

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 337**

21 Número de solicitud: 201331357

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**18.09.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.04.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070702**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (50.0%)  
Campus Pza. San Francisco (Edif.  
Interfacultades) C/ Pedro Cerbuna, 12  
50009 Zaragoza ES y  
CAPHER IDI, S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CASTILLO SUÁREZ, Juan Ramón;  
VIDAL IBAÑEZ, Juan Carlos;  
FERNÁNDEZ DE BAYA, María Isabel;  
HERNÁNDEZ AGÓIZ, Susana y  
BONEL SANMARTIN, Laura**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL**

57 Resumen:

Inmunosensor electroquímico para la determinación de deoxinivalenol.

La presente invención se refiere a un kit que comprende un inmunosensor electroquímico para la determinación cuantitativa del deoxinivalenol (DON). Se trata de un inmunosensor electroquímico competitivo directo, donde se utilizan anticuerpos específicos de la micotoxina DON inmovilizados sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G. DON procedente de la muestra a analizar competirá con un DON marcado con peroxidasa de rábano picante 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 DON utilizando el kit y a su uso para la detección y cuantificación en cereales y productos derivados.

ES 2 534 337 A1

## **INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL**

### **DESCRIPCIÓN**

La presente invención se refiere a un kit que comprende un inmunosensor electroquímico  
5 para la determinación de deoxinivalenol (DON).

Además, la invención se refiere al método de detección y cuantificación electroquímico de la  
micotoxina DON 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**

El deoxinivalenol (DON) es uno de los 150 compuestos perteneciente al grupo de los  
tricotecenos de tipo B, junto a nivalenol, y las toxinas H-2 y HT-2, tricotecenos de tipo A. Es  
una micotoxina que tiene la capacidad de inhibición de síntesis proteica eucariótica y la  
15 síntesis de DNA y RNA, afecta al sistema inmunitario, y se encuentra en cereales como  
trigo, avena y maíz. El intervalo de concentraciones permitidas es de entre 200 y 1750 ng/g.

El DON es uno de los tricotecenos más polares, por lo que es soluble en agua y en  
disolventes polares como metanol o acetonitrilo, lo que facilita su extracción. Posee, a  
diferencia de otros tricotecenos, un grupo carbonilo conjugado que le otorga cierta  
20 absorbancia molecular en el UV y que puede utilizarse para seleccionar su bio-  
reconocimiento o su separación por cromatografía líquida de alta eficacia (en inglés High  
performance liquid chromatography HPLC).

El comité científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA (del inglés  
European Food Safety Authority) considera crítica su toxicidad e inmunotoxicidad, por lo que  
25 establece una ingesta máxima diaria TDI (del inglés Tolerable Dayly Intake) de 1 µg/Kg b.w.  
Empleando técnicas analíticas que permitan determinar concentraciones del orden de 5  
ng/g, puede encontrarse una frecuencia de alrededor del 50% en cereales.

La toma de conciencia de la Unión Europea sobre el problema de la toxicidad e  
inmunotoxicidad de DON en cereales va encaminada hacia el control de los productos

contaminados, los modos de transformación de los alimentos y sobre su comercialización y etiquetado, por medio de organismos como la EFSA, la Oficina Alimentaria y Veterinaria FVO (del inglés Food and Veterinary Office ) y la Oficina Comunitaria de las Variedades Vegetales CPVO (del inglés Community Plant Variety Office). Estas disposiciones comunitarias son de directa aplicación en España, y son adoptadas directamente por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN.

La presencia de esta micotoxina en alimentos es un problema que hace necesaria una reglamentación estricta y unos laboratorios acreditados para su detección y análisis que empleen métodos analíticos validados. Los resultados de diversos proyectos de investigación de los estados miembros de la UE han contribuido en gran medida al desarrollo de métodos analíticos estándar y a la disponibilidad de estándares de calibración de alimentos para esta micotoxina.

Los métodos desarrollados para la detección y determinación de deoxinivalenol (DON), generalmente suelen emplear técnicas tales como la cromatografía en capa fina, cromatografía en capa fina de alta resolución, cromatografía líquido-líquido de alta resolución, cromatografía de gases y métodos de inmunoensayo ELISA. También se han empleado varias técnicas de espectrometría de masas (EM) con este fin. La mayoría de métodos analíticos de determinación de DON incluyen columnas de extracción en fase sólida o columnas de afinidad para la eliminación de la matriz, que están combinadas con cromatografía de gases y detectores de captura electrónica o espectrometría de masas, o bien están combinadas con cromatografía líquida de alta resolución y detección fluorescente o detección de absorción en el UV.

El DON puede extraerse de cereales con mezclas de agua con metanol o acetonitrilo, y presenta absorción en el UV aunque su medida espectrofotométrica no es muy sensible. Métodos como cromatografía de capa fina y HPLC presentan por este motivo baja sensibilidad, por lo que lo más frecuente es emplear cromatografía de gases usualmente acoplada a la espectrometría de masas. Sin embargo, al tratarse de una molécula que no es volátil, previamente al uso de la cromatografía de gases es necesario derivatizarlo en una molécula que sí pueda determinarse por esta técnica.

También es posible la determinación electroquímica indirecta de algunos tricotecnos de tipo B, como el DON, después de su liberación mediante hidrólisis a pH básico a 80 °C durante 1 h., siendo la sensibilidad de DON de 9,1 µM en un rango lineal 0,32 a 32 mg/Kg.

Los métodos de inmunoensayo ELISA con detección espectrofotométrica son comúnmente empleados en los análisis rutinarios, aunque generalmente sólo se usan para confirmar la presencia o la ausencia de niveles máximos de micotoxinas en alimentos . La sensibilidad y especificidad de un método ELISA depende en su mayor parte de la naturaleza, del origen y de las propiedades de los anticuerpos usados. En general, la exactitud de los análisis depende de la naturaleza de la micotoxina a determinar, del procedimiento de preparación de la muestra y de la naturaleza de la matriz, por lo que una separación preliminar al inmunoensayo ELISA permite mejorar la exactitud y reproducibilidad de la determinación. Las autoridades internacionales imponen unos límites de cuantificación de los métodos analíticos validados de alrededor de 0,73 µg/Kg de DON. Los inmunoensayos ELISA son muy sensibles, tienen límites de detección de hasta 0,025 µg/l), además son específicos y rápidos.

Aunque algunos ensayos ELISA tienen sensibilidades comparables con los métodos instrumentales de cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción en el UV, sin embargo, debido a la reactividad cruzada del anticuerpo con la matriz y las interacciones no selectivas con otras micotoxinas de la misma clase, existe el riesgo de obtener falsos positivos. También existe el riesgo de obtener falsos resultados negativos por la sensibilidad inadecuada del inmunoensayo, por lo que finalmente sería necesario confirmar con cualquier resultado del inmunoensayo con cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción en el UV. La disponibilidad y especificidad de anticuerpos de DON se ha aprovechado también en otras técnicas analíticas muy prometedoras. La determinación selectiva de DON mediante biosensores específicos se basa en el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales como elementos de bio-reconocimiento, que suelen tener bajos porcentajes de reactividad cruzada y son los mejores candidatos como elementos sensores. Recientemente se han publicado un inmunosensor electroquímico amperométrico para la determinación de DON, y otro de impedancia electrónica. Estos inmunosensores electroquímicos se basan en los mismos principios que los inmunoensayos ELISA, aunque la inmovilización del anticuerpo o antígeno tiene lugar sobre la superficie del transductor electroquímico. En la comparación del esquema ELISA competitivo directo o indirecto para la determinación de DON, el formato directo proporcionó resultados comparables el menor límite de detección y el rango analítico requerido para la determinación de DON en harinas.

Por tanto, para superar todos los problemas técnicos de sensibilidad mencionados es necesario el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación cuantitativa de

DON.

## DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un kit que comprende un inmunosensor electroquímico para la determinación cuantitativa del deoxinivalenol (DON). Se trata de un inmunosensor electroquímico competitivo directo, donde se utilizan anticuerpos específicos de la micotoxina DON inmovilizados sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G. Además, la invención se refiere al método de detección y cuantificación electroquímico de la micotoxina DON utilizando el kit y a su uso para la detección y cuantificación en cereales y productos derivados.

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

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

El tamaño de estas partículas magnéticas, de entre 2,5 a 3  $\mu\text{m}$ , hace que aumente el número de anticuerpos específicos del DON que se pueden unir a la partículas magnéticas, por lo que la densidad de grupos Fc que pueden unirse al antígeno también es mayor.

El deoxinivalenol procedente de la muestra a analizar competirá con un DON marcado con peroxidasa de rábano picante (conjugado DON-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.

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

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.

5 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.

10 El inmunosensor de la invención tiene un límite de detección de  $6 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  y una sensibilidad de  $\text{EC}_{50}=0,5-1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  con un rango dinámico lineal de  $0-100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . 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.

15 La medida electroquímica es amperométrica, se realiza a un potencial reductor de  $-0,35 \text{ V}$  durante un corto periodo de tiempo ( $0,03 \text{ s}$  cada  $0,24 \text{ s}$ ), 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).

20 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 del DON disminuye la unión no específica sobre por ejemplo una microplaca de valoración ELISA, donde tiene lugar la etapa de competición.

También, cabe mencionar el menor consumo de biorreactivos, sobretodo del anticuerpo monoclonal del deoxinivalenol, 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.

25 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.

30 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 la micotoxina deoxinivalenol (DON) inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas por proteína G, un conjugado enzimático (DON-HRP) que comprende la micotoxina DON 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 potenciómetro portable, un electrodo múltiple, preferiblemente de 8 electrodos serigrafiados de carbono, un soporte y un sistema de imanes.

El límite de detección del inmunosensor, es de 6 ng/ml y una sensibilidad de  $EC_{50}=0,5-1$  ng/ml con un rango dinámico lineal de 0-100 ng/ml.

En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal DON inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas por proteína G está en forma de suspensión en disolución tampón. Preferiblemente, tiene una concentración de entre 0,6 y 10 mg/l. Más preferiblemente una concentración de 5 mg/l.

En otra realización preferida, el conjugado DON-HRP que comprende la micotoxina DON unida a una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) está diluido en la disolución tampón en una proporción seleccionada de entre 1 a 10, 1 a 8 y 1 a 5. Más preferiblemente, en una proporción de 1 a 5.

En otra realización preferida, la cantidad de micropartículas magnéticas necesarias está en un rango comprendido entre 5 y 20  $\mu\text{g}$ . Más preferiblemente, la cantidad de micropartículas magnéticas necesarias está en un rango comprendido entre 10 y 15  $\mu\text{g}$ .

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

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.

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 deoxinivalenol (DON) en una muestra utilizando el kit  
5 descrito anteriormente que comprende las siguientes etapas:

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

b) añadir una suspensión del anticuerpo monoclonal de DON inmovilizado sobre  
10 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,

15 e) 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.

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

20 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.

25 En la etapa (c) se ha de aplicar un campo magnético mediante un sistema de imanes. Dicho sistema de imanes debe ser capaz de retener al conjunto formado por un anticuerpo monoclonal de DON inmovilizado sobre unas micropartículas magnéticas funcionalizadas

por 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.

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 deoxinivalenol (DON) en cereales y sus productos derivados.

10 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  
15 sean limitativos de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Absorbancia medida en presencia o no del elemento de bio-reconocimiento sobre el pocillo ELISA. Estudio de la unión no específica.

Figura 2. Influencia de la concentración de DON en la etapa de competición en el valor de absorbancia medido. DON= 0; 4,29 y 4,3 ng/ml.

Figura 3. Separador magnético para viales *ependorf*.

Figura 4. Absorbancia medida en los pocillos ELISA en función del bloqueante utilizado, BSA (1 %), Protein free (Pierce) y Superblocker (Pierce).

Figura 5. Inmunoensayo directo competitivo sobre partículas magnéticas modificadas con proteína G realizado sobre pocillos de placa de poliestireno.

Figura 6. Separador magnético para las placas de inmunoensayo de 96 pocillos.

Figura 7. Estudio de la unión no específica sobre las partículas magnéticas modificadas con proteína G para diferentes diluciones del conjugado enzimático DON-HRP (1/40, 1/400 y 1/4000).

5 Figura 8. Optimización de la dilución del conjugado enzimático (DON-HRP, 10 X) al trabajar con tres cantidades de partículas magnéticas diferentes (5, 10 y 15  $\mu\text{g}$ ). Representación de la absorbancia medida.

Figura 9. Optimización de la concentración de anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas (0; 0,6; 5 y 10 mg/l) en función de la concentración de DON (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 ng/ml). Representación de la absorbancia medida.

10 Figura 10. Optimización de la concentración de anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas (0; 0,6; 5 y 10 mg/l). Ajuste sigmoideo de la absorbancia medida en función de la concentración de DON.

Figura 11. Ajuste sigmoideo tras llevar a cabo la etapa de competición con las condiciones optimizadas del inmunosensor. [anticuerpo DON] = 5 mg/l, [DON-HRP] = 1/10 (10X).

15 Figura 12. Placa ELISA tras llevar a cabo el inmunoensayo magnético espectrofotométrico.

Figura 13. Estudio del efecto interferente de otras micotoxinas: OTA, OTB y FB1 (50 ng/ml) en presencia o no de DON en la etapa de competición.

Figura 14. Absorbancia en función del porcentaje de metanol, en ausencia de la etapa de competición y en presencia de DON.

20 Figura 15. Absorbancia medida frente al logaritmo de la concentración de DON para tres porcentajes de metanol y acetonitrilo (0, 10 y 50 %, v/v).

Figura 16. Representación esquemática de los bioreactivos que se depositan sobre la superficie del electrodo para que tenga lugar la reacción enzimática y la etapa de detección electroquímica.

25 Figura 17. Representación esquemática de un electrodo serigrafiado de carbono individual, con electrodo de trabajo, auxiliar y referencia, y los contactos eléctricos para conectarlo con el potenciostato.

Figura 18. Valor de la corriente medida en función de la concentración de DON (0,01 – 100 ng/ml) con las condiciones optimizadas en el inmunoensayo magnético utilizando electrodos individuales.

Figura 19: Valor de la corriente medida en función de la concentración de DON (0,01 – 1000 ng/ml) con las condiciones optimizadas en el inmunoensayo magnético utilizando electrodos CH8.

Figura 20. Electrodo múltiple de ocho electrodos de la Universidad de Florencia.

Figura 21. Fotografía del imán que colocado bajo los electrodos de trabajo es capaz de atraer a las partículas magnéticas y conseguir así una correcta colocación de las partículas magnéticas sobre la superficie del electrodo de trabajo.

Figura 22. Representación de la corriente medida frente al logaritmo de la concentración de DON, usando TMB (sigma) como sustrato de la reacción enzimática. Ajuste sigmoideo 4-PL.

Figura 23. Representación de la corriente medida frente al logaritmo de la concentración de DON, usando HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) como sustrato y cosustrato de la reacción enzimática. Ajuste sigmoideo 4-PL.

Figura 24. Comparación de calibrados usando como sustratos de la reacción enzimática: TMB ó hidroquinona y peróxido de hidrógeno.

Figura 25. Comparativa de las corrientes medidas frente al logaritmo de la concentración de DON, usando TMB o HQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos y de la reacción enzimática en diferentes concentraciones. Ajuste sigmoideo 4-PL.

Figura 26. Valor de la corriente medida en cada uno de los electrodos individuales.

Figura 27. Calibrados electroquímicos usando dos electrodos serigrafados múltiples diferentes.

Figura 28. Estudio del tiempo de vida del inmunosensor. Gráfico de control.

EJEMPLOS

**Ejemplo nº 1: Comprobación de la reacción de afinidad entre el anticuerpo**

**monoclonal y el deoxinivalenol.**

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

Para ello se han utilizado los pocillos de poliestireno de la placa ELISA, sobre los que se han añadido 50 µl de anticuerpo monoclonal de DON (59,44 mg/l) en tampón de carbonatos (0,05 M, pH 9,6) y se ha dejado inmovilizando durante 24 horas a 4° C. Antes de añadir el  
10 anticuerpo, los pocillos se han lavado tres veces con 300 µl de este mismo tampón. Una vez inmovilizado el elemento de bio-reconocimiento sobre el pocillo se lava tres veces con 300 µl de tampón PBS (0,1 M, pH 7,4) y a continuación se añade el conjugado enzimático DON-HRP directamente del Kit comercial de Europroxima (50 µl). Se incuba con el anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación, se lava tres veces de nuevo con 200  
15 µl de tampón PBS y finalmente se añaden 50 µl del sustrato de la reacción enzimática 3,3',5,5'-trimetilbencidina (TMB) y se mantiene en agitación orbital durante 20 minutos para que tenga lugar la reacción enzimática. La disolución de los pocillos toma una coloración azul en presencia del TMB que es oxidado por la enzima peroxidasa. Cuando se añade el ácido sulfúrico para parar la reacción (50 µl, 0,5 M) toma una coloración amarilla que se  
20 mide en el lector ELISA a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de 415 nm.

En la figura 1, y en presencia del elemento de bio-reconocimiento inmovilizado se puede observar que el valor de absorbancia medido es unas 100 veces mayor que en ausencia del mismo (0,282 frente a 0,030), por lo que existe una baja unión no específica del conjugado enzimático sobre la superficie del pocillo y queda demostrado que el anticuerpo monoclonal  
25 reconoce dicho conjugado en la disolución.

Además se ha demostrado que existe competición entre el DON y DON-HRP por su unión al anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre el pocillo. Para ello una vez el anticuerpo monoclonal está inmovilizado, y tras la etapa de lavado posterior con tampón PBS, se añaden 25 µl de DON-HRP (sin diluir, directo del Kit) junto con tres concentraciones  
30 diferentes de DON (0; 4,29 y 4,3 ng/ml) en tampón PBS y se deja un tiempo de competición de 1 hora.

En la figura 2 se ha representado el valor de la absorbancia medida frente a la

concentración de DON, observándose una disminución en la señal medida del 93,38 % en el caso de la concentración de DON de 4,3 ng/ml. Por lo que ha quedado demostrada la competición entre ambos reactivos por su unión al anticuerpo monoclonal que está inmovilizado sobre las partículas magnéticas.

- 5 A continuación se llevó a cabo el estudio de la reacción de afinidad sobre la superficie de las partículas magnéticas modificadas con la proteína G, que es capaz de unirse a la región Fc del anticuerpo monoclonal del DON. Para ello, se toman 10 µl de partículas magnéticas modificadas con proteína G y se añaden en un vial *ependorf*, se lavan dos veces con tampón PBST (0,1 M, pH 7,4, 0,1 % Tween 20) y una vez con tampón PBS (0,1 M, pH 7,4),  
 10 a continuación se añade 1 µl de mAbDON (2600 mg/l) y se deja un tiempo de reacción de 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación en un volumen final de 500 µl de tampón PBS (0,1 M, pH 7,4), por lo que queda una concentración de anticuerpo de 5,2 mg/l. Después de la etapa de inmovilización del elemento de bio-reconocimiento sobre las partículas magnéticas, se lavan dos veces con tampón PBST (0,1 M, pH 7,4, 0,1 % Tween  
 15 20) y una vez con tampón PBS (0,1 M, pH 7,4) para eliminar el posible exceso de anticuerpo que haya quedado en la disolución sin reaccionar con las partículas magnéticas. 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.

### **Ejemplo nº 2: Estudio de diferentes bloqueantes sobre placas de poliestireno.**

- 20 La superficie de poliestireno de los pocillos de la placa ELISA puede tener una elevada unión no específica frente a diferentes compuestos que se añaden en etapas posteriores del desarrollo de este inmunosensor. Para minimizar lo máximo posible este efecto de unión no específica, es necesario bloquear la superficie de los pocillos previamente a la adición de los diferentes bioreactivos. En este esquema de ensayo que hemos planteado, la superficie de  
 25 los pocillos tan sólo es la superficie en la que tienen lugar las reacciones, pero no es la superficie sólida de inmovilización del elemento de bio-reconocimiento, ya que esta función la desempeñan las partículas magnéticas.

Se estudiaron tres bloqueantes diferentes, la albúmina sérica bovina (BSA) y dos bloqueantes comerciales de la casa comercial Pierce (Superblock Blocking y Protein Free).

- 30 Se añadieron 300 µl de BSA (1 %, m/v) sobre la superficie del pocillo y se dejaron durante 30 minutos. Con los otros dos bloqueantes se siguió el protocolo que se recomendaba en la casa comercial: *SuperBlock* (tres adiciones consecutivas de 300 µl y retirar seguidamente) y

*Protein Free* (adicionar 300 µl durante 1 hora). Una vez se bloquearon las superficies de los diferentes pocillos se añadieron 50 µl de HRP (1 mg l<sup>-1</sup>) en PBS (0,1 M, pH 7,4) para estudiar la unión no específica de la enzima peroxidasa en los tres casos estudiados.

En la figura 4 se ha representado la absorbancia medida en cada una de los pocillos. Podemos observar que el efecto bloqueante es muy semejante en los tres casos, y la absorbancia medida disminuye notablemente en comparación con la absorbancia en ausencia de bloqueante si añadimos la HRP directamente sobre el pocillo. Por lo tanto, se ha comprobado la fuerte unión no específica de la enzima HRP sobre el pocillo de poliestireno si este no está bloqueado, lo que podría suponer un error en las determinaciones llevadas a cabo con nuestro inmunosensor, ya que se usa DON-HRP como conjugado enzimático en la etapa de competición de dicho sensor.

Sin embargo, el DON-HRP se añade en una concentración muy baja en el desarrollo del inmunosensor, por lo que no se han observado efectos de unión inespecífica sobre los pocillos de poliestireno.

### 15 **Ejemplo nº 3: Estudio de la unión no específica sobre 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 inmovilización del elemento de biorreconocimiento y la etapa de competición.

20 En la figura 5 se ha representado el esquema de ensayo que hemos diseñado utilizando estas partículas magnéticas. Se trata de un esquema de inmunoensayo directo competitivo.

En el diseño de este inmunosensor electroquímico, tenemos dos superficies sólidas que intervienen en las diferentes etapas del sensor, una superficie es la de los pocillos de poliestireno y la otra la superficie funcionalizada de las partículas magnéticas. En este caso hemos utilizado partículas magnéticas funcionalizadas con la proteína G de la casa comercial INVITROGEN (diámetro 2,8 µm), y se ha estudiado la unión no específica que puede producirse sobre la superficie de las mismas. Para ello se han diseñado dos experiencias paralelas, una experiencia donde se ha modificado la superficie de las partículas magnéticas con el anticuerpo monoclonal y otra en que no, variando la concentración del conjugado enzimático DON-HRP entre valores comprendidos entre diluciones 1/40, 1/400 y 1/4000.

En primer lugar se modifican las partículas magnéticas con el anticuerpo monoclonal, para ello se toman 10 µl de partículas MBs-prG (30 mg/ml) y se lavan dos veces con tampón PBST (0,1 M, pH 7,4, 0,1 % Tween) y un lavado final con PBS. Con ayuda de un sistema de imanes se separan las partículas magnéticas y tras los lavados se llevan a sequedad, a continuación se añade el anticuerpo (1 µl, 2600 mg/l) y se incuban en un volumen total de tampón PBS de 500 µl durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. Se vuelven a realizar las etapas de lavado y finalmente las partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo se resuspenden en 500 µl de tampón PBS y se pueden almacenar a 4° C durante un mes para ser utilizadas en posteriores experiencias.

A continuación se añaden 8 µl (5 µg) de partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo monoclonal en algunos pocillos y el mismo volumen de partículas sin elemento de bio-reconocimiento en otros pocillos.

En la figura 6 se muestra el bloque magnético que utilizamos para llevar a cabo las etapas de separación y lavado de las partículas magnéticas en los pocillos de la placa ELISA.

En cada uno de los pocillos se añadió o bien tampón PBS o HRP, o concentraciones creciente de DON-HRP. Tras la etapa de reacción competitiva, se añade el sustrato enzimático y la detección espectrofotométrica es igual que se ha descrito en el ejemplo nº 1.

En la figura 7 se ha representado la absorbancia medida para las dos experiencias (con y sin elemento de bio-reconocimiento). Para la experiencia que no contiene el anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas se demuestra que no hay unión inespecífica de DON-HRP sobre las partículas magnéticas, pues la absorbancia medida es muy próxima a cero en todos los casos (0,014; 0,019; 0,066; 0,029; 0,033).

#### **Ejemplo nº 4: Cantidad necesaria de partículas magnéticas**

El volumen de partículas magnéticas es un parámetro a tener en cuenta en un inmunosensor, ya que al modificar la cantidad de partículas magnéticas utilizadas también se modifica la cantidad de elemento de bio-reconocimiento que estará disponible para reaccionar con el analito en la etapa de competición.

La cantidad de partículas magnéticas se ha modificado entre 5, 10 y 15 µg, y se han estudiado varias diluciones del conjugado enzimático DON-HRP (1/1, 1/2, 1/5, 1/8, 1/10 y 1/100). El protocolo de trabajo es el mismo que el que se ha descrito en el ejemplo nº 1, el

tiempo de reacción de la etapa de competición es de 60 minutos.

En la figura 8 se ha representado la absorbancia medida frente a las diferentes diluciones de DON-HRP, observándose el mayor valor de absorbancia cuando se trabajó con 15 µg de partículas magnéticas y dilución 1/5 del conjugado enzimático.

5 **Ejemplo nº 5: Tiempo de la etapa de competición**

El tiempo de la etapa de competición es también un parámetro a tener en cuenta en un inmunosensor competitivo, ya que puede afectar tanto a la unión específica con el anticuerpo como a la unión inespecífica sobre la superficie sólida del inmunosensor, en nuestro caso tanto la superficie de las partículas magnéticas como la superficie del pocillo.

10 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 el anticuerpo y el analito marcado no transcurra en la extensión adecuada.

15 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 tres tiempos de competición diferentes: 30, 60 y 120 minutos, y en la tabla 1 se ha representado el valor de absorbancia frente a la concentración de DON  
 20 en el pocillo para los tres tiempos. Esta experiencia se ha llevado a cabo para dos condiciones diferentes, bien trabajando con 10 µg de partículas magnéticas y dilución 1/5 del conjugado enzimático o 15 µg de partículas magnéticas y dilución 1/10.

25 **Tabla 1.** Valores de absorbancia en función de la dilución del conjugado enzimático (DON-HRP, 1/5 y 1/10), cantidad de partículas magnéticas (10 y 15 µg) y tiempo de la etapa de competición (30, 60 y 120 minutos)

		MBs-prG-mAbDON		
		DON-HRP (10x)		
		1/5		1/10

	MBs-prG	DON (0 µg/l)	DON (100 µg/l)	MBs-prG	DON (0µg/l)	DON (100 µg/l)
30 min	10 µg	0,184	0,066	15 µg	0,133	0,049
60 min	10 µg	0,248	0,081	15 µg	0,152	0,058
120 min	10 µg	0,282	0,066	15 µg	0,222	0,062

En la tabla 1 se han representado los valores numéricos de la absorbancia medida en función de estos parámetros. Se observa que a medida que aumenta el tiempo de reacción, la absorbancia medida es mayor, obteniéndose el máximo de absorbancia al utilizar un tiempo de competición de 120 minutos (10 µg de partículas y dilución 1/5 del DON-HRP). No obstante, un tiempo de competición tan elevado, conlleva un tiempo de análisis muy alto y posibles problemas de unión no específica de otros componentes de la muestra o del propio conjugado DON-HRP, que se puede unir de forma no específica sobre la superficie de las partículas magnéticas modificadas con proteína G.

Por lo tanto, se decidió utilizar un tiempo de competición de 60 minutos, en conjunción con 10 µg de partículas magnéticas y dilución 1/5 del conjugado DON-HRP.

#### **Ejemplo nº 6: Concentración de anticuerpo monoclonal y conjugado enzimático DON-HRP**

La concentración de conjugado enzimático y de anticuerpo monoclonal son parámetros importantes para la señal analítica, 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 DON 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 DON en la etapa de competición, éste será capaz de desplazar al conjugado enzimático DON-HRP y por lo tanto disminuirá la señal analítica medida. Si por el contrario hubiese un exceso de DON-HRP para este punto de no competición, se traduciría en que al añadir DON a la disolución, desplazaría al DON-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 DON en la muestra.

Inicialmente se parte de la concentración de elemento de bio-reconocimiento (anticuerpo monoclonal) que recomienda el fabricante de las partículas magnéticas (MBs-prG). Para ello hay que tener en cuenta la capacidad teórica de unión de las partículas magnéticas, que en nuestro caso es de 8 µg de anticuerpo por cada 1 mg de partículas magnéticas. Teniendo en cuenta también la concentración de las partículas magnéticas (30 mg/l) se llega a una concentración de 5 mg/l de anticuerpo monoclonal como la óptima para inmovilizar sobre la superficie de las partículas.

En la figura 9 se ha representado el valor de absorbancia medida en función de la concentración de DON presente en el pocillo (0-100 ng/ml). La concentración de anticuerpo monoclonal se ha modificado entre 0; 0,6; 5 y 10 mg/l. En todos los casos se tomaron 10 µg de partículas magnéticas y la dilución de conjugado enzimático fue 1/5.

Cuando se trabaja en ausencia de anticuerpo monoclonal (0 mg/l) la absorbancia medida es muy baja en todos los casos, lo que demuestra la baja unión no específica del conjugado enzimático sobre la superficie de las partículas magnéticas modificadas con proteína G.

En la figura 10 se ha representado la absorbancia medida frente a la concentración de DON, tras haber llevado a cabo el ajuste sigmoideo con el software GRAPHPAD y usando el modelo de los cuatro parámetros logísticos (4-PL). Este ajuste sigmoideo se ha realizado para las cuatro concentraciones de anticuerpo estudiadas.

En la tabla 2 se han plasmado los valores numéricos tras llevar a cabo este ajuste sigmoideo, se observa que en el primer caso que no hay anticuerpo monoclonal el ajuste a una sigmoidea no es posible, como era de esperar, pues no hay reacción de competición alguna, tal y como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

Tabla 2. Valores numéricos tras el ajuste sigmoideo al trabajar con cuatro concentraciones de anticuerpo monoclonal diferentes (0; 0,6; 5 y 10 mg/l).

	[mAbDON] mg/l			
	0	0,6	5	10
Mínimo	0,006	-0,0161	-0,0564	-0,1615
Máximo	0,0083	~33.36	0,173	0,2005
IC50	~12.46	~0	22,75	63,65
sensibilidad	~-8.148	~-0.1405	-0,6646	-0,372

R	0,2460	0,9705	0,9999	0,9981
---	--------	--------	--------	--------

Cuando se trabajó con una concentración de 0,6 mg/l de anticuerpo monoclonal (unas diez veces menor en relación a la capacidad de unión de las partículas magnéticas) el ajuste sigmoideo no es muy bueno (R=0,9705) y las absorbancias medidas son bajas. Para las concentraciones de 5 mg/l (estequiométrica en relación a la capacidad de unión de las partículas) y 10 mg/l de anticuerpo monoclonal, el ajuste es muy bueno en los dos casos (R=0,9999 y 0,9981 respectivamente) y los valores de absorbancia medidos son mucho mayores (máximo cercano a 0,2). Sin embargo, para la concentración de 5 mg/l el valor de la pendiente es mucho mayor (casi el doble que para 10 mg/l de anticuerpo) y el valor de EC<sub>50</sub> es mucho menor también en este caso (22,75 frente a 63,65 ng/ml), lo que se traduce en una mayor sensibilidad para el caso de utilizar 5 mg/l de anticuerpo, además de un menor coste del análisis, dado el elevado precio de estos bioreactivos.

Para estudiar el efecto de la concentración de DON-HRP se estudiaron dos factores de dilución (1/5 y 1/10) para dos cantidades de partículas magnéticas diferentes (10 y 15 µg), manteniendo constante las demás condiciones del ensayo: 5 mg/l de concentración de anticuerpo, 60 minutos de tiempo de reacción y temperatura ambiente.

En la tabla 3 se han plasmado los valores numéricos de absorbancia que se midieron con el espectrofotómetro ultravioleta visible. Las condiciones más favorables se obtienen con una relación cercana a 6 en ausencia o presencia de DON (100 ng/ml) en la etapa de competición.

Tabla 3. Valores de absorbancia medido en presencia o no de DON (0 ó 100 ng/ml) durante la etapa de competición al trabajar con dos diluciones diferentes de DON-HRP (1/5 y 1/10) y dos cantidades diferentes de partículas magnéticas (10 y 15 µg).

	MBs-prG	MBs-prG-mAbDON			
MBs		DON-HRP (10x)			
	1/10	1/10		1/5	
	DON (0 µg/l)	DON (0 µg/l)	DON (100 µg/l)	DON (0 µg/l)	DON (100 µg/l)
10 µg	0,006	0,125	0,039	0,201	0,034
15 µg	0,006	0,133	0,063	0,235	0,072

- Las condiciones más favorables son por tanto las siguientes: Concentración de anticuerpo monoclonal: 5 mg/l
- Tiempo de competición: 60 minutos
- Dilución DON-HRP: 1/5
- 5 • Cantidad de partículas magnéticas: 10 µg
- Temperatura del ensayo: temperatura ambiente
- Tiempo de reacción del TMB: 20 minutos

### Ejemplo nº 7. Calibrado

10 Se realizó un calibrado completo modificando la concentración de DON presente en la etapa de competición, desde 0 hasta 1000 ng/ml. En todos los casos se añaden 10 µg de partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo monoclonal (50 µl), 25 µl de conjugado enzimático DON-HRP (1/5) y 25 µl de DON para que la concentración del analito en el pocillo durante la etapa de competición oscile entre 0 y 1000 ng/ml. De forma que el volumen final de reacción es en todos los casos de 100 µl.

15 En la figura 11 se ha representado el correspondiente ajuste sigmoideo representando la absorbancia medida frente a la concentración de DON. Tal y como se puede comprobar con estos valores, el ajuste sigmoideo es muy bueno, se obtiene un valor de absorbancia máxima próxima a 0,3, una pendiente de -0,9068 y un valor de EC<sub>50</sub> de 6,617 ng/ml. En la tabla 4 se han recopilado todos los valores numéricos resultantes de llevar a cabo este  
20 ajuste sigmoideo.

Tabla 4. Valores numéricos tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo con la ecuación de los cuatro parámetros logísticos después de la medida espectrofotométrica (4-PL).

Parámetros	
Mínimo	0,0215
Máximo	0,2859
Pendiente	-0,9068
IC <sub>50</sub> (ng/ml)	6,617
R	0,9996

La ecuación de los cuatro parámetros logísticos, que se ha utilizado para realizar el ajuste, y que responde a un modelo de ensayo de inhibición competitiva frente a un sitio de

anticuerpos limitado, es la siguiente:

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

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 más favorables mencionadas  
5 previamente.

- Concentración de DON-HRP: 1/10
- Concentración mAbDON: 5 mg/l
- Cantidad de partículas magnéticas: 10 µg
- Tiempo de competición: 60 minutos
- 10 • Temperatura competición: 25 ° C

En la figura 12 se muestra una fotografía de la diferente oscuridad 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**

Durante el proceso de extracción y preconcentración de la muestra, hay veces que no se  
15 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, aunque el anticuerpo monoclonal que hemos utilizado en el desarrollo de este inmunosensor, es altamente específico y selectivo al DON.

Las interferencias más destacadas van a ser otras micotoxinas, como por ejemplo la  
20 ocratoxina A (OTA), la ocratoxina B (OTB) o la fumonisina B1 (FB1). Estas micotoxinas pueden estar presentes en las muestras de cereales y productos derivados de cereales en concentraciones semejantes al DON.

Otra interferencia que se debe tener en cuenta es el efecto del disolvente de extracción de la  
25 muestra, en este caso la mezcla de extracción puede ser metanol:agua (84:16, v:v) o bien acetónitrilo:agua (84:16, v:v).

Otro procedimiento de extracción más simple y con menor efecto de matriz para el inmunosensor de la invención es utilizar el tampón PBS (0,1 M, pH 7,4). Los resultados en la

señal de absorbancia en presencia de DON (100 ng/ml) y en ausencia del mismo, cuando están presentes o ausentes otras micotoxinas se recogen en la tabla 5.

Tabla 5. Efecto de varias interferencias en el ELISA inmunomagnético (OTA, OTB y FB1 100 ng/ml).

5

	DON		OTA		OTB		FB1	
µg/l	0	100	0	100	0	100	0	100
Abs	0.184	0.046	0.188	0.185	0.185	0.166	0.171	0.173
% disminución	75.0		1.6		10.3		-1.2	

Se ha representado el valor de absorbancia medido frente en las diferentes situaciones, en presencia o ausencia de DON durante la etapa de competición para varias interferencias. Las micotoxinas que se han estudiado como posibles interferencias han sido OTA, OTB y FB1, en concentraciones de 100 ng/ml.

Podemos ver claramente que no existe efecto interferente por parte de estas micotoxinas, ya que la absorbancia disminuye en presencia de DON pero no cuando son las otras micotoxinas las que se ponen en contacto con el anticuerpo monoclonal, lo que indica que no se produce competición.

A la vista de los resultados se puede concluir que este anticuerpo monoclonal es altamente selectivo y específico al DON y no reacciona con otras micotoxinas que puedan estar presentes en las muestras de cereales.

Otro posible efecto interferente a evaluar es el causado por otras micotoxinas que pueden estar presentes en la misma muestra que el DON en la etapa de competición. En la figura 13 se ha representado el valor de absorbancia medido para las diferentes experiencias. Las barras oscuras representan las experiencias en ausencia de DON en la etapa de competición. En el primer caso no hay ninguna micotoxina presente, pero en las sucesivas representaciones hay OTA, OTB o FB1 en concentración de 100 ng/ml. Se observa que, en ausencia de DON en la etapa de competición, no se produce descenso de la señal de absorbancia debido a la presencia de otras micotoxinas, mientras que, en presencia de DON en la etapa de competición, el descenso que se produce es el mismo en todos los casos, por lo que no se puede atribuir a la presencia de las micotoxinas interferentes, sino al DON que

compite con el DON-HRP por su unión al anticuerpo monoclonal.

Además, se estudió el efecto interferente de dos disolventes de extracción, el metanol y el acetonitrilo. En una primera experiencia, se estudiaron los porcentajes de estos disolventes que se había estimado podría haber en la muestra una vez extraída, que eran porcentajes del 8,4 y 12,6 % (v:v).

En la tabla 6 se han plasmado los valores numéricos de absorbancia medidos en presencia de estos dos disolventes, y se ha comparado este valor con los obtenidos en presencia de tampón PBS o agua miliQ.

Tabla 6. Absorbancia medida en presencia de dos disolventes orgánicos (acetonitrilo y metanol en porcentajes del 8,4 y 12,6 %). Comparación con los resultados obtenidos en presencia de tampón PBS o agua miliQ.

	PBS	AGUA	MeOH (8,4%)	MeOH (12,6%)	ACN (8,4%)	ACN (12,6%)
	0,164	0,191	0,185	0,186	0,208	0,228
	0,183	0,202	0,163	0,183	0,229	0,187
PROMEDIO	0,174	0,197	0,174	0,185	0,219	0,208
s	0,013	0,008	0,016	0,002	0,015	0,029
%DSR	7,7	4,0	8,9	1,1	6,8	14,0

Según podemos extraer de esta tabla, no hay diferencia significativa entre los valores de absorbancia medidos en ausencia de estos dos disolventes orgánicos y en presencia de los mismos.

Además se realizó un estudio adicional aumentando la concentración de metanol hasta el 90 % y así obtener el límite de la concentración de este disolvente orgánico que puede estar presente en las muestras sin que afecte a la señal analítica medida. En las tablas 7 y 8 se han recopilado los valores de absorbancia en presencia de porcentajes crecientes de metanol y acetonitrilo (0-100 %) en presencia y ausencia del DON en la etapa de competición, y se ha representado también el porcentaje de disminución de la señal debido al incremento de estos disolventes orgánicos.

Tabla 7. Disminución de la absorbancia para porcentajes crecientes de metanol (0-100 %) en presencia y ausencia de DON (0 y 100 ng/ml) en la etapa de competición.

MeOH (% en agua)	DON	DON	% disminución
	(0 µg/l)	(100 µg/l)	
0	0,230	0,046	0,0
5	0,159	0,047	30,9
10	0,153	0,049	33,5
20	0,129	0,054	43,9
50	0,087	0,051	62,2
84	0,044	0,063	80,9
100	0,036	0,044	84,3
media	0,120	0,051	0,0
s	0,069	0,006	
%DSR	57,8	12,7	

Tabla 8. Disminución de la absorbancia para porcentajes crecientes de acetonitrilo (0-100 %) en presencia y ausencia de DON (0 y 100 ng/ml) en la etapa de competición.

ACN(% en agua)	DON	DON	% disminución
	(0 µg/l)	(100 µg/l)	
0	0,192	0,043	0,0
5	0,18	0,049	6,3
10	0,167	0,045	13,0
20	0,129	0,037	32,8
50	0,054	0,032	71,9
84	0,025	0,015	87,0
100	0,007	0	96,4
media	0,108	0,032	
s	0,078	0,018	
%DSR	72,1	56,6	

Se llevó a cabo una experiencia muy semejante a la descrita en el párrafo anterior, que consistió en modificar la concentración de metanol entre 0, 10, 30, 50, 70 y 90 %. En la figura 14 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, con y sin etapa de competición.

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 84,3 % en el valor de la absorbancia medida debido a la presencia de un 100 % de metanol en la muestra. El primer descenso acusado en la señal se ha observado con un 5 % de metanol (30,9 %) indica que en la muestra no podrá haber en ningún caso porcentajes de metanol superiores al 5 %, 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.

10 Cuando hay etapa de competición se observa un descenso acusado de la señal debido a la presencia de DON (50 ng/ml), pero no se observa un mayor descenso en la señal debido al incremento de metanol en la disolución. El efecto de la unión de DON es predominante sobre la presencia del metanol y por lo tanto eclipsa el efecto.

Para estudiar en profundidad el efecto de este disolvente orgánico en el funcionamiento de nuestro inmunoensayo, se ha realizado un calibrado completo, modificando la concentración de DON 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, 10 y 50 % de metanol.

En la figura 15 se ha representado la absorbancia medida frente al logaritmo de la concentración de DON para los tres porcentajes estudiados.

20 En la figura 15 se observa claramente cómo la presencia de metanol disminuye la señal analítica medida. Supone una interferencia en la determinación que podría conducir a falsos positivos, y por lo tanto a unos resultados erróneos en la determinación. Sin embargo, anteriormente ha quedado demostrado que hasta un porcentaje de metanol del 5 % éste no afecta a la medida.

25 En la tabla 9 se han recopilado los resultados del ajuste siguiendo el modelo de los tres parámetros logísticos (3-PL). El máximo es mayor en ausencia de 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 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 9. Valores numéricos (máximo, mínimo,  $EC_{50}$  y R) siguiendo el modelo de los tres parámetros logísticos (3-PL) para dos porcentajes de los disolventes metanol y acetonitrilo (10 y 50 %).

	Mínimo	Máximo	$IC_{50}$	R
PBS (0,1M)	0,008	0,152	5,397	0,9953
MeOH 10%	0,000	0,072	17,92	0,9988
MeOH 50%	-0,007	0,065	30,67	0,9729
ACN 10%	-0,007	0,087	20,25	0,9914
ACN 50%	0,006	0,046	4,294	0,9495

El mismo estudio se ha llevado a cabo modificando el porcentaje de acetonitrilo presente en la muestra, llegando hasta un 50 % de acetonitrilo. Cuando el porcentaje de acetonitrilo que se añade al pocillo supera el 10 % se produce un fuerte descenso en el valor de la absorbancia medida, debido a la presencia del disolvente orgánico y no al efecto de la competición con el DON-HRP.

Para comprobar el efecto de la presencia del disolvente orgánico en el medio de reacción durante la etapa de competición, se realizaron tres calibrados con concentraciones de acetonitrilo en la disolución de DON de 0, 10 y 50 %.

En presencia de un 10 % de acetonitrilo la señal de absorbancia medida disminuye un poco en relación a la curva que sólo contiene PBS, mientras que en presencia de un 50 % de acetonitrilo la bajada en el valor de absorbancia es muy elevado en ausencia de competición, lo que se traduciría en una señal de falso positivo en el funcionamiento de este sensor electroquímico.

Por lo tanto, se puede concluir que el porcentaje máximo de acetonitrilo que se puede emplear en el proceso de extracción de la muestra es del 10 %.

### **Ejemplo nº 9: Estudios de recuperación**

Para validar el inmunosensor de la invención desarrollado, se ha llevado a cabo un estudio de recuperación.

En este ejemplo se describe cómo se hizo el estudio de recuperación, utilizando un material de referencia certificado que no contiene DON. Disponemos de dos materiales de referencia

certificados, BCR-377 (harina de maíz) y BCR-396 (harina de trigo) el contenido de DON es <50 ng/g.

1. Para llevar a cabo el dopado de las muestras se siguieron los pasos indicados a continuación:
- 5 2. Pesar 1 g de cada una de las muestras. (BCR-377: 1,0035 g y BCR-396: 1,0022 g)
3. Añadir 2 µl de DON (1000 mg l<sup>-1</sup>). Se lleva la alícuota a 100 µl añadiendo 98 µl de agua mili Q.
4. Agitar con ayuda de un agitador magnético durante toda la noche a temperatura ambiente.
- 10 5. Continuar con el protocolo de extracción de la FB1, con lo que se tendrá 1 gramo de muestra con 2000 ng/g de DON.

Una vez que se tiene la muestra preparada, se siguió el mismo procedimiento de trabajo que se ha descrito en el ejemplo nº 7.

El porcentaje de recuperación se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$15 \quad \% \text{ Recuperación} = \frac{Y - X_i}{X_a} \cdot 100$$

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

X<sub>i</sub> = [muestra] = 0 ng.ml<sup>-1</sup> FB1.

20 X<sub>a</sub> = [patrón] = 401,4 ng ml<sup>-1</sup> (BCR-377) y 400,9 ng ml<sup>-1</sup> (BCR-396)

Para las experiencias realizadas se obtuvieron en todos los casos porcentajes de recuperación entre el 90 y 110 %.

### **Ejemplo nº 10: Comparación de la determinación de DON en muestras de cereales con distintas técnicas**

25 La validación del Kit de la invención se ha llevado a cabo mediante la comparación con un Kit ELISA convencional que se ha adquirido en la casa comercial Europroxima. La referencia del Kit utilizado es 5121DON1p[7]05.08.

Algunas características generales del Kit de inmunoensayo 5121DON1p[7]05.08 son:

- 96 pocillos
- Ensayo directo *screening* en alimentos y en muestras biológicas
- Anticuerpo sin inmovilizar (anti-rabbit DON-HSA)
- 5 • Rango lineal 0 - 10 ng/ml
- Reactividad cruzada:
  - Deoxinivalenol (DON) 100 %
  - 3-Acetil-deoxinivalenol 96 %
  - 15-Acetil-deoxinivalenol < 0.1 %
  - 10 • Nivalenol 40 %
  - T-2 toxina < 0.1 %
  - Zearalenona < 0.1 %
  - Fumonisina < 0.1 %
- Recuperación: 80-110%
- 15 • Sustrato TMB  $\lambda=450$  nm
- Competición entre DON y DON-HRP

Para la preparación de las muestras (cereales, comida y piensos) se siguieron los siguientes pasos:

1. Moler y pulverizar la muestra (50-100 g) hasta conseguir un polvo homogéneo
- 20 2. Pesar 1 g y diluir con 19 ml H<sub>2</sub>O destilada.
3. Agitar durante 5 minutos.
4. Filtrar por gravedad con filtro de papel

Los reactivos deben estar siempre almacenados entre 2-8 °C. Antes del uso se deben dejar a temperatura ambiente durante alrededor de 30 minutos. Son:

- 25 • Tampón de lavados (*rinsing buffer*): diluir 20 veces justo antes de usar (2 ml con 38 ml de H<sub>2</sub>O destilada, dilución 1/20)
- Tampón de dilución: Para resuspender o realizar las diluciones de anticuerpo y de DON-HRP. Viene preparado directamente
- Disolución sustrato: mantener a una temperatura de 4°C y protegido de la luz. Agitar
- 30 bien antes de usar

- Disoluciones patrón: DON 0; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 y 10 ng/ml. Están listas para usar.
- Anticuerpo y DON-HRP son sólidos liofilizados. Llevar a 4 ml con tampón de dilución y mantener almacenados a 4°C.

5 Todas las experiencias se realizaron por duplicado en 2 pocillos contiguos:

1. 100 µl estándar 0 ng/ml DON
2. 50 µl estándar 0 ng/ml y 50 µl cada uno de los estándares 0,313-10 ng/ml DON
3. 50 µl de cada muestra (cada una en pocillos distintos)
4. 25 µl DON-HRP en todos los pocillos excepto en los del punto 1.
- 10 5. 25 µl anticuerpo en todos los pocillos excepto en los del punto 1.
6. Sellar la placa y agitar 1 min
7. Se incuba 1 h a 4°C en la oscuridad
8. Lavar 3 veces con el tampón de lavados como se detalla más adelante
9. Añadir 100 µl del sustrato 3,3',5,5', tetrametilbenicidina (TMB) en todos los pocillos
- 15 10. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad.
11. Añadir 100 µl de la disolución de parada de la reacción enzimática (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
12. Leer la señal de absorbancia a  $\lambda=450$  nm

Los lavados se realizaron vaciando el contenido de la placa y agitando. A continuación llenando con 300 µl de tampón de lavado tras cada vaciado y secando sobre papel  
20 absorbente

Para validar el Kit de la invención se disponía de dos materiales de referencia certificados (CRMs) cuyas referencias son: WH1144A-1, WH1144A-2, y su contenido certificado de DON es 1579,78 y 54,50 µg/Kg respectivamente.

El tratamiento de estas dos muestras consiste en pesar 1 g de muestra y extraerlo con 5 ml  
25 de tampón fosfato salino (PBS, 0,1 M, pH 7,4), 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 del sobrenadante.

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

En la tabla 10 se muestran los resultados del ensayo. El Kit de la invención tiene buena reproducibilidad, el valor del coeficiente de variación oscila entre 8 y 13 %, y la exactitud se puede considerar buena, con errores relativos del 8 % y 6,6 %, para las muestras 1 y 2 respectivamente. Para el análisis de las dos muestras se ha determinado el contenido de DON en dos réplicas.

Tabla 10. Validación del inmunoensayo magnético de la invención mediante la comparación con un ELISA comercial (Europroxima) y dos materiales de referencia certificados (CRMs).

	WH1144A-1	WH1144A-2
[DON] <sub>certificada</sub> (ng/g)	1579,78	54,50
CV (%)	5	8
[DON] <sub>medida</sub> (ng/g)	1452,93	58,12
Intervalo de confianza (ng/g)	25,45	
Error (%)	8	6,6

#### **Ejemplo nº 11. Calibrado completo utilizando electrodos serigrafiados individuales**

Una vez conocidas las condiciones para llevar a cabo el inmunoensayo de la invención, se trabajó utilizando como celda de reacción los pocillos de la placa y la etapa de transducción electroquímica se llevó a cabo sobre la superficie de los electrodos serigrafiados de carbono individuales fabricados en la Universidad de Florencia. En la figura 16 se ha representado de forma esquemática los bioreactivos 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 ELISA, y luego se re-suspenden las partículas en 22 µl de tampón PBS (0,1 M, pH 6,5). A continuación se añaden 20 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 tenga lugar la reacción enzimática se añaden 40 µl de hidroquinona (4,5 mM) y 40 µl de peróxido de hidrógeno (24 mM) en tampón PBS (0,1 M, pH 6,5), quedando una concentración final de hidroquinona de 1,8 mM y de peróxido de hidrógeno de 9,6 mM sobre el electrodo. Los sustratos de la reacción enzimática se preparan a pH 6,5 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 transcurre durante 10 minutos a temperatura ambiente

sobre la superficie del electrodo y finalmente se aplica 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 toma el valor de la corriente medida a 80 s y se representa en función de la concentración de DON.

5 Los electrodos utilizados en este análisis han sido fabricados en la Universidad de Florencia y un potenciostato portable de la casa comercial PalmSens. En la figura 17 se muestra una representación esquemática de este tipo de electrodos: el electrodo de trabajo, el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia, así como los contactos eléctricos para conectarlo con el potenciostato.

10 En la figura 18 se ha representado el valor de la corriente medida en función del logaritmo de la concentración de DON, usando las condiciones experimentales mostradas en el ejemplo nº 7.

Cada uno de los puntos de la curva sigmoide se corresponde al promedio de dos medidas. La máxima corriente medida es de -0,2  $\mu$ A.

15 **Ejemplo nº12. Determinación de DON en muestras de cereales utilizando electrodos individuales.**

Para validar el inmunosensor electroquímico de la invención se disponía de dos materiales de referencia certificados (CRMs), son los mismos materiales de referencia que se han utilizado en el ejemplo nº 10, WH1144A-1, WH1144A-2, y su contenido certificado de DON  
20 es de 1579,78 y 54,50  $\mu$ g/Kg respectivamente. En la figura 19 se ha representado la correspondiente curva de calibrado que ha sido utilizada para la interpolación de la concentración de estos dos materiales de referencia certificados.

El tratamiento de estas dos muestras y el esquema de trabajo son los mismos que se ha descrito en el ejemplo nº 10, salvo que, en el caso de la muestra, en lugar de añadir sobre el  
25 pocillo 25  $\mu$ l de DON (patrón) se añaden 25  $\mu$ l de muestra de harina de trigo.

Al interpolar las dos muestras se han obtenido errores del 8,3 y 11 %, para WH1144A-1, WH1144A-2, respectivamente.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para las dos réplicas que se han hecho de cada muestra.

Tabla 11. Validación del inmunoensayo magnético de la invención utilizando electrodos individuales mediante la realización de la determinación de DON en dos materiales de referencia certificados (CRMs).

	WH1144A-1	WH1144A-2
[DON] <sub>certificada</sub> (ng/g)	1579,78	54,50
CV (%)	8	7
[DON] <sub>medida</sub> (ng/g)	1603,74	51,63
Intervalo de confianza (ng/g)	18,41	22,45
Error (%)	8,3	11

### Ejemplo nº13. Calibrado electroquímico con el sensor múltiple de ocho electrodos

5 Se llevó a cabo un estudio para la miniaturización y portabilidad del inmunosensor de la invención utilizando un potenciostato 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 20 se observa una fotografía de estos electrodos, que en combinación con el potenciostato portable dotan a este dispositivo sensor de la portabilidad adecuada. En la figura 21 se muestra una fotografía del imán que se ha utilizado para atraer las partículas magnéticas sobre la superficie del electrodo de trabajo.

15 Las dimensiones de sensor múltiple son 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.

20 Al trabajar con partículas magnéticas es necesario colocar un imán debajo de cada electrodo, de forma que sólo afecte al área superficial del electrodo de trabajo.

Existe la posibilidad de utilizar diferentes sustratos de la reacción enzimática para llevar a cabo la etapa de transducción electroquímica, por lo que se realizó un ensayo para trabajar con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), y otro la hidroquinona (HQ) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato.

En primer lugar se trabajó con este electrodo de ocho canales usando el compuesto 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como sustrato de la reacción enzimática, siendo las condiciones instrumentales electroquímicas que se fijaron:

- E acondicionamiento: 0 V
- 5      • E deposición: 0 V
- Intervalo: 0,1
- Pasos: 1
- Tiempo acondicionamiento: 5 s
- Tiempo deposición: 0
- 10     • Tiempo equilibrio : 0s
- Ciclos: 1
- E inicial: 0
- Tiempo: 85 s

El protocolo de trabajo es el mismo que se ha descrito cuando se trabaja con electrodos 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 porque la superficie de los electrodos es menor que en el caso de los electrodos individuales.

Los resultados de intensidad en función del logaritmo de la concentración de DON se muestran en la figura 22. En la tabla 12 se recogen los parámetros obtenidos en el ajuste sigmoideo del calibrado.

Tabla 12. Valores numéricos tras llevar a cabo el correspondiente ajuste sigmoideo usando el modelo de los cuatro parámetros logísticos del calibrado con TMB usando un electrodo múltiple de la Universidad de Florencia.

Parámetros 4PL	
Mínimo	-0,0085
Máximo	-0,021
Pendiente	1,263
IC50	6,367
R	0,9985

Las corrientes medidas fueron muy bajas, por lo que se decidió probar con un calibrado utilizando HQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato y co-sustrato de la reacción enzimática respectivamente, y la técnica electroquímica seleccionada fue la cronoamperometría.

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

5

- E acondicionamiento: 0 V
- E deposición: 0 V
- Intervalo: 0,1
- Pasos: 1

10

- Tiempo acondicionamiento: 5 s
- Tiempo deposición: 0
- Tiempo equilibrio : 0s
- Ciclos: 1

15

- E inicial: -0,25 V
- Tiempo: 85 s

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 µl 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 µl de HQ (concentración final de 1,8 mM) y 40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentración final de 1 mM), se esperan 10 minutos de tiempo de reacción enzimática y se mide aplicando el salto de potencial.

20

En la figura 23 se ha representado la corriente medida a un tiempo constante (80 s) frente a la concentración de DON. Se observa un buen ajuste sigmoideo pero un valor máximo de corriente máxima con poca sensibilidad (-0,08 µA). En la tabla 13 se muestran los valores numéricos tras llevar a cabo el correspondiente ajuste sigmoideo basado en el modelo de los cuatro parámetros logísticos.

25

Tabla 13. Valores numéricos tras llevar a cabo el correspondiente ajuste sigmoideo usando el modelo de los cuatro parámetros logísticos del calibrado con HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) usando un electrodo múltiple de la Universidad de Florencia

Parámetros 4PL	
Mínimo	-0,0479

Máximo	-0,0761
Pendiente	1,311
IC <sub>50</sub>	1,561
R	0,9459

Por tanto se puede concluir que usando este par de sustratos y la técnica de cronoamperometría, la detección electroquímica tiene una mayor sensibilidad que en el caso de usar el TMB de detección electroquímica. En la figura 24 se muestran dos curvas de calibrado correspondientes a estos dos supuestos, observándose que para el caso del TMB las corrientes medidas, así como la sensibilidad obtenida son mucho menores. En la tabla 14 se han recopilado las condiciones electroquímicas fijadas en el potenciostato cuando se trabaja con estos dos tipos de sustratos electroquímicos para su comparación.

Tabla 14. Condiciones electroquímicas fijadas en el potenciostato de PalmSens para trabajar con dos sustratos electroquímicos diferentes, TMB o HQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente.

	HQ + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	TMB
E cond	0	0
E dep	0	0
intervalo	0,1	0,1
steps	1	1
t cond	0	5
t dep	0	0
t eq	0	0
ciclos	1	1
E(1)	-0,25	0
t(1)	90	85

10 Pese a que la sensibilidad utilizando HQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato y co-sustrato de reacción respectivamente es mayor, se intentó aumentar la intensidad máxima obtenida aumentando las concentraciones de ambos. En la figura 25 se han comparado los ajustes sigmoideos de las concentraciones estudiadas de ambos compuestos.

15 A la vista de los resultados se selecciona para la reacción enzimática, 40 µl de HQ (concentración final de 1,8 mM) y 40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentración final de 9,6 mM), se esperan 10 minutos de tiempo de reacción enzimática y se mide aplicando el salto de potencial (-0,25

V).

A continuación se estudió la reproducibilidad entre los ocho electrodos que constituyen el inmunosensor de la invención, realizando en los ocho pocillos el mismo ensayo, que consiste en añadir el volumen fijado de partículas magnéticas modificadas con el anticuerpo monoclonal (8  $\mu$ l) y el volumen correspondiente del conjugado enzimático DON-HRP (25  $\mu$ l, dilución 1/10). Hasta 100  $\mu$ l 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 desde 0 hasta -0,25 V durante un tiempo de 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 26 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  $\mu$ A.

Un segundo estudio de reproducibilidad que se llevó a cabo con el inmunosensor de la invención 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 27 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  $EC_{50}$ ) son diferentes para ambos calibrados, trabajando con una probabilidad del 95 %.

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

Tabla 15. Valores numéricos tras llevar a cabo el correspondiente ajuste sigmoideo basado en el modelo de los cuatro parámetros logísticos (4-PL) para dos electrodos múltiples diferentes.

Parámetros	MBs (1)	MBs (2)
Máximo	-0,3771	-0,3860
Mínimo	-0,0599	-0,0735
Pendiente	1,154	1,992
IC <sub>50</sub>	12,81	38,44
R	1	1

5

#### **Ejemplo nº14: Estudio del tiempo de vida del inmunosensor de la invención**

Otro estudio que hemos llevado a cabo es el estudio del tiempo de vida del inmunosensor de la invención, para ello se ha estudiado la actividad del anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre las partículas magnéticas. Se conjugaron 10 µl 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 DON-HRP todos los días. Se ha estudiado durante cuatro semanas, y los valores de absorbancia medida se han representado en el gráfico de control que se muestra en la figura 28. En esta gráfica se puede ver que el valor de absorbancia medido está entre el límite de control superior e inferior.

La señal obtenida se mantiene prácticamente constante a medida que transcurre el tiempo hasta 15 días después del comienzo del estudio, después se produce un descenso pronunciado hasta debajo del nivel inferior por lo que se estima que la vida útil de uso del inmunosensor son 25 días desde la inmovilización del anticuerpo monoclonal sobre las partículas magnéticas.

El estudio se realizó para un tiempo de vida de un mes, ya que es el tiempo de vida del anticuerpo monoclonal en disolución cuando se encuentra almacenado a una temperatura entre 2-8 °C, por lo tanto parece lógico pensar que inmovilizado tendrá el mismo tiempo de vida. El conjugado enzimático DON-HRP (dilución 1/10) se ha preparado en el mismo momento que las partículas magnéticas, y se ha estudiado el efecto de los dos parámetros conjuntamente.

Uno de los motivos por lo que disminuya la actividad del inmunosensor es la pérdida de afinidad del anticuerpo monoclonal inmovilizado y la otra puede ser la pérdida de actividad

de la enzima que forma parte del conjugado enzimático DON-HRP.

### **Ejemplo nº 15: Determinación de DON utilizando un sensor múltiple de ocho electrodos**

Para llevar a cabo la determinación de DON en muestras de cereales se ha tratado la muestra tal y como se ha descrito en ejemplos anteriores, y se ha cuantificado el contenido de DON utilizando el inmunosensor electroquímico con partículas magnéticas de la invención. Se han utilizado dos materiales de referencia certificados WH1144-1 y WH1144-2, siendo su contenido certificado de DON es 1579,78 y 54,50 µg/Kg respectivamente.

Para realizar la determinación cuantitativa de la concentración de DON se puede optar por varios formatos de calibración diferentes.

Se ha llevado a cabo un calibrado de cuatro puntos para cuantificar el contenido de DON en dos muestras por duplicado utilizando el inmunosensor electroquímico de la invención y la técnica de amperometría aplicando un potencial constante de -0,35 V durante 90 s tomando el valor de la corriente a 80 s.

En la tabla 16 se muestran los parámetros logísticos tras llevar a cabo el ajuste sigmoideo de cuatro puntos para después interpolar la corriente obtenida para las muestras certificadas.

Tabla 16. Valores numéricos tras llevar a cabo el correspondiente ajuste sigmoideo basado en el modelo de los cuatro parámetros logísticos (4-PL) usando un electrodo múltiple de ocho electrodos. Utilizado para la interpolación posterior de dos materiales de referencia certificados (WH1144-1, WH1144-2).

	Parámetros
Máximo	-1,960
Mínimo	-0,04164
IC <sub>50</sub>	11,40
Pendiente	1
% Disminución	87,0
R	0,9917
Ajuste	3PL

En la tabla 17 se han recopilado los resultados de la determinación de DON en estas dos

muestras de maíz, obteniéndose valores de concentraciones de DON de 1574,74 y 56,27 ng/ml respectivamente para los dos materiales de referencia certificados, lo que supone un error relativo del 8,3 y 11 % por defecto respectivamente.

5 Para cada una de las muestras se han realizado dos réplicas, y se ha calculado un coeficiente de variación del 5 y 4 % respectivamente para las dos muestras analizadas.

Tabla 17. Validación del inmunosensor electroquímico utilizando electrodos múltiples de ocho electrodos mediante la realización de la determinación de DON en dos materiales de referencia certificados (CRMs, WH1144-1, WH1144-2).

	WH1144A-1	WH1144A-2
[DON] <sub>certificada</sub> (ng/g)	1579,78	54,50
CV (%)	5	4
[DON] <sub>medida</sub> (ng/g)	1574,84	56,27
Intervalo de confianza (ng/g)	16,80	24,12
Error (%)	8,3	11

10 A continuación se ha llevado a cabo un calibrado de ocho puntos para cuantificar el contenido de DON en una muestra de un material de referencia certificado TR-D100, DW-158:  $1400 \pm 200$  ng/g de DON por duplicado utilizando el inmunosensor electroquímico de la invención y se ha utilizado la técnica de amperometría en modo alternado aplicando un potencial constante de -0,35 V durante 90 s tomando el valor de la corriente a 80 s. El control potencioestático sobre los 8 canales se aplica cada 0,24 s a los 8 electrodos (0,03 s para cada uno de los 8 electrodos uno detrás de otro), y a la vez que aplica el potencial en  
15 estos 0,03 s en cada electrodo se mide a la vez la corriente amperométrica, todo ello gestionado con un elemento electrónico multiplexor.

En la tabla 18 se han recopilado los resultados de la determinación de DON en esta muestra de harina de trigo, obteniéndose valores de concentraciones de DON de  $1450 \pm 123,5$  ng/g,  
20 lo que supone un error relativo del 3,63% por exceso.

Tabla 18. Valores numéricos tras llevar a cabo la interpolación del material de referencia certificado TR-D100, DW-158 utilizando el calibrado de los cuatro parámetros logísticos (4-PL). Detección amperométrica (modo alternado) con HQ (1,8 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,6 mM).

	TR D-100 DW-158	
	Réplica 1	Réplica 2
Corriente medida ( $\mu\text{A}$ )	-1,235	-1,155
Promedio ( $\mu\text{A}$ )	-1,195	
[DON] <sub>certificada</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1400	
CV (%)	10	
[DON] <sub>experimental</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1564,7	
Intervalo de confianza	134,5	
Error (%)	11,8	

### Ejemplo nº 15. Validación del inmunosensor electroquímico múltiple de la invención utilizando otras técnicas analíticas

La validación del inmunosensor múltiple de la invención se llevó a cabo mediante el uso de varias técnicas analíticas, entre ellas la metodología oficial de cromatografía líquida de alta resolución y el Kit ELISA comercial, ya descrito en el ejemplo nº 10.

Para extraer la muestra se han de llevar a cabo los siguientes pasos:

1. Pesar 1 g de muestra
2. Añadir 3 ml de una disolución compuesta por 0,5 g de polietilenglicol (PEG, 8000) en 10 ml de agua milliQ
3. Agitar durante 10 minutos (agitador rotatorio: voltear)
4. Centrifugar 10 min, T amb a 2500 g
5. Filtrar el sobrenadante con microfiltro de 0,20  $\mu\text{m}$
6. Recoger el filtrado en tubo falcon y guardar 4°C. Las cantidades exactas de muestras pesadas son 1,0540 g de trigo y 1,0623 g de CRM
7. Tomar 1 ml (equivalente a 0,25 g de muestra) del extracto filtrado y colocarlo en una jeringa para pasarlo a través de la columna de inmunoafinidad denominada "DON test".
8. Pasar este 1 ml de extracto completamente a través de la columna de inmunoafinidad DON Test HPLC, a una velocidad aproximada de una gota por segundo
9. Pasar 5 ml de agua mili Q a través de la columna a una velocidad de 1 gota/s
10. En un jeringuilla dispensar 1 ml de metanol (grado HPLC)
11. Colocar un botecito de HPLC debajo de la columna de inmunoafinidad y eluir a una velocidad de 1 gota por segundo y recoger el eluido (tomar cuantitativamente en el botecito el ml por completo). Para preparar la inyección en HPLC se evapora 1 ml de

metanol de la muestra hasta sequedad total con una corriente de nitrógeno y siempre bajo la campana extractora y se reconstituye la muestra en 300 µl de fase móvil para el análisis en HPLC. El rango del análisis está entre 0 y 5 ppm en ACN/H<sub>2</sub>O (10:90).

Las condiciones de HPLC son:

- 5 • Columna en fase reversa C18, 4,6x75 mm (3,5 µm)
- Fase móvil: acetonitrilo:agua (10:90) filtrar en filtro 0,45 µm
- Velocidad de flujo: 0,6 ml/min
- Volumen de inyección: 50 µl
- Detección: 218 nm
- 10 • Volumen de inyección de muestra en el loop: 200 µl
- Tiempo de retención:  $t_r=5,80$  minutos.

Se realiza un calibrado de DON con estándares comprendidos entre 0 y 5 mg/l en la fase móvil ACN/H<sub>2</sub>O (10:90).

15 En la tabla 19 se han indicado los valores numéricos obtenidos al determinar la concentración de DON en este material de referencia certificado, observándose una muy buena correlación entre los resultados obtenidos y unos errores relativos inferiores al 8 % en todos los casos.

20 Tabla 19. Validación del inmunosensor electroquímico mediante varias técnicas analíticas, usando el material de referencia certificado TR-D100, DW-158, de concentración  $1400 \pm 200$  µg/kg (n=5).

Material de referencia certificado (harina de maíz)	HPLC - FLD [DON] (µg/kg) (95%)	ELISA comercial [DON] (µg/kg) (95%)	ELISA magnético [DON] (µg/kg) (95%)	Inmunosensor electroquímico [DON] (µg/kg) (95%)	[DON] certificada (µg/kg) (95%)
DW-158	1377±205	1286 ± 185	1347,96 ± 577	1450 ± 10	1400 ± 200
Error (%)	1,65	8,14	3,78 (defecto)	3,63	-

## REIVINDICACIONES

1. Kit que comprende un anticuerpo monoclonal de la micotoxina deoxinivalenol DON inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas por proteína G, un  
5 conjugado DON-HRP que comprende la micotoxina DON unida a una enzima peroxidasa de rábano picante HRP, un sustrato y un cosustrato enzimáticos de dicha enzima HRP que comprende hidroquinona y peróxido de hidrógeno, disolución tampón y un inmunosensor electroquímico que comprende un potenciómetro portátil, un electrodo múltiple, un soporte y un sistema de imanes.
- 10 2. El kit, según la reivindicación 1, donde el anticuerpo monoclonal DON inmovilizado sobre micropartículas magnéticas funcionalizadas por proteína G está en forma de suspensión en disolución tampón.
3. El kit, según la reivindicación anterior, donde el anticuerpo monoclonal DON tiene una concentración de entre 0,6 y 10 mg/l.
- 15 4. El kit, según la reivindicación anterior, donde el anticuerpo monoclonal DON tiene una concentración de 5 mg/l.
5. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el conjugado DON-HRP que comprende la micotoxina DON unida a una enzima peroxidasa de rábano picante HRP está diluido en la disolución tampón en una proporción seleccionada de entre 1 a 10, 1 a  
20 8 y 1 a 5.
6. El kit, según la reivindicación anterior, donde el conjugado DON-HRP está diluido en la disolución tampón en una proporción de 1 a 5.
7. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la cantidad de micropartículas magnéticas necesarias está en un rango comprendido entre 5 a 20 µg.
- 25 8. El kit, según la reivindicación anterior, donde la cantidad de micropartículas magnéticas necesarias está en un rango comprendido entre 10 a 15 µg.
9. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde las micropartículas magnéticas tienen un diámetro de entre 2,5 µm y 3 µm.
10. El kit, según la reivindicación anterior, donde las micropartículas magnéticas tienen un  
30 diámetro de 2,8 µm.
11. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la disolución tampón es una disolución fosfato salina que se selecciona de la lista que comprende PBS, PBST o cualquiera de sus combinaciones.

12. El kit, según la reivindicación anterior, donde la disolución tampón está a una concentración de 0,1 M.
13. El kit, según cualquiera de las reivindicaciones 11 u 12, donde la disolución tampón se encuentra a un pH de entre 6.5 y 7.5.
- 5 14. El kit, según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 13 donde el soporte se selecciona de la lista que comprende una placa de microvaloración ELISA o soporte de plástico o cuentas.
15. Un método para determinar y cuantificar electroquímicamente la micotoxina DON en una muestra utilizando el kit, según las reivindicaciones 1 a 14, que comprende las siguientes etapas:
- 10
- a) poner en contacto una muestra a analizar, diluida en disolución tampón, con una disolución de un conjugado enzimático DON-HRP que comprende la micotoxina DON unida a una enzima peroxidasa de rábano picante HRP,
  - b) añadir una suspensión del anticuerpo monoclonal de DON 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,
  - e) 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.
16. El método, según la reivindicación anterior, donde la muestra a analizar procede de muestras de cereales o productos derivados.
- 25
17. El método, según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, 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.
18. El método, según la reivindicación anterior, que se lleva a cabo en una placa de microvaloración ELISA.
- 30

19. El método, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, donde la medida electroquímica es una medida amperométrica.
20. El método, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, donde la etapa (f) se realiza a un potencial reductor de -0.35V.
- 5 21. Uso del kit, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para determinar y cuantificar la micotoxina DON en cereales y sus productos derivados.

Figura 1.

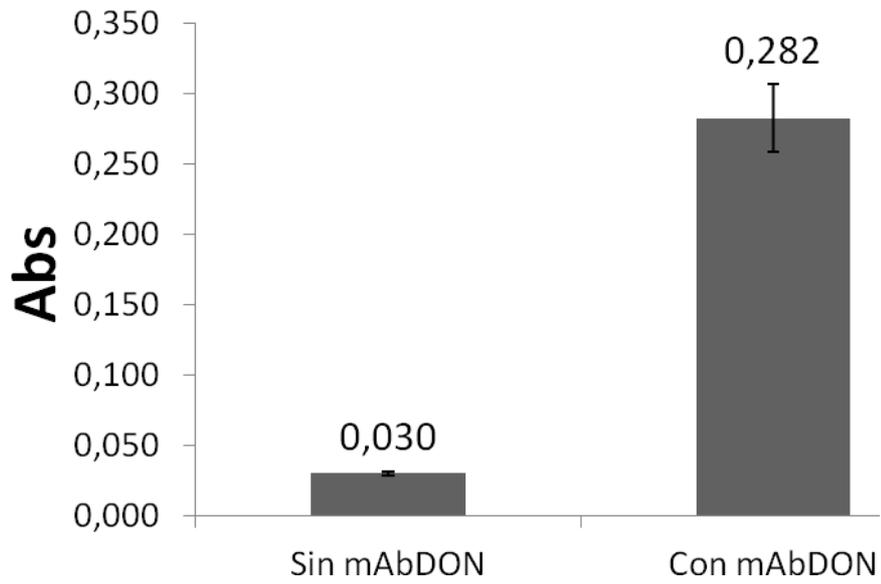


Figura 2.

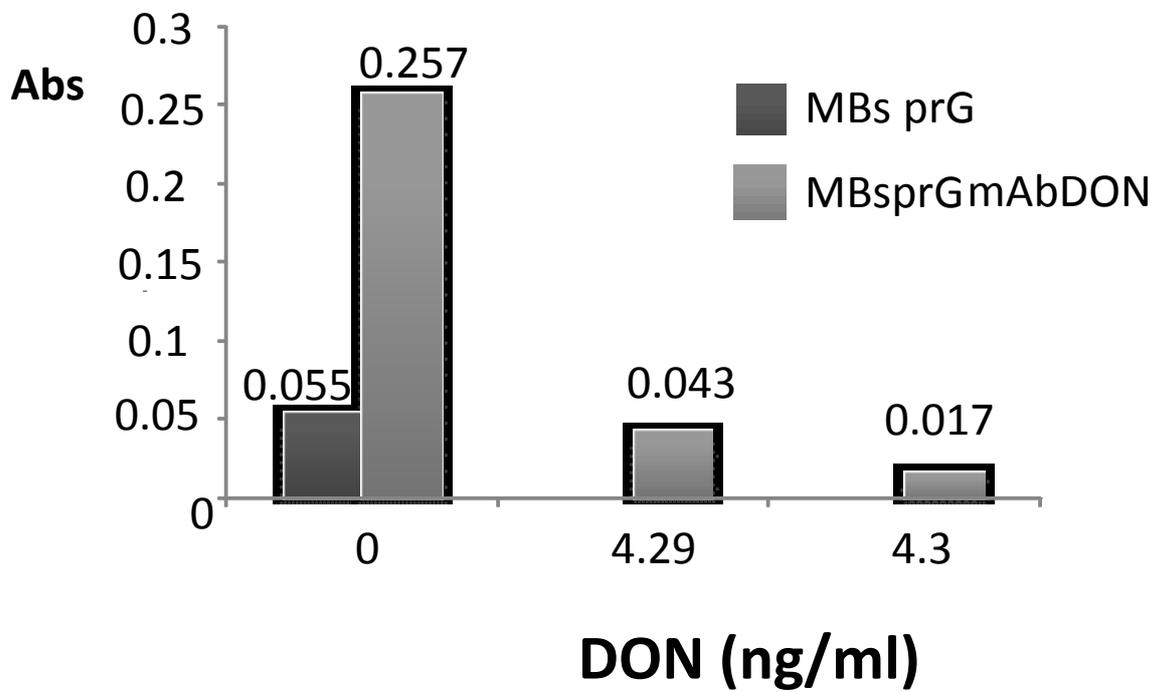


Figura 3.



Figura 4.

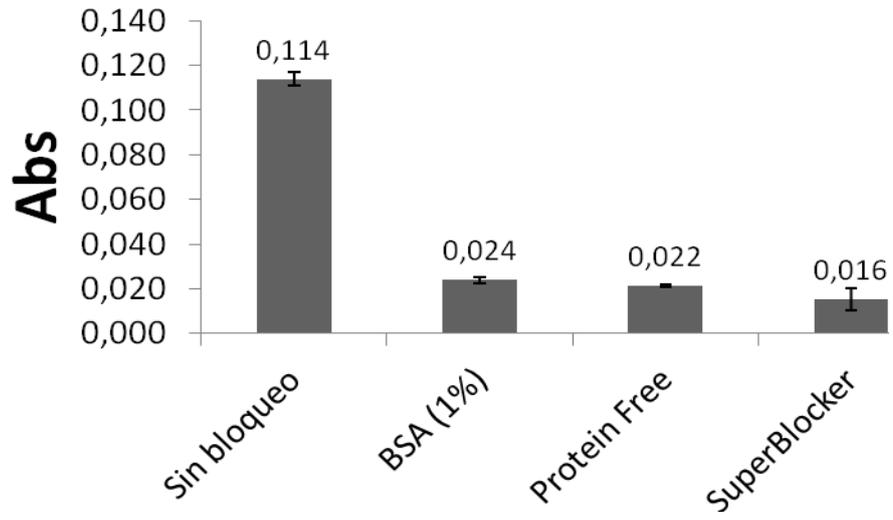


Figura 5.

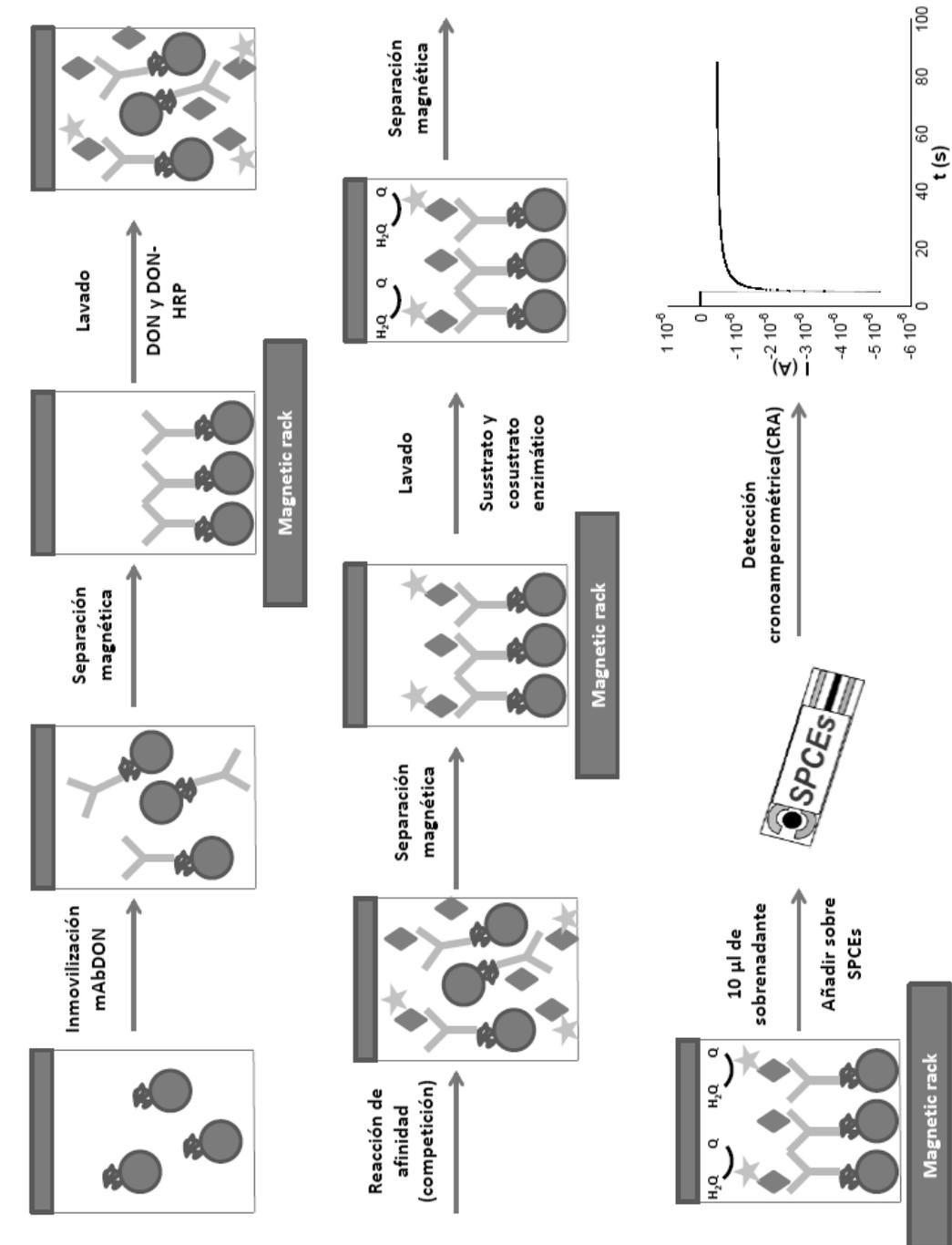


Figura 6.

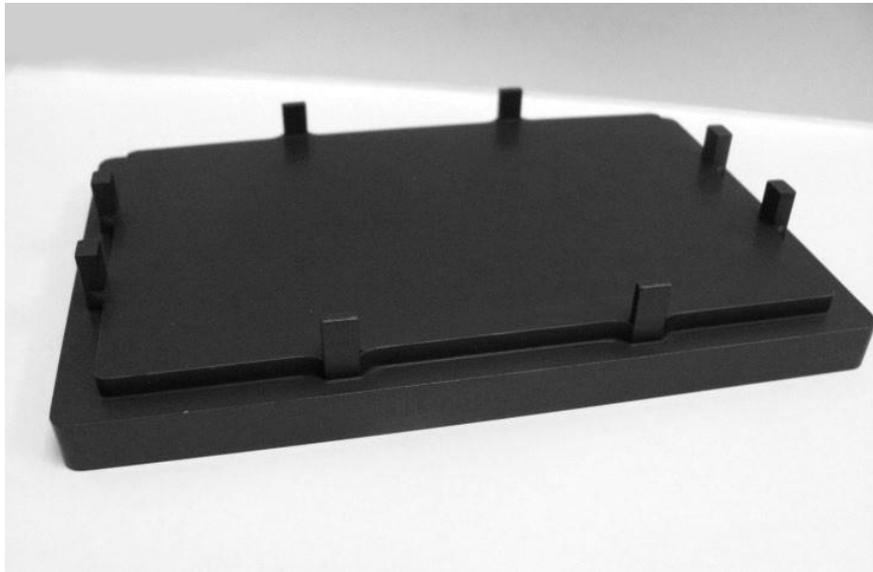


Figura 7.

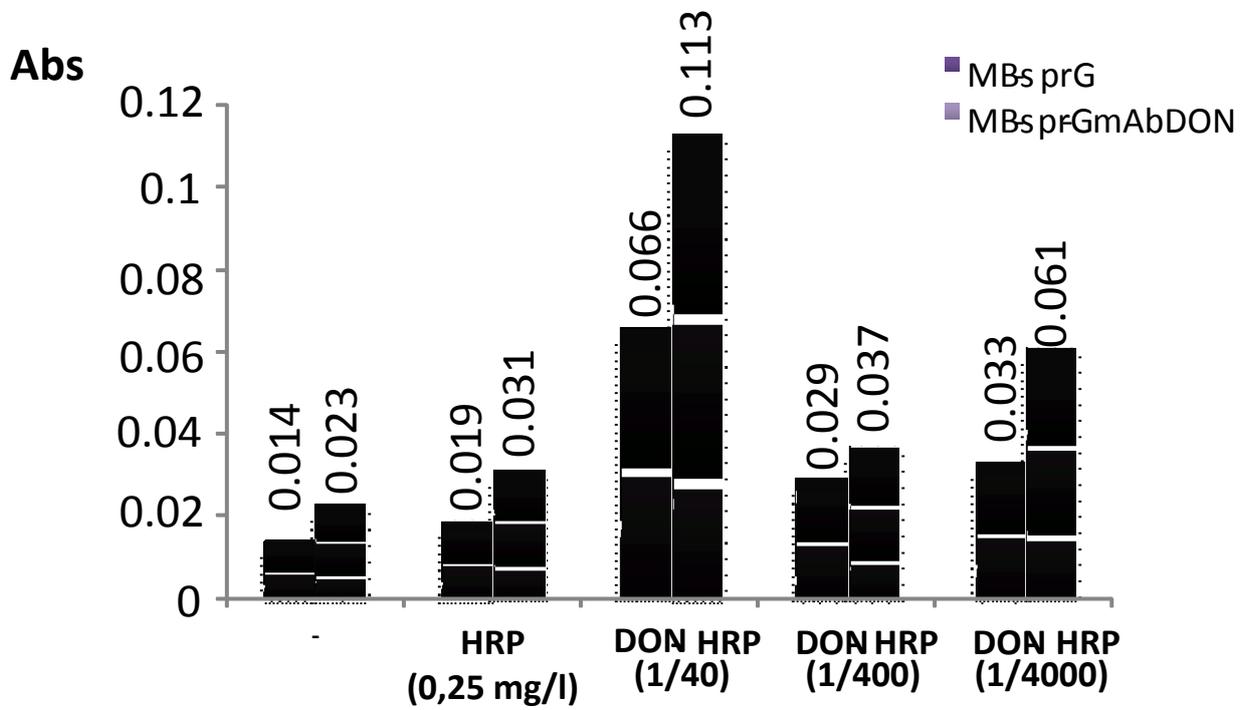


Figura 8.

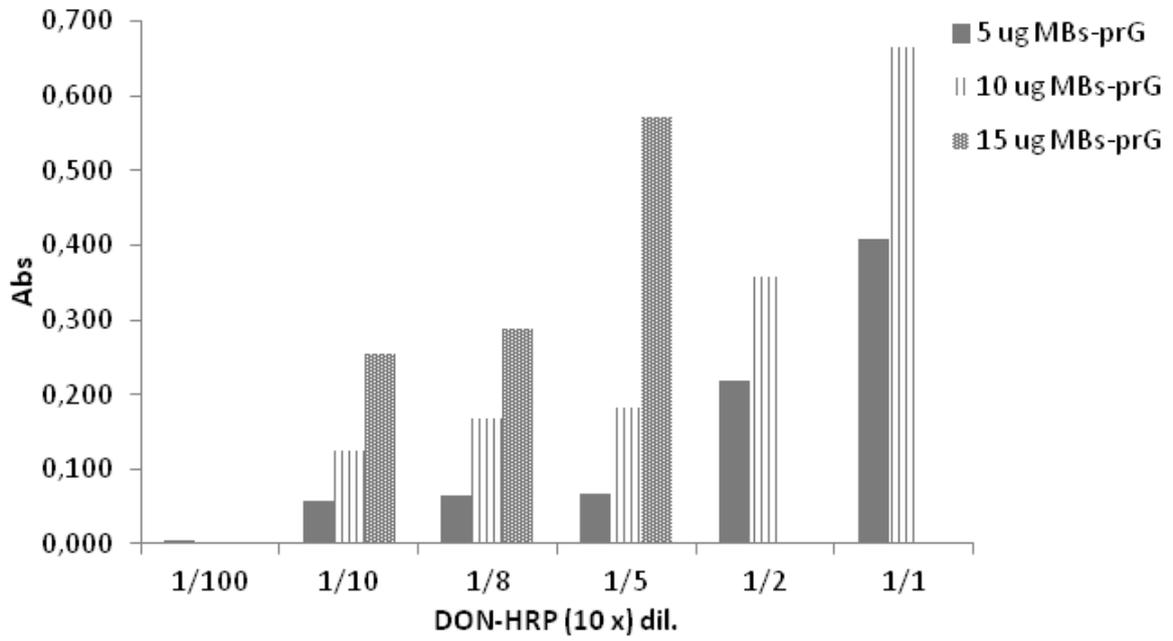


Figura 9.

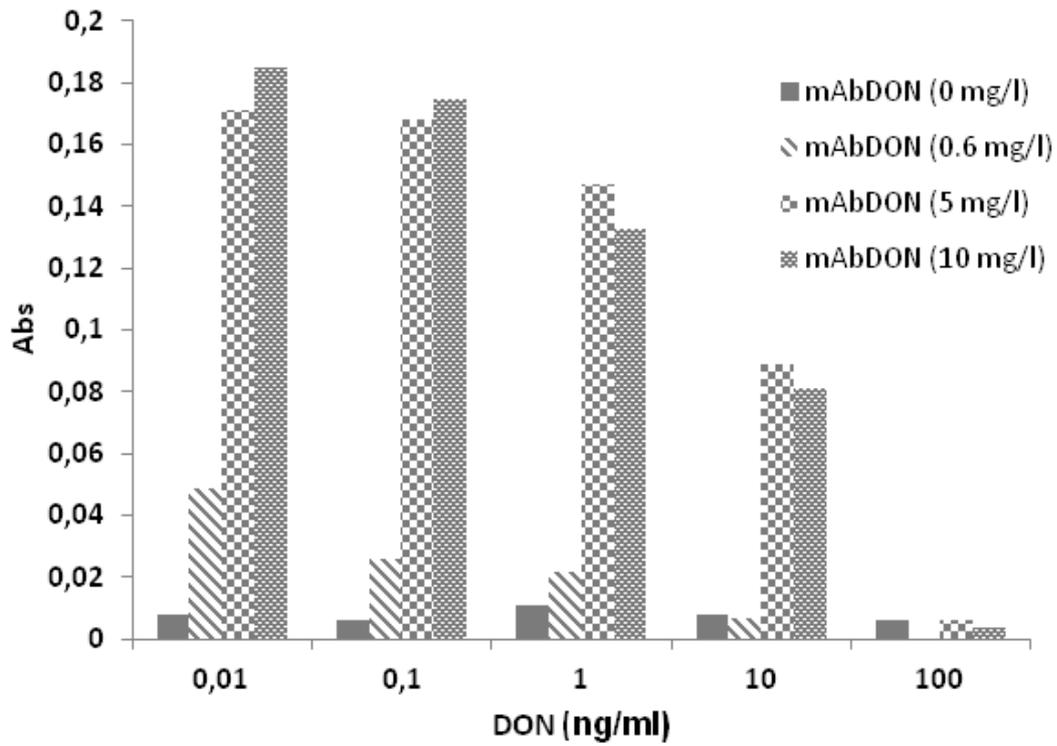


Figura 10.

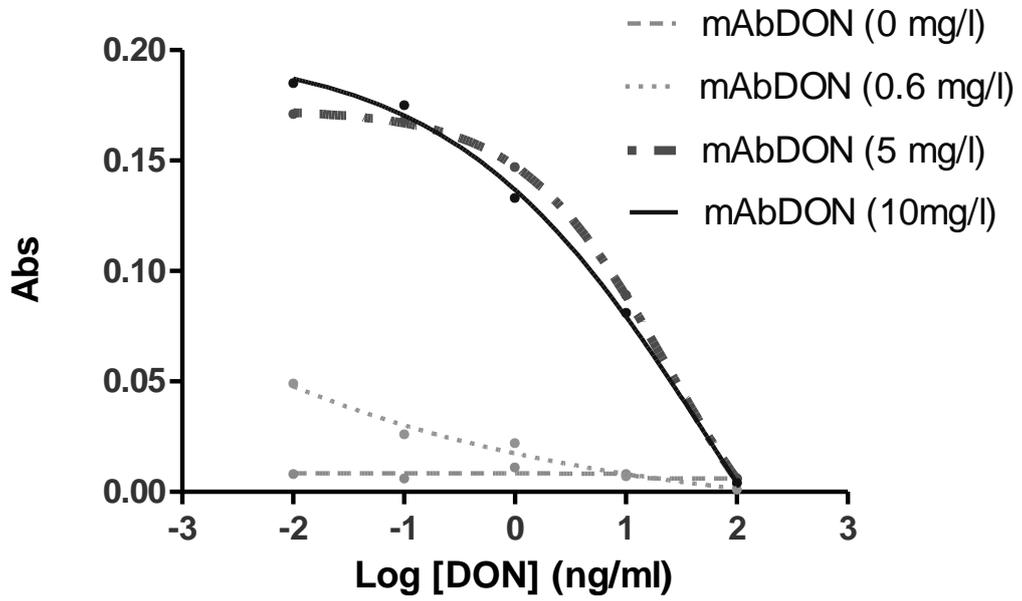


Figura 11.

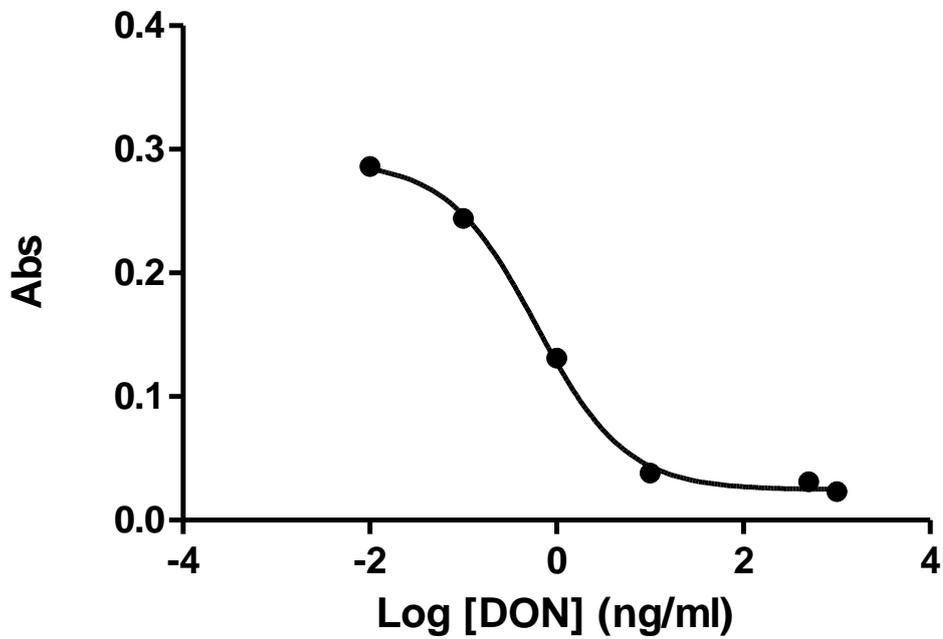


Figura 12.

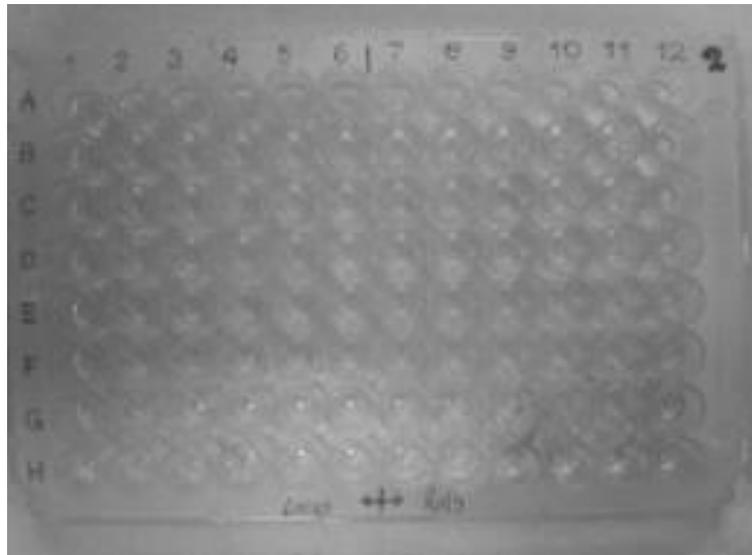


Figura 13.

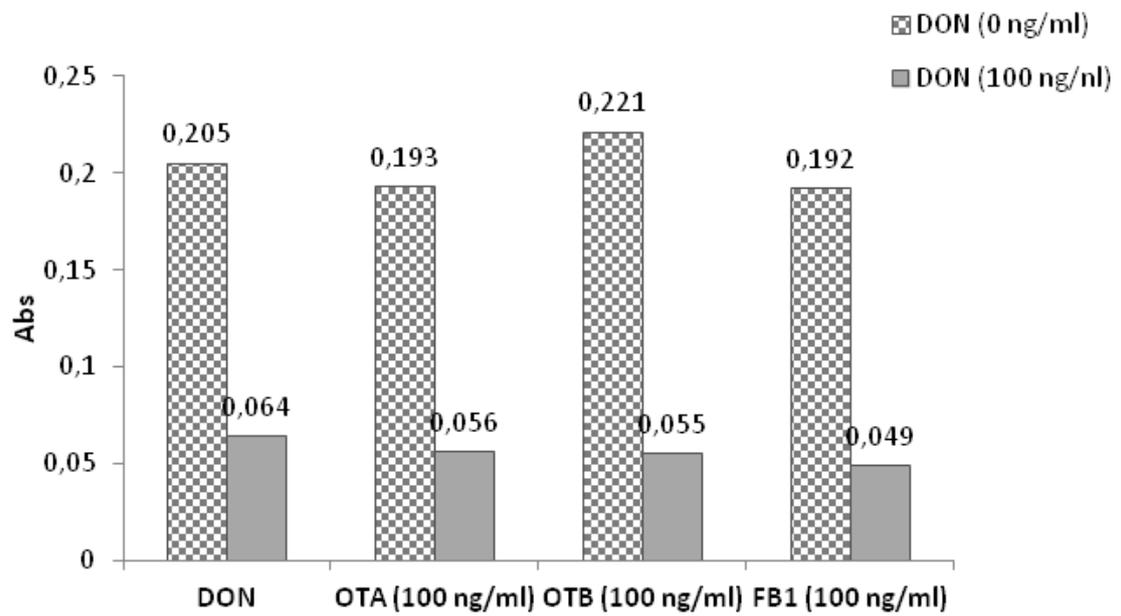


Figura 14.

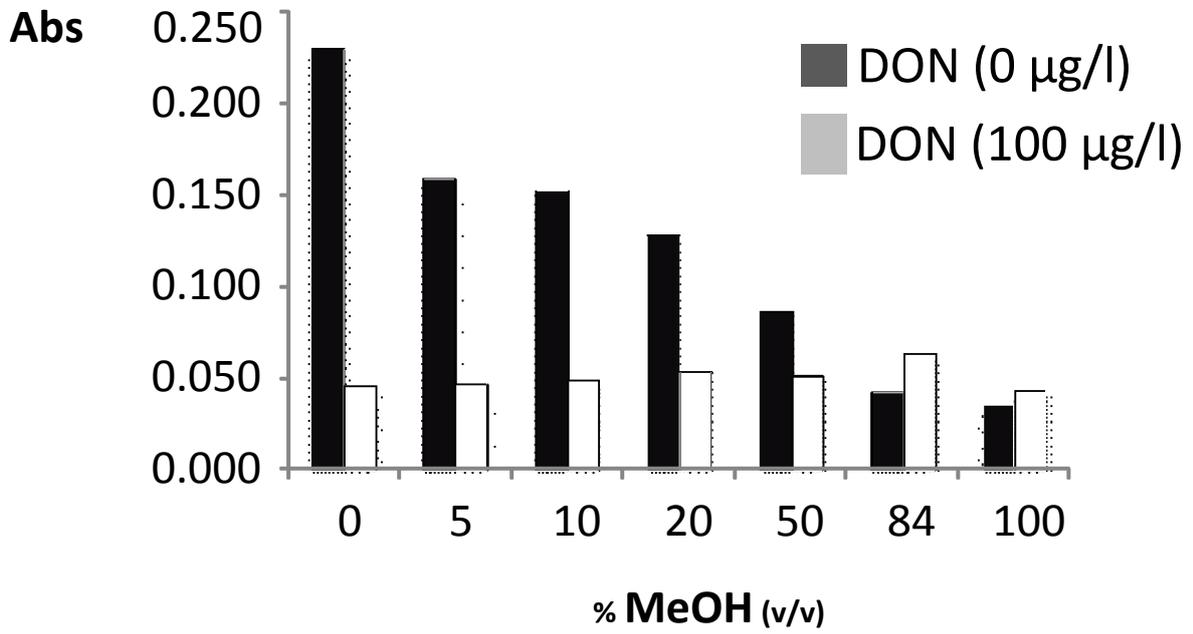


Figura 15.

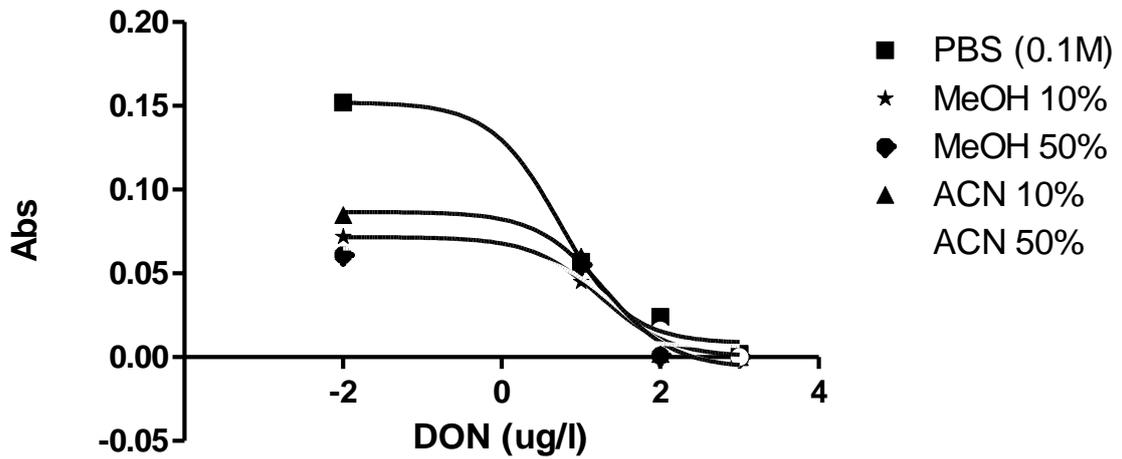


Figura 16.

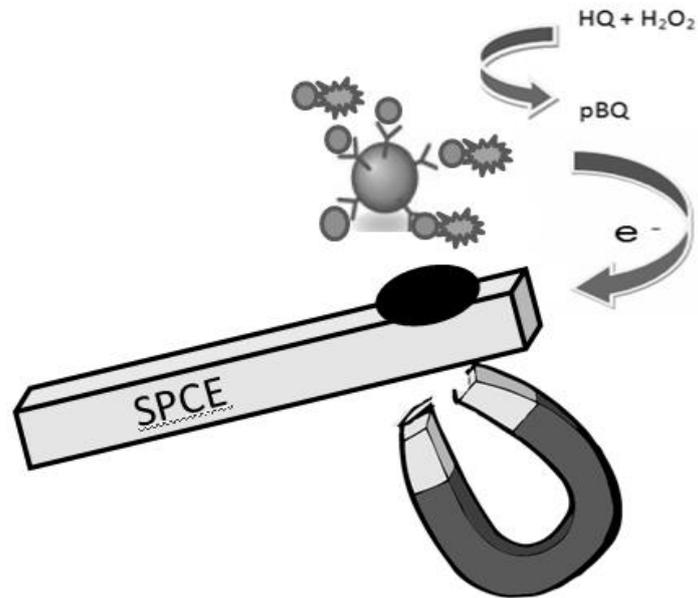


Figura 17.

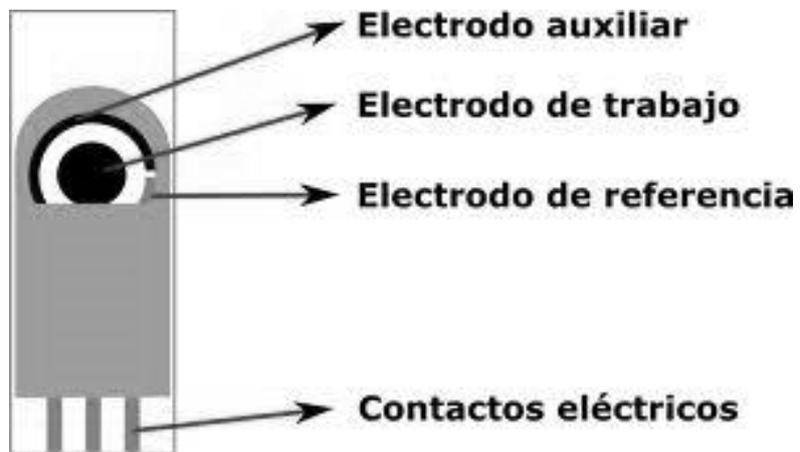


Figura 18.

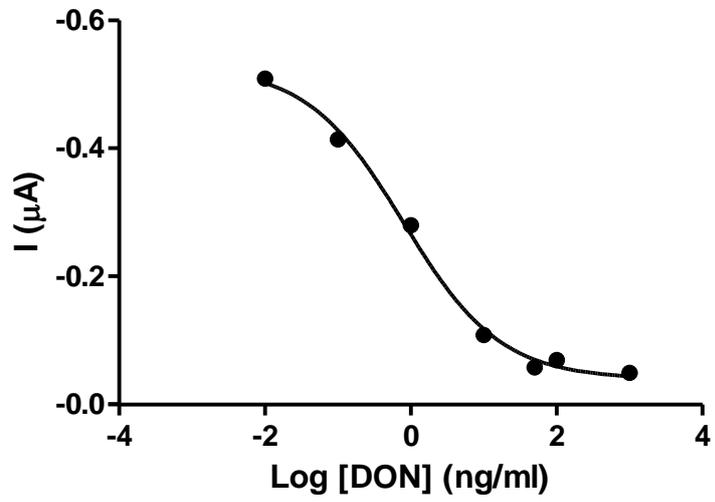


Figura 19:

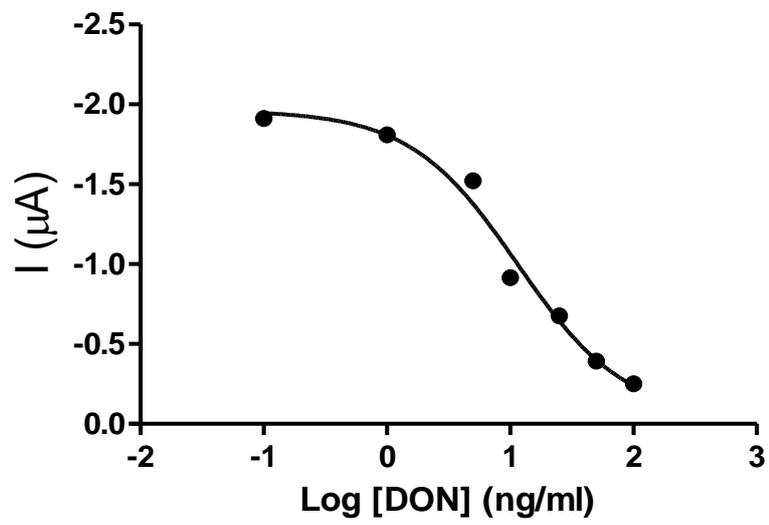


Figura 20.



Figura 21.

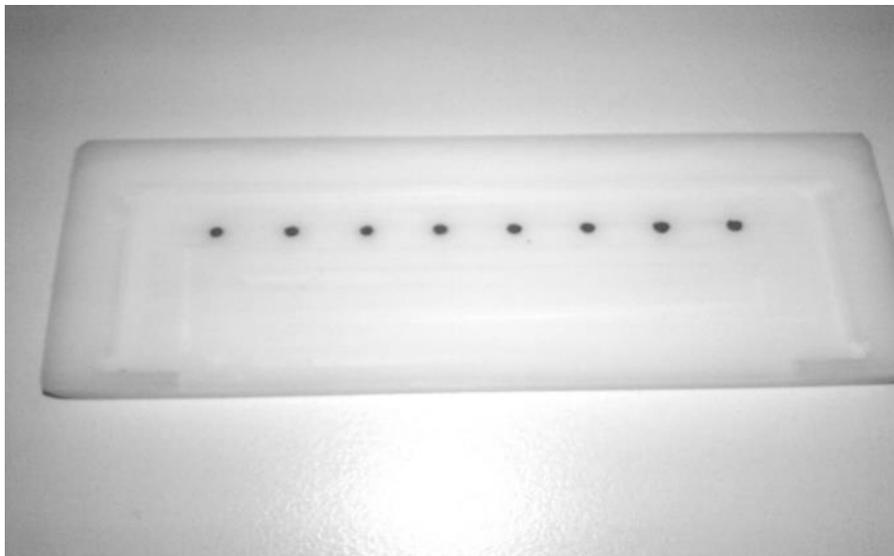


Figura 22.

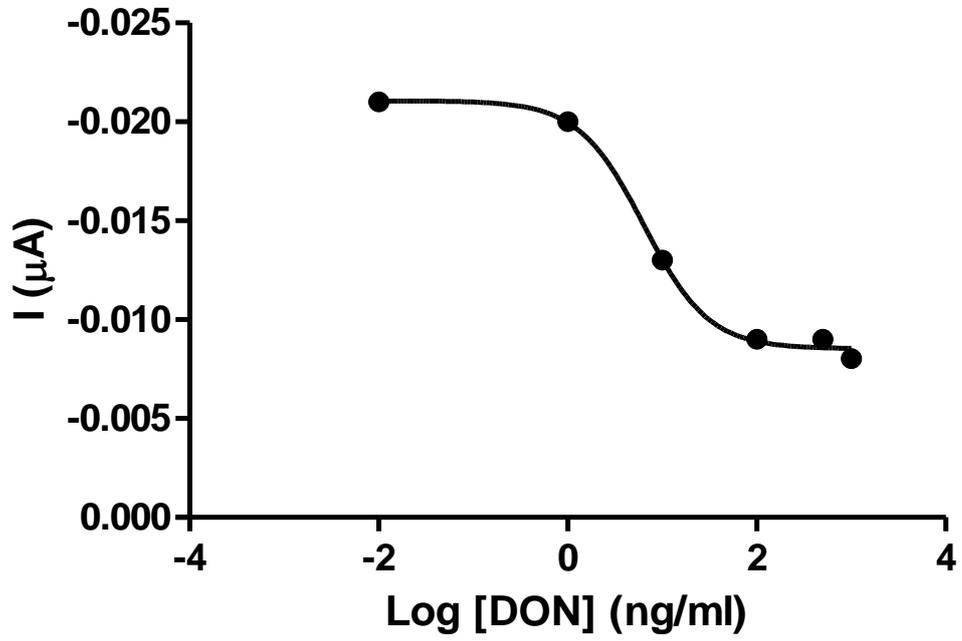


Figura 23.

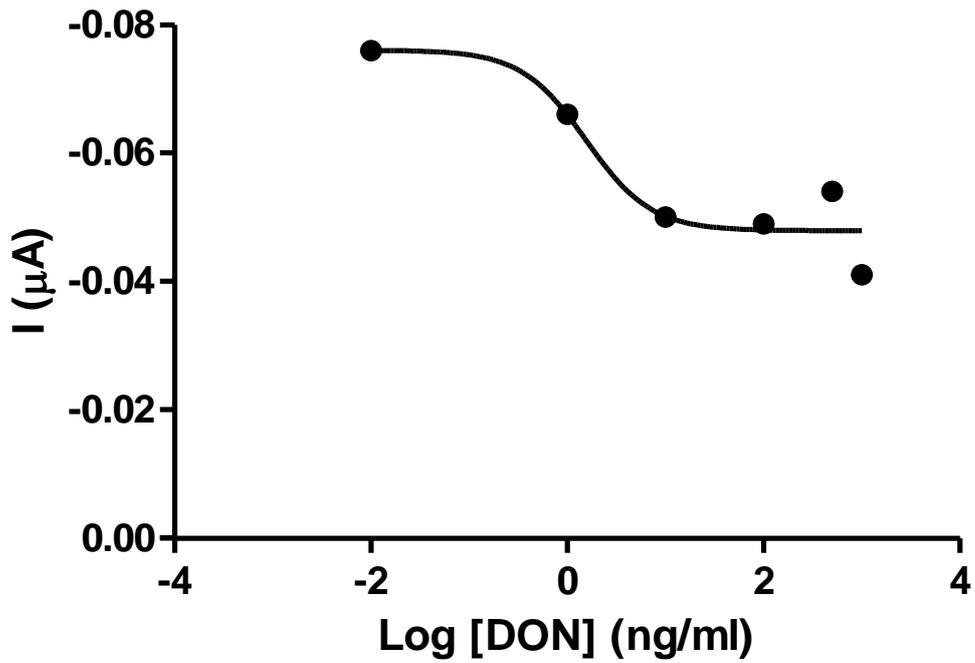


Figura 24.

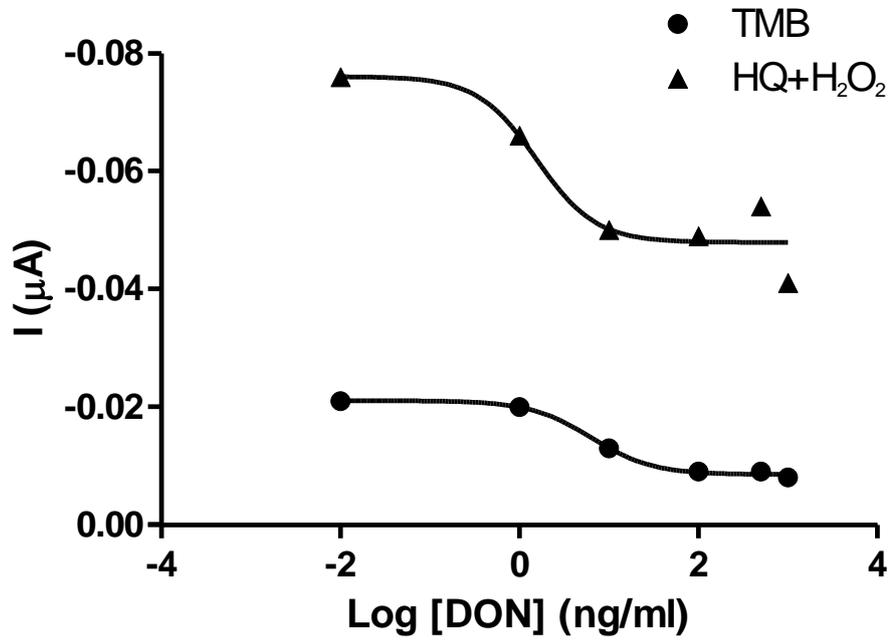


Figura 25.

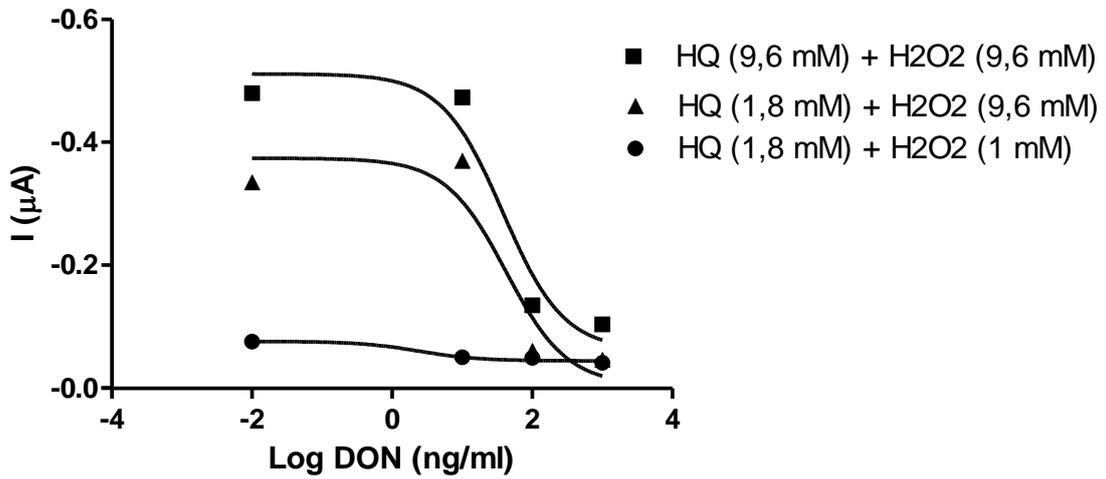


Figura 26.

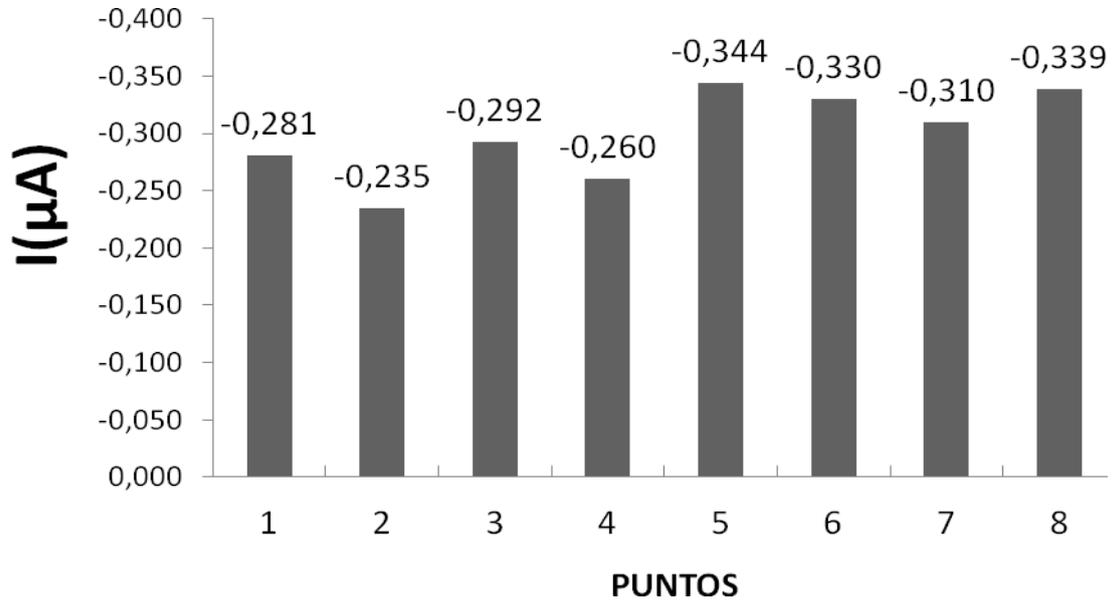


Figura 27.

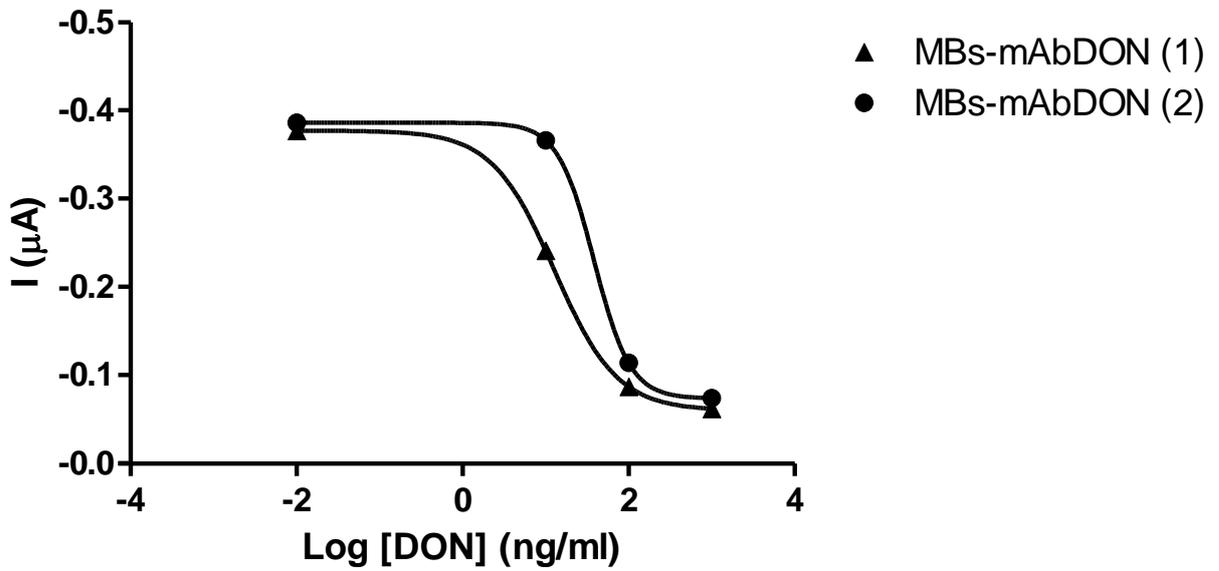


Figura 28

