. [mAbFB1] = 5 mg/l; [FB1-HRP] = 1/100 ; [FB1] = 0, 5, 50 y 100 ng/ml. Temperatura ambiente y con agitación.

Figura 10. Optimización de la concentración de anticuerpo monoclonal y conjugado

enzimático FB1-HRP en el ELISA magnético espectrofotométrico. Concentraciones anticuerpo monoclonal: 1, 5 y 10 mg/l; Concentraciones conjugado enzimático: 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Tiempo de competición: 30 minutos. Temperatura ambiente y con agitación.

- 5 Figura 11. Optimización de la concentración de anticuerpo monoclonal en el ELISA magnético espectrofotométrico. Concentraciones estudiadas: 1, 5 y 10 mg/l. [FB1-HRP] = 1/100; [FB1] = 0, 5, 50 y 100 ng/ml. Tiempo de competición: 30 minutos. Temperatura ambiente y con agitación.

- 10 Figura 12. Optimización de la cantidad de partículas magnéticas en el ELISA magnético espectrofotométrico. Cantidad de partículas magnéticas estudiadas: 5, 9 y 15  $\mu$ g. [mAbFB1] = 10 mg/l; [FB1-HRP] = 1/100 ; [FB1] = 0, 5, 50 y 100 ng/ml. Temperatura ambiente y con agitación.

- 15 Figura 13. Calibrado en el ELISA magnético espectrofotométrico de ocho puntos con los parámetros optimizados. [mAbFB1] = 10 mg/l; [FB1-HRP] = 1/100; [FB1] = 0-100 ng/ml. Temperatura ambiente y con agitación.

Figura 14. Placa ELISA tras llevar a cabo el inmunoensayo magnético espectrofotométrico.

Figura 15. Efecto de interferencias (OTB, DON y OTA, 50 ng/ml) en el funcionamiento del inmunoensayo en presencia o ausencia de FB1 con el ELISA magnético espectrofotométrico optimizado.

- 20 Figura 16. Efecto de diferentes porcentajes de metanol en el funcionamiento del inmunoensayo. Valor de Absorbancia en función del porcentaje de metanol presente en el pocillo en presencia o ausencia de FB1 (50 ng/ml) durante la etapa de competición.

Figura 17. Calibrado ELISA inmunomagnético espectrofotométrico para los tres porcentajes de metanol (0, 20 y 30 %, v/v), [FB1] = 0 – 100 ng/ml.

- 25 Figura 18. Esquema representativo del inmunosensor directo competitivo sobre la superficie de los electrodos serigrafiados de carbono y el separador magnético.

Figura 19. Esquema de un electrodo serigrafiado de carbono compuesto de electrodo auxiliar, referencia y trabajo, y los contactos eléctricos.

Figura 20. Curva de calibrado utilizando electrodos SPCEs individuales (8 puntos). Intensidad de corriente ( $\mu\text{A}$ ) frente a la concentración de FB1.

Figura 21. Curva de calibrado utilizando electrodos SPCEs individuales (4 puntos). Intensidad de corriente ( $\mu\text{A}$ ) frente a la concentración de FB1.

5 Figura 22. Electrodo múltiple de ocho electrodos.

Figura 23. Voltagrama de pulsos diferenciales (DPV) de una disolución de TMB tras ser oxidado enzimáticamente por la enzima HRP.

Figura 24. Curvas sigmoideas obtenidas al llevar a cabo la reacción enzimática durante 5 minutos (TMB supersensitive) y 10 minutos (TMB normal).

10 Figura 25. Curva de calibrado utilizando electrodos SPCEs múltiples (8 puntos). Intensidad de corriente ( $\mu\text{A}$ ) frente a la concentración de FB1. Sustratos: hidroquinona y peróxido de hidrógeno, potencial  $-0,35\text{ V}$ .

Figura 26. Calibrado en modo alternado y consecutivo usando como sustratos hidroquinona y peróxido de hidrógeno, potencial:  $-0,35\text{ V}$ .

15 Figura 27. Corrientes ( $\mu\text{A}$ ) para los ocho electrodos que constituyen un sensor de ocho posiciones. Cálculo de la irreproducibilidad asociada.

Figura 28. Curvas de calibrado con dos electrodos múltiples CH8 diferentes, realizados el mismo día. Irreproducibilidad debida a los electrodos, manteniendo el resto de parámetros constantes.

20 Figura 29. Gráfico de control correspondiente al estudio del tiempo de vida del inmunosensor, considerando la vida media del anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas y el conjugado enzimático (FB1-HRP) diluido 1/100.

## EJEMPLOS

**Ejemplo nº 1: Estudio de la afinidad entre el anticuerpo monoclonal y la FB1 y FB1-HRP**

25

El primer paso en el diseño y desarrollo de un biosensor de afinidad es comprobar la reacción de afinidad entre el elemento de biorreconocimiento y el analito. En nuestra invención como se trata de un inmunosensor directo competitivo, ha sido necesario chequear tanto la reacción de afinidad entre el anticuerpo y la FB1 así como con el  
5 conjugado enzimático FB1-HRP.

Para llevar a cabo esta primera identificación de la reacción hemos utilizado un esquema convencional de inmunoensayo utilizando una placa ELISA en la que se han inmovilizado 50  $\mu$ l de mAbFB1 de concentración 5,75 mg/l en tampón PBS (0,1 M, pH 7,4). Se ha dejado inmovilizando durante toda la noche a 4°C y sin agitación. A continuación se ha eliminado el  
10 volumen de mAbFB1 no inmovilizado que se había añadido en exceso.

Una vez inmovilizado el elemento de biorreconocimiento se han bloqueado los pocillos con tampón Superblock de Pierce añadiendo 300  $\mu$ l tal y como se describe en el protocolo y repitiéndolo 3 veces.

A continuación se han añadido 25  $\mu$ l del conjugado FB1-HRP (1:100) diluido en tampón PBS del Kit de la casa comercial Europroxima llevando a cabo la incubación durante 30 minutos  
15 a temperatura ambiente y con agitación orbital.

En los pocillos en los que se ha realizado la competición, se han añadido simultáneamente 50  $\mu$ l de FB1 de concentración 10 ng/ml en tampón PBS y se ha llevado a cabo la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación orbital.  
20 Seguidamente, se han llevado a cabo tres lavados con PBS al 0,1% de Tween (PBST) y uno sin Tween. Entonces se han adicionado 50  $\mu$ l de TMB en cada uno de los pocillos y se ha llevado a cabo la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se paró la reacción enzimática añadiendo 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 M) con agitación durante 1 minuto. Se midió el valor de Abs a 450 nm utilizando un filtro de 415 nm.

En la figura 1 se ha representado el valor de la absorbancia medida en presencia y ausencia de FB1 en la etapa de competición. En presencia de una concentración de 10 ng/ml de FB1 en la etapa de competición se observa una disminución importante en el valor de absorbancia medida.

Además, se ha estudiado el efecto competidor de diferentes concentraciones de FB1 sobre  
30 la señal analítica del inmunosensor. Se modificó la concentración de FB1 en el rango de 0 a

1000 ng/ml y se representó el valor de la absorbancia medida en función de la concentración de FB1, obteniéndose el gráfico de barras que se muestra en la figura 2.

Una vez se ha estudiado la reacción de afinidad sobre el pocillo de la placa, este mismo esquema de ensayo se trasladó sobre la superficie de las partículas magnéticas modificadas con la proteína G, que es capaz de unirse a la región Fc del anticuerpo monoclonal de la  
5 FB1.

Para ello se tomaron 10 µl de partículas magnéticas modificadas con proteína G y se añadieron en un vial *ependorf*, lavándose tres veces con tampón PBS. A continuación se ha añadido 1 µl de mAbFB1 (2600 mg/l) dejando un tiempo de reacción de 10 minutos a  
10 temperatura ambiente y con agitación. Para eliminar el posible exceso de anticuerpo que haya quedado en la disolución sin reaccionar con las partículas magnéticas, se lleva a cabo un lavado (tres veces) con tampón PBS. Para llevar a cabo esta etapa de lavado se utiliza un bloque magnético de la casa comercial Promega, que se muestra en la figura 3 que inmoviliza el conjunto de partículas magnéticas, proteína G y anticuerpo.

15 Una vez se ha eliminado el exceso de anticuerpo monoclonal, se han diluido las partículas magnéticas modificadas en 500 µl de tampón PBS pudiéndose conservar a 4 ° C durante 1 mes aproximadamente.

A continuación se han añadido 8 µl de partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo monoclonal de la FB1 (MBs-prG-mAbFB1) sobre el pocillo. Seguidamente se han añadido  
20 25µl del conjugado FB1-HRP (1:100 y 1:1000) del kit comercial Europroxima en tampón PBS llevándose a cabo una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación orbital. Simultáneamente se ha añadido la micotoxina FB1 de concentración deseada en el mismo tampón y las mismas condiciones, en el pocillo de la experiencia competitiva. La etapa de competición transcurrió durante 30 minutos a temperatura  
25 ambiente y con agitación orbital. Una vez pasado este tiempo se lavaron los pocillos de la placa 2 veces con tampón de lavado PBS al 0,1% de Tween (PBST) y un último lavado sin Tween. La etapa de transducción de la señal analítica es exactamente la misma que ya se ha descrito en el párrafo anterior para el ELISA convencional sin partículas magnéticas.

Se comprobó también si una suspensión de estas partículas magnéticas sin bioreactivos  
30 producía un valor de absorbancia elevado, pero el resultado fue negativo, por lo que se eliminó esta posibilidad de la existencia de ruido de fondo por parte de la suspensión de partículas magnéticas.

En la figura 4 se ha representado la absorbancia medida para las diferentes concentraciones del conjugado comercial FB1-HRP (1/100, 1/1000 y 1/10000). Se observa que la mayor absorbancia se midió al trabajar con una dilución 1/100 del conjugado enzimático, y en los casos de que la dilución sea 1/1000 o 1/10.000, se produjo un descenso muy acusado de la absorbancia medida, y por lo tanto una disminución enorme en la sensibilidad de la determinación.

**Ejemplo nº 2: Cálculo del porcentaje de inmovilización del anticuerpo monoclonal de FB1 sobre las partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G.**

Una vez se ha sintetizado el conjugado entre las partículas magnéticas modificadas con la proteína G y el anticuerpo monoclonal, es necesario caracterizar esta reacción de inmovilización, para asegurar que el anticuerpo monoclonal se ha inmovilizado correctamente y cuantificar en qué porcentaje se ha inmovilizado.

Para calcular este porcentaje de inmovilización, se ha comparado la absorbancia del anticuerpo monoclonal ( $\lambda=280$  nm) antes y después de estar en contacto con las partículas magnéticas tras la etapa de inmovilización. Para ello, se ha tomado 1  $\mu$ l de mAbFB1 (2600 mg/l) y se ha diluido hasta 500  $\mu$ l con tampón PBS en una cubeta de cuarzo para medir la absorbancia de esta disolución antes de la etapa de inmovilización.

A continuación se ha tomado la suspensión de partículas magnéticas después de los 10 minutos de la etapa de inmovilización. Se han separado las partículas magnéticas con ayuda del bloque magnético que se muestra en la figura 3, y se ha tomado el sobrenadante, que contiene el exceso de anticuerpo que no se ha inmovilizado sobre las partículas magnéticas. Se volvió a medir la absorbancia a 280 nm.

Para poder cuantificar la cantidad de anticuerpo que queda sin inmovilizar ha sido necesario preparar una recta de calibrado con concentraciones de anticuerpo monoclonal puro por debajo de la concentración inicial que se colocó en la cubeta de cuarzo.

En la figura 5 se ha ajustado a una recta el valor de la absorbancia medida a 280 nm frente a la concentración de anticuerpo libre, observándose una correlación muy buena ( $R=0,9978$ ). Al interpolar el valor de la absorbancia medida para el sobrenadante se ha observado un porcentaje de inmovilización del anticuerpo monoclonal del 80%.

### **Ejemplo nº 3: Estudio de la unión inespecífica sobre la superficie de las partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G**

En el diseño de un inmunosensor competitivo es muy importante tener controlado el efecto de la unión no específica sobre la superficie sólida en la que se lleva a cabo la etapa de  
5 inmovilización del elemento de biorreconocimiento y la etapa de competición.

En la figura 6 se ha representado el esquema de ensayo que hemos diseñado utilizando estas partículas magnéticas. Se trata de un esquema de inmunoensayo directo competitivo. Se utilizan partículas magnéticas como superficie sólida, y por lo tanto ha sido necesario evaluar el efecto de la unión inespecífica sobre las mismas.

10 Se han llevado a cabo dos experiencias en paralelo, en una de ellas se han utilizado partículas magnéticas sin el anticuerpo monoclonal y en la otra modificadas con el anticuerpo monoclonal de la FB1 tal y como se ha descrito en el ejemplo nº 1.

Se ha tomado el volumen correspondiente de partículas magnéticas (8 µl) modificadas con el anticuerpo monoclonal (5 mg/l) y se han depositado sobre el pocillo donde se han lavado  
15 tres veces con 300 µl de tampón PBS con ayuda del bloque magnético que se muestra en la figura 7.

Una vez se han depositado las partículas magnéticas se añaden 25 µl de FB1-HRP (1:100) y 25 µl de FB1 de las correspondientes concentraciones (5, 50 y 100 ng/ml) y se ha llevado a cabo el ensayo exactamente de la misma forma que ya se ha descrito en el ejemplo nº 1.

20 En la figura 8 se ha representado el valor de la absorbancia medida frente a la concentración de FB1 para las dos experiencias. Se observa una disminución de la señal a medida que aumenta la concentración de FB1 en la etapa de competición.

La experiencia que no contiene el anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas demuestra que no hay unión inespecífica de la FB1-HRP sobre las partículas  
25 magnéticas, pues la absorbancia es muy próxima a cero en todos los casos.

### **Ejemplo nº 4: Optimización del tiempo de la etapa de competición con el esquema de ELISA magnético**

El tiempo de la etapa de competición es un parámetro muy importante en el diseño de un inmunosensor competitivo, ya que puede afectar tanto a la unión específica como a la unión

inespecífica sobre la superficie sólida del inmunosensor, es decir, sobre la superficie sólida de las partículas magnéticas.

Si el tiempo de competición es insuficiente, se traduce en un resultado escasamente sensible, ya que la reacción de afinidad antígeno-anticuerpo no habrá tenido lugar en su totalidad. Se obtendrá una señal analítica menor a la que se puede obtener. También puede contribuir a que la reacción de competición entre al anticuerpo y el analito marcado no trascorra en la extensión adecuada.

Por el contrario, si el tiempo de la etapa de competición es elevado o superior al necesario, se va a producir una elevada unión inespecífica sobre la superficie sólida del inmunosensor, en nuestro caso, las partículas magnéticas.

Así pues, se han estudiado cuatro tiempos diferentes (15, 30, 45 y 60 minutos) de la etapa de competición, y las demás etapas se mantienen igual que se ha descrito en el ejemplo nº 1.

En la figura 9 se ha representado el valor de absorbancia medido frente a la concentración de FB1 presente en el pocillo para los cuatro tiempos estudiados. La concentración de FB1 se ha modificado entre 0 y 100 ng/ml.

En esta figura 9, se puede observar que la mejor curva de calibrado y por lo tanto los mejores resultados, se obtienen al trabajar con un tiempo de la etapa de competición de 30 minutos. Cuando se ha trabajado con tiempos superiores (45 y 60 minutos) la absorbancia medida ha sido menor, lo cual puede ser debido a que se revierte el equilibrio de la unión antígeno-anticuerpo. Para tiempos menores (15 minutos) también se obtienen valores de absorbancia más bajos y por lo tanto una menor sensibilidad.

#### **Ejemplo nº 5: Optimización de la concentración de anticuerpo monoclonal FB1 y conjugado enzimático FB1-HRP**

En este ejemplo se describe cómo se optimizó la concentración de conjugado enzimático y de anticuerpo monoclonal en el diseño del inmunosensor. Ambos parámetros tienen mucha importancia en la señal analítica que se va a obtener tras la aplicación del sensor, pues van a ser determinantes en la sensibilidad obtenida con el inmunosensor.

La concentración de estos bioreactivos tiene que ser optimizada de forma que el conjugado enzimático no se encuentre ni en exceso ni en defecto con respecto al anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas. En el caso de que no exista competición, es decir, no haya FB1 en la etapa de competición, el conjugado enzimático tiene que estar en una concentración semejante a la de anticuerpo. En el momento en que haya FB1 en la etapa de competición, será capaz de desplazar a la FB1-HRP y por lo tanto disminuirá la señal analítica medida. Si por el contrario hubiese un exceso de FB1-HRP para este punto de no competición, se traduciría en que al añadir FB1 a la disolución, desplazaría a la FB1-HRP, pero al estar en un gran exceso no se observaría cambio en la señal analítica medida, y por lo tanto no tendríamos suficiente sensibilidad para bajas concentraciones de FB1 en la muestra.

En la figura 10 se ha representado el valor de absorbancia medida frente a varias diluciones de FB1-HRP (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/1000) para tres concentraciones de anticuerpo (1, 5 y 10 mg/l).

Se han tomado estas diluciones de conjugado enzimático para barrer un rango amplio de concentraciones del mismo, y las de anticuerpo se han seleccionado, partiendo de que en función de la capacidad de unión de las partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G, la concentración óptima es de 5 mg/l de anticuerpo monoclonal, por ello se han probado una más diluida y una más concentrada.

En esta figura se observa un máximo de absorbancia para la dilución de FB1-HRP 1/100 en *dilution buffer* (tampón suministrado por Europroxima para la dilución del conjugado enzimático), observándose el máximo valor de absorbancia para una concentración de anticuerpo de 10 mg/l, sin embargo no hay mucha diferencia entre la absorbancia medida al utilizar anticuerpo de 5 mg/l o bien de 10 mg/l.

Para cerciorarnos de cuál es la concentración óptima de anticuerpo monoclonal a inmovilizar, se ha realizado el calibrado para concentraciones variables de FB1 entre 0 y 100 ng/ml. En la figura 11 se ha representado el valor de absorbancia frente a la concentración de FB1 para estas tres concentraciones de anticuerpo.

Los mayores valores de absorbancia, y los mejores parámetros tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo basado en el modelo de los cuatro parámetros logísticos, se han obtenido al trabajar con una concentración de anticuerpo inmovilizado de 10 mg/l. Según se puede ver en la tabla 1 se obtiene una absorbancia máxima de 0,589 en ausencia de competición y

una absorbancia mínima de 0,025 para la máxima concentración de FB1 estudiada (100 ng/ml), el EC<sub>50</sub> es de 16,426 y la pendiente de 1,466 ng/ml. Para las tres concentraciones de anticuerpo estudiadas el ajuste sigmoideo ha sido perfecto, ya que se obtiene un valor del coeficiente de correlación de 1.

- 5 Tabla 1. Optimización de la concentración de anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas. Concentraciones estudiadas: 1, 5 y 10 mg/l. ELISA magnético espectrofotométrico.

[mAbFB1] (mg/l)	A <sub>max</sub>	A <sub>min</sub>	EC <sub>50</sub> (ng/ml)	Pendiente (ng/ml)	R
1	0,151	-0,048	7,57	0,003	1
5	0,352	0,007	15,027	1,277	1
10	0,589	0,025	16,426	1,466	1

**Ejemplo nº 6: Optimización de la cantidad de partículas magnéticas (figura 12, tabla 2)**

- 10 Una vez se han optimizado la concentración del anticuerpo a inmovilizar sobre las partículas magnéticas, así como la de conjugado enzimático utilizado en la etapa de competición, un parámetro que también debemos considerar es la cantidad de partículas magnéticas que se depositan en cada pocillo de la placa para llevar a cabo el análisis.

- 15 Los estudios que se han mostrado hasta ahora se han realizado utilizando 5 µg de partículas magnéticas ya modificadas con el anticuerpo monoclonal. En este ejemplo se han estudiado tres cantidades de partículas magnéticas (5, 9 y 15 µg), la dilución de FB1-HRP es 1/100 en *dilution buffer* (Europroxima), la concentración de anticuerpo 10 mg/l.

En la figura 12 se ha representado la absorbancia medida frente a la concentración de FB1 (0-100 ng/ml) y se ha llevado a cabo el correspondiente ajuste sigmoideo para las tres cantidades de partículas magnéticas.

- 20 Se observa que al representar la sigmoide para las tres cantidades de partículas magnéticas, la máxima absorbancia, así como el menor valor de EC<sub>50</sub> (mayor sensibilidad) se han obtenido al utilizar 5 µg de partículas magnéticas. La pendiente tiene un valor de 1,402 y el coeficiente de regresión 1 (tabla 2).

Tabla 2. Optimización de la cantidad de partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo monoclonal. Cantidades estudiadas: 5, 9 y 15 µg. ELISA magnético espectrofotométrico.

MBs (µg)	A <sub>max</sub>	A <sub>min</sub>	EC <sub>50</sub> (ng/ml)	Pendiente (ng/ml)	R
5	0,205	0,015	15,618	1,402	1
9	0,175	-0,027	48,353	1,257	1
15	0,180	-8,338	1971,5	1,393	0,9504

**Ejemplo nº 7: Calibrado completo usando ELISA magnético y las condiciones optimizadas**

- 5 Una vez optimizadas todas las condiciones para llevar a cabo el ELISA utilizando partículas magnéticas se ha realizado un calibrado completo (8 puntos) modificando la concentración de FB1 entre 0 y 100 ng/ml. En la figura 13 se ha representado el valor de la absorbancia medida frente a la concentración de FB1, y se ha utilizado la ecuación del ajuste de los cuatro parámetros logísticos para obtener los valores numéricos que se muestran en la tabla
- 10 3.

$$f(x) = A_{min} + \frac{(A_{max} - A_{min})}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^m}$$

Tabla 3. Parámetros del ajuste de los cuatro parámetros logísticos tras representar la Abs medida frente a la concentración de FB1.

Parámetros	ng/ml
Mínimo	0,01413
Máximo	0,1931
Pendiente-Sensibilidad	1,554
IC <sub>50</sub>	6,462

- 15 El protocolo de trabajo que se ha seguido para realizar este calibrado es el mismo que ya se ha descrito en ejemplos anteriores, fijando las condiciones que se han optimizado previamente.

Concentración de FB1-HRP: 1/100

Concentración mAbFB1: 10 mg/l

Tiempo de competición: 30 minutos

Temperatura competición: 25 ° C

5 En la figura 14 se muestra una fotografía de la diferente coloración que toma la disolución de los pocillos una vez se ha llevado a cabo la etapa de competición y de reacción enzimática.

### **Ejemplo nº 8: Efecto de las interferencias en el funcionamiento del inmunoensayo**

10 Durante el proceso de extracción y preconcentración de la muestra, hay veces que no se obtiene la selectividad y especificidad adecuadas, por lo que debemos comprobar las posibles interferencias de otros compuestos que puedan estar presentes en la matriz de nuestra muestra.

Las interferencias más destacadas van a ser otras micotoxinas, como por ejemplo la ocratoxina A (OTA), la ocratoxina B (OTB) o el deoxinivalenol (DON). Estas micotoxinas pueden estar presentes en las muestras de cereales en concentraciones semejantes a la FB1.

15 El anticuerpo monoclonal que hemos utilizado en el desarrollo, diseño, validación y optimización de este inmunosensor, es altamente específico y selectivo a la FB1, pero debemos comprobar el efecto de estas posibles interferencias.

20 Otro efecto que se debe tener en cuenta es el del disolvente de extracción de la muestra, en este caso la mezcla de extracción es metanol:agua (70:30, v:v). Se ha estudiado el efecto del metanol en porcentajes del 7 y 0,7 %, ya que en la mayoría de los casos es necesario disolver las muestras 10 ó 100 veces, para llevar a cabo su análisis y determinación.

25 El estudio del efecto de estas interferencias se ha hecho con el esquema ELISA magnético en los pocillos de la placa, siguiendo el protocolo de trabajo y las condiciones que se han descrito en el ejemplo nº 7. Se ha diseñado la experiencia de forma que se ha comparado el efecto en la señal de absorbancia en presencia de la FB1 (50 ng/ml) y en ausencia de la misma, cuando están o no presentes dichas interferencias.

En la figura 15 se muestran los efectos de estas interferencias. Se ha representado el valor de absorbancia medido frente a las diferentes situaciones, en presencia o ausencia de la FB1 durante la etapa de competición, y para varias interferencias.

Se observa, que en ausencia de FB1 no se produce descenso de la señal al añadir estas  
5 interferencias en una concentración de 50 ng/ml. En el caso de que haya FB1 en la etapa de competición el descenso de la absorbancia que se produce en presencia sólo de la FB1 es el mismo que cuando están presentes las demás interferencias.

Así pues, se puede concluir que este anticuerpo monoclonal es altamente selectivo a la FB1  
y no reacciona con otras micotoxinas que puedan estar presentes en las muestras de  
10 cereales. Además, la presencia de metanol no afecta en porcentajes del 0,7 y 7 % (v/v).

Además de estudiar el efecto de estos bajos porcentajes de metanol, se realizó un estudio adicional aumentando la concentración de metanol hasta el 90 %, y comprobar cuál es el límite de la concentración de este disolvente orgánico que puede estar presente en las muestras sin que afecte a la señal analítica medida.

15 Se llevó a cabo una experiencia muy semejante a la descrita en el párrafo anterior, y se modificó la concentración de metanol entre 0, 10, 30, 50, 70 y 90 %. En la figura 16 se ha representado la absorbancia para las diferentes situaciones en las que se modifica el porcentaje de metanol. El estudio se ha hecho para dos situaciones diferentes, aquélla en la que no hay etapa de competición y en la situación en la que hay etapa de competición

20 En ausencia de etapa de competición se observa claramente un descenso en la señal analítica, que se debe al efecto del incremento en el porcentaje de metanol. Se observa un descenso del 36,10 % en el valor de la absorbancia medida debido a la presencia de un 90 % de metanol en la muestra. El primer descenso acusado en la señal se ha observado con un 30 % de metanol (32,66 %) indica que en la muestra no podrá haber en ningún caso  
25 porcentajes de metanol superiores al 10 %, pues el descenso en la señal no será debido a la etapa de competición sino al efecto del metanol, que puede afectar tanto a la reacción de afinidad antígeno-anticuerpo como a la reacción enzimática.

Si nos fijamos en los resultados obtenidos cuando hay etapa de competición, se observa un descenso acusado de la señal debido a la presencia de FB1 (50 ng/ml), pero no se observa  
30 un mayor descenso en la señal debido al incremento de metanol en la disolución. Esto se

puede explicar, considerando que el efecto de la unión de la FB1 es predominante sobre la presencia del metanol y por lo tanto eclipsa este efecto y no deja verlo por separado.

Para estudiar más en profundidad el efecto de este disolvente orgánico en el funcionamiento de nuestro inmunoensayo, se ha realizado un calibrado completo, modificando la  
5 concentración de FB1 en la etapa de competición entre 0 y 100 ng/ml.

El procedimiento experimental es el mismo que ya se ha descrito en ejemplos anteriores. Se hizo el calibrado y el ajuste sigmoideo con el software GRAPHPAD para tres supuestos: 0, 20 y 30 % de metanol.

En la figura 17 se ha representado la absorbancia medida frente al logaritmo de la  
10 concentración de FB1 para los tres supuestos a estudiar.

Se observa claramente en la gráfica que la presencia de metanol disminuye la señal analítica medida, y por lo tanto supondrá una interferencia en la determinación que podría conducir en último lugar a falsos positivos, y por lo tanto a unos resultados erróneos en la determinación. Sin embargo, en las experiencias anteriores hemos demostrado que hasta  
15 un porcentaje del 10 % no afecta a la medida.

En la tabla 4 se han recopilado los valores numéricos del ajuste siguiendo el modelo de los tres parámetros logísticos. El máximo es mayor en el caso de no haber metanol en la disolución. La sensibilidad disminuye cuando aumenta el porcentaje de metanol, pues aumenta la pendiente de la parte lineal de la sigmoide. El valor de  $EC_{50}$  también aumenta  
20 con el porcentaje de metanol, lo cual es también indicativo de una menor sensibilidad en el análisis. Los valores de los coeficientes de correlación son muy cercanos a 1 en los tres casos, pero esto sólo es indicativo de que el ajuste sigmoideo es bueno en los tres.

Tabla 4. Comparación de los parámetros del ajuste sigmoideo sin metanol y en presencia de metanol (20 y 30 %). Abs frente a la concentración de FB1.

Parámetros 3-PL	No metanol	Metanol 20%	Metanol 30%
Mínimo	-0,009880	0,005570	-0,04241
Máximo	0,4057	0,2956	0,3139
LogIC <sub>50</sub>	1,193	1,220	1,485
IC <sub>50</sub>	15,59	16,60	30,52
R	0,9993	0,9978	0,9940

**Ejemplo nº 9: Determinación de FB1 y estudios de recuperación con ELISA magnético optimizado**

Para validar el ELISA magnético diseñado y desarrollado, se ha llevado a cabo un estudio de recuperación.

- 5 En este ejemplo se describe cómo se hizo el estudio de recuperación, utilizando un material de referencia certificado que no tiene FB1. Disponemos de dos materiales de referencia certificados, BCR-377 (harina de maíz) y BCR-396 (harina de trigo) que no contienen FB1 y el contenido de DON es <50 ng/g.

El protocolo utilizado en el laboratorio es:

- 10 1.- Pesar 1 g de cada una de las muestras. (BCR-377: 1,0035 g y BCR-396: 1,0022 g)
- 2.- Añadir 4 µl de FB1 (1000 mg l<sup>-1</sup>). Se lleva la alícuota a 100µl añadiendo 96 µl de agua mili Q.
- 3.- Agitar con ayuda de un agitador magnético durante toda la noche a temperatura ambiente.
- 15 4.- Continuar con el protocolo de extracción de la FB1. Tendré 1 gramo de muestra con 4000 ng g<sup>-1</sup> de FB1.

El porcentaje de metanol presente en estas muestras es del 1,75 %, por lo que se puede asegurar que no afectará a la señal analítica, ya que tal y como se ha demostrado en el ejemplo anterior, hasta un 10 % de metanol no afecta a la señal del inmunoensayo diseñado.

20

Una vez que se tiene la muestra preparada, se siguió el mismo procedimiento de trabajo que se ha descrito en el ejemplo nº 11.

El cálculo del porcentaje de recuperación se lleva a cabo utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \textit{Recuperación} = \frac{Y - X_i}{X_a} \cdot 100$$

Y = [muestra + patrón]= valor medido experimentalmente (interpolado en la signoidea)

$X_i = [\text{muestra}] = 0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ FB1}$ .

$X_a = [\text{patrón}] = 401,4 \text{ ng ml}^{-1} \text{ (BCR-377)} \text{ y } 400,9 \text{ ng ml}^{-1} \text{ (BCR-396)}$

El porcentaje de recuperación obtenido ha sido del 92 % y 94 % para ambos materiales de referencia certificados respectivamente.

5 **Ejemplo nº 10: Comparación con un Kit comercial para la determinación de FB1 en muestras de cereales**

La validación de este ensayo ELISA basado en la utilización de partículas magnéticas se ha llevado a cabo mediante la realización de un Kit ELISA convencional que se ha adquirido en la casa comercial Europroxima, siguiendo el protocolo experimental aconsejado por el  
10 fabricante.

La referencia del kit utilizado es 5121FUM1p[9]08.05.

Para validar este Kit ELISA se disponía de dos materiales de referencia certificados (CRMs) de un ensayo interlaboratorios en el que se participó el año 2011. Estos dos materiales de referencia certificados son MA1140A-1 y MA1140A-2, cuyo contenido en FB1 certificado es  
15 de 1178 y 3635 ng/g, respectivamente. En ambos casos se trata de harina de maíz.

El tratamiento de estas dos muestras consiste en pesar 1 g de muestra y extraerlo con 10 ml de metanol:agua (70:30, v:v), se agita con ayuda de un agitador magnético durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifuga a 1600 g durante 30 minutos también a temperatura ambiente, para separar el sólido y el sobrenadante.

20 Una vez se han separado las dos fases (líquido y sólido), se toma el sobrenadante con ayuda de una pipeta y se filtra con un filtro CHROMAFIL, 0,20µm. PET-20/25. Dicho sobrenadante se puede conservar en el frigorífico a 4° C.

Las dos muestras fueron analizadas mediante este Kit ELISA. En la tabla 6 se muestran los resultados numéricos que se obtuvieron. Este Kit ELISA tiene buena reproducibilidad, el  
25 valor del coeficiente de variación oscila entre 5 y 16 %, y la exactitud se puede considerar buena, con errores relativos del 12,6 y 15,7 % para la muestra 1 y 2 respectivamente. Para el análisis de las dos muestras se ha determinado el contenido de FB1 en dos réplicas.

Tabla 6. Valores numéricos tras llevar a cabo la interpolación de dos muestras certificadas (M111440A-1 y MA1140A-2) utilizando el calibrado resultante del ELISA magnético espectrofotométrico.

	MA1140A-1	MA1140A-2
[FB1] <sub>certificada</sub> (ng/ml)	0,1178	0,1454
CV (%)	16	5,2
[FB1] <sub>medida</sub> (ng/ml)	0,103	0,1225
Intervalo de confianza	0,035	0,012
Error (%)	12,6 (defecto)	15,7 (defecto)

### Ejemplo nº 11: Calibrado completo utilizando electrodos serigrafiados individuales

5 Una vez se han optimizado todas las condiciones para llevar a cabo este inmunoensayo, se trasladó al desarrollo de un inmunosensor electroquímico. El protocolo de trabajo es el mismo, se trabajó tomando como celda de reacción los pocillos de la placa, sólo que en este caso, la etapa de transducción es electroquímica y tiene lugar sobre la superficie de los electrodos serigrafiados de carbono de la casa comercial DropSens. En la figura 18 se han representado de forma esquemática los biorreactivos que se depositan sobre la superficie del electrodo para que tenga lugar la reacción enzimática y la etapa de detección electroquímica.

La etapa de competición tiene lugar en los pocillos de la placa, y luego se resuspenden las partículas en 20 µl de tampón PBS. A continuación se toman 10 µl de esta suspensión de partículas magnéticas y se depositan sobre la superficie del electrodo de trabajo, colocando debajo un campo magnético externo mediante un imán.

Para que tuviera lugar la reacción enzimática se añadieron 25 µl de hidroquinona (1,8 mM) y 25 µl de peróxido de hidrógeno (9,6 mM). Los sustratos de la reacción enzimática se añadieron sobre tampón PBS (0,1 M, pH 6,5). Se ajustó a este valor de pH porque la hidroquinona se oxida fácilmente en contacto con el aire y es más estable a valores de pH ácidos, además la enzima peroxidasa tiene una mayor actividad enzimática a valores de pH entre 6-7.

La reacción enzimática transcurrió durante 10 minutos a temperatura ambiente sobre la superficie del electrodo y finalmente se aplicó un salto de potencial mediante la técnica de cronoamperometría desde 0 hasta -0,25 V durante 90 s, con un acondicionamiento previo

durante 5 s a 0 V. Finalmente se tomó el valor de la corriente medida a 80 s y se representó en función de la concentración de FB1.

Los electrodos utilizados en este análisis han sido los de DropSens y un potenciostato Eco Chemie PGSTAT 10. En la figura 19 se muestra una representación esquemática de este tipo de electrodos, donde se ven el electrodo de trabajo, auxiliar y de referencia, así como los contactos eléctricos para conectarlo con el potenciostato.

En la figura 20 se ha representado el valor de la corriente medida en función de la concentración de FB1, usando las condiciones optimizadas que se han mostrado en el ejemplo nº 7.

10 Cada uno de los puntos de la sigmoide se corresponde al promedio de dos medidas. Se han obtenido valores de corriente que oscilan entre -0,77 y -0,30  $\mu\text{A}$ , y un valor de  $\text{EC}_{50}$  de 14,592 ng/ml. Los valores numéricos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Valores tras el ajuste de la ecuación de los cuatro parámetros logísticos (4-PL) con electrodos serigrafados individuales.

Parámetros Ajuste 4-PL	
Máximo	-0,77326
Mínimo	-0,30655
$\text{EC}_{50}$	14,592
Pendiente	1,4103
R	0,9805

15 **Ejemplo nº 12: Determinación de FB1 en muestras de cereales utilizando electrodo individuales**

El fin último de este inmunosensor electroquímico es determinar de forma cuantitativa el contenido de FB1 en muestras de cereales. El tratamiento de la muestra es bastante sencillo.

20 Para validar este inmunosensor electroquímico se disponía de dos materiales de referencia certificados (CRMs). Estos dos materiales de referencia certificados son MA1140A-1 y MA1140A-2, cuyo contenido en FB1 certificado es de 1178 y 3635 ng/g. En ambos casos se trata de harina de maíz.

El tratamiento de estas dos muestras consiste en pesar 1 g de muestra y extraerlo con 10 ml de metanol:agua (70:30, v:v), se agita con ayuda de un agitador magnético durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifuga a 1600 g durante 30 minutos también a temperatura ambiente, para separar el sólido y el sobrenadante.

- 5 Una vez se han separado las dos fases (líquido y sólido), se toma el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se filtra con un filtro CHROMAFIL, 0,20 µm. PET-20/25. Dicho sobrenadante se puede conservar en el frigorífico a 4° C.

El esquema de trabajo que se sigue es el mismo que ya se ha descrito en ejemplos anteriores, sólo que en el caso de la muestra, en lugar de añadir sobre el pocillo 25 µl de FB1 (patrón) se añaden 25 µl de muestra de harina de maíz.

10

En la figura 21 se ha representado la corriente en función de la concentración de FB1 y se han interpolado estas dos muestras. En la tabla 8 se muestran los valores numéricos después de realizar el ajuste sigmoideo siguiente el modelo de los cuatro parámetros logísticos.

- 15 Tabla 8. Ajuste con el modelo de los tres parámetros logísticos (3-PL) utilizando electrodos individuales SPCEs.

Parámetros Ajuste 3PL	
Máximo	-0,7065
Mínimo	-0,2958
LogEC <sub>50</sub>	0,6294
EC <sub>50</sub>	4,260
R	0,9967

Al interpolar las dos muestras se han obtenido errores del 21 y 3,49 % para MA1140A-1 y MA1140A-2, respectivamente.

En la tabla 9 se muestran los valores numéricos de los resultados obtenidos para las dos réplicas que se han hecho de cada muestra.

20

Tabla 9. Valores numéricos tras llevar a cabo la interpolación de dos muestras certificadas ((M111440A-1 y MA1140A-2) utilizando el calibrado anterior de los tres parámetros logísticos (3-PL). Detección cronoamperométrica con HQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

	MA1140A-1		MA1140A-2	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
Corriente medida ( $\mu\text{A}$ )	-0,394	-0,303	-0,345	-0,398
Promedio ( $\mu\text{A}$ )	-0,345		-0,387	
[FB1] <sub>certificada</sub> (ng/ml)	11,78		14,54	
CV (%)	18		20,8	
[FB1] <sub>medida</sub> (ng/ml)	10,193		15,07	
Intervalo de confianza	1,44		5,20	
Error (%)	13,47(defecto)		3,49 (exceso)	

Los resultados que se han obtenido para este material de referencia certificado al realizar estudios de recuperación son:

BCR-377: Dilución 1:40, concentración final  $10,03 \text{ ng ml}^{-1}$ .

Valor certificado:  $10,03 \text{ ng ml}^{-1}$

- 5 Valor experimental:  $8,31 \text{ ng ml}^{-1}$  (coeficiente de variación del 7 %) Si tenemos en cuenta el factor de dilución (40) el valor experimental de FB1 ha sido de  $332,6 \text{ ng ml}^{-1}$ .

Error relativo: 17 % (por defecto).

Intervalo de confianza 95%:  $(8,31 \pm 2,92 \cdot 3,14/\sqrt{2}) = 6,48 \text{ ng ml}^{-1}$

- 10 Teniendo en cuenta los valores de error relativo y coeficiente de variación que se han mostrado, se puede concluir que la precisión y reproducibilidad son buenos.

Sólo se ha podido llevar a cabo este cálculo para la muestra BCR-377.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{332,6}{401,4} \cdot 100$$

El % de Recuperación para la muestra BCR-377 obtenido ha sido del 83 %.

### Ejemplo nº 13. Optimización y validación del calibrado electroquímico con el sensor múltiple de ocho electrodos

- 15 Descripción gráfica del dispositivo usado

Una vez han sido optimizadas las condiciones del inmunosensor y también la etapa de transducción electroquímica, se ha dado un paso más, tendiendo a la miniaturización y portabilidad de este dispositivo sensor. Se trata de utilizar un potencióstato portable de la casa comercial PalmSens en combinación con un sensor múltiple que contiene ocho electrodos individuales, cada uno de los cuales tiene electrodo de trabajo, referencia y auxiliar. En la figura 22 se observa una fotografía de estos electrodos, que en combinación con el potencióstato portable dotan a este dispositivo sensor de la portabilidad adecuada para cumplir con los objetivos que se habían planteado al comienzo del desarrollo de esta invención.

Este sensor múltiple tiene unas dimensiones de 40 mm x 84 mm, y se usa junto con el conector de PalmSens que dispone de 24 conexiones, ya que en cada electrodo individual hay tres conexiones, para los tres electrodos. Sobre este sensor se coloca una placa de metacrilato que cuenta con ocho celdas de reacción, para evitar que se mezclen los reactivos de los diferentes electrodos individuales. De esta forma se consigue disponer de ocho celdas electroquímicas individuales.

Cuando se trabaja con partículas magnéticas, como en nuestra invención, es necesario colocar un imán debajo de cada electrodo, de forma que sólo afecte al área superficial del electrodo de trabajo.

Existía la posibilidad de utilizar diferentes sustratos de la reacción enzimática y además dos técnicas electroquímicas diferentes para llevar a cabo la etapa de transducción electroquímica.

En primer lugar se trabajó con este electrodo de ocho canales usando el compuesto 3,3',5,5'-trimetilbencidina (TMB) como sustrato de la reacción enzimática, ya que era el mismo que se había utilizado en el ELISA magnético optimizado, pero en este caso se detectará el producto de la reacción enzimática electroquímicamente mediante la técnica de voltametría de pulsos diferenciales (DPV). Las condiciones electroquímicas que se fijaron en el potencióstato fueron:

E inicial: 0,3V

E final: -0,1V

E paso: 0,003V

E pulso: 0,028 V

Velocidad de barrido: 0,01 V/s

t pulso: 0,07s

El protocolo de trabajo es el mismo que se ha descrito cuando se trabaja con electrodos  
5 individuales, sólo que en este caso, la suspensión final de partículas magnéticas (20 µl) se  
añade en su totalidad sobre la superficie de los electrodos y luego se añaden 80 µl de TMB.  
Este cambio en la metodología de trabajo es debido a que la superficie de los electrodos del  
nuevo sensor *array* es menor que en el caso de los electrodos individuales, y una mayor  
cantidad de partículas magnéticas nos dará una mayor corriente medida y por lo tanto mayor  
10 sensibilidad en el análisis de FB1.

Las corrientes medidas fueron muy bajas y el ajuste sigmoideo no fue correcto, por lo que se  
decidió cambiar la técnica electroquímica.

El funcionamiento de este sustrato electroquímico se estudió con la técnica de  
amperometría.

15 En primer lugar se realizaron varios voltagramas para fijar el potencial a aplicar en esta  
técnica de medida. En la figura 23 se observa que el TMB después de ser oxidado por la  
HRP, presenta dos picos de reducción, uno en torno a +0,35 V y otro a +0,2 V.

Para detectar electroquímicamente el producto de oxidación del TMB tras llevar a cabo la  
reacción enzimática, se fijan en el potencióstato las siguientes condiciones:

- 20
- Amperometría, modo *alternado*.
  - Potencial: -0,2 V
  - Potencial de acondicionamiento: +0,45 V
  - Potencial de deposición: 0 V
  - Potencial de reposo: 0 V
- 25
- Intervalo: 0,25 s
  - Tiempo: 90 s
  - Tiempo de acondicionamiento: 5 s
  - Tiempo de deposición: 0 s
  - Tiempo de equilibrio: 0s

Sobre la superficie de cada uno de los electrodos serigrafiados se depositaron 20 µl de partículas magnéticas y a continuación 80 µl del sustrato electroquímico TMB. Se estudiaron dos tipos de TMB, uno normal y otro *supersensitive* (en teoría 40 % más rápido). Se estudiaron dos tiempos de reacción enzimática diferentes con estos dos sustratos, 5 minutos para el supersensitive y 10 minutos para el normal. En la figura 24 se observan las dos curvas sigmoideas obtenidas.

Se observa una mayor señal electroquímica al trabajar con TMB normal y 10 minutos de reacción enzimática.

Se estudió el tiempo de reacción enzimática para cada uno de estos sustratos enzimáticos. El tiempo de la reacción enzimática se modificó entre 90 s, 5 y 10 minutos. En la tabla 10 se muestran los cuatro parámetros logísticos para los tres tiempos tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo en el caso de utilizar TMB *supersensitive*.

Tabla 10. Parámetros logísticos para tres tiempos de reacción enzimática (90 s, 5 y 10 minutos) tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo y TMB *supersensitive*.

Parámetros	90 segundos	5 minutos	10 minutos
Máximo	-0,1883	-0,3606	-0,5422
Mínimo	0,003638	0,01103	0,01032
LogIC <sub>50</sub>	0,4616	0,4865	0,5171
Pendiente	1,136	1,289	1,584
IC <sub>50</sub>	2,895	3,065	3,290
R	0,9843	0,9892	0,9929
% Descenso señal	98,1%	96,9%	98,1%

En la tabla 10 se observa que a medida que aumenta el tiempo de reacción aumenta el máximo de la curva y también el valor de IC<sub>50</sub>, por lo que el ensayo es menos sensible.

En el caso de usar el TMB normal como sustrato de la reacción enzimática con HRP, se obtuvieron los siguientes parámetros logísticos.

Tabla 11. Parámetros logísticos para tres tiempos de reacción enzimática (90 s, 5 y 10 minutos) tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo y TMB normal.

Parámetros	90s	5min	10 min
------------	-----	------	--------

Máximo	-0,6794	-1,078	-1,569
Mínimo	0,02601	0,001346	-0,003805
LogIC <sub>50</sub>	-0,2878	0,03497	0,1912
Pendiente	0,5891	1,172	1,528
IC <sub>50</sub>	0,5155	1,084	1,553
R	1	1	1
% Descenso de señal	96,2%	99,9%	99,8%

En la tabla 11 se observa que para los tres tiempos de reacción enzimática estudiados el máximo de la señal es mayor, y el valor del IC<sub>50</sub> es menor en todos los casos, por lo que el trabajo con TMB normal (contrariamente a lo esperado) nos ha reportado mayor sensibilidad.

- 5 Utilizando esta técnica amperométrica, es posible medir en dos modos en el potencióstato que se utiliza en esta invención: modo alternado y modo consecutivo. Estos dos modos de medida se diferencian en que en el primero se lleva a cabo la medida de los ocho electrodos simultáneamente mientras que en el segundo la medida es consecutiva, por lo que en el primer modo la medida se lleva a cabo en 90 s y en el segundo modo cuesta cerca de 25 minutos.
- 10

Tabla 12. Valores de corrientes medidas con modo alternado o consecutivo. Comparación de DSR (%).

Alternado (µA)	Consecutivo (µA)
-0,1155	-0,06235
-0,1306	-0,06639
-0,1328	-0,07026
-0,1367	-0,07137
-0,1091	-0,05904
-0,1019	-0,05552
-0,1014	-0,05753
-0,1104	-0,05290
% DSR (n=8) = 12,06 %	% DSR (n=8)= 11,07 %

En la tabla 12 se observa que la reproducibilidad obtenida con estos dos modos de medida es muy semejante, por lo que se selecciona el modo alternado como más óptimo ya que es mucho más rápido.

Además de estudiar el TMB como sustrato electroquímico, también se llevó a cabo un  
5 calibrado utilizando la hidroquinona (HQ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como sustrato y cosustrato de la reacción enzimática, y la técnica electroquímica seleccionada fue la amperometría. No se probó con la técnica DPV, porque en estudios preliminares se había observado un elevado ruido de fondo de la señal electroquímica medida tras la reacción enzimática de la HRP con la HQ y  $H_2O_2$ .

10 En este caso las condiciones que se fijaron en el potenciostato PalmSens fueron:

Potencial de acondicionamiento: 0 V

Potencial de deposición: 0 V

Intervalo: 0,1 s

Pasos: 1 s

15 Tiempo de acondicionamiento: 0 s

Tiempo de deposición: 0s

Tiempo de equilibrio: 0s

Ciclos: 1 s

E(1): -0,35 V

20 t (1): 90s

Una vez ha tenido lugar la etapa de competición en el pocillo de la placa, se lavan las partículas magnéticas y se resuspenden en 20  $\mu$ l de tampón PBS (0,1 M, pH 6,5), se pipetea con mucho cuidado y se depositan sobre las celdas de cada uno de los electrodos. Finalmente, para que tenga lugar la reacción enzimática, se añaden 40  $\mu$ l de HQ  
25 (concentración final de 1,8 mM) y 40  $\mu$ l de  $H_2O_2$  (concentración final de 9,6 mM), se espera 10 minutos de tiempo de reacción y se mide aplicando un salto de potencial de -0,35 V

En la figura 25 se ha representado la corriente medida a un tiempo constante (80 s) frente a la concentración de FB1 (detección amperométrica, modo alternado). Y en la tabla 13 se han representado los cuatro parámetros logísticos tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo.

5 Tabla 13. Parámetros de la ecuación de los 4-PL tras llevar a cabo el calibrado con los electrodos múltiples (CH8), hidroquinona y peróxido de hidrógeno como sustrato y cosustrato de la reacción enzimática con HRP.

Parámetros	
Mínimo	-1,353
Máximo	-0,1353
Pendiente	0,7802
IC <sub>50</sub>	1,245
R	0,9985
% Descenso de señal	86%

Así pues, se puede concluir que usando este par de sustratos y la técnica de amperometría, la detección electroquímica tiene una sensibilidad similar (EC<sub>50</sub> 1,245 ng/ml frente a 1,553 ng/ml) el caso de usar el TMB también con esta técnica de detección electroquímica.

10 En la figura 26 se muestran dos curvas de calibrado correspondientes a los modos de medida alternado y consecutivo utilizando hidroquinona y peróxido de hidrógeno como sustratos de la reacción enzimática con HRP.

Se observa que las corrientes medidas con el modo alternado son tres veces mayores (-1,5 µA frente a -0,5 µA) a las medidas por el modo consecutivo.

15 En la tabla 14 se han recopilado los parámetros logísticos tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo.

Tabla 14. Parámetros de la ecuación de los 4-PL tras llevar a cabo el calibrado con los electrodos múltiples (CH8), hidroquinona y peróxido de hidrógeno como sustrato y cosustrato de la reacción enzimática con HRP, modo alternado y consecutivo.

Parámetros	Alternado	Consecutivo
Máximo	-1,606	-0,4068
Mínimo	-0,1721	-0,0798

Pendiente	3,562	0,8259
IC <sub>50</sub>	4,609	2,068
R	0,9993	0,9985
% Descenso de señal	89,9	80,4%

Estudios de reproducibilidad

En primer lugar se estudió la reproducibilidad entre los ocho electrodos que constituyen el sensor, realizando en los ocho pocillo el mismo ensayo, que consiste en añadir el volumen fijado de partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo monoclonal (8 µl) y el volumen correspondiente del conjugado enzimático FB1-HRP (25 µl). Hasta 100 µl se añade el volumen necesario de PBS (0,1 M, pH 7,4).

La determinación electroquímica se hace mediante la técnica electroquímica de cronoamperometría, aplicando un salto de potencial de -0,25 V durante 90 s, y se toma el valor de la corriente a 80 s.

10 Tras llevar a cabo esta experiencia se calculó la DSR (%) y resultó ser del 4,7 %.

En la figura 27 se ha representado el valor de la corriente medida en cada uno de estos electrodos individuales, observándose en todos los casos corrientes cercanas a -0,3 µA.

Un segundo estudio de reproducibilidad que se llevó a cabo con este dispositivo sensor fue el estudio de la reproducibilidad en el calibrado entre electrodos diferentes. El mismo día se llevaron a cabo dos calibrados utilizando dos electrodos múltiples diferentes.

Según se puede ver en la figura 28 los dos calibrados son diferentes y en la tabla 15 los valores numéricos tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo, y además se han comparado estadísticamente con el software GRAPHPAD y el resultado final es que los cuatro parámetros (máximo, mínimo, pendiente y EC<sub>50</sub>) son diferentes para ambos calibrados, trabajando con una probabilidad del 95 %.

Tabla 15. Valores numéricos tras llevar a cabo la interpolación de dos muestras certificadas ((M111440A-1 y MA1140A-2) utilizando el calibrado anterior de los cuatro parámetros logísticos (4-PL). Detección cronoamperométrica con HQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

	MA1140A-1	MA1140A-2
--	-----------	-----------

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
Corriente medida ( $\mu\text{A}$ )	-0,101	-0,098	-0,124	-0,116
Promedio ( $\mu\text{A}$ )	-0,0995		-0,120	
[FB1] <sub>certificada</sub> (ng/ml)	11,78		14,54	
CV (%)	17,21		8,45	
[FB1] <sub>medida</sub> (ng/ml)	12,464		13,704	
Intervalo de confianza	0,785		0,524	
Error relativo (%)	5,80		5,75	

Estos calibrados se han llevado a cabo con las condiciones optimizadas que ya se han descrito previamente en este mismo ejemplo.

#### Tiempo de vida del inmunosensor

Otro estudio llevado a cabo es el estudio del tiempo de vida del inmunosensor, para ello se ha estudiado la actividad del anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas. Se conjugaron 10  $\mu\text{l}$  de partículas magnéticas modificadas con proteína G con la cantidad correspondiente de anticuerpo monoclonal, tal y como ya se ha descrito en otros ejemplos. Se conserva esta suspensión a 4 °C y se realiza el estudio de la reacción de afinidad con el conjugado enzimático FB1-HRP todos los días. Se ha estudiado durante 4 semanas, y los valores de absorbancia medida se han representado en el gráfico de control que se muestra en la figura 29. En esta gráfica se puede ver que el valor de la absorbancia medido se mantiene en todos los casos entre el límite de control superior e inferior, por lo que podemos considerar que el valor de la absorbancia se mantiene constante a lo largo del tiempo y por lo tanto la reproducibilidad de nuestro inmunosensor. Se observa que a partir del día 22 se produce un descenso acusado de la señal del inmunosensor, por lo que el tiempo de vida de este inmunosensor es de tres semanas aproximadamente.

El conjugado enzimático FB1-HRP (dilución 1/100) se ha preparado en el mismo momento que las partículas magnéticas, y se ha estudiado el efecto de los dos parámetros conjuntamente.

#### 20 **Ejemplo nº 14: Determinación de FB1 en cereales utilizando un sensor múltiple de ocho electrodos**

##### Determinación de FB1 en muestras de cereales

Se ha llevado a cabo el proceso de tratamiento de muestra tal y como se ha descrito en ejemplos anteriores, y se ha cuantificado el contenido de FB1 utilizando este dispositivo de inmunosensor electroquímico con partículas magnéticas.

5 En estas últimas experiencias con el sensor múltiple de ocho electrodos, el conjugado enzimático FB1-HRP dilución 1/100 utilizado hasta la fecha con esa dilución, pasó a ser utilizado con una dilución de 1/200, ya que con la dilución 1/200 las señales eran suficientemente grandes para realizar correctamente el calibrado, llegando a un compromiso económico con el volumen del mismo.

10 Para realizar la determinación cuantitativa de la concentración de FB1 se puede optar por varios formatos:

1. Calibrado de cuatro puntos y determinación de dos muestras por duplicado

15 Se ha llevado a cabo el proceso de tratamiento de muestra tal y como se ha descrito en ejemplos anteriores, y se ha cuantificado el contenido de FB1 utilizando este dispositivo de inmunosensor electroquímico con partículas magnéticas. Se ha utilizado la técnica de amperometría (modo alternado) aplicando un potencial constante de -0,35 V durante 90 s y se ha tomado el valor de la corriente a 80 s.

Se han utilizado dos materiales de referencia certificados:

MA1140A-1: 14,725 ng/ml

MA1140A-2: 18,171 ng/ml

20 En la tabla 16 se han recopilado los resultados de la determinación de FB1 en estas dos muestras de maíz, obteniéndose valores de concentraciones de FB1 de 16,699 y 20,141 ng/ml respectivamente para las dos muestras MA1140A-1 y MA1140A-2, lo que supone un error relativo del 13 y 10 % por exceso respectivamente.

25 Tabla 16. Valores numéricos tras llevar a cabo la interpolación del material de referencia certificado TR FC-433 utilizando el calibrado de los cuatro parámetros logísticos (4-PL). Detección amperométrica (modo alternate) con HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,6 mM).

Muestra	Valor certificado (µg/kg)	Valor HPLC (µg/kg)	Inmunosensor (µg/kg)

		(n=2)	(n=4)
TR-FC-433	1500±400	1320,35 ± 116,21	1648,8,669 ± 118,3
Haricaman	---	307,42 ± 85,45	391,871 ± 90,8

Para cada una de las muestras se han realizado dos réplicas, y se ha calculado un coeficiente de variación del 6 y 8 % respectivamente para las dos muestras analizadas.

Esta misma determinación se ha llevado a cabo utilizando TMB normal como sustrato de la reacción enzimática, detección amperométrica con las condiciones electroquímicas fijadas y calibrado de cuatro puntos. Para ello se utilizó un material de referencia certificado diferente (TR-FC-433) y una harina comercial (Marca Haricaman). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 18.

Tabla 17. Determinación de FB1 en un CRM (TR-FC-433), y una muestra de harina comercial, validación con HPLC-FLD. Calibrado de cuatro puntos y análisis de dos réplicas de dos muestras.

Muestra	Valor certificado (µg/kg)	Valor HPLC (µg/kg) (n=2)	Inmunosensor (µg/kg) (n=4)
TR-FC-433	1500±400	1320,35 ± 116,21	1358,669 ± 278,5
Haricaman	---	307,42 ± 85,45	382,871 ± 110,2

## 2. Calibrado de ocho puntos y determinación de muestras

Se ha llevado a cabo el proceso de tratamiento de muestra tal y como se ha descrito en ejemplos anteriores, y se ha cuantificado el contenido de FB1 utilizando este dispositivo de inmunosensor electroquímico con partículas magnéticas. Se ha utilizado la técnica de amperometría aplicando un potencial constante de -0,35 V durante 90 s y se ha tomado el valor de la corriente a 80 s, usando la hidroquinona y el peróxido de hidrógeno como sustratos de la reacción enzimática de la HRP.

Se ha utilizado un material de referencia certificado y una harina comercial Haricaman:

Tabla 18. Determinación de FB1 en un CRM (TR-FC-433), y una muestra de harina comercial de maíz, validación con HPLC-FLD. Calibrado de ocho puntos y análisis de dos réplicas de dos muestras.

Muestra	Valor certificado (µg/kg)	Valor HPLC (µg/kg) (n=2)	Inmunosensor (µg/kg) (n=4)
TR-FC-433	1500±400	1320,35 ± 116,21	1345,9 ± 113,8
Haricaman	---	307,42 ± 85,45	334,5 ± 85,23

El mismo tratamiento de muestra se ha llevado a cabo utilizando TMB como sustrato electroquímico de la reacción enzimática. En la tabla 19 se muestran los valores de concentraciones de FB1 obtenidos.

Tabla 19. Determinación de FB1 en un CRM (TR-FC-433), y una muestra de harina comercial de maíz, validación con HPLC-FLD. Calibrado de ocho puntos y análisis de dos réplicas de dos muestras.

Muestra	Valor certificado (µg/kg)	Valor HPLC (µg/kg) (n=2)	Inmunosensor (µg/kg) (n=4)
TR-FC-433	1500±400	1320,35 ± 116,21	1484,5,8 ± 299,9
Haricaman	---	307,42 ± 85,45	236,8 ± 23,2

**Ejemplo nº 15. Validación del inmunosensor electroquímico múltiple**

El último ejemplo de realización de esta invención incluye la validación del inmunosensor múltiple haciendo uso de varias técnicas analíticas, entre ellas la metodología oficial de cromatografía líquida de alta resolución y un ELISA comercial (ya descrito en el ejemplo nº 10), así como nuestro ELISA inmunomagnético optimizado a lo largo del desarrollo de esta invención.

El procedimiento de trabajo en HPLC incluye los siguientes pasos y condiciones experimentales:

1. Extracción de la muestra- Pesar 2 g de muestra en un vial de 25 ml. (En este caso ha sido de centrifuga de 15 ml, suficiente)

CRM TR FC-433: 1,9961g

CRM TR FC-433: 2,0037g

- Añadir 5 ml de disolvente de extracción (acetonitrilo:metanol:agua, 25:25:50).

- Agitar durante 20 minutos en un agitador orbital.

5 - Centrifugar durante 10 minutos a 2500 x g.

- Pasarlo a través de un filtro Whatman nº4, 12 cm (filtración por gravedad), evitando poner en contacto el material sólido con el filtro.

- Recoger el filtrado en un material limpio.

10 - Extraer de nuevo el material sólido añadiendo 5 ml de disolvente de extracción a un bote de centrifuga y agitando durante 20 minutos. Centrifugar durante 10 minutos a 2500 x g.

- Filtrar en el mismo papel de filtro. Recoger y juntar los dos filtrados anteriores.

- Transferir 1 ml del extracto filtrado en un vaso limpio.

- Diluir el eluido con 4 ml de PBS. Agitar.

- Filtrar a través de un filtro de 0,22 µm.

15 - Recogerlo en un vaso limpio.

## 2. Columna cromatográfica

- Pipetear 1 ml del extracto filtrado y pasarlo a través de la columna de inmunoafinidad a una velocidad de unas 1-2 gotas/s.

20 - Pasar 1 ml de tampón PBS a través de la columna (1-2 gotas /s) hasta acabar pasando un poco de aire por la columna.

- Colocar el vial debajo de la columna.

- Eluir la columna pasando 1,5 ml de metanol (grado HPLC) a una velocidad de 1 gota/s o menos. Recoger el eluido en un vial de 4 ml.

- Secar el eluido bajo una corriente de nitrógeno a 60 °C. Redisolver el eluato en 400 µL de acetonitrilo:agua (50:50, v/v).

- Transferir 200 µl de las alícuotas a tubos de 1 ml y añadir 200 µl del reactivo OPA. Mezclar durante 30 segundos en un agitador vortex.

5 - Inyectar 50 µl del derivado en el sistema HPLC, exactamente 3 minutos después de haber añadido el reactivo OPA.

### 3. Condiciones en el HPLC

- Columna: Fase reversa C18 (Waters Nova Pack C18, 3,5µm, 4,6 x 75mm)

10 - Fase móvil: metanol / dihidrógeno fosfato de sodio (0.1 M)(77:23 v/v) desgasificada, pH 3.3 con ácido ortofosfórico.

- Velocidad de flujo: 0.8 ml/min

- Detector fluorescente: Waters 474 , excitación: 335 nm, emisión: 440 nm.

- Ganancia: 5

- Tiempo de retención: ~ 8.3 min para la fumonisina B1.

### 15 4. Recta de calibrado

Se preparó una recta de calibrado de 6 puntos de concentraciones de FB1 de 0, 40, 100, 150, 200 y 300 ng/ml.

Los puntos se prepararon en acetonitrilo:agua (50:50, v/v) al igual que todas las muestras extraídas.

20 En primer lugar se realizaron las medidas con ganancia 20, pero viéndose saturación de la señal a mitad de la recta, se bajó la ganancia hasta 5, obteniéndose buenos resultados.

En la tabla 20 se han indicado los valores numéricos obtenidos al determinar la concentración de FB1 en este material de referencia certificado, observándose una muy buena correlación entre los resultados obtenidos y unos errores relativos inferiores al 15 %  
25 en todos los casos.

Tabla 20. Validación del inmunosensor electroquímico mediante varias técnicas analíticas, usando el material de referencia certificado FC-433, de concentración  $1500 \pm 400 \mu\text{g/kg}$  (n=5).

Material de referencia certificado (harina de maíz)	HPLC -FLD [FB1] ( $\mu\text{g/kg}$ ) (95%)	ELISA comercial [FB1] ( $\mu\text{g/kg}$ ) (95%)	ELISA magnético [FB1] ( $\mu\text{g/kg}$ ) (95%)	Inmunosensor electroquímico [FB1] ( $\mu\text{g/kg}$ ) (95%)	[FB1] certificada ( $\mu\text{g/kg}$ ) (95%)
FC-433	$1347 \pm 391$	$1610 \pm 358$	$1724 \pm 284$	$1346 \pm 609$	$1500 \pm 400$
Error (%)	-10,3	7,326	14,942	-10,3	-

## REIVINDICACIONES

1. Kit que comprende un anticuerpo monoclonal de la micotoxina FB1 inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G, un conjugado FB1-HRP que comprende la micotoxina FB1 unida a una enzima peroxidasa de rábano picante HRP, un sustrato y un cosustrato enzimáticos de dicha enzima HRP que comprende hidrokuinona y peróxido de hidrógeno, disolución tampón y un inmunosensor electroquímico que comprende un potencióstato portable, un electrodo múltiple, preferiblemente de 8 electrodos serigrafados de carbono, un soporte y un sistema de imanes.
2. El kit, según la reivindicación 1, donde el anticuerpo monoclonal FB1 inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G está en forma de suspensión en disolución tampón.
3. El kit, según la reivindicación anterior, donde el anticuerpo monoclonal FB1 tiene una concentración de entre 5 y 15 mg/l.
4. El kit, según la reivindicación anterior, donde el anticuerpo monoclonal FB1 tiene una concentración de 10 mg/l.
5. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el conjugado FB1-HRP que comprende la micotoxina FB1 unida a una enzima peroxidasa de rábano picante HRP está diluido en la disolución tampón en una proporción 1 a 200.
6. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cantidad de micropartículas magnéticas necesarias está en un rango comprendido entre 5 y 10  $\mu\text{g}$ .
7. El kit, según la reivindicación anterior, donde la cantidad de micropartículas magnéticas necesarias es de 5  $\mu\text{g}$ .
8. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde las micropartículas magnéticas tienen un diámetro de entre 2,5  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$ .
9. El kit, según la reivindicación anterior, donde las micropartículas magnéticas tienen un diámetro de 2,8  $\mu\text{m}$ .
10. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la disolución tampón es una disolución fosfato salina que se selecciona de la lista que comprende PBS, PBST o cualquiera de sus combinaciones.
11. El kit, según la reivindicación anterior, donde la disolución tampón está a una concentración de 0,1 M.
12. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la disolución tampón se encuentra a un pH de entre 6.5 y 7.5.

13. El kit, según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 12 donde el soporte se selecciona de la lista que comprende una placa de microvaloración ELISA o soporte de plástico o cuentas.
14. Un método para determinar y cuantificar electroquímicamente la micotoxina FB1 en una muestra utilizando el kit, según las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las siguientes etapas:
- a) poner en contacto una muestra a analizar, diluida en disolución tampón, con una disolución de un conjugado enzimático FB1-HRP que comprende la micotoxina FB1 unida a una enzima peroxidasa de rábano picante HRP,
- b) añadir una suspensión del anticuerpo monoclonal de FB1 inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G en disolución tampón sobre la disolución obtenida en la etapa a),
- c) agitar y aplicar un campo magnético mediante un sistema de imanes,
- d) añadir la suspensión de la etapa c) sobre un electrodo múltiple, preferiblemente de 8 electrodos serigrafiados de carbono,
- f) añadir una disolución de un sustrato y cosustrato enzimáticos de la enzima HRP que comprende hidroquinona y peróxido de hidrógeno, sobre la suspensión de la etapa d),
- f) realizar la medida electroquímica.
15. El método, según la reivindicación anterior, donde la muestra a analizar procede de muestras de cereales o productos derivados.
16. El método, según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, donde las etapas (a), (b) y (c) se llevan a cabo en un soporte seleccionado de la lista que comprende una placa de microvaloración ELISA o soporte de plástico o cuentas.
17. El método, según la reivindicación anterior, que se lleva a cabo en una placa de microvaloración ELISA.
18. El método, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde la medida electroquímica es una medida amperométrica.
19. El método, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde la etapa (f) se realiza a un potencial reductor de -0.35V.

20. Uso del kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para determinar y cuantificar la micotoxina FB1 en cereales y sus productos derivados.

Figura 1.

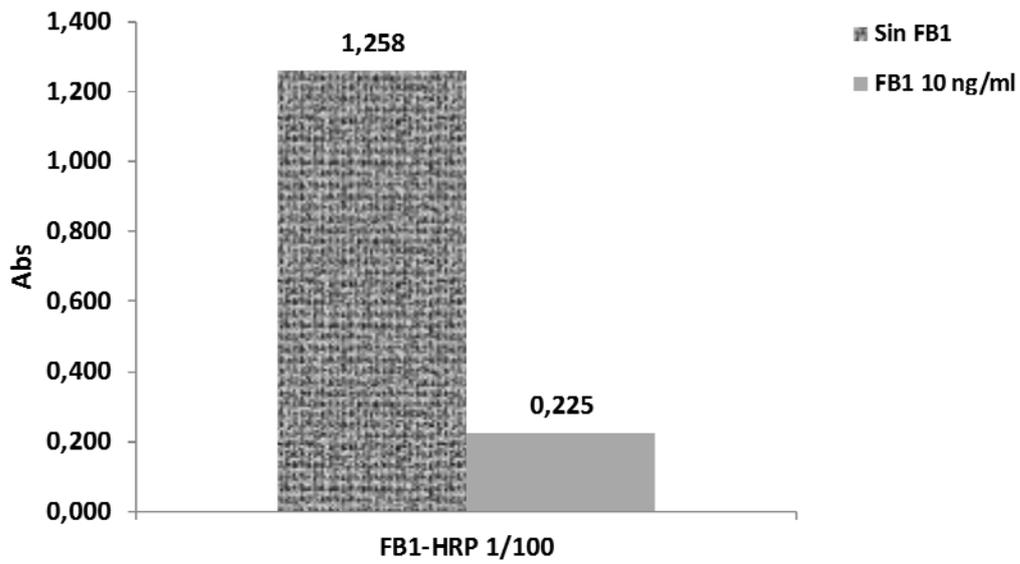


Figura 2.

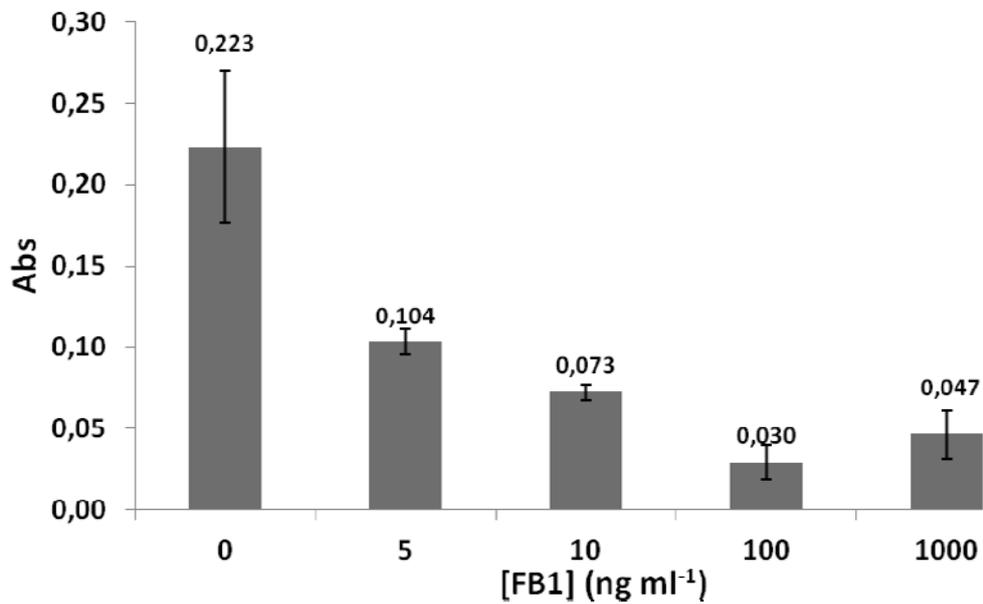


Figura 3.

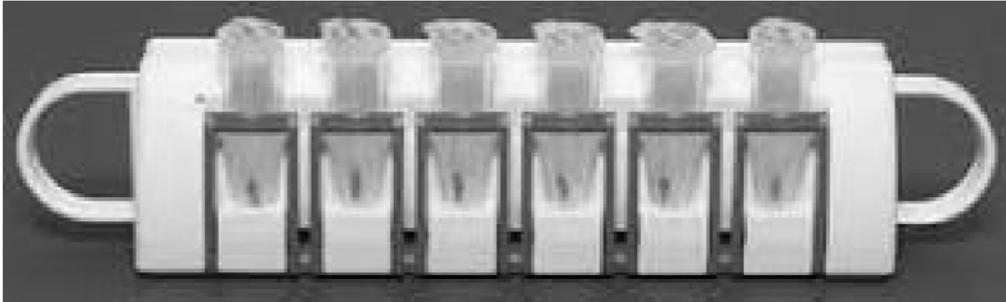


Figura 4.

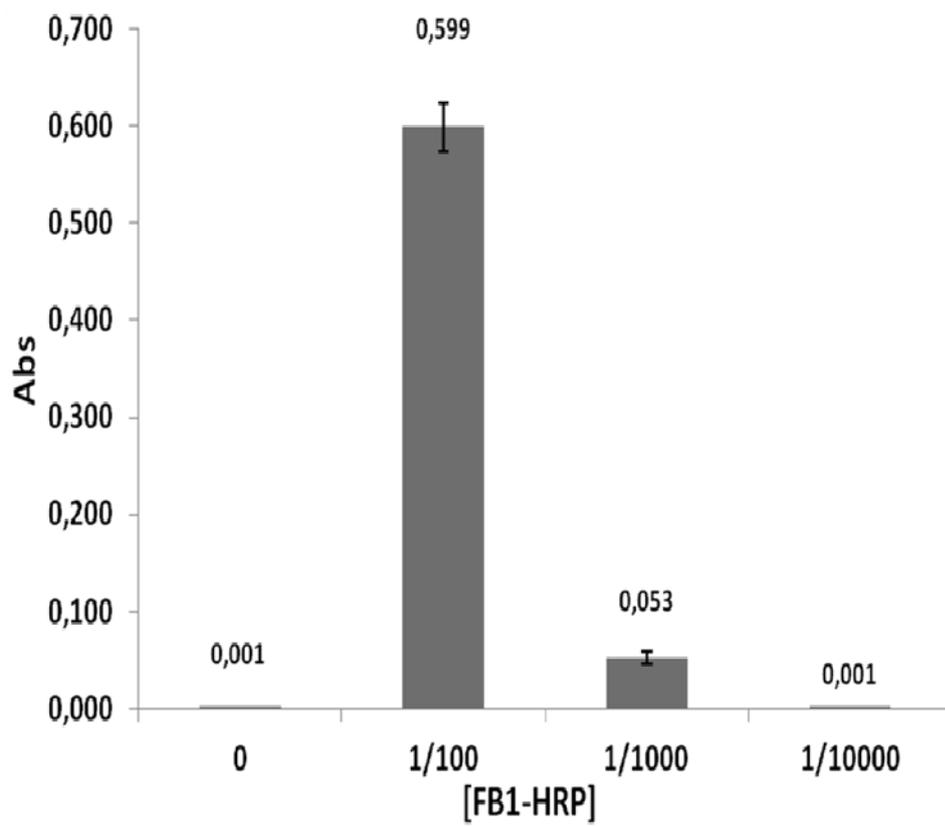


Figura 5.

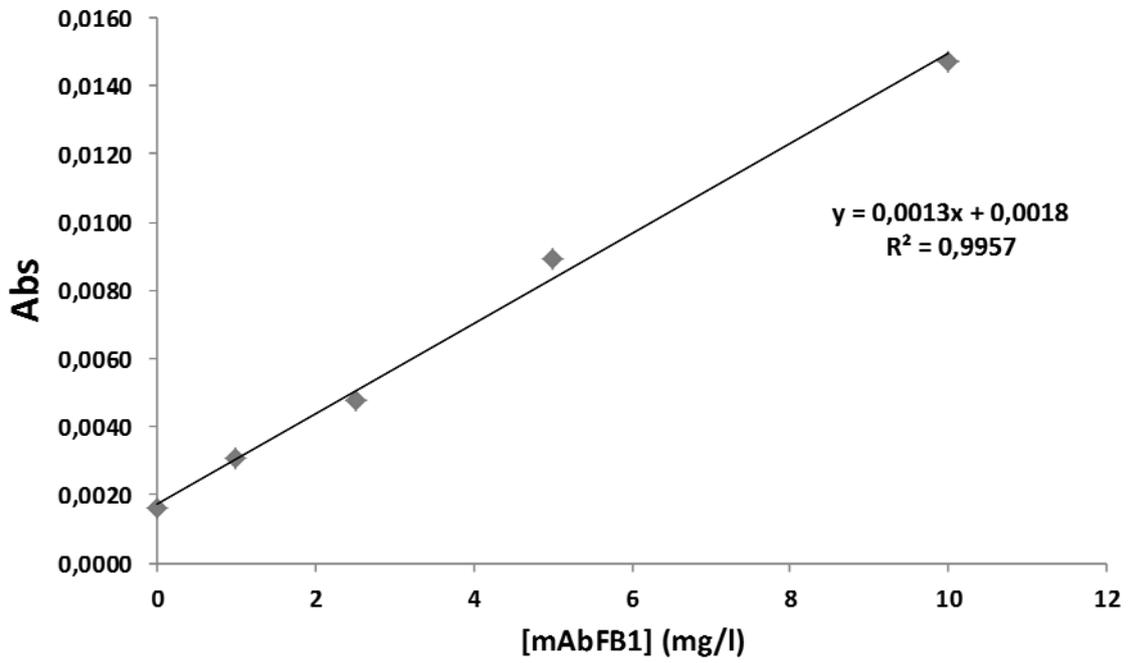


Figura 6.

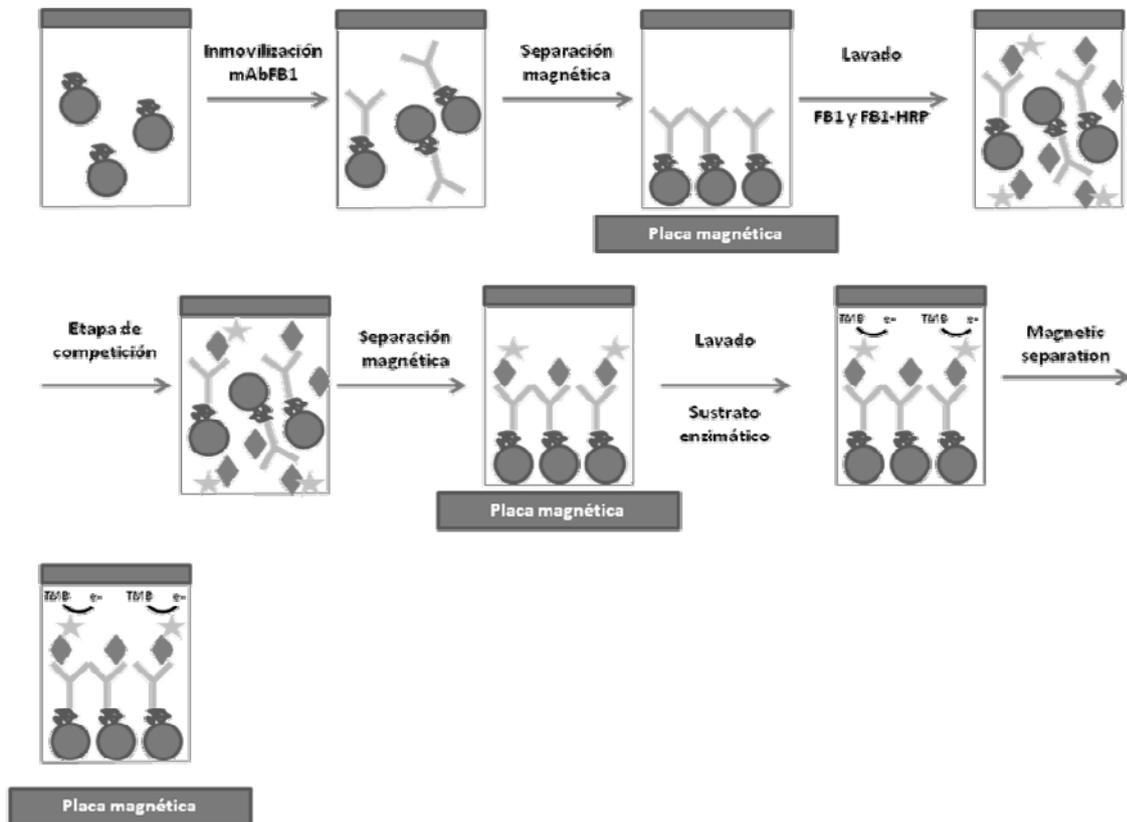


Figura 7.

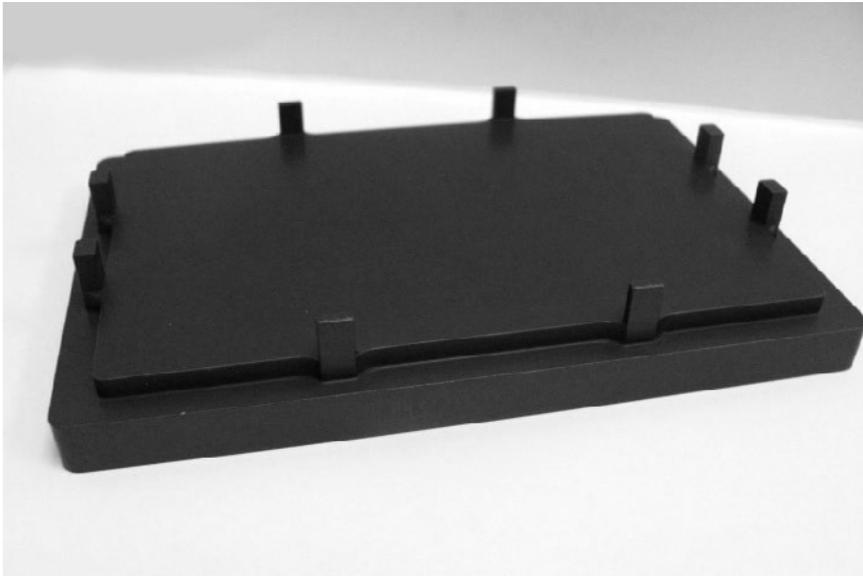


Figura 8.

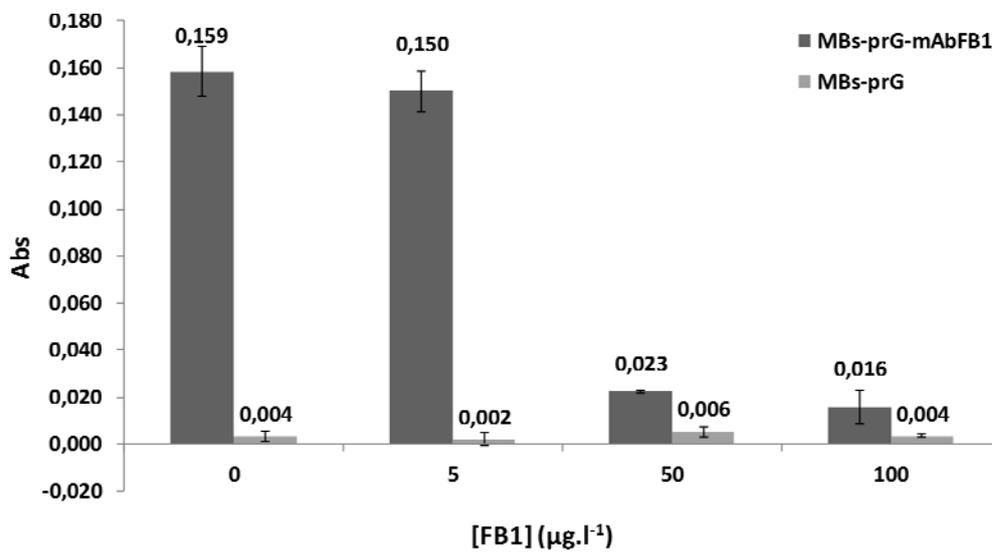


Figura 9.

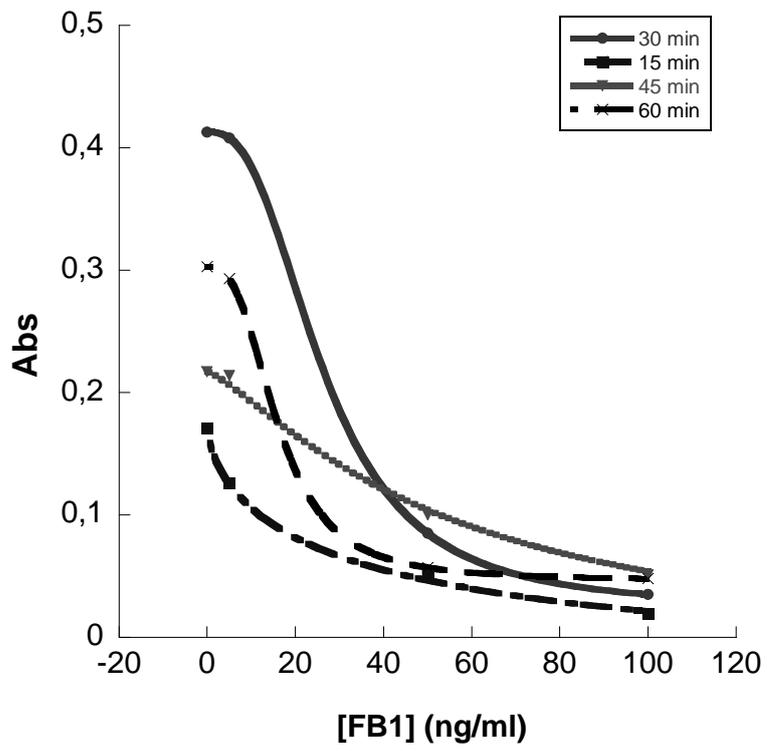


Figura 10.

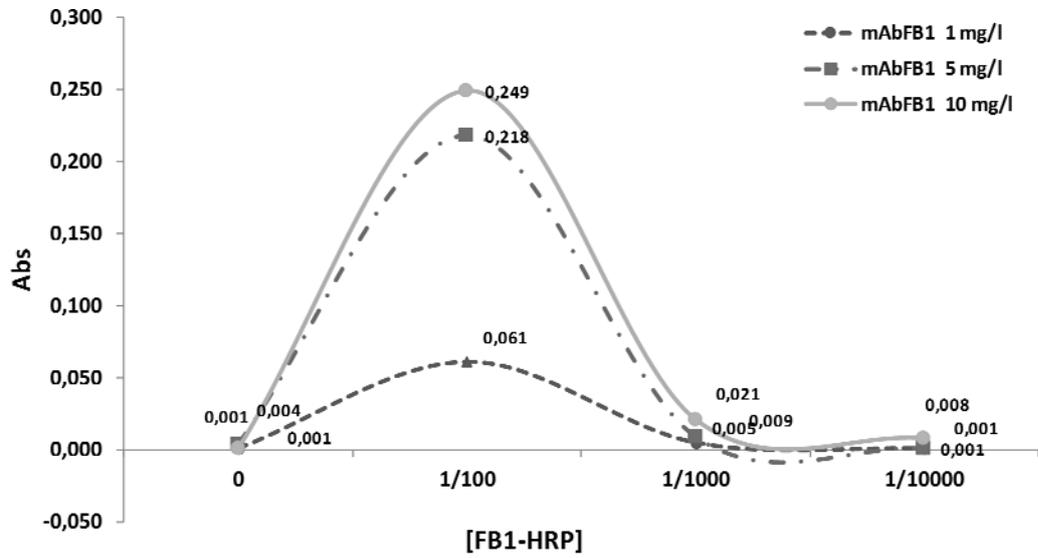


Figura 11.

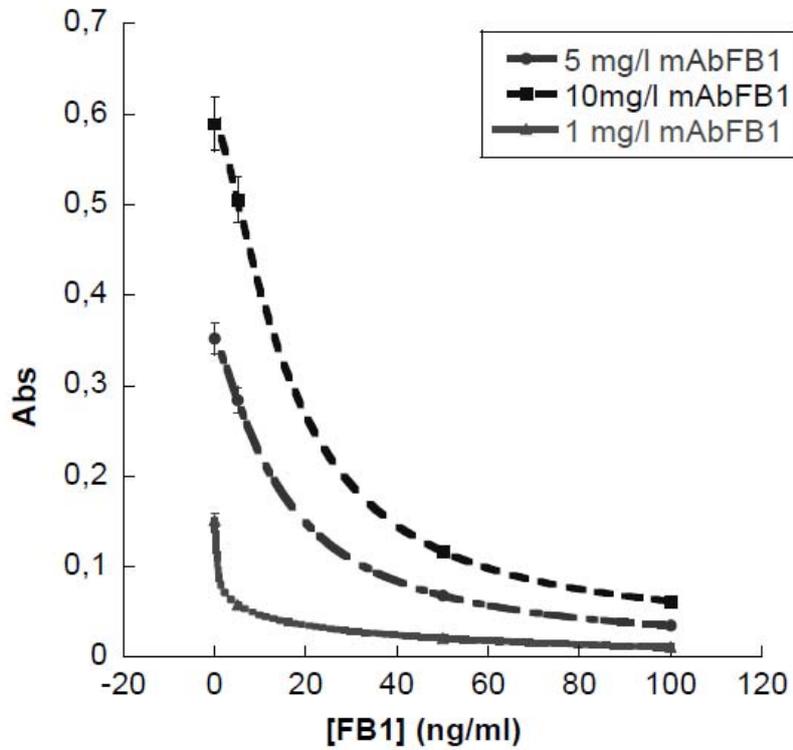


Figura 12.

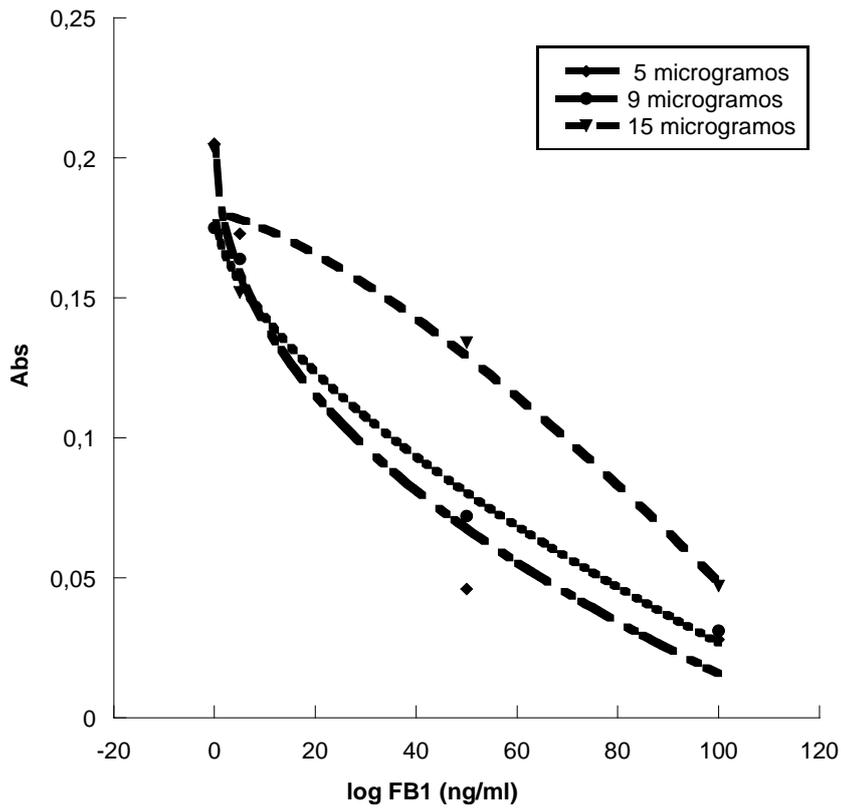


Figura 13.

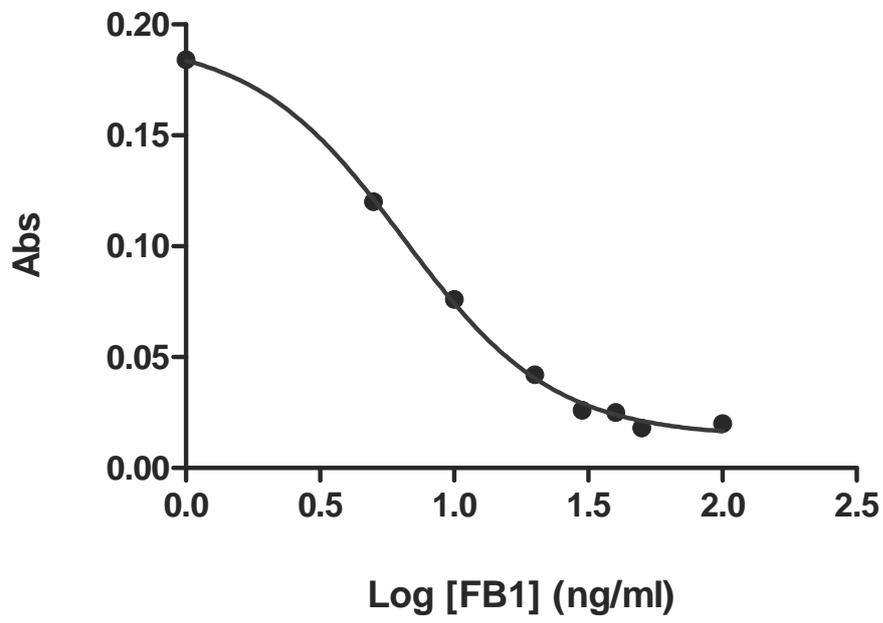


Figura 14.

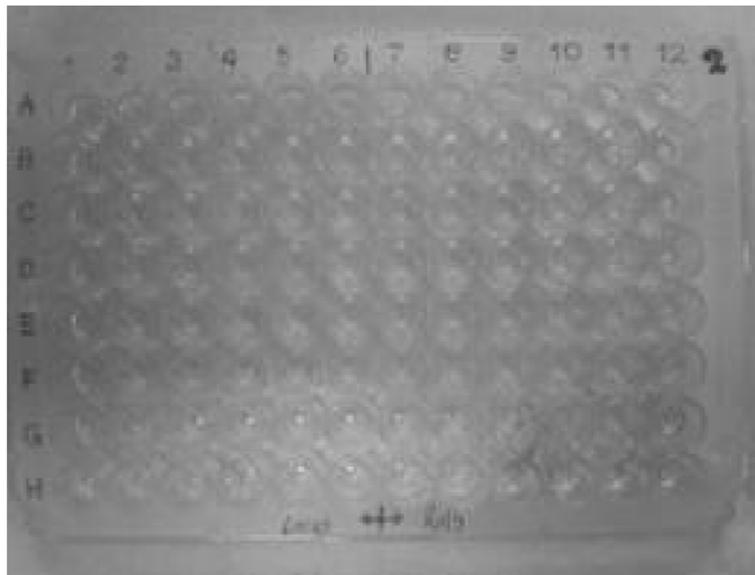


Figura 15.

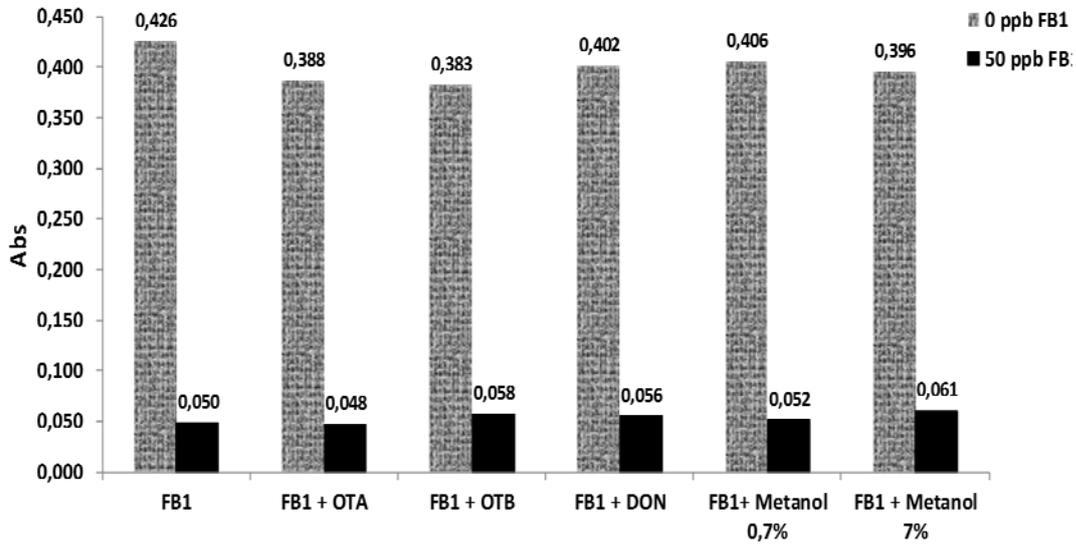


Figura 16.

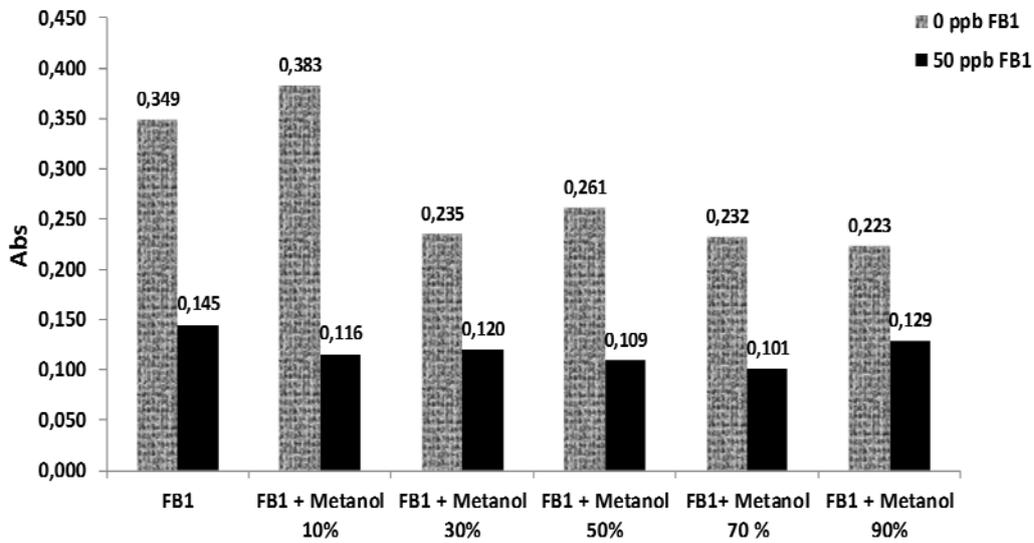


Figura 17.

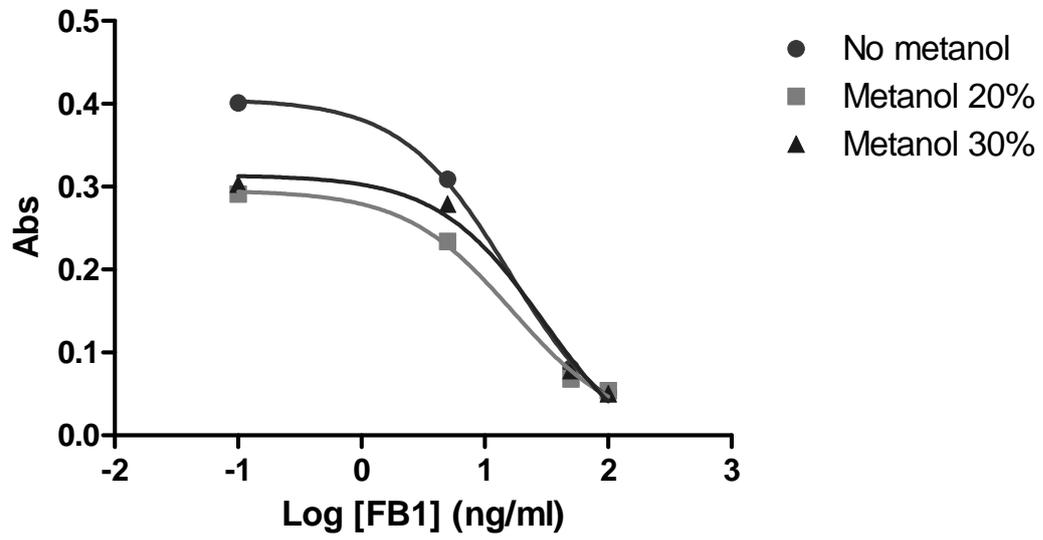


Figura 18.

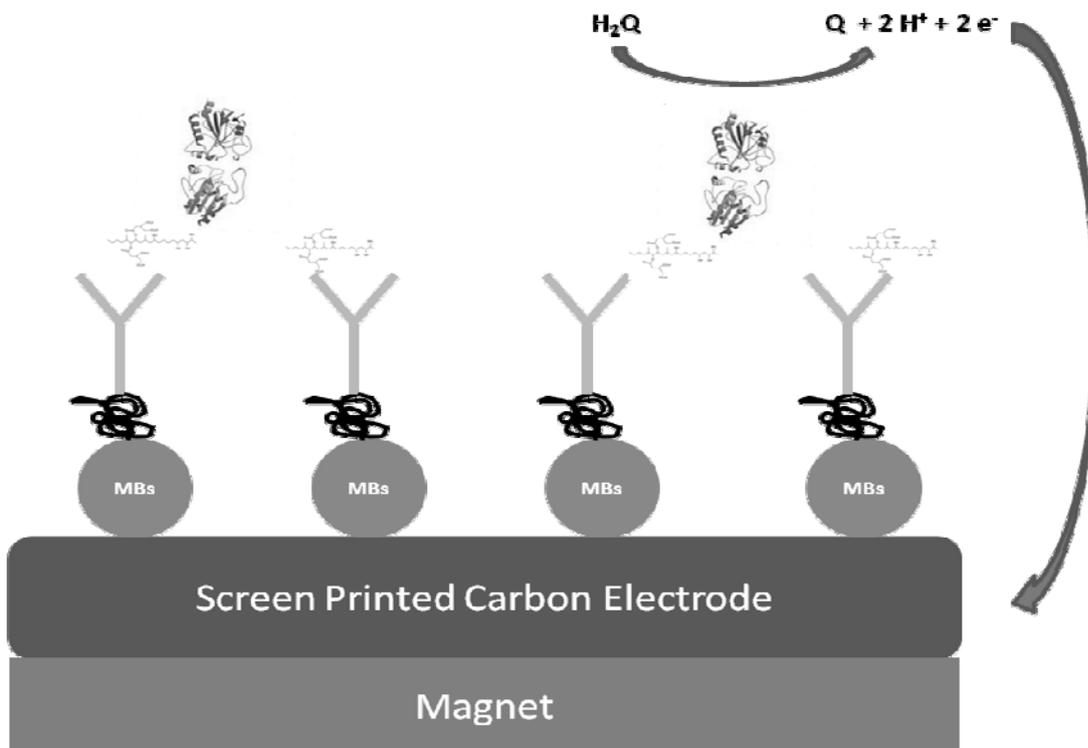


Figura 19.

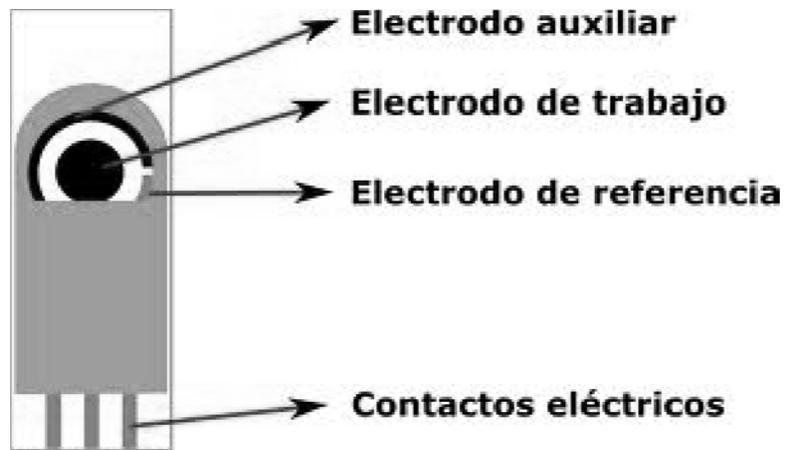


Figura 20.

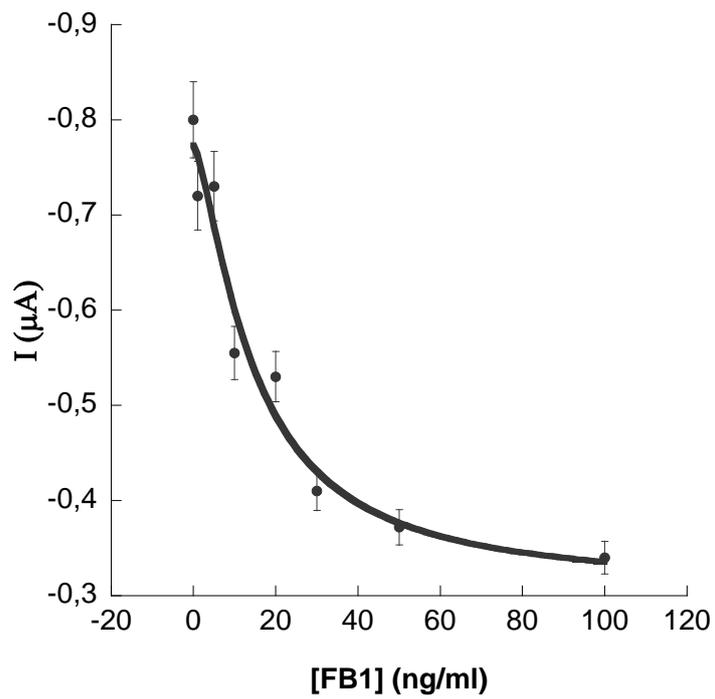


Figura 21.

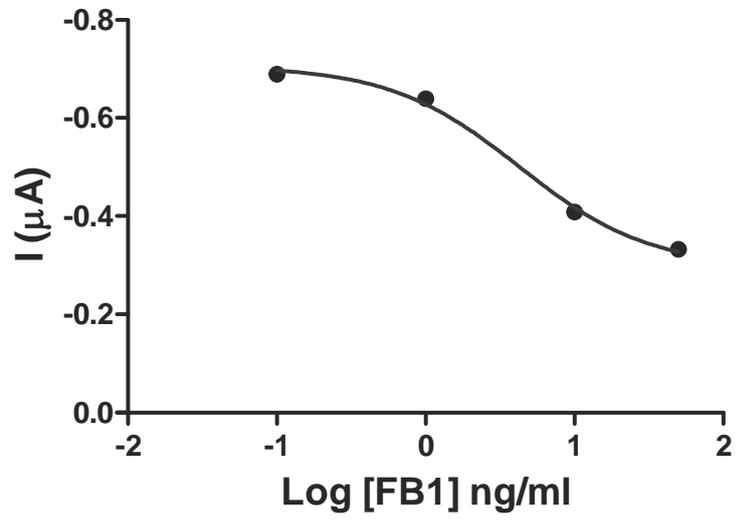


Figura 22.



Figura 23.

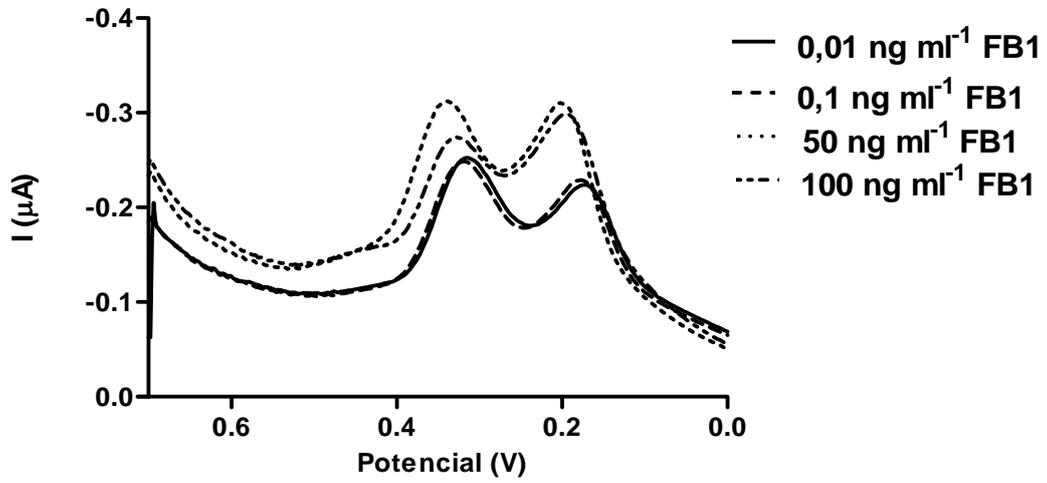


Figura 24.

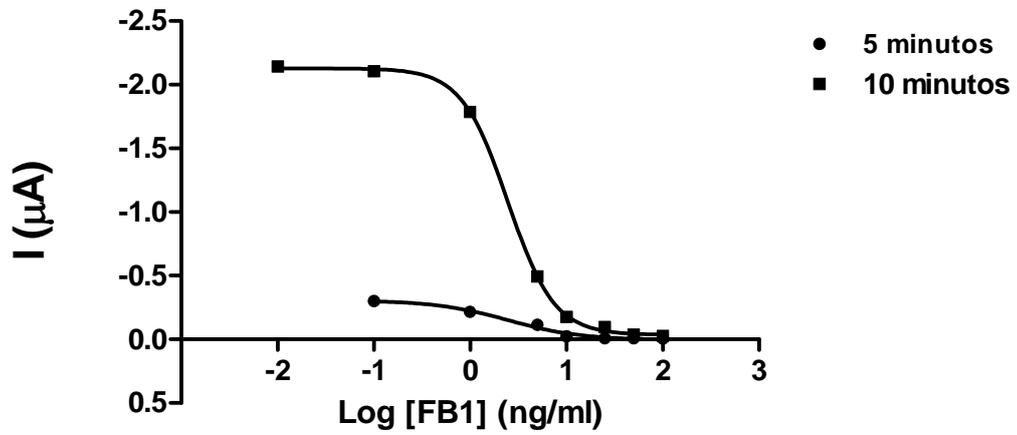


Figura 25.

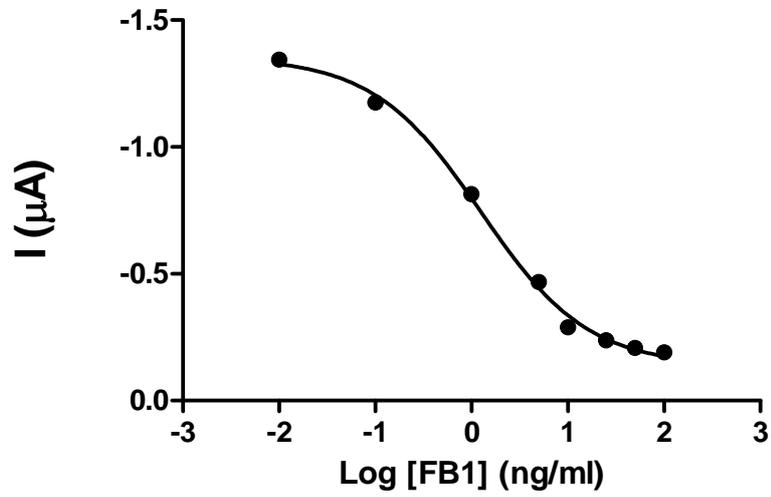


Figura 26.

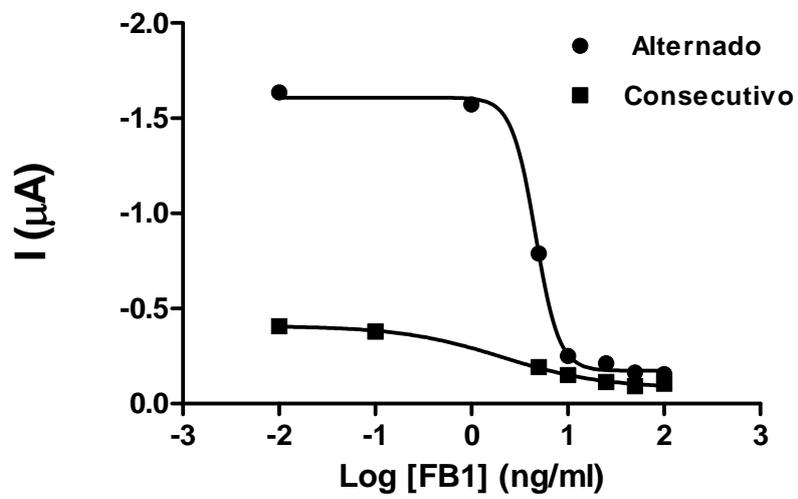


Figura 27.

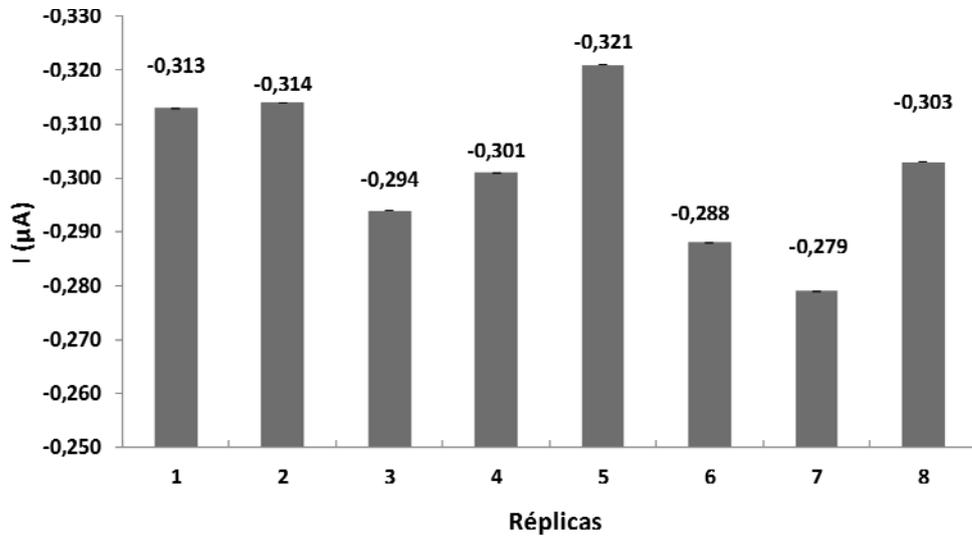


Figura 28.

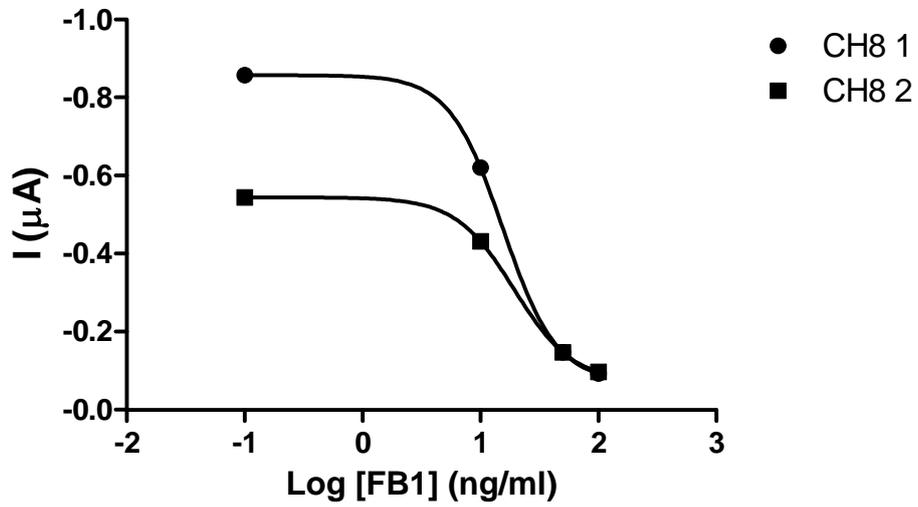


Figura 29.

