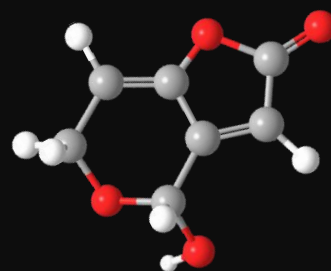




**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
RÍO CUARTO**

**Facultad de Ciencias Exactas,
Físico-Químicas y Naturales**



**Estudios electroquímicos de micotoxinas del
género *Fusarium*.**

**Inmovilización de biomoléculas sobre electrodos
nanoestructurados y desarrollo de
inmunosensores. Aplicaciones analíticas.**



Walter Iván RIBERI

Río Cuarto

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales
Departamento de Química

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Químicas

**ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS DE MICOTOXINAS DEL
GÉNERO *FUSARIUM*.
INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS SOBRE ELECTRODOS
NANOESTRUCTURADOS Y DESARROLLO DE
INMUNOSENSORES. APLICACIONES ANALÍTICAS.**

Lic. Walter Iván Riberi

DIRECTOR: Dr. Héctor Fernández
CO-DIRECTOR: Dr. Fernando Javier Arévalo

Río Cuarto, 29 de abril de 2019

COMISIÓN ASESORA

Dra. Sofía Noemí Chulze

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

Dr. Luis Alberto Otero

Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

Dra. Marcela Cecilia Rodríguez

INFIQC - Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba

Lugar y fecha: Universidad Nacional de Río Cuarto; 29 de Abril de 2019

Calificación:

JURADO

Firma.....Aclaración.....

Firma.....Aclaración.....

Firma.....Aclaración.....

DIRECTOR Y CODIRECTOR

.....

Dr. Héctor Fernández

.....

Dr. Fernando J. Arévalo

LISTA DE ARTÍCULOS

- I. Riberi, W.I.; Tarditto, L.V.; Zon, M.A.; Arévalo, F.J.; Fernández, H.**
Development of an electrochemical immunosensor to determine zearalenone in maize using carbon screen printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes / polyethyleneimine dispersions.
Sensors and Actuators B: Chem. (2018), 254, 1271-1277.
- II. Fernández, H.; Arévalo, F.J.; Granero, A.M.; Robledo, S.N.; Díaz Nieto, C.H.; Riberi, W.I.; Zon, M.A.**
Electrochemical biosensors for the determination of toxic substances related to food safety developed in South America: mycotoxins and herbicides.
Chemosensors (2017), 5(3), 23.
- III. Riberi, W.I.; Zon, M.A.; Fernández, H.; Arévalo, F.J.**
Optimization of a nanostructured surface for the development of electrochemical immunosensors.
Journal of Electroanalytical Chemistry (2019), 836, 38-44.
- IV. Di Tocco, A.; Porcal, G.V.; Riberi, W.I.; Zon, M.A.; Fernández, H.; Robledo, S.N.; Arévalo, F.J.**
Synthesis of stable CdS nanocrystals using an experimental design: optimization of the emission.
Enviado.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **Riberi, W.I.; Arévalo, F.J.; Zon, M.A.; Fernández, H.**

Desarrollo de un inmunosensor electroquímico para la determinación de la micotoxina zearalenona en ausencia de mediador rédox.

VIII Congreso Argentino de Química Analítica, La Plata, 2015.

- **Riberi, W.I.; Tarditto, L.V.; Zon, M.A.; Arévalo, F.J.; Fernández, H.**

Desarrollo de un inmunosensor electroquímico sensible para la determinación de zearalenona en muestras de maíz.

IX Congreso Argentino de Química Analítica, Río Cuarto, 2017.

- **Riberi, W.I.; Zon, M.A.; Arévalo, F.J.; Fernández, H.**

Optimización de una superficie nanoestructurada para el desarrollo de un inmunosensor electroquímico.

IX Congreso Argentino de Química Analítica, Río Cuarto, 2017.

Premio al mejor poster en la Sección Química Electroanalítica.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra me ayudaron a cumplir este objetivo.

A mis padres Walter y Estela, por haberme apoyado siempre tanto económica como emocionalmente. Gracias por haberme alentado en cada decisión que tomé.

A mi hermano Patricio y mis abuelos Henri, Ana, Roque y Luisa, por haber estado siempre presentes, a pesar de la distancia.

A mi hermano Kevin, por acompañarme y haberme sabido entender todos estos años. Gracias por haber estado y ayudarme cuando tuve alguna duda sobre química.

A mis jefes Tito y Fernando, por haberme enseñado sobre electroquímica e inmunoensayos. Gracias por haberme aceptado y confiado en mí.

A Alicia, que si bien no fue mi jefa en los papeles, la consideraba como tal. Gracias por haber estado siempre y dispuesta a ayudar cada vez que surgía algún interrogante.

A mis compañeros de GEANA Adrián, Seba, Gastón, Jime y Aylén, gracias por estar siempre dispuestos para ayudar y compartir sus conocimientos cuando lo necesité. También quiero agradecer a Lore, que ya no está en el grupo, pero con quien hemos compartido mucho tiempo trabajando juntos. A Paulo, con quien compartí poco tiempo, pero fue muy importante, ya que estuvo siempre dispuesto a enseñarnos todo lo relativo al manejo en el laboratorio cuando recién comenzábamos con Jimena. A César, el doc, por haber tomado la posta que dejó Paulo tras su partida y convertirse en el referente al que podía acudir cuando tenía alguna duda, además de ser mi compañero de viajes.

A mis amigos de la carrera, gracias por haberme acompañado todos estos años con su buena actitud y energía, alentándome cada vez que se presentaba alguna adversidad. Sin ustedes todos estos años no hubieran sido iguales.

A mis compañeros del gran becario, gracias por todo el tiempo compartido, y haberme aceptado tal cual soy. También por estar siempre presentes para ayudar con su conocimiento sobre química u otros temas.

A Cachito y Marisel, por haberme ayudado cada vez que necesité algún equipo o material de vidrio durante la tesis. También a Anita, que se incorporó recientemente como técnica, una muy buena, pero que estuvo presente en toda mi etapa universitaria.

A Jorge Robledo, por haberme ayudado cuando daba mis primeros pasos dentro del mundo de la química. Muchas gracias.

A Gustavo Morales, por su ayuda con las imágenes de AFM y la muestra de óxido de grafeno.

A Mario Romero, por ayudarme más de una vez con los conectores de los electrodos.

A los docentes del departamento, por haber estado siempre predispuestos a dar una mano cuando lo necesitaba, compartiendo sus conocimientos y dando sugerencias.

Al Departamento de Química, la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales y la UNRC por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones.

A CONICET por la ayuda económica brindada que me permitió realizar este doctorado.

A mi país que me brindó una educación gratuita y de excelencia.

RESUMEN

Las micotoxinas son moléculas de bajo peso molecular producidas por diversas especies de hongos capaces de afectar distintas fuentes de alimentos y producir serios daños a la salud humana y animal, pudiendo ser mortal en casos extremos, y representan un serio perjuicio económico en la producción agropecuaria. Los métodos de determinación más utilizados son los cromatográficos, pero estos requieren de equipamiento muy costoso y tienen un consumo excesivo de solventes, por lo cual se han propuesto diversos métodos alternativos tales como los inmunosensores, los cuales son específicos y selectivos debido a la alta afinidad del complejo que se forma por la unión de un anticuerpo con su respectivo antígeno, y tienen un consumo de solventes significativamente menor. Durante el desarrollo de este trabajo se realizó un inmunosensor amperométrico para la determinación de zearalenona (ZEA) en soluciones estándar y en muestras naturales contaminadas ex profeso, empleando electrodos impresos de carbono (EIC). Se creó una superficie nanoestructurada formada por un compuesto de nanotubos de carbono de paredes múltiples (NTC) y nanopartículas de oro (NPAu), que presentó buenas propiedades eléctricas y una gran área superficial, sobre la cual se realizó el anclaje de anticuerpos policlonales específicos contra ZEA. Las sucesivas etapas de construcción del inmunosensor se corroboraron mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) y micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM). La determinación de ZEA se realizó mediante un inmunoensayo competitivo empleando estándares en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) 10 mM, pH 7,5; y muestras de maíz contaminadas ex profeso con ZEA, obteniéndose un límite de detección (LD) de $0,11 \text{ pg mL}^{-1}$. La concentración de ZEA determinada utilizando el inmunosensor estuvo en buen acuerdo con la determinada por cromatografía HPLC, validando así el inmunosensor desarrollado. Además, se estudió el efecto de la cantidad de NTC y NPAu empleados en el nanocompuesto sobre las propiedades electroquímicas de dicha superficie empleando un diseño experimental de superficies de respuesta. Mediante un diseño factorial completo de tres niveles con dos factores, se analizó como varió la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) y la corriente de pico catódica ($i_{p,c}$) del par redox ferrocianuro/ferricianuro según variaba la composición de la superficie nanoestructurada del EIC. Tanto los NTC como las NPAu producen un incremento en la $i_{p,c}$ observadas, mientras que los NTC también causan un aumento de la R_{tc} , pero las NPAu no producen un efecto apreciable sobre ésta. A partir del análisis de la función de desactivación se eligió un compuesto de composición adecuada que

presentó una menor R_{ic} y una mayor $i_{p,c}$. También se desarrolló un inmunosensor impedimétrico para la determinación de la micotoxina patulina (PAT) tanto en soluciones estándar como en muestras naturales contaminadas ex profeso. Se utilizaron electrodos de carbono vítreo (ECV) modificados con óxido de grafeno (OG). Sobre esta superficie modificada se anclaron de forma covalente anticuerpos policlonales específicos contra PAT. Las etapas de construcción del inmunosensor se corroboraron mediante estudios de EIE. La determinación de PAT se llevó a cabo mediante un inmunoensayo no competitivo empleando muestras de PAT en SAF 1 mM, pH 7,5; y muestras de jugo de manzana comercial contaminadas ex profeso, para las cuales se obtuvo un LD de $9,82 \text{ pg mL}^{-1}$. La concentración de PAT determinada en muestras de jugo contaminadas ex profeso, mostró un buen porcentaje de recuperación, y estuvo en concordancia con la determinada mediante HPLC, lo que valida al inmunosensor impedimétrico para determinar PAT en muestras reales.

ABSTRACT

Mycotoxins are low molecular weight molecules produced by different species of fungi capable of affecting food sources and cause serious damage to human and animal health, which can be fatal in extreme cases, and represent a serious economic damage in agricultural production. Chromatographic methods are the most commonly used for quantitative determination, but they require very expensive equipment and have an excessive consumption of solvents, which is why various alternative methods have been proposed, such as immunosensors, which are specific and selective due to the high affinity of the complex formed by the union of an antibody with its respective antigen, and have a significantly lower solvent consumption. During the development of this work an amperometric immunosensor was performed for the determination of zearalenone (ZEA) in standard solutions and natural samples *ex professo* contaminated using screen-printed carbon electrodes (SPE) was studied. A nanostructured surface formed by a composite of multi-walled carbon nanotubes (CNT) and gold nanoparticles (AuNP) was created, which presented good electrical properties and a large surface area, on which specific polyclonal antibodies against ZEA were anchored. The successive stages of construction of the immunosensor were corroborated by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and scanning electron microscopy (SEM) micrographs. ZEA determination was carried out by means of a competitive immunoassay using standards in phosphate buffered solution (PBS) 10 mM, pH 7.5; and corn samples *ex professo* contaminated with ZEA, obtaining a limit of detection (LD) of 0.11 pg mL^{-1} . ZEA concentration determined using the immunosensor was in good agreement with that determined by HPLC chromatography, thus validating the immunosensor developed. In addition, we studied the effect of CNT and AuNP amount used in the nanocomposite on the electrochemical properties of the surface using an experimental design response surface methodology. By means of a full factorial design of three levels with two factors, it was analyzed how the charge transfer resistance (R_{ct}) and the cathodic peak current ($i_{c,p}$) of the ferrocyanide/ferricyanide redox couple varied with the composition of the SPE nanostructured surface. Both the CNT and the AuNP produce an increase in the $i_{c,p}$, while the CNT also cause an increase in the R_{ct} . AuNP do not produce an appreciable effect on $i_{c,p}$. From analysis of desirability function, a composite of adequate composition that presented a smaller R_{ct} and a higher $i_{c,p}$ was chosen. An impedimetric immunosensor for the determination of patulin (PAT) in both standard solutions and samples *ex professo* contaminated was also developed. Glassy carbon electrodes (GCE) modified with graphene

oxide (GO) were used. On this modified surface, specific polyclonal antibodies against PAT were covalently anchored. The construction stages of the immunosensor were corroborated by EIE studies. The determination of PAT was carried out by means of a non-competitive immunoassay using PAT samples in PBS 1 mM, pH 7.5; and *ex professo* contaminated commercial apple juice samples, for which a LD of 9.82 pg mL⁻¹ was obtained. The concentration of PAT determined in *ex professo* contaminated juice samples showed a good recovery rate, and was in agreement with that determined by HPLC, which validates the impedimetric immunosensor to determine PAT in real samples.

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	xvii
INDICE DE FIGURAS	xix
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xxvii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Micotoxinas.....	1
1.1.1. <i>Fusarium</i>	5
1.1.1.1. Zearalenona	6
1.1.1.2. Ocurrencia de ZEA y hongos productores en Argentina	9
1.1.2. <i>Penicillium</i>	10
1.1.2.1. Patulina.....	11
1.1.2.2. Ocurrencia de PAT en Argentina	15
1.2. Métodos de detección.....	16
1.3. Biosensores.....	20
1.1.3. Inmunosensores	22
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
2.1. Hipótesis.....	27
2.2. Objetivos Generales	27
2.3. Objetivos Específicos	27
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Reactivos	29
3.1.1. Polímeros empleados	30
3.1.2. Solución amortiguadora de fosfato salino (SAF), pH 7,5.....	30
3.1.3. Solución amortiguadora citrato-fosfato (SAC) 0,05 M, pH 5	30
3.1.4. Solución amortiguadora de acético.....	31
3.1.5. Síntesis de nanopartículas de oro (NPAu)	31
3.1.6. Dispersión de nanotubos de carbono (NTC).....	31
3.1.7. Conjugado ZEA-HRP	32
3.1.8. Extracto de maíz	33
3.1.9. Extracto de maíz contaminado con ZEA	33
3.1.10. Extracto de jugo de manzana contaminado con PAT	34
3.2. Materiales	34

3.2.1.	Electrodos	34
3.2.2.	Potenciostatos	36
3.2.3.	Columnas de extracción en fase sólida (CEFS)	37
3.2.4.	Cromatógrafo líquido de alto rendimiento	37
3.3.	Métodos.....	39
3.3.1.	Técnicas electroquímicas.....	39
3.3.1.1.	Cronoamperometría	39
3.3.1.2.	Voltamperometría cíclica (VC).....	40
3.3.1.3.	Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE).....	42
3.3.2.	Métodos cromatográficos	45
3.3.2.1.	Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	45
3.3.3.	Inmunoensayos	46
3.3.3.1.	ELISA no competitivo directo	46
3.3.3.2.	Inmunoensayo competitivo directo	47
3.3.4.	Herramientas complementarias	47
3.3.4.1.	Diseño experimental	47
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		51
4.1.	Zearalenona.....	51
4.1.1.	Determinación del diámetro de las nanopartículas de oro.....	51
4.1.2.	Armado del inmunosensor electroquímico para la determinación de zearalenona	53
4.1.3.	Estudio de la actividad electrocatalítica de la dispersión de NTC hacia la reducción de H ₂ O ₂	57
4.1.4.	Optimización de las concentraciones de pAb-ZEA y ZEA-HRP por ELISA.....	59
4.1.5.	Elección del par redox	61
4.1.6.	Optimización de la concentración de pAb-ZEA y ZEA-HRP.....	63
4.1.7.	Optimización de las concentraciones de CAT y H ₂ O ₂	65
4.1.8.	Optimización del volumen de la celda	67
4.1.9.	Estudio del inmunosensor mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)	69
4.1.10.	Caracterización de la superficie nanoestructurada por SEM.....	71
4.1.11.	Construcción de la curva de calibración en SAF 1 mM.....	73
4.1.12.	Construcción de la curva de calibración en muestras de maíz	79

4.1.13.	Ensayo de recuperación	80
4.1.14.	Estudios de extracción de ZEA en fase sólida (EFS)	81
4.1.15.	Elección de la fase móvil para la determinación de ZEA por HPLC	87
4.1.16.	Determinación de zearalenona mediante HPLC	87
4.1.17.	Discusión	92
4.2.	Optimización de la superficie nanoestructurada del inmunosensor	94
4.2.1.	Superficie de respuesta obtenida para la $I_{p,c}$	95
4.2.2.	Superficie de respuesta obtenida para la R_{tc}	98
4.2.3.	Determinación de la superficie óptima	101
4.2.4.	Discusión	102
4.3.	Patulina.....	103
4.3.1.	Construcción del inmunosensor impedimétrico para la detección de PAT.	103
4.3.2.	Optimización de la dilución de pAb-PAT	107
4.3.3.	Construcción de la curva de calibración en SAF 1 mM	109
4.3.4.	Construcción de la curva de calibración en jugo de manzana	114
4.3.5.	Ensayo de recuperación	117
4.3.6.	Determinación de patulina mediante HPLC	117
4.3.7.	Discusión	120
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES		123
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA		127

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos toxicológicos producidos por diferentes micotoxinas.	2
Tabla 2. Niveles máximos permitidos de ZEA de alimentos para consumo humano en diferentes países.	9
Tabla 3. Niveles máximos permitidos de PAT de alimentos para consumo humano en diferentes países.	14
Tabla 4. Métodos de determinación de ZEA desarrollados en los últimos años.	16
Tabla 5. Métodos de determinación de PAT desarrollados en los últimos años.	19
Tabla 6. Esquema de modificación de los EIC, indicando los volúmenes de las distintas soluciones que se emplearon para modificarlos, donde a y b corresponden a dos EIC diferentes.	55
Tabla 7. Esquema de modificación de los EIC, indicando los volúmenes de las distintas soluciones que se emplearon para modificarlos.	57
Tabla 8. Esquema de modificación de los EIC+NTC+NPAu, indicando las diluciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA utilizadas en cada uno de ellos.	63
Tabla 9. Esquema de modificación de los EIC+NTC+NPAu, indicando las diluciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA utilizadas en cada uno de ellos.	64
Tabla 10. Valores de I_{ee} observados en los EIC modificados según se indica en la Tabla 8.	64
Tabla 11. Valores de I_{ee} observados en los EIC modificados según se indica en la Tabla 9.	65
Tabla 12. Concentraciones finales de las soluciones de CAT y H ₂ O ₂ empleadas en cada electrodo.	66
Tabla 13. Volúmenes de celda empleados con cada inmunosensor electroquímico.	68
Tabla 14. Diluciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA empleadas en el armado del inmunosensor electroquímico. pAb-ZEA: 1:80; ZEA-HRP: 1:160.	74
Tabla 15. Soluciones de ZEA preparadas para la determinación por HPLC.	88
Tabla 16. Soluciones de extracto de maíz contaminado por ZEA.	89
Tabla 17. Concentración de ZEA determinada por HPLC y el inmunosensor electroquímico.	91
Tabla 18. Límites de detección de ZEA logrados en publicaciones recientes.	91

Tabla 19. Volúmenes de dispersión de NTC y NPAu usados en la modificación de los EIC.....	94
Tabla 20. Corrientes de pico catódica ($I_{p,c}$) y diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico (ΔE_p) obtenidas para cada electrodo. Cada valor representa la media de tres medidas replicadas.	96
Tabla 21. Parámetros estadísticos obtenidos por el ajuste de la superficie de respuesta usando el modelo lineal.	98
Tabla 22. Resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) obtenidas para cada electrodo. Cada valor representa la media de tres medidas replicadas.....	100
Tabla 23. Parámetros estadísticos obtenidos por el ajuste de la superficie de respuesta utilizando el modelo cuadrático.....	101
Tabla 24. Combinaciones de volúmenes de NTC y NPAu que producen mayores valores de la función deseabilidad.	102
Tabla 25. Esquema de modificación de los ECV, indicando la dilución de pAb-PAT utilizada.	107
Tabla 26. Concentraciones de PAT empleadas en la construcción del inmunosensor impedimétrico.....	109
Tabla 27. Parámetros del circuito equivalente determinados para una medición de la curva de calibración.....	112
Tabla 28. Concentraciones de PAT en las muestras de jugo de manzana.	114
Tabla 29. Límites de detección de PAT logrados en publicaciones recientes.	116
Tabla 30. Ensayo de recuperación de PAT.	117
Tabla 31. Soluciones de extracto de jugo de manzana contaminado con PAT.....	118
Tabla 32. Concentración de PAT determinada por HPLC y por el inmunosensor impedimétrico.....	119

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micotoxinas de mayor importancia mundial y los correspondientes hongos toxicogénicos productores.	2
Figura 2. Cadena de la contaminación por micotoxinas en humanos y animales.	3
Figura 3. Imagen del hongo <i>Fusarium graminearum</i>	5
Figura 4. Estructura química de ZEA.	6
Figura 5. Maíz infectado con <i>Fusarium graminearum</i>	7
Figura 6. Imagen del hongo <i>Penicillium expansum</i>	11
Figura 7. Estructura química de PAT.	11
Figura 8. Manzana infectada con <i>P. expansum</i>	12
Figura 9. Estructura de un anticuerpo.	23
Figura 10. Fragmentos Fab y ScFv de un anticuerpo.	24
Figura 11. Esquema de inmunoensayos sándwich y competitivo.	26
Figura 12. Electrodo impreso ItalSens IS-C.	35
Figura 13. Esquema de una celda de tres electrodos y notación de los distintos electrodos.	35
Figura 14. Electrodo de carbono vítreo.	36
Figura 15. Representación esquemática de un dispositivo experimental para experimentos a potencial controlado.	36
Figura 16. Potenciostatos: Autolab PGSTAT30 (izq. arr.), PalmSens 4 (izq. ab.), Autolab PGSTAT101 (centro), BASi Epsilon (der.).	37
Figura 17. CEFS Strata-X.	37
Figura 18. Columna Phenomenex Luna 00G-4252-E0.	38
Figura 19. Esquema de los componentes de un equipo de HPLC.	38
Figura 20. Waters Alliance e2695 Separations Module.	39
Figura 21. (a) variación del potencial en el tiempo, (b) cambio de los perfiles de concentración con el tiempo y (c) respuesta de la corriente de reducción con el tiempo.	40
Figura 22. Programa de barrido de potencial en voltamperometría cíclica.	41
Figura 23. Voltamperograma cíclico resultante.	42
Figura 24. Circuito de Randles.	44

Figura 25. Gráfico de Nyquist para un par rédox bajo régimen de difusión lineal semi-infinita.....	45
Figura 26. Placa de microtitulación para ensayos ELISA colorimétricos.....	46
Figura 27. Gráfico de isorespuesta.....	48
Figura 28. Representación en el plano del diseño 3 ²	49
Figura 29. Espectro UV-visible de las nanopartículas de oro sintetizadas.	51
Figura 30. Imagen de AFM topográfica tridimensional de nanopartículas de oro inmovilizadas sobre mica.	52
Figura 31. Imagen de AFM topográfica de nanopartículas de oro inmovilizadas sobre mica.	52
Figura 32. Histograma de altura de AFM para las nanopartículas de oro sintetizadas.....	53
Figura 33. Esquema del inmunosensor electroquímico para la determinación de ZEA.	55
Figura 34. Voltamperograma cíclico de una solución de H ₂ O ₂ 1 mM, empleando EIC modificados con: (a) NTC+NPAu+leche, (b) NTC+NPAu+pAb-ZEA+leche+ZEA-HRP, (c) sin modificar. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$	56
Figura 35. Voltamperograma cíclico de una solución de CAT 1 mM empleando EIC modificados con: (a) NTC+NPAu+leche, (b) NTC+NPAu+pAb-ZEA+leche+ZEA-HRP. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$	56
Figura 36. Voltamperogramas cíclicos utilizando EIC modificados con: (a) NTC, (b) NTC+NPAu. Solución 100 μM de H ₂ O ₂ , SAC pH = 5. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$	57
Figura 37. Voltamperogramas cíclicos empleando el EIC+NTC para concentraciones de H ₂ O ₂ de (a) 1 μM , (b) 10 μM , (c) 100 μM , (d) 1000 μM ; SAC, pH = 5. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$	58
Figura 38. Voltamperogramas cíclicos empleando el EIC+NTC+NPAu para concentraciones de H ₂ O ₂ de (a) 1 μM , (b) 10 μM , (c) 100 μM , (d) 1000 μM , SAC, pH = 5. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$	58
Figura 39. Corriente de pico catódica ($I_{p,c}$) en función de la concentración de H ₂ O ₂ empleando electrodos impresos de carbono modificados con: (a) NTC, (b) NTC+NPAu.....	59
Figura 40. Placa de ELISA obtenida para la optimización de las concentraciones de pAb-ZEA y ZEA-HRP.	60
Figura 41. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para una solución de CAT 100 μM , SAC, pH = 5, empleando: (a y b) EIC+NTC, (c y d) EIC+NTC+NPAu, (e y f) EIC.	

$v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Inseto: voltamperograma cíclico para CAT 1 mM, SAC, pH = 5, empleando EIC+NTC+NPAu.	62
Figura 42. Voltamperograma cíclico obtenido empleando un EIC modificado con NTC+NPAu para una solución de CAT 100 μM + H ₂ O ₂ 100 μM , SAC, pH = 5. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	62
Figura 43. Cronoamperogramas obtenidos empleando los inmunosensores electroquímicos para concentraciones de CAT de: electrodo a) 1 μM , electrodo b) 10 μM , electrodo c) 100 μM , electrodo d) 1 mM. Concentración de H ₂ O ₂ 100 μM	66
Figura 44. Cronoamperogramas obtenidos empleando los inmunosensores electroquímicos para concentraciones de H ₂ O ₂ de: electrodo e) 1 μM , electrodo g) 10 μM , electrodo h) 100 μM y electrodo i) 1 mM. Concentración de CAT 100 μM	66
Figura 45. Variación de I_{ee} con la concentración de CAT, tras añadir H ₂ O ₂ 100 μM . Tiempo: a) 50 s, b) 100 s.	67
Figura 46. Variación de I_{ee} con la concentración de H ₂ O ₂ para una concentración de CAT = 100 μM . Tiempo: a) 50 s, b) 100 s.	67
Figura 47. Cronoamperogramas obtenidos con el inmunosensor electroquímico para diferentes volúmenes de la celda. $c^*_{\text{CAT}} = 1 \text{ mM}$ y $c^*_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \text{ mM}$	68
Figura 48. Variación de la I_{ee} en función del volumen de celda a diferentes tiempos de lectura: a) 50 s, b) 100 s, c) 150 s.	69
Figura 49. Gráfico de Nyquist de las diferentes etapas de construcción del inmunosensor: 1) EIC desnudo, 2) EIC-NTC, 3) EIC-NTC-NPAu, 4) EIC-NTC-NPAu-pAbZEA, 5) EIC-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA y 6) EIC-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA-ZEA-HRP. Intervalo de frecuencia mostrado comprendido entre 10 kHz y 6 Hz.	69
Figura 50. Gráfico de Nyquist de las diferentes etapas de construcción del inmunosensor: 1) ECV desnudo, 2) ECV-NTC, 3) ECV-NTC-NPAu, 4) ECV-NTC-NPAu-pAbZEA, 5) ECV-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA y 6) ECV-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA-ZEA-HRP.	70
Figura 51. Gráfico del valor mínimo de la componente real de la impedancia obtenido para cada etapa de modificación de los inmunosensores. En negro: EIC. En azul: ECV. Etapas de modificación: 1) Electrodo desnudo, 2) El.-NTC, 3) El.-NTC-NPAu, 4) El.-NTC-NPAu-pAbZEA, 5) El.-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA, 6) El.-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA-ZEA-HRP.	71
Figura 52. Micrografías del electrodo impreso de carbono modificado con NTC. Las imágenes poseen los siguientes aumentos: a): 1K x; b): 50K x; c): 70K x.	72

Figura 53. Micrografías del electrodo impreso de carbono modificado con NTC-NPAu. Las imágenes poseen los siguientes aumentos: a): 1K x; b): 50K x; c): 70K x.	72
Figura 54. Micrografías del electrodo impreso de carbono modificado con NTC-NPAu- pAbZEA. Las imágenes poseen los siguientes aumentos: a): 1K x; b): 50K x; c): 70K x.	73
Figura 55. Cronoamperogramas obtenidos para diferentes concentraciones de ZEA en SAF 1 mM: 1) 0, 2) 1×10^{-5} ng mL ⁻¹ , 3) 1×10^{-4} ng mL ⁻¹ , 4) 1×10^{-3} ng mL ⁻¹ , 5) 1×10^{-2} ng mL ⁻¹ , 6) 0,1 ng mL ⁻¹ , 7) 1 ng mL ⁻¹ , 8) 100 ng mL ⁻¹	75
Figura 56. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para los diferentes inmunosensores electroquímicos en una solución de K ₃ [Fe(CN) ₆] 1 mM en KCl 0,1 M. $v = 50$ mV s ⁻¹	76
Figura 57. Gráfico típico de Q vs $t^{1/2}$ empleado en la determinación del área electroquímica de los electrodos.	77
Figura 58. Curva de calibración para ZEA. Parámetros de la curva: $SC_{50} = 2,55$ pg mL ⁻¹ , LD = 0,99 pg mL ⁻¹ , $p = 1,92$	79
Figura 59. Cronoamperogramas obtenidos para diferentes concentraciones de ZEA en extracto de maíz en SAF 1 mM: 1) 0, 2) 9×10^{-6} ng mL ⁻¹ , 3) 9×10^{-5} ng mL ⁻¹ , 4) 9×10^{-4} ng mL ⁻¹ , 5) 9×10^{-3} ng mL ⁻¹ , 6) 9×10^{-2} ng mL ⁻¹ , 7) 0,94 ng mL ⁻¹ , 8) 94,0 ng mL ⁻¹	79
Figura 60. Curva de calibración de ZEA en muestra de maíz. Parámetros de la curva: $SC_{50} = 1,00$ pg mL ⁻¹ , LD = 0,11 pg mL ⁻¹ , $p = 0,560$	80
Figura 61. Espectros UV-visible en MeOH/H ₂ O/ACN 55:35:10 de: a) ZEA $3,93 \times 10^{-7}$ M, b) ZEA $1,96 \times 10^{-5}$ M.	81
Figura 62. Espectros de emisión de fluorescencia de ZEA $1,96 \times 10^{-5}$ M en MeOH/H ₂ O/ACN 55:35:10 con λ de excitación de: a) 212 nm, b) 262 nm, c) 271 nm, d) 300 nm.	82
Figura 63. Espectros UV-vis de: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) ZEA en MeOH/ACN 50:50, 3) eluyente de MeOH/ACN 50:50 previo a la inyección de ZEA, 4) 1 ^{ra} fracción de eluyente luego de la inyección, 5) 2 ^{da} fracción, 6) 3 ^{ra} fracción, 7) 4 ^{ta} fracción, 8) 5 ^{ta} fracción.	83
Figura 64. Δ Abs de ZEA obtenida entre el espectro de absorción del eluido de la columna conteniendo ZEA y sin contener ZEA.	83
Figura 65. Espectros UV-vis de: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) 1 ^{ra} fracción de eluyente tras la inyección de la muestra de maíz, 3) 2 ^{da} fracción, 4) 3 ^{ra} fracción, 5) 4 ^{ta} fracción, 6) 5 ^{ta} fracción, 7) 6 ^{ta} fracción.	84

Figura 66. Espectros UV-vis de: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) 1 ^{ra} fracción de eluyente tras inyección de muestra de ZEA en maíz, 3) 2 ^{da} fracción, 4) 3 ^{ra} fracción, 5) 4 ^{ta} fracción, 6) 5 ^{ta} fracción, 7) 6 ^{ta} fracción.....	85
Figura 67. Δ Abs en 1) MeOH/ACN 50:50, 2) 1 ^{ra} fracción de eluyente tras inyección, 3) 2 ^{da} fracción, 4) 3 ^{ra} fracción, 5) 4 ^{ta} fracción, 6) 5 ^{ta} fracción, 7) 6 ^{ta} fracción.	85
Figura 68. Δ Abs de ZEA en: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) eluyente de maíz contaminado ex profeso con ZEA.	86
Figura 69. Espectros UV-vis de: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) extracto de maíz en MeOH/ACN 50:50, 3) 1 ^{ra} fracción de eluyente de maíz tras inyección en la columna de EFS, 4) 2 ^{da} fracción, 5) 3 ^{ra} fracción, 6) 4 ^{ta} fracción, 7) 5 ^{ta} fracción, 8) 6 ^{ta} fracción. .	86
Figura 70. Espectros de emisión de fluorescencia de ZEA $1,6 \times 10^{-7}$ M en: a) MeOH, b) MeOH-ACN 90:10, c) MeOH-ACN 70:30, d) MeOH-ACN 50:50, excitando las muestras a 272 nm.	87
Figura 71. Cromatogramas de soluciones de ZEA en MeOH-ACN 90:10, para concentraciones de ZEA de: 1) 0, 2) 6,82, 3) 21,60, 4) 35,82, 5) 50,03 ng mL ⁻¹	88
Figura 72. Curva de calibración de ZEA en MeOH/ACN 90:10.	89
Figura 73. Cromatogramas de extractos de maíz contaminados ex profeso con soluciones de estándar de ZEA en MeOH-ACN 90:10. Las concentraciones de los estándares de ZEA fueron: 1) 0, 2) 4,97, 3) 15,73, 4) 26,08, 5) 36,42 ng mL ⁻¹	90
Figura 74. Curva de las adiciones de estándar de ZEA en extracto de maíz en MeOH/ACN 50:50. Pendiente = $(2,26 \pm 0,06) \times 10^2$ U.A. mL ng ⁻¹ . Ordenada al origen = $(1,12 \pm 0,08) \times 10^3$ U.A.	90
Figura 75. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para EIC modificados con diferentes volúmenes de dispersión de NTC y NPAu, utilizando $c^* = 1$ mM de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. $v = 0,1$ V s ⁻¹	96
Figura 76: Gráfico de superficie de respuesta de $I_{p,c}$ como función del volumen de dispersión de NTC y NPAu. Las esferas son los valores experimentales obtenidos para cada electrodo.	97
Figura 77. Circuito eléctrico equivalente utilizado para ajustar los espectros.	98
Figura 78. Espectros de impedancia de los EIC modificados.	99
Figura 79. Gráfico de superficie de respuesta de R_{tc} como función del volumen de dispersión de NTC y NPAu. Las esferas son los valores experimentales obtenidos para cada electrodo.	100

Figura 80. Función deseabilidad para los EIC modificados con dispersiones de NTC y NPAu. Las esferas son los valores obtenidos para cada electrodo.....	102
Figura 81. Esquema del inmunosensor impedimétrico para la detección de PAT.....	105
Figura 82. Voltamperogramas cíclicos del par rédox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M sobre ECV y ECV-OG.	106
Figura 83. Espectros de impedancia del par rédox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ sobre: a) ECV; b) ECV-OG; c) ECV-OG-pAbPAT 1:160; d) ECV-OG-pAbPAT 1:160-PAT 100 ng mL ⁻¹	106
Figura 84. Espectros de impedancia sobre: a) ECV-OG-pAbPAT 1:160; b) ECV-OG-pAbPAT 1:160-PAT 100 ng mL ⁻¹	108
Figura 85. Espectros de impedancia sobre: a) ECV-OG-pAbPAT 1:80; b) ECV-OG-pAbPAT 1:80-PAT 100 ng mL ⁻¹	108
Figura 86. Espectros de impedancia sobre: a) ECV-OG-pAbPAT 1:40; b) ECV-OG-pAbPAT 1:40-PAT 100 ng mL ⁻¹	108
Figura 87. Voltamperogramas cíclicos de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40, sin PAT.	110
Figura 88. Voltamperogramas cíclicos de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40. Concentración de PAT: 1) 1×10^{-3} ng mL ⁻¹ ; 2) 1×10^{-2} ng mL ⁻¹ ; 3) 0,1 ng mL ⁻¹ ; 4) 1 ng mL ⁻¹ ; 5) 10 ng mL ⁻¹ ; 6) 100 ng mL ⁻¹	110
Figura 89. Espectros de impedancia electroquímica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M sobre: ECV 1-6: pAb-PAT 1:40, sin PAT. $E = E_{ca}$	111
Figura 90. Espectros de impedancia electroquímica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $E = E_{ca}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40. Concentración de PAT: 1) 1×10^{-3} ng mL ⁻¹ ; 2) 1×10^{-2} ng mL ⁻¹ ; 3) 0,1 ng mL ⁻¹ ; 4) 1 ng mL ⁻¹ ; 5) 10 ng mL ⁻¹ ; 6) 100 ng mL ⁻¹	111
Figura 91. Curva de calibración para PAT. Parámetros de la curva: $IC_{50} = 54,8 \text{ pg mL}^{-1}$, $LD = 4,61 \text{ pg mL}^{-1}$, $p = -0,922$	113
Figura 92. Aumento de R_{ct} producido por el agregado de PAT.....	114
Figura 93. Espectros de impedancia electroquímica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $E = E_{ca}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40; sin PAT.	115
Figura 94. Espectros de impedancia electroquímica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $E = E_{ca}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40. Concentración de PAT en jugo	

de manzana: 1) 1×10^{-3} ng mL ⁻¹ ; 2) 1×10^{-2} ng mL ⁻¹ ; 3) 0,1 ng mL ⁻¹ ; 4) 1 ng mL ⁻¹ ; 5) 10 ng mL ⁻¹ ; 6) 100 ng mL ⁻¹	115
Figura 95. Curva de calibración para PAT en jugo de manzana. Cifras de mérito: IC ₅₀ = 370 pg mL ⁻¹ , LD = 9,82 pg mL ⁻¹ , p = -0,225.....	116
Figura 96. Cromatogramas de soluciones de PAT en ACN/H ₂ O (1/10 v/v), para concentraciones de PAT de: 1) 1,56, 2) 2,50, 3) 3,44, 4) 6,25, 5) 15,63 ng mL ⁻¹	118
Figura 97. Curva de las adiciones estándar de PAT en ACN/H ₂ O 1/10 v/v. Pendiente = $(9,76 \pm 1,01) \times 10^4$ U.A. mL ng ⁻¹ . Ordenada al origen = $(2,76 \pm 0,29) \times 10^5$ U.A.	119

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A continuación, se enumeran las abreviaciones y símbolos empleados en la presente tesis.

Símbolos iguales pueden tener diferentes significados según el capítulo donde sean utilizados.

A. <i>Aspergillus</i>	ECV Electrodo de carbono vítreo
Ab Anticuerpo	EDC <i>N</i> -(3-(dimetilamino)propil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida hidrocloreuro
ACN Acetonitrilo	EFS Extracción en fase sólida
ADN Ácido desoxirribonucleico	EIC Electrodo impreso de carbono
AFM Microscopía de fuerza atómica	EIE Espectroscopía de impedancia electroquímica
Ag Antígeno	ELISA Ensayo inmunsorbente ligado a enzimas
ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária	EPC Electrólisis a potencial controlado
Aprox. Aproximadamente	ER Electrodo de referencia
AOAC Association of Official Analytical Chemists	ET Electrodo de trabajo
AP Fosfatasa alcalina	F. <i>Fusarium</i>
ARN Ácido ribonucleico	GO Glucosa oxidasa
B. <i>Byssochlamys</i>	HPLC Cromatografía líquida de alto rendimiento
BQ Benzoquinona	HRP Peroxidasa de rábano picante
BSA Albúmina de suero bovino	IARC International Agency for Research on Cancer
CA Cronoamperometría	IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry
CAT Catecol	LC Límite de cuantificación
CE Contraelectrodo o electrodo auxiliar	LD Límite de detección
CEN European Committee for Standardization	MeOH Metanol
CEFS Columna de extracción en fase sólida	MIP Polímero molecular impreso
CG Cromatografía gaseosa	NHS <i>N</i> -hidroxisuccinimida
Col. Colaboradores	
EC European Commission	

NPAu	Nanopartículas de oro	RSM	Metodología de superficies de respuesta
NTC	Nanotubos de carbono	SAC	Solución amortiguadora citrato-fosfato
OG	Óxido de grafeno	SAF	Solución amortiguadora de fosfato salino
OPD	Orto-fenilendiamina	SAFT	Tween 20 al 0,05% en SAF 1 mM
OVAT	Optimización de una variable a la vez	SEM	Microscopía electrónica de barrido
<i>P. Penicillium</i>		TLC	Cromatografía de capa fina
pAb-PAT	Anticuerpo policlonal anti-PAT	VC	Voltamperometría cíclica
pAb-ZEA	Anticuerpo policlonal anti-ZEA	Vol.	Volumen
PAT	Patulina	ZEA	Zearalenona
PEI	Polietilenimina		

Símbolo	Significado
A	Área
	Absorbancia
c^*	Concentración
C_{dl}	Capacitancia de la doble capa eléctrica
CPE	Elemento de fase constante
D	Coefficiente de difusión
e^-	Electrón
E	Potencial
$E^{\circ'}$	Potencial formal
$E_{1/2}$	Potencial de media onda
E_p	Potencial de pico
E_{ca}	Potencial de circuito abierto
$E_{p,a}$	Potencial de pico anódico
$E_{p,c}$	Potencial de pico catódico
EC_{50}	Concentración efectiva media máxima
F	Constante de Faraday
I	Corriente
i	
$I_{e,e}$	Corriente de estado estacionario
$I_{p,c}$	Corriente de pico catódica
$i_{p,c}$	
IC_{50}	Concentración de inhibición media máxima
J	Densidad de corriente
J_{ee}	Densidad de corriente de estado estacionario
N	Número de electrones
O	Especie oxidada
Q	Carga
R	Especie reducida
R_s	Resistencia de la solución
R_{tc}	Resistencia a la transferencia de carga
SC_{50}	Concentración de saturación media máxima
T_R	Tiempo de retención

v	Velocidad de barrido
V	Volumen
W	Elemento de Warburg
W_O	Elemento de Warburg open
W_S	Elemento de Warburg short
t	Tiempo
Z	Impedancia
Z_0	Valor absoluto de impedancia
Z_{Im}	Componente imaginaria
Z''	de la impedancia
Z_{Re}	Componente real
Z'	de la impedancia
ΔE_p	Diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico
ω	Velocidad angular
Φ	Corrimiento de fase

CAPÍTULO 1.INTRODUCCIÓN

1.1. Micotoxinas

El término “micotoxina”, cuya etimología proviene del griego *μύκης* (*mykes, mukos*) “hongo” y del latín *toxicum* “veneno” (Brase 2013) fue empleado por primera vez durante una grave crisis veterinaria acaecida en 1961 en Inglaterra a causa de la enfermedad X de los pavos (Bosco 2012). Abarcan varios compuestos químicos de diversidad estructural y bajo peso molecular (por debajo de 700 Da), que son metabolitos secundarios activos biológica y químicamente, producidos por una gran variedad de mohos o microhongos filamentosos (*Fusarium, Aspergillus, Penicillium, Alternaria, Claviceps, etc.*) (Gursoy 2004, Whitaker 2010, Bianchini 2014, Sharma 2014b). Bennet propuso la primera definición que no dio lugar a dudas sobre su significado: “Las micotoxinas son productos naturales producidos por hongos que evocan una respuesta tóxica cuando son introducidos en bajas concentraciones en vertebrados superiores y otros animales por una ruta natural. Algunas micotoxinas tienen efectos múltiples y pueden causar síndromes fitotóxicos y antimicrobianos además de toxicidad animal” (Bennett 1987).

Estructuralmente, pueden ser pironas, antraquinonas, cumarinas, macrólidos, esteroides, polipéptidos cíclicos, etc. (Weidenbörner 2001).

Las micotoxinas presentan un gran interés debido al riesgo que suponen para la salud humana y animal. Poseen una gran variedad de efectos tóxicos que varían con la dosis de exposición, los cuales reciben el nombre de micotoxicosis. Concentraciones muy altas pueden causar intoxicación aguda e, incluso, la muerte. A su vez, suelen estar asociadas con síntomas gastrointestinales, dermatológicos y neurológicos. Por otro lado, menores dosis conllevan problemas reproductivos, pérdida de peso, crecimiento lento y déficit en la producción de leche y huevo en animales. Cantidades muy bajas causan efectos inmunosupresores, neurotóxicos, teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos (Tabla 1), así como enfermedades crónicas, debidos a la formación de complejos estables con las cadenas de ADN (Bianchini 2014, Waśkiewicz 2014). Aunque se han reportado casos de micotoxicosis agudas, estos son muy raros (dándose preferentemente en países en vías de desarrollo), pero la exposición crónica a pequeñas dosis de toxinas representan un gran desafío a las políticas de salud pública (Weidenbörner 2001, Curtui 2004, Gil-Serna 2014).

Tabla 1. Efectos toxicológicos producidos por diferentes micotoxinas.

Micotoxina	Mutagenicidad	Teratogenicidad	Carcinogenicidad
Ácido penicílico	+	-	+
Aflatoxina	+++	+++	+++
Cicloclorotina			+
Citrinina	-+	+	+
Esterigmatocistina	+	+	+++
Fumonisina B ₁			+
Fusarenona X		+	+
Luteoskirina	-		+
Ocratoxina A	+	+	+
Patulina	+	+	+
Rugulosina	-+		+
Toxina T-2	-	+	+
Zearalenona	+	+	+

(+++): evidencia fuerte. (+): evidencia débil. (-+): evidencia no concluyente. (-): evidencia negativa. (en blanco): falta de estudio.

Aproximadamente el 25% de los cultivos a nivel global se encuentra afectado por hongos toxicogénicos pero, de las más de 400 micotoxinas conocidas, alrededor de 20 son las más comunes y están en cantidades potencialmente peligrosas para poner en riesgo la seguridad alimentaria (Figura 1) (Rai 2010, Bosco 2012, Bianchini 2014, Waśkiewicz 2014).

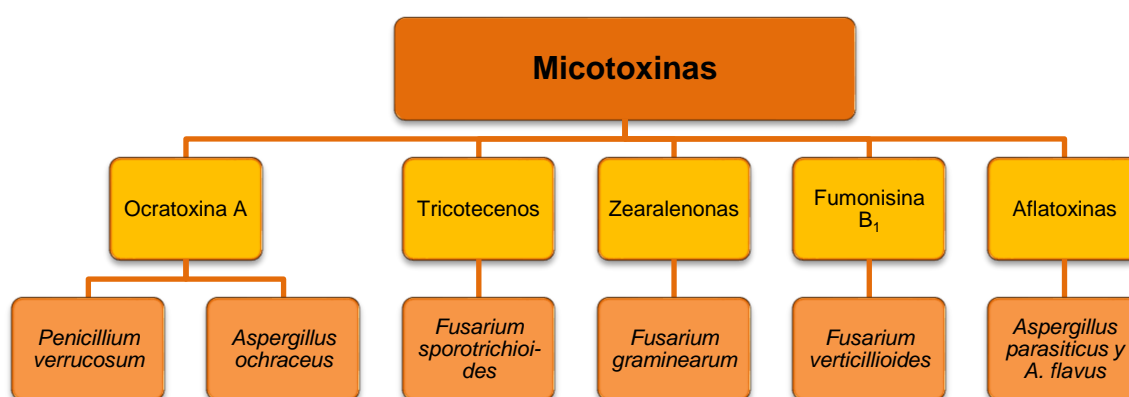


Figura 1. Micotoxinas de mayor importancia mundial y los correspondientes hongos toxicogénicos productores.

Una micotoxina puede ser producida por varias especies de hongos (normalmente del mismo género, salvo contadas excepciones), y cada especie generalmente es capaz de

producir más de una clase de micotoxinas (hasta 15 diferentes clases en algunos casos) (Weidenbörner 2001, Chandelier 2004, Gursoy 2004).

Los productos más susceptibles de ser contaminados por hongos toxicogénicos y micotoxinas son cereales (maíz, sorgo, trigo), oleaginosas (maní) y sus derivados, algunos frutos secos y carnes. La contaminación ocurre en distintas etapas de la cadena de producción alimenticia, ya sea antes o después de la cosecha, siendo esta última la más importante. El riesgo es mayor en regiones de clima cálido y húmedo, donde las condiciones de actividad acuosa, temperatura y niveles de oxígeno son óptimas para que los hongos toxicogénicos produzcan toxinas. La presencia de micotoxinas en los alimentos ocurre de dos maneras diferentes, por contaminación directa o indirecta (Figura 2). La contaminación directa se debe a la producción de micotoxinas (y, por tanto, al crecimiento de hongos) directamente sobre los alimentos, mientras que la contaminación indirecta se debe al empleo de ingredientes contaminados para la manufactura de alimentos y al consumo de piensos contaminados por parte del ganado. Una vez contaminados, los alimentos son difíciles de tratar, y el calor no permite destruir las micotoxinas, por lo que la mejor opción es evitar la contaminación de los cultivos (Weidenbörner 2001, Jooste 2008, Bianchini 2014, Gil-Serna 2014, Waśkiewicz 2014).

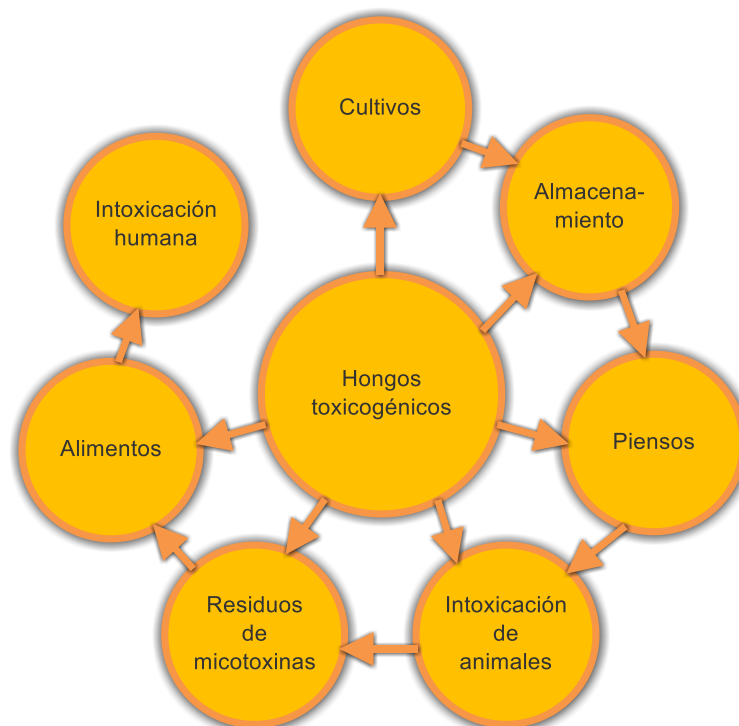


Figura 2. Cadena de la contaminación por micotoxinas en humanos y animales.

INTRODUCCIÓN

La gran importancia para la salud pública del control de micotoxinas ha hecho que varios países y organismos adopten regulaciones para la contaminación por micotoxinas. Uno de los organismos más importantes, la Comisión del *Codex Alimentarius* (dependiente de la ONU), establece métodos regulatorios a nivel mundial. La European Commission (EC) cumple la misma función dentro del territorio perteneciente a la Unión Europea, y tiene establecidos los niveles máximos permitidos de micotoxinas en alimentos a través de las resoluciones N° 1881/2006 y 1126/2007 (Cheli 2011).

Los límites tolerados de micotoxinas varían de acuerdo al grado de procesamiento que presentan los alimentos. Los cereales presentan los niveles permitidos más altos, mientras que los alimentos procesados tienen límites menores. La regulación es aún más severa en el caso de los alimentos destinados a los infantes.

Los métodos oficiales de determinación son aprobados fundamentalmente por dos organismos: la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) y el European Committee for Standardization (CEN), aunque existen entidades que representan a diferentes sectores de la industria alimenticia que también han establecido métodos oficiales de análisis (Senyuva 2011).

En nuestro país se aplican las reglamentaciones fijadas por el MERCOSUR (MERCOSUR 2002). Aunque no existen regulaciones para micotoxinas en alimentos, a excepción de las aflatoxinas, sí existen para las materias primas empleadas en la industria alimenticia. Así, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos en su *Protocolo de Calidad para la Harina de Maíz o Sémola de Maíz Argentina de Cocción Rápida para Preparar Polenta*, creado por la Resolución 302/2007, establece como límite máximo de contaminación del maíz por zearalenona el valor de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ y, como método de análisis, el Método Oficial AOAC 968.22 y/o sus actualizaciones o equivalentes (Secretaría de Agricultura 2007).

Brasil es el ejemplo a seguir a nivel regional. Allí, la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estableció límites máximos tolerados para micotoxinas en alimentos mediante la Resolución N° 7, del 18 de febrero de 2011, con anexos que entraron en vigencia en enero de 2012, enero de 2014 y enero de 2016, los cuales disminuyeron los límites máximos tolerados (ANVISA 2011), estableciéndolos en niveles comparables a los de Alemania.

Aunque no tan estrictos como en el caso de Brasil, Uruguay también posee una legislación que establece los niveles máximos permitidos de micotoxinas en alimentos, los cuales se implementan junto con lo establecido por el MERCOSUR. El Reglamento

Bromatológico Nacional fijó, en 1994, los niveles máximos permitidos para ocratoxina A, patulina, zearalenona y aflatoxinas, estableciendo un límite de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ZEA en maíz y cebada y de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para PAT en jugos de frutas (Uruguay 1994). Posteriormente en el año 2006, mediante el Decreto N° 155/006, se estableció el límite máximo permitido para deoxinivalenol en harinas de trigo, subproductos del trigo y alimentos elaborados en base a trigo (MGAP 2006).

1.1.1. *Fusarium*

El género *Fusarium* se desarrolla a lo largo del mundo en diferentes suelos y sustratos orgánicos, debido a su excelente adaptación a condiciones climáticas diversas. Lo anterior, sumado a que se encuentran entre los principales hongos productores de micotoxinas, lo convierten en uno de los más importantes en cuanto a su impacto económico.

Las serias epidemias debidas a *Fusarium* registradas en los años 90 en Canadá, Estados Unidos y Europa causaron una renovada atención por parte de la comunidad científica (Ittu 2004).

Este género comprende unas 150 especies, las cuales normalmente se desarrollan en los cereales, fundamentalmente maíz, trigo y cebada, antes de su cosecha (aunque a veces apenas después de ésta), y son la causa principal de su contaminación en regiones de clima templado (IARC 1993, Thrane 2014, Waśkiewicz 2014).

Los hongos del género *Fusarium* crecen en forma óptima a temperaturas entre 0 y 37 °C y condiciones de humedad elevada (actividad acuosa mayor a 0,86). Las especies de climas fríos son las más tóxicas, donde las bajas temperaturas llevan a una mayor producción de micotoxinas (Weidenbörner 2001, Thrane 2014).

Las especies más importantes desde el punto de vista sanitario son *Fusarium graminearum* (Figura 3), *F. verticillioides* y *F. sporotrichioides* (Weidenbörner 2001).



Figura 3. Imagen del hongo *Fusarium graminearum* (Weidenbörner 2001).

De las micotoxinas producidas por especies de esta familia revisten importancia los tricotecenos (especialmente las toxinas T2 y HT2, el deoxinivalenol y sus acetyl-derivados, y el nivalenol), las fumonisinas, la moniliformina y la zearalenona (Chandelier 2004, Bianchini 2014, Waśkiewicz 2014).

1.1.1.1. Zearalenona

También conocida como toxina F-2, la zearalenona (ZEA) es la lactona del ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- β -resorcílico (Figura 4). El nombre sistemático de ZEA definido por la IUPAC es (-)-(3S,11E)-3,4,5,6,9,10-hexahidro-14,16-dihidroxi-3-metil-1H-2-benzoacicotetradecin-1,7(8H)-diona. La fórmula empírica de ZEA es $C_{18}H_{22}O_5$ y su peso molecular es de 318,4 g mol⁻¹. A 25 °C presenta solubilidades de 0,002 en agua (en % P/P); 0,05 en n-hexano, 1,13 en benceno, 8,6 en acetonitrilo, 17,5 en diclorometano, 18 en metanol, 24 en etanol y 58 en acetona.

Esta molécula es estable frente a la hidrólisis y resistente al calor. Estudios de estabilidad mostraron que es estable hasta 120 °C, que el 29% se descompone cuando es calentada a 150°C, y el 69% cuando se calienta a 200 °C durante 60 minutos (IARC 1993).

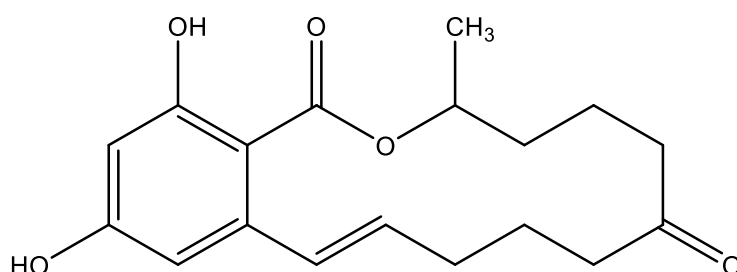


Figura 4. Estructura química de ZEA.

ZEA fue aislada por primera vez en 1962 a partir del hongo *Fusarium graminearum*, su estructura se determinó en 1966, y dos años después se logró su síntesis total y la determinación de su configuración absoluta (IARC 1983).

Las principales especies productoras de ZEA son *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*.

ZEA está presente comúnmente en cereales y sus derivados en regiones templadas, con temperaturas óptimas de producción por debajo de los 25 °C. Es una de las micotoxinas del género *Fusarium* más ampliamente distribuidas, por lo que resulta una sustancia de gran importancia. Aunque se asocia fundamentalmente con el maíz (Figura 5), también existe en

trigo, cebada, sorgo, avena, centeno y heno, entre otros (IARC 1993, Bianchini 2014, Waśkiewicz 2014).

La producción de ZEA ocurre tanto antes como después de la cosecha y durante el procesamiento comercial de granos, pero fundamentalmente en su almacenamiento, donde las condiciones húmedas permiten la aparición de altos niveles de ZEA. Su presencia suele darse en conjunto con tricotecenos tales como nivalenol y deoxinivalenol (Weidenbörner 2001).

No es una molécula altamente tóxica y, aunque se sospeche que es carcinogénica (se ha especulado sobre su incidencia en el cáncer de mama), la evidencia en tal sentido es limitada. No obstante, su exposición crónica puede causar desórdenes reproductivos, estrogenismo, abortos e incluso esterilidad (IARC 1983, Pepeljnjak 2004, Bianchini 2014, Waśkiewicz 2014).

Entre los síndromes hiperestrogénicos asociados a la intoxicación con ZEA se pueden mencionar el agrandamiento del útero, vulvovaginitis, inflamación de glándulas mamarias y pezones, prolapso de vagina o recto, estro prolongado o interrumpido, pseudoembarazo, infertilidad en prepúberes, etc. Asimismo, en los hombres causa reducción del peso de los testículos, disminución de testosterona, y menor espermatogénesis. Estos efectos se deben a que la zearalenona imita al 17β -estradiol y se une a los receptores estrogénicos (lo que implica que también posee propiedades anabólicas) (Brase 2013, Gil-Serna 2014). También se han reportado efectos hepatotóxicos, inmunotóxicos y hematotóxicos (Gil-Serna 2014).



Figura 5. Maíz infectado con *Fusarium graminearum* (Brase 2013).

Los efectos estrogénicos, sumados a una alta LD_{50} (4.000-10.000 mg kg^{-1} de peso corporal) hacen que ZEA se considere más como una hormona no esteroidea que como una micotoxina (Weidenbörner 2001).

INTRODUCCIÓN

Los niveles permitidos varían de acuerdo al alimento, así como también de un país a otro, existiendo, al igual que para otras micotoxinas, diferencias entre la Unión Europea, por un lado, y los Estados Unidos y el MERCOSUR por el otro. Así, en Alemania el máximo permitido de ZEA para cereales, pan y derivados es de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, que disminuye a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ en el caso de cereales utilizados en alimento de bebés (Curtui 2004). Mientras que en el caso de Uruguay el límite es de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ para maíz y cebada (Uruguay 1994).

Brasil, mediante la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicó una resolución muy detallada en la cual se establecieron diversos límites máximos tolerados para ZEA: $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para alimentos infantiles a base de cereal (lactantes y primera infancia); $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para harina de trigo, pastas, galletas, productos de panificación, cereales y sus productos, excepto trigo, arroz elaborado y sus derivados, $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ para palomitas de maíz; sémola de maíz y productos y subproductos a base de maíz; $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ para trigo integral, salvado de trigo, harina de trigo integral; $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ para arroz integral, maíz en grano y trigo; y $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ para salvado de arroz (ANVISA 2011).

En la Tabla 2 se muestran los niveles permitidos de ZEA en alimentos para el consumo humano en distintos países.

Tabla 2. Niveles máximos permitidos de ZEA de alimentos para consumo humano en diferentes países.

País/Organismo	Alimento	Nivel $\mu\text{g kg}^{-1}$	Referencias
Alemania	Cereales, pan y derivados Cereales para alimento de bebés	50 20	(Curtui 2004)
Armenia	Todos los alimentos	1000	(FAO 2004)
Austria	Trigo, centeno	60	(FAO 2004)
Belarús	Cebada, trigo, maíz Alimento para bebés	1000 0	(FAO 2004)
Brasil	Alimento para bebés Harina de trigo, pastas, galletas, etc. Productos a base de maíz Trigo integral, salvado de trigo Arroz integral, maíz en grano, trigo Salvado de arroz	20 100 150 200 400 600	(ANVISA 2011)
Bulgaria	Cereales y derivados para consumo humano	200	(FAO 2004)
Chile	Todos los alimentos	200	(FAO 2004)
Estonia	Cereales, derivados, pasta, etc.	1000	(FAO 2004)
Francia	Cereales y derivados Aceites	50 200	(FAO 2004)
Hungría	Harinas, productos molidos, muesli	100	(FAO 2004, Varga 2004)
Indonesia	Maíz	0	(FAO 2004)
Irán	Cebada Maíz, arroz, trigo	400 200	(FAO 2004)
Italia	Alimento para bebés Cereales y derivados	20 100	(FAO 2004)
Letonia	Cereales, pan Cerdos Lechones	1000 300 100	(FAO 2004)
Marruecos	Cereales, aceites	200	(FAO 2004)
Moldavia	Trigo, cebada, maíz y sus harinas	1000	(FAO 2004)
Rusia	Trigo, cebada, maíz	1000	(FAO 2004)
Serbia y Montenegro	Maíz	1000	(FAO 2004)
Ucrania	Alimento para bebés	40	(FAO 2004)
Unión Europea	Cereales sin procesar Maíz sin procesar Harinas Productos a base de maíz Pan, productos de panadería y cereales para desayuno Productos a base de cereal para niños	100 350 75 100 50 20	(Moss 2009, Meneely 2014)
Uruguay	Maíz, cebada	200	(Uruguay 1994, FAO 2004)

1.1.1.2. Ocurrencia de ZEA y hongos productores en Argentina

Debido a la importancia de la producción agrícola-ganadera en la economía del país, y de los grandes perjuicios económicos y sanitarios que puede sufrir a causa de la contaminación por micotoxinas, se ha llevado a cabo la realización de estudios para

INTRODUCCIÓN

determinar la ocurrencia de diversas micotoxinas, así como hongos con potencial micotoxicogénico en diversos cultivos y animales de granja en diversos puntos del país.

En relación a ZEA, hay estudios recientes sobre su ocurrencia en pastos naturales, forraje, sorgo y maíz en la región de los humedales chaqueños, en donde se detectó una alta presencia de *F. semitectum* y *F. armeniacum*, así como zearanol (metabolito derivado de la ZEA) en muestras de orina bovina (Nichea 2015a, Nichea 2015b, Salvat 2016). En la región de Concordia, Entre Ríos, se detectó la presencia de *F. graminearum* y *F. verticillioides* en cultivos de arándanos (Munitz 2014). En la provincia de Buenos Aires se detectó una alta incidencia de *F. graminearum* en cultivos de trigo (Martínez 2014), *F. verticillioides* y *F. subglutinans* en piensos para lechones (Pereyra 2011), así como la presencia de *F. graminearum*, *F. semitectum* y *F. verticillioides* en cultivos de soja en esta provincia y La Pampa (Garrido 2013). En cultivos de maíz en la provincia de Tucumán también se detectó la presencia de *F. graminearum* (Sampietro 2013). En la provincia de Córdoba se halló contaminación en cebada y bagazo de cerveza de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (González Pereyra 2011b), así como *F. verticillioides* en maíz almacenado en silos destinado a feedlots (González Pereyra 2011a).

Aunque los niveles de ZEA hallados fueron variables y dependieron de las condiciones climáticas en las cuales se desarrolló el cultivo y almacenamiento, la alta presencia de especies productoras es un elemento muy importante a tener en cuenta.

1.1.2. *Penicillium*

Los hongos de este género son mohos que habitualmente se presentan como contaminantes habituales de cereales, paja, frutas, etc., capaces de desarrollarse en diferentes regiones y en un amplio intervalo de condiciones climáticas, con preferencia por las regiones templadas, pero pudiendo aparecer incluso a muy bajas temperaturas (Weidenbörner 2001, Cabañes 2007). La contaminación por *Penicillium* se produce, por lo general, en la etapa de postcosecha o almacenamiento, salvo algunas excepciones (Vaclavikova 2015). Algunos de estos hongos tienen importancia para la industria farmacéutica, como los productores de penicilina, pero otras especies son importantes en la industria alimentaria debido a su capacidad de producción de micotoxinas, que pueden llegar a producir pérdidas de hasta el 10% de los productos de góndola (Barad 2016). Más de 80 especies de *Penicillium* son productoras de micotoxinas, pero la mayoría son producidas por un pequeño número de especies entre las que se incluyen *P. expansum* (Figura 6), *P. citrinum*, *P. roqueforti*, y *P. verrucosum*; siendo cada especie capaz de producir varias micotoxinas. Son los responsables

de la producción de diversas micotoxinas como patulina, citrinina, ocratoxina A, roquefortina, ácido ciclopiazónico, ácido penicílico, etc. (Weidenböner 2001, Morales Valle 2011).



Figura 6. Imagen del hongo *Penicillium expansum* (Pitt 2014).

1.1.2.1. Patulina

La patulina (PAT) es una micotoxina que, estructuralmente, es una γ -lactona α,β -insaturada (Figura 7) de fórmula molecular $C_7H_6O_4$ cuyo nombre de acuerdo al sistema de nomenclatura de la IUPAC es 4-hidroxi-4*H*-furo[3,2-*c*]piran-2(6*H*)-ona. A causa de la naturaleza ubicua de los productores de patulina, esta se encuentra en una gran variedad de alimentos, como trigo, nueces, manzanas, peras, higos, quesos, frutillas, mangos, naranjas, damascos, uvas, bananas, duraznos, grosellas, cerezas, ananás, ciruelas, arándanos, tomates, algunos vegetales y frutos de mar (Vaclavikova 2015, Wright 2015, Sarubbi 2016, Torović 2017). PAT es producida por especies pertenecientes a los géneros *Penicillium* (*P. expansum*, *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, etc.), *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. giganteus*, *A. longivesica*, etc.), y *Byssochlamys* (*B. nivea*) (Barad 2016, Li 2017a, Oteiza 2017, Torović 2017).

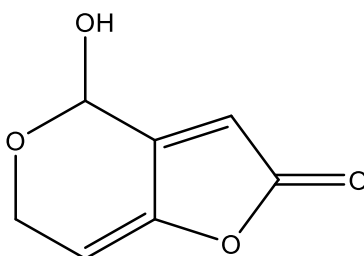


Figura 7. Estructura química de PAT.

PAT es hallada principalmente en manzanas y peras, así como en sus derivados procesados como jugos, purés, sidras, concentrados y compotas, siendo estos las principales

INTRODUCCIÓN

fuentes de PAT en la alimentación humana. *P. expansum* es el principal productor de esta micotoxina y es comúnmente asociado con la podredumbre azul de las manzanas en descomposición (Figura 8). La presencia de esta micotoxina se debe a contaminación fúngica durante la producción primaria de manzanas, debido tanto a condiciones climáticas adversas como así también de almacenamiento de las manzanas, y su producción depende de la temperatura y de la proporción de CO₂ y O₂ en el aire. Por lo tanto, el nivel de PAT se puede considerar como un marcador para evaluar la calidad alimenticia y la eficiencia de las prácticas de pre-/postcosecha (González 2007, Sarubbi 2016, Li 2017b, Torović 2017).

PAT forma cristales incoloros con un punto de fusión de 111 °C; es muy soluble en solventes polares como agua, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, éter y cloroformo, e insoluble en benceno y éter de petróleo. Es altamente reactiva, estable frente al calor y muy estable en medio ácido, mientras que pierde su actividad biológica tras hidrolizar en medio básico y también debido a la fermentación (González 2007, Oteiza 2017).

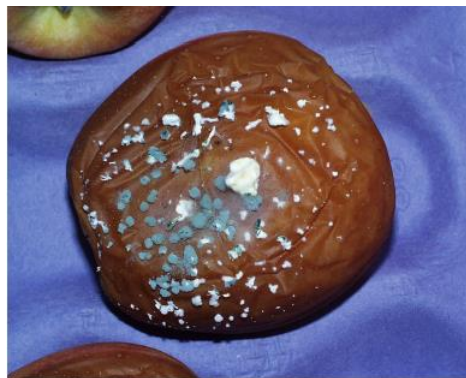


Figura 8. Manzana infectada con *P. expansum* (Wright 2015).

PAT fue descubierta en la década de 1940 producida *P. patulum* (actualmente clasificado como *P. griseofulvum*), mientras la industria farmacéutica se encontraba en la búsqueda de nuevos antibióticos producidos por hongos tras el éxito del descubrimiento de la penicilina pocos años antes. Tras unos primeros ensayos como antibiótico se encontró que el mismo era de amplio espectro, pudiendo inhibir a más de 75 bacterias diferentes, pero muy pronto descubrieron los efectos tóxicos de PAT sobre animales como gatos, ratas, conejos y ratones, por lo que se dejó de usar como antibiótico (Rubinstein 2011, Guo 2017, Li 2017a).

PAT es una micotoxina altamente tóxica, que presenta una serie de efectos crónicos y agudos. Los efectos agudos de la ingesta de PAT incluyen agitación, convulsiones, disnea, congestión pulmonar y gastrointestinal, ulceración, edema, hiperemia, degeneración de

células epiteliales y daño renal, siendo un potente nefrotóxico (Barad 2016, Guo 2017, Li 2017a). La exposición crónica a PAT se asocia a problemas gastrointestinales, neurotóxicos, inmunológicos, mutagénicos, genotóxicos y teratogénicos. Es una toxina enteropatogénica capaz de alterar las funciones del intestino. Aunque se ha reportado que posee actividad anticancerígena en células de carcinoma epidermoide humanas, está bien documentado que es capaz de inducir tumores en células epiteliales de ratón. Pero en lo que respecta a humanos, la falta de estudios que demuestren su carcinogenicidad hace que IARC clasifique a PAT, desde 1986, como categoría 3 (no clasificable como carcinógeno en humanos). Sus efectos tóxicos se explican por su acción inhibitoria sobre la actividad de muchas enzimas y la reducción del nivel de glutatión en las células, debido a la fuerte afinidad de PAT por los grupos sulfhidrilos que lleva a la formación de aductos con cisteína. Además, recientemente se descubrió que la acción de PAT sobre el ADN se debe a la formación de aductos con bases individuales, lo que produce ruptura de las hebras de ADN (Rubinstein 2011, Wright 2015, Oteiza 2017, Torović 2017).

PAT posee una fuerte incidencia en alimentos a base de manzana y es, de hecho, la toxina de frutas más importante a nivel global. Por lo que, dados los efectos tóxicos descritos anteriormente, varios organismos internacionales han establecido límites máximos permitidos de PAT en diferentes alimentos. El Codex Alimentarius recomienda una concentración de PAT menor a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ en jugo de manzana (González 2007, Ge 2017). Por su parte la Unión Europea ha establecido el mismo límite para jugos de frutas y sidra y otras bebidas fermentadas, mientras que para productos sólidos a base de manzana se reduce a $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ y, en el caso de alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad, disminuye hasta $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ dado que los bebés e infantes son más susceptibles a la ingesta de toxinas y poseen una menor capacidad para detoxificar compuestos tóxicos. En nuestra región, Uruguay estableció, mediante el Decreto 155/006 del Ministerio de Salud Pública, un límite máximo admisible de PAT de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para jugos de frutas. De la misma manera, Brasil estableció, mediante la ANVISA en la Resolución-RDC N° 7, un límite máximo tolerable de PAT para jugo y pulpa de manzana de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Ramos Girona 2011, Vaclavikova 2015, Wright 2015).

En la Tabla 3 se puede ver en detalle los límites de PAT permitidos para varios alimentos en diferentes países.

Tabla 3. Niveles máximos permitidos de PAT de alimentos para consumo humano en diferentes países.

País/Organismo	Alimento	Nivel $\mu\text{g kg}^{-1}$	Referencias
Armenia	Pasta de tomate, manzanas	5	(FAO 2004)
Belarús	Champiñones, frutas, vegetales	50	(FAO 2004)
Brasil	Jugo y pulpa de manzana	50	(ANVISA 2011, Ramos Girona 2011)
Bulgaria	Jugos de fruta y néctares Concentrados de fruta	50 50	(FAO 2004)
Rep. Checa	Alimentos para infantes Alimentos para lactantes Alimentos tipo A Alimentos tipo B	30 20 50 100	(FAO 2004)
China	Jugo de frutas Bebidas y derivados a base de manzana	50 50	(Ge 2017, Li 2017a)
Corea del Sur	Jugo de manzana, concentrado de jugo de manzana	50	(FAO 2004)
Croacia	Jugos y concentrados, manzanas	50	(FAO 2004)
Cuba	Frutas	50	(FAO 2004)
Eslovaquia	Leche, carne, aves de corral, harina y derivados, arroz, vegetales, papas Fórmula infantil Alimento para niños Otros alimentos	50 20 30 100	(FAO 2004)
Estados Unidos	Jugo de manzana, concentrado de jugo de manzana	50	(FAO 2004, Li 2017a)
Estonia	Frutas y vegetales, tomate y manzana enlatada, jugos, bebidas, etc.	50	(FAO 2004)
Hungría	Productos de frutas y vegetales	50	(FAO 2004, Varga 2004)
Irán	Jugos de fruta, nectarina y bebidas a base de fruta	50	(FAO 2004)
Israel	Jugo de manzana	50	(FAO 2004)
Japón	Jugo de manzana	50	(FAO 2004)
Letonia	Manzana, jugo de tomate	50	(FAO 2004)
Lituania	Jugo	25	(FAO 2004)
Marruecos	Jugo de manzana (productos)	50	(FAO 2004)
Moldavia	Jugos, vegetales enlatados, frutas	50	(FAO 2004)
Polonia	Jugo de manzana, productos de manzana	30	(FAO 2004)
Rumania	Jugo de fruta	50	(FAO 2004)
Rusia	Vegetales embotellados o enlatados, frutas, concentrados de vegetales, etc.	50	(FAO 2004)
Serbia y Montenegro	Jugo de manzana	50	(FAO 2004)
Singapur	Manzana y jugo de manzana	50	(FAO 2004)
Sudáfrica	Alimentos	50	(FAO 2004)
Suiza	Jugos de fruta	50	(FAO 2004)
Turquía	Jugo de fruta	50	(FAO 2004)

País/Organismo	Alimento	Nivel $\mu\text{g kg}^{-1}$	Referencias
Ucrania	Conservas y mezclas de frutas y vegetales para alimentación infantil	20	(FAO 2004)
	Vegetales, papas, frutas; conservas de vegetales y frutas	50	
Unión Europea	Jugos de frutas	50	(FAO 2004, Ramos Girona 2011)
	Bebidas espirituosas, sidra y otras bebidas fermentadas a base de manzanas	50	
	Productos sólidos a base de manzanas	25	
	Jugos de manzana y productos sólidos a base de manzana para lactantes y niños de corta edad	10	
	Alimentos infantiles	10	
Uruguay	Jugo de fruta	50	(FAO 2004, Ramos Girona 2011)

1.1.2.2. Ocurrencia de PAT en Argentina

Funes y col. analizaron 51 muestras que contienen manzana y pera (mermelada, dulce y puré de manzana, y mermelada de pera) disponibles comercialmente, recolectadas en las provincias de Córdoba, Entre Ríos, Buenos Aires y Ciudad de Buenos Aires. Hallaron que el 22,5% de las muestras analizadas estaban contaminadas con PAT, mientras que los niveles de contaminación más altos se encontraron en el puré de manzana, donde el 50% de las muestras estaban contaminadas (Funes 2009).

Oteiza y col. determinaron las concentraciones de PAT en muestras de diferentes tipos de frutas (manzana, damasco, uva, naranja, durazno, pera y ananá) y tipos de productos de fruta (jugos clarificados, jugos concentrados, pulpa concentrada y jugo sulfitado) recolectados entre 2005 y 2013 de 19 productores de pulpa y jugos localizados en distintas provincias argentinas. Los resultados mostraron que un 33,5% de las muestras de jugos de fruta presentaron niveles de PAT detectable. Las concentraciones halladas variaron en gran medida entre las muestras de acuerdo al año, tipo de fruta y tipo de producto. Es importante remarcar que un 8,6% de las muestras analizadas presentaron niveles de PAT por encima de lo establecido por la Unión Europea (Oteiza 2017).

A pesar de que los estudios precedentes muestran que la contaminación por PAT es habitual en nuestro país y, que en algunos casos supera los niveles permitidos, es de remarcar que no se han encontrado más estudios referidos a la ocurrencia de PAT en Argentina.

1.2. Métodos de detección

Al día de hoy, los métodos de detección de micotoxinas se basan, fundamentalmente, en técnicas cromatográficas: cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía gas líquido; así como combinaciones de éstas con técnicas como espectrometría de masa, espectroscopía UV-visible o de fluorescencia, etc. Es común que antes de la cromatografía en sí se utilicen columnas de extracción en fase sólida (CEFS) o columnas de inmunoafinidad acopladas, las cuales aumentan el porcentaje de recuperación de las micotoxinas.

El equipamiento que se requiere para llevar a cabo estos métodos de análisis es muy caro, lo que ha propiciado la búsqueda de técnicas alternativas más económicas. Entre éstas podemos mencionar los dispositivos de flujo lateral, electroforesis capilar, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, los ensayos inmunsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y, finalmente, los biosensores y sensores de afinidad (Moss 2009, Cheli 2011).

Los métodos inmunológicos o inmunoensayos utilizan equipos de bajo costo, robustos, y permiten realizar determinaciones en forma rápida, con una menor preparación de la muestra, gran precisión y bajos límites de detección, logrando realizar determinaciones in-situ (Goryacheva 2011, Sharma 2014a, Sharma 2014b, Valle-Algarra 2014).

Los análisis de ZEA suelen realizarse por HPLC mediante detección por fluorescencia, por cromatografía gaseosa previa derivatización, y por TLC, aunque cada vez son más comunes las técnicas basadas en la utilización de métodos de inmunoafinidad.

La AOAC estableció tres métodos oficiales de determinación de ZEA, uno para determinación en maíz por TLC con el uso previo de una columna de purificación (AOAC 976.22), otro también para maíz mediante HPLC (AOAC 985.18) y, el último, para maíz, trigo y piensos mediante ELISA (AOAC 994.01) (IARC 1993, Senyuva 2011).

En la Tabla 4 se muestran algunos métodos para la determinación de ZEA empleados en los últimos años.

Tabla 4. Métodos de determinación de ZEA desarrollados en los últimos años.

Matriz	LD	Técnica analítica	Detección	Año	Referencias
Alimentos	0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$	PdVC-PIL/GCE	Voltamperometría	2016	(Afzali 2016)
Maíz Trigo	5,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 4,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Inmunoensayo	Fluorescencia	2016	(Beloglazova 2016)
Maíz Arroz Maní	0,42 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 0,43 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 0,46 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Inmunoensayo de flujo lateral	Óptica	2016	(Chen 2016)

Matriz	LD	Técnica analítica	Detección	Año	Referencias
Leche de cabra semidescremada Yogurt natural Leche de vaca entera	1,58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 3,73 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 2,16 $\mu\text{g kg}^{-1}$	HF-LPME/GC	MS/MS	2016	(D’Orazio 2016)
Maíz	1,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	HPLC	MS/MS	2016	(Dagnac 2016)
Trigo y maíz	15 $\mu\text{g kg}^{-1}$	SUPRAS- RAM/HPLC	MS	2016	(García-Fonseca 2016)
Papilla de maíz	2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	UPLC	MS/MS	2016	(Geary 2016)
Piensos	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	IAC/UPLC	MS/MS	2016	(Hu 2016)
Piensos	0,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$	HPLC	Fluorescencia	2016	(Iqbal 2016)
Arroz	2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$	UPLC	MS/MS	2016	(Jettanajit 2016)
Trigo duro	30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	HPLC	MS/MS	2016	(Juan 2016)
Batata china	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	UPLC	MS/MS	2016	(Li 2016b)
<i>A. catechu</i>	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	UPLC	MS/MS	2016	(Liu 2016)
Maíz	0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	SPE/HPLC	MS	2016	(Moreno 2016)
Leche y trigo	0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$	Biosensor basado en ADN	DPV	2016	(Sadrabadi 2016)
Aceite vegetal	1,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	QuEChERS/HPLC	MS/MS	2016	(Sharmili 2016)
Agua mineral Agua de estanque Agua residual Leche en polvo para bebé	1,68 $\mu\text{g L}^{-1}$ 7,74 $\mu\text{g L}^{-1}$ 6,56 $\mu\text{g L}^{-1}$ 2,41 $\mu\text{g L}^{-1}$	SPE/HPLC	MS	2016	(Socas-Rodríguez 2016)
Maíz, trigo y arroz	6,5 ng L^{-1}	Inmuno-PCR	Fluorescencia	2016	(Wang 2016a)
Maíz	12 $\mu\text{g kg}^{-1}$	SPE/UPLC	TOF-MS	2016	(Wang 2016b)
Cebada y avena	5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	UPLC	MS/MS	2017	(Al-Taher 2017)
Maíz	9 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Inmunocitometría de flujo	Fluorescencia	2017	(Bánáti 2017)
Maíz y trigo	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Inmunoensayo de flujo lateral	Fluorescencia	2017	(Beloglazova 2017)
Maní	1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	HPLC	Fluorescencia	2017	(Chen 2017a)
Harina de maíz	2,12 $\mu\text{g L}^{-1}$	ELISA	Colorimétrica	2017	(Chen 2017b)
Harina de maíz Arroz	24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LC) 16 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LC)	HPLC	MS/MS	2017	(Diniz Andrade 2017)
Leche	0,510 $\mu\text{g L}^{-1}$	HPLC	MS	2017	(Flores-Flores 2017)
Maíz	0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$	SPE/UPLC	MS/MS	2017	(Han 2017)
Salvia roja asiática	0,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$	SPE/UPLC	MS/MS	2017	(Jiang 2017)
Arroz integral Mijo Sorgo Maíz Cereales mezclados	0,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 0,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 0,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 0,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	HPLC	MS/MS	2017	(Kim 2017)

INTRODUCCIÓN

Matriz	LD	Técnica analítica	Detección	Año	Referencias
Maíz Trigo duro	1,0 µg kg ⁻¹ 2,2 µg kg ⁻¹	SPE/UPLC	MS/MS	2017	(La Barbera 2017)
Solución reguladora	1,5 ng L ⁻¹	Inmunosensor	Amperométrica	2017	(Liu 2017)
Bebidas a base de plantas	0,04 µg L ⁻¹	QuEChERS/UPLC	MS/MS	2017	(Miró-Abella 2017)
Vino blanco	0,48 µg L ⁻¹	Inmunosensor	SCI	2017	(Orlov 2017)
Sangre humana	0,294 µg L ⁻¹	HPLC	MS/MS	2017	(Osteresch 2017)
Harina de maíz	5,23 µg kg ⁻¹	UPLC	TQ-MS/MS	2017	(Paschoal 2017)
Queso descremado Queso entero, kéfir de vaca y kéfir de cabra	0,050 µg kg ⁻¹ (LC) 0,250 µg kg ⁻¹ (LC)	QuEChERS/UPLC	TQ-MS/MS	2017	(Socas-Rodríguez 2017)
Cerdo Peces Hígado	0,03 µg kg ⁻¹	IAC/LC	MS/MS	2017	(Sun 2017)
Pastas	0,21 µg kg ⁻¹	UPLC	Q-Orbitrap MS	2017	(Tolosa 2017)
Maíz Cerveza	0,126 µg kg ⁻¹ 0,007 µg L ⁻¹	Aptasensor	Fluorescencia	2017	(Wu 2017)
Aceites vegetales	0,04 µg kg ⁻¹	QuEChERS/HPLC	MS/MS	2017	(Zhao 2017)
Leche humana	0,093 µg L ⁻¹	QuEChERS/HPLC	MS/MS	2018	(Braun 2018)
Trigo	12 µg kg ⁻¹	Inmunosensor	iSPR	2018	(Hossain 2018)
Cerveza	1,5 µg L ⁻¹	SPE/HPLC	Fluorescencia	2018	(Lhotská 2018)
Orina	0,02 µg L ⁻¹	SPE/UPLC	MS/MS	2018	(Li 2018a)
Maíz Arroz Trigo	0,53 µg kg ⁻¹ 0,55 µg kg ⁻¹ 0,57 µg kg ⁻¹	Inmunosensor	SERS	2018	(Li 2018d)
Trigo	10,8 µg kg ⁻¹	Ensayo de inmunofinidad	Quimioluminiscencia	2018	(Li 2018b)
Células cancerosas	2,92 µg kg ⁻¹ (LC)	QuEChERS/HPLC	Fluorescencia	2018	(Pajewska 2018)
	0,01 µg kg ⁻¹ (LC)	QuEChERS/UPLC	QTOF-MS		
Trigo	5 µg L ⁻¹	IP-ELISA	Óptica	2018	(Pidenko 2018)
Cereal	1,9 µg L ⁻¹	HPLC	UV	2018	(Rai 2018)
Maíz	0,15 ng L ⁻¹	Inmusensor	Amperométrica	2018	(Riberi 2018)
Piensos	25 µg kg ⁻¹	UPLC	MS/MS	2018	(Romera 2018)
Orina	1 ng L ⁻¹	UPLC	MS/MS	2018	(Šarkanj 2018)
Maíz	59,15 ng L ⁻¹	QB-ICA	Fluorescencia	2018	(Shao 2018)
Maíz y aceite de maíz	10 µg L ⁻¹	Aptasensor	Colorimétrica	2018	(Sun 2018a)
Hierbas medicinales	0,40 µg kg ⁻¹	TRFICA	Fluorescencia	2018	(Sun 2018b)
Maíz	47,7 µg L ⁻¹	MSPE/HPLC	Fluorescencia	2018	(Thongprapai 2018)
Extracto de cereales	0,6 µg kg ⁻¹ 1,5 µg kg ⁻¹	Inmunoensayos FCLR FRLC	Fluorescencia	2018	(Zhang 2018)

DPV: voltamperometría de pulso diferencial. FCLR: primero captura, después reacciona. FRLC: primero reacciona, después captura. HL-LPME: microextracción en fase líquida de fibra hueca. HPLC: cromatografía líquida de alto

rendimiento. IAC: columna de inmunoafinidad. IP: proteínas impresas. iSPR: imágenes de resonancia de plasmón superficial. LC: límite de cuantificación. MS: espectrometría de masas. MS/MS: espectrometría de masas tándem. MSPE: extracción en fase sólida magnética. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. PdVC-PIL/GCE: electrodo de carbono vítreo modificado con un nanocompuesto de nanopartículas de paladio y carbón Vulcan con un líquido iónico polimérico. QB-ICA: inmunocromatografía basada en nanopelotas de puntos cuánticos. Q-Orbitrap MS: espectrómetro de masas cuadrupolo-orbitrap. QTOF-MS: espectrometría de masas de cuadrupolo de tiempo de vuelo. QuEChERS: acrónimo en inglés para rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro, técnica de preparación de muestras. SCI: interferometría de correlación espectral. SERS: dispersión Raman mejorada en superficie. SPE: extracción en fase sólida. SUPRAS-RAM: solvente supramolecular con propiedades de acceso restringido. TOF-MS: espectrometría de masas de tiempo de vuelo. TQ-MS/MS: espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. TRFICA: inmunocromatografía de fluorescencia resuelta en el tiempo. UPLC: cromatografía líquida de ultra rendimiento.

En lo que respecta a PAT, la AOAC tiene establecidos tres métodos oficiales de determinación; el más antiguo, del año 1974, es para la determinación en jugo de manzana mediante TLC con una etapa de purificación con sílica gel (AOAC 974.18); el segundo es del año 1995, también para jugo de manzana, mediante HPLC con detección UV con una extracción líquida previa (AOAC 995.10); mientras que el más reciente es del año 2000, para la determinación en puré y jugo de manzana mediante HPLC con detección UV, también con una etapa previa de extracción líquida (AOAC 2000.02) (Senyuva 2011).

En la Tabla 5 se muestran algunos métodos de determinación de PAT empleados en los últimos años.

Tabla 5. Métodos de determinación de PAT desarrollados en los últimos años.

Matriz	LD	Técnica analítica	Detección	Año	Referencias
Agar puré de manzana Jugo de manzana Puré de manzana	3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LLE-SPE-HPLC	UV-vis	2016	(De Clercq 2016)
Jugo de manzana Jugo de pera Escamas de espino	3,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	MIP-sensor MCC	MCC	2016	(Fang 2016)
Jugo de manzana Jugo de pera	0,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	CG	MS/MS	2016	(Marsol-Vall 2016)
Jugo de manzana	48 ng L^{-1}	Aptasensor	UV-vis	2016	(Wu 2016)
<i>Radix Paeoniae Alba</i>	2,38 $\mu\text{g kg}^{-1}$	QuEChERS/UHPLC	QqLIT-MS	2016	(Xing 2016)
Jugo de manzana Jugo de pera Jugo de espino	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	MIP-SPE-HPLC	UV-vis	2016	(Yang 2016)
Solución reguladora	7,57x10 ⁻¹³ mol L^{-1}	MIP-Au/CS-CD/GCE	Voltamperometría	2017	(Guo 2017)
Longan seco Higo seco Espino seco Pasas Jugo de manzana Mermelada de manzana	3,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 7,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 2,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 3,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 3,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 2,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	HPLC	UV-vis	2017	(Ji 2017)

Matriz	LD	Técnica analítica	Detección	Año	Referencias
Jugo de manzana	15 $\mu\text{g L}^{-1}$ 6 $\mu\text{g L}^{-1}$	On-line MISPE-HPLC Off-line MISPE-HPLC	DAD	2017	(Lhotská 2017)
Jugo de manzana Puré de manzana Mermelada de manzana	0,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	MISPE-HPLC	UV-vis	2017	(Lucci 2017)
Jugos de manzana y derivados	0,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	SPE-HPLC	UV-vis	2017	(Torović 2017)
Jugo de manzana	2,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	MPSE-HPLC	UV	2017	(Wang 2017)
Jugo de manzana	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	MSPE-HPLC	UV-vis	2017	(Yu 2017)
Jugo de manzana	0,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$	MIP-QD nanosensor	Fosforescencia	2017	(Zhang 2017b)
Solución reguladora	0,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$	MIP-capped AgNPs@ZnMOF	Fluorescencia	2018	(Bagheri 2018)
Solución reguladora	0,27 ng L^{-1}	Aptasensor	Voltamperometría	2018	(He 2018)
Jugo de manzana	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	SD-LLLME/HPLC	MS/MS	2018	(Li 2018c)
Jugo de manzana y uva	0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$	Aptasensor	Fluorescencia	2018	(Ma 2018)
Vino	2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	UPLC	MS/MS	2018	(Ostry 2018)
Frutillas	1,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	QuEChERS/HPLC	DAD	2018	(Sadok 2018)
Solución reguladora	3 ng L^{-1}	Aptasensor	Fluorescencia	2018	(Wu 2018)

CS-CDs: puntos cuánticos de carbón de quitosano. MCC: microbalanza de cristal de cuarzo. MIP: polímero de impresión molecular. MISPE: extracción en fase sólida de impresión molecular. MSPE: extracción en fase sólida magnética. QqLIT-MS: espectrometría de masas de trampa de iones cuadrupolar lineal. SD-LLLME: microextracción líquido-líquido-líquido de gota única.

1.3. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo bioanalítico que posee un elemento de reconocimiento biológico, o bioreceptor, acoplado a un transductor fisicoquímico. Según la IUPAC “*un biosensor es un dispositivo integrado, capaz de proveer información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico en contacto directo con un elemento de transducción*”.

Estos dispositivos son de acción rápida, baratos, portátiles y, gracias a su elemento de reconocimiento biológico, son específicos al analito de interés. Estas características permiten, si el instrumental es portátil, su utilización in-situ en el campo o en la industria y constituyen una gran ventaja en la cuantificación de micotoxinas, entre otros (Tothill 2011, Adley 2015).

Los transductores utilizados pueden ser electroquímicos, ópticos, calorimétricos, magnéticos o piezoeléctricos. Cada uno de ellos registra un tipo de señal diferente pero, en última instancia, todos la transforman en una señal digital. La elección de uno de ellos se

realiza teniendo en cuenta el analito a ser determinado, la matriz en la que se encuentra, costos, sensibilidad requerida, etc. (Volpe 2003, Goldschmidt 2014).

Los biosensores electroquímicos utilizan un electrodo como transductor. En ellos, el elemento de reconocimiento biológico interacciona con el analito o target y esta interacción produce una señal eléctrica relacionada a la concentración de analito (Wang 2006). Esta respuesta eléctrica puede ser amperométrica, potenciométrica o conductimétrica/impedimétrica según sea la clase de transductor utilizado y técnica electroquímica empleada, siendo más popular el primero.

La amperometría consiste en medir la corriente eléctrica producida debido a la oxidación o reducción de una molécula al aplicar un potencial determinado entre el electrodo de trabajo y el de referencia. La corriente faradaica obtenida muestra una correlación con la concentración del analito presente en la solución. Si la corriente es registrada en función del tiempo, el proceso se conoce como cronoamperometría (Sawyer 1995).

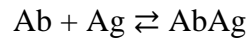
Los biosensores electroquímicos son, potencialmente, dispositivos aptos para la detección de micotoxinas en gran escala. Entre sus ventajas, podemos mencionar que son baratos, portátiles, simples de usar, y altamente sensibles. Además, el equipamiento necesario ha evolucionado hacia una gran miniaturización en los últimos tiempos, consiguiéndose hoy en día dispositivos lo bastante pequeños como para emplearlos in-situ.

Los elementos de reconocimiento biológico utilizados en la determinación de micotoxinas son variados, tales como anticuerpos, cadenas de ADN y ARN, aptámeros, péptidos de despliegue en fagos, proteínas de unión, entre otros. Por otra parte, se pueden emplear elementos de reconocimiento químicos basados en procesos de síntesis. Así, tenemos los polímeros moleculares impresos (MIP) y péptidos sintéticos (Tohill 2011, Goldschmidt 2014).

En los biosensores electroquímicos de afinidad el elemento de reconocimiento posee la capacidad de unirse selectivamente al analito o target y esta interacción genera una señal eléctrica. El proceso de unión elemento de reconocimiento-analito se encuentra bajo control termodinámico y depende de la afinidad entre ellos. Estos dispositivos poseen una alta sensibilidad y selectividad y, a diferencia de los basados en fluorescencia, son estables a la luz, lo que los convierte en los más indicados para la detección de micotoxinas (Wang 2006, Byrne 2015).

1.1.3. Inmunosensores

Cuando el elemento biológico de reconocimiento utilizado es un anticuerpo los biosensores son llamados inmunosensores. Esta clase de biosensores es específica contra el analito de interés, debido a que el anticuerpo (Ab) reacciona con el antígeno (Ag) (el analito o target) para formar un complejo antígeno/anticuerpo (AbAg):



Los anticuerpos son inmunoglobulinas, proteínas globulares con pesos moleculares mayores a 150.000 Da. En la Figura 9 se muestra un esquema de su estructura. Poseen cuatro cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), que se encuentran unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Las cadenas pesadas están compuestas por los fragmentos variables (VH) y constantes (CH). De igual forma, las cadenas livianas también poseen fragmentos variables y constantes, (VL) y (CL), respectivamente (Byrne 2015).

Son producidos por los glóbulos blancos del organismo como respuesta al ingreso de moléculas extrañas al mismo, también llamadas antígenos. Los antígenos, con un peso molecular inferior a 1.000 Da, no producen una respuesta inmunogénica, es decir, no inducen a la formación de anticuerpos. Este es el caso típico de las micotoxinas que, como mencionamos al comienzo, son moléculas de bajo peso molecular. Para lograr la producción de anticuerpos específicos contra micotoxinas lo que se hace es conjugar (unir) la micotoxina con una molécula de gran peso molecular (carrier), generalmente una proteína, e introducir este conjugado en el organismo, de manera de lograr así una respuesta inmune, con una producción de una gran variedad de inmunoglobulinas, donde solo algunas reconocerán a una región estructural de la micotoxina (Goryacheva 2011, Sharma 2014a).

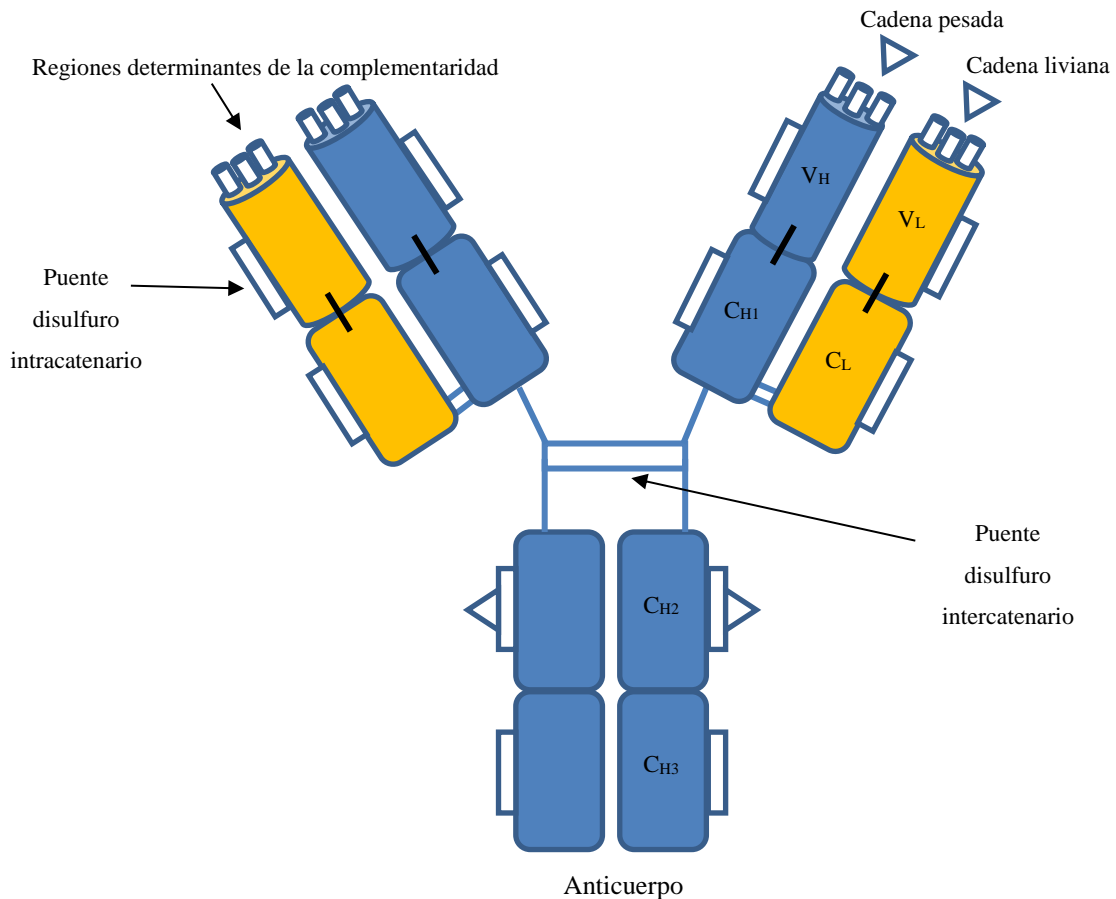


Figura 9. Estructura de un anticuerpo.

La estereoespecificidad del anticuerpo, es decir, la habilidad para reconocer un antígeno determinado y poder formar el complejo AbAg, depende de las regiones determinantes de la complementaridad, que se encuentran en las regiones variables de las cadenas livianas y pesadas, ubicadas en la región N-terminal de las cadenas polipeptídicas, conocidas como fragmento de unión al antígeno (región Fab). La formación del complejo AbAg se da mediante diferentes tipos de interacciones como ser fuerzas de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, etc. Esta región es denominada paratopo o paratope, o sitios sobre los que se une el antígeno. Los fragmentos variables *per se* son capaces de reconocer al antígeno y son también conocidos como fragmentos variables de una sola cadena (ScFv). En la Figura 10 se muestran esquemas de ambos (Byrne 2015).

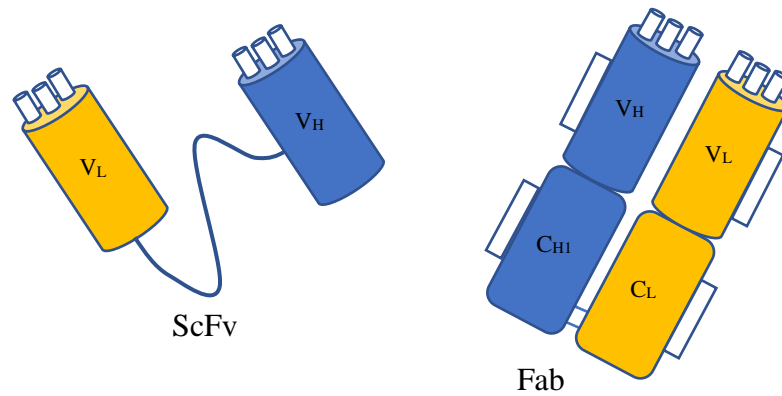


Figura 10. Fragmentos Fab y ScFv de un anticuerpo.

Esta gran estereoespecificidad de la región Fab permite detectar el antígeno dentro de una matriz compleja, lo que implica una gran ventaja en su uso para el desarrollo de inmunosensores, ya que se minimizan las etapas de purificación previas a la determinación y se obtienen dispositivos altamente selectivos.

La región Fab no reconoce el antígeno completo sino cierta región de él, conocida como *epítopo* o *epítope*. Los complejos AbAg formados poseen constantes de unión muy altas, del orden de 10^5 - 10^9 . Debido a estas propiedades, el empleo de anticuerpos permite lograr límites de detección muy bajos (Wang 2006, Goldschmidt 2014, Sharma 2014a).

Los anticuerpos utilizados pueden ser policlonales o monoclonales. Los policlonales son producidos naturalmente por los organismos. Son más económicos, pero poseen diferentes afinidades y especificidades, debido a que son capaces de reconocer distintos epítomos. Los anticuerpos monoclonales se obtienen artificialmente mediante la tecnología de hibridoma. Se selecciona una línea celular que produzca los anticuerpos con la afinidad y especificidad deseada y se la clona. Esta línea celular es la encargada de producir los anticuerpos monoclonales de interés. La afinidad uniforme de los anticuerpos monoclonales constituye una gran ventaja en el desarrollo de técnicas analíticas, pero su empleo significa un costo mayor (Goryacheva 2011).

La principal desventaja de la mayoría de los inmunoensayos electroquímicos es que requieren que el anticuerpo o el antígeno estén marcados, es decir que el anticuerpo (o el antígeno) se conjugue con una enzima. La enzima actúa sobre un sustrato y genera una especie electroactiva, o bien participa en una serie de reacciones que terminen formando una especie electroactiva, la que será oxidada o reducida sobre el electrodo y cuya corriente estará vinculada con la concentración del antígeno. Las enzimas más utilizadas son la

glucosa oxidasa (GO), la peroxidasa del rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina (AP) (Wang 2006, Tothill 2011, Smiley 2014).

Los inmunosensores electroquímicos suelen emplear inmunoensayos competitivos directos o sándwich (Figura 11). En los inmunosensores competitivos directos se produce una competencia por los sitios de unión (región Fab del anticuerpo) limitados entre las moléculas de antígeno libres y aquellas que están marcadas con una enzima. Así, el anticuerpo de captura es fijado sobre el electrodo, luego se introduce el electrodo en un medio que contiene el antígeno libre (es decir, la muestra) y antígeno unido a una enzima (marcado), que compiten por unirse a los anticuerpos, como se mencionó anteriormente. Una vez finalizado el inmunoensayo se remueven los componentes que permanecen sin reaccionar, se agrega el sustrato de la enzima y se mide la señal del compuesto obtenido en la reacción enzimática. La señal que se obtiene es inversamente proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra (Wang 2006, Goryacheva 2011, Sharma 2014a, Sharma 2014b).

Los inmunoensayos tipo sándwich deben su nombre a que el antígeno se une a dos anticuerpos. En un inmunosensor de este tipo un anticuerpo de captura específico contra el antígeno se une al electrodo. Se introduce el electrodo en el medio que contiene el antígeno y se produce la formación del complejo AbAg. Se remueve el material que permaneció sin reaccionar y se agrega el anticuerpo de detección o marcado, específico contra el mismo antígeno, el cual se encuentra unido a una enzima. Este anticuerpo se une al antígeno y, a continuación, se remueven los componentes sin reaccionar, se agrega el sustrato enzimático y se procede. El inconveniente que presentan los ensayos sándwich es que solo pueden realizarse con antígenos lo suficientemente grandes como para unirse a dos anticuerpos (McCarthy 2003, Sharma 2014a, Smiley 2014).

Como las micotoxinas son moléculas pequeñas, los inmunoensayos que se desarrollan son competitivos.

INTRODUCCIÓN

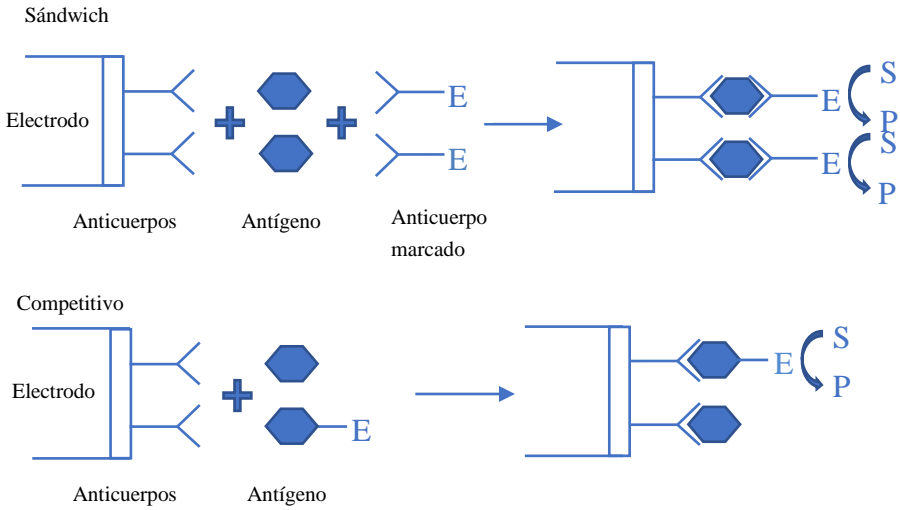


Figura 11. Esquema de inmunoensayos sándwich y competitivo.

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El proceso de formación del complejo antígeno-anticuerpo se encuentra regido por la ley de acción de masas, lo cual hace que sea factible la determinación del antígeno mediante la formación del inmunocomplejo. En base a este hecho, se pretenden desarrollar metodologías analíticas empleando técnicas electroquímicas para la determinación de las micotoxinas zearalenona y patulina: por un lado, conjugando el antígeno con una enzima y siguiendo la reacción enzimática y, por el otro, analizando los cambios en la resistencia producidos sobre la superficie del inmunosensor al formarse el inmunocomplejo.

2.2. Objetivos Generales

Estudiar los mecanismos de reacción electroquímica de micotoxinas del género *Fusarium*, como asimismo los aspectos fundamentales de la inmovilización de biomoléculas sobre transductores electroquímicos nanoestructurados y evaluar las aplicaciones analíticas de los bioelectrodos resultantes para la cuantificación sensible y selectiva de las micotoxinas zearalenona (ZEA) y patulina (PAT), las que son sustancias de interés para la industria agroalimentaria.

2.3. Objetivos Específicos

- a) Estudiar los mecanismos de reacción electroquímica y propiedades superficiales (adsorción) de ZEA. Aportar datos sobre sus propiedades electroanalíticas.
- b) Estudiar las propiedades de electrodos nanoestructurados, tales como aquellos obtenidos con nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, monocapas autoensambladas de tioles sobre oro y polímeros conductores. Evaluar su aplicación a la detección y cuantificación de ZEA y de PAT.
- c) Diseñar, estudiar y caracterizar nuevos biosensores (inmunosensores), inmovilizando sobre diferentes superficies nanoestructuradas los anticuerpos específicos para ZEA y PAT. Calcular los parámetros característicos de los inmunoelectrodos y evaluar sus aplicaciones analíticas para la determinación de estos compuestos de interés en la industria agroalimentaria.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

d) Aportar conocimientos relacionados con el desarrollo y validación de nuevas metodologías analíticas en la detección y cuantificación selectiva de las micotoxinas mencionadas en matrices naturalmente contaminadas (maíz, soja, trigo, cebada, jugo de manzana) basados, fundamentalmente, en el diseño y desarrollo de biosensores electroquímicos y en técnicas voltamperométricas de pulso y de redisolución adsortiva. Evaluar sus aplicaciones analíticas para la determinación de estos compuestos de interés en la industria agroalimentaria.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Se utilizó zearalenona (toxina F-2), adquirida comercialmente de Sigma-Aldrich, con un grado de pureza de 99%, la cual se disolvió en acetonitrilo (ACN) a una concentración de 1,17 mM (corroborada a partir de mediciones por espectroscopía UV-visible, sabiendo que en ACN ZEA posee un $\epsilon^{274} = 13111 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon^{316} = 6020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y se conservó en heladera a 4°C. A partir de la solución patrón se prepararon diluciones en solución amortiguadora de fosfato salino (SAF) 1 mM, pH 7,5 según lo requerido en el experimento correspondiente. El anticuerpo policlonal anti-ZEA (pAb-ZEA) fue de Sigma-Aldrich. Se prepararon soluciones en SAF 1 mM en concentraciones que se detallan en cada experimento.

Patulina (PAT), marca Sigma-Aldrich, con 99% de pureza, se disolvió en ACN hasta una concentración de 7,10 mM, determinada a partir de espectroscopía UV-vis, utilizando el coeficiente de absorptividad molar $\epsilon^{275} = (1,65 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, determinado previamente por el grupo de investigación (Chanique 2012, Chanique 2013). La misma se conservó en heladera a 4°C y, partir de la solución stock, se prepararon diluciones en SAF 100 mM, pH 7,5. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-PAT (pAb-PAT), marca Anti-Prot, del cual se prepararon diluciones en SAF 100 mM.

Cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), monohidrógenofosfato de disodio hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), dihidrógenofostato de potasio (KH_2PO_4), citrato de sodio hidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), ácido clorhídrico (HCl), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), catecol (1,2-bencenodiol o 1,2-dihidroxibenceno) (CAT), ácido tetracloroaúrico (III) (HAuCl_4), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de sodio (NaOH), ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), ferricianuro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) y acetato de sodio anhidro ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), todos de grado p.a., fueron adquiridos de Merck.

Glicina, albúmina de suero bovino (BSA), peroxidasa de rábano picante (HRP) tipo VI, *N*-(3-(dimetilamino)propil)-*N*'-etilcarbodiimida hidrocloreuro (EDC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS), de grado p.a., fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. La leche descremada en polvo, marca Svelty (Nestlé), y el jugo de manzana, marca Cepita, fueron adquiridos en comercios de la zona.

Piridina, benceno, acetato de etilo, N,N'-dimetilformamida, metanol (MeOH), ACN, ácido acético glacial, *n*-hexano y acetona, de grado HPLC, fueron Sintorgan; y Tween 20, de grado HPLC, adquirido de Cicarelli.

Nanotubos de carbono (NTCs), de pureza 95%, diámetro 20 nm y longitud 1-5 μm , se adquirieron de Nano-Lab y se utilizaron tal como se recibieron.

El óxido de grafeno (OG) fue provisto por el grupo del Dr. Gustavo Morales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río de Cuarto. El mismo se dispersó 2:1 en H_2O .

Las muestras de maíz, esterilizadas mediante irradiación gamma (1200 krad), fueron provistas por el grupo de la Dra. Sofía Chulze, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Se utilizó agua doblemente destilada para preparar todas las soluciones acuosas.

3.1.1. Polímeros empleados

Se utilizaron polietilenimina, etilendiamina ramificada (PEI 800), de PM promedio en masa (M_w) igual a 800 y PM promedio en número (M_n) igual a 600; polietilenimina ramificada (PEI 25K), de PM promedio en masa (M_w) de 25000 (25K) y PM promedio en número (M_n): 10000 (10K); y solución de polietilenimina (PEI 750K), de PM promedio en masa (M_w) de 750000 (750K) y PM promedio en número (M_n) igual a 60000 (60K); adquiridos comercialmente de Sigma-Aldrich, con una pureza de 99%. Para cada uno se preparó una solución acuosa de concentración 14 mg mL^{-1} .

3.1.2. Solución amortiguadora de fosfato salino (SAF), pH 7,5

Se preparó una solución de SAF 100 mM, a partir de la cual se prepararon posteriormente soluciones de SAF 10 mM, pH 7,5 y SAF 1 mM, pH 7,5 a fin de generar un medio adecuado para disolver el pAb-ZEA.

Los valores de pH se midieron con un pHmetro marca Radiometer Copenhagen NV PHM 64, que se calibró con soluciones reguladoras comerciales al momento de usar.

3.1.3. Solución amortiguadora citrato-fosfato (SAC) 0,05 M, pH 5

A fin de generar un medio adecuado para la enzima HRP (presente en el conjugado ZEA-HRP) se preparó una solución amortiguadora citrato-fosfato (SAC) 0,05 M, pH 5.

Para ajustar el pH de la solución amortiguadora se empleó una solución de HCl 1 M en H₂O.

3.1.4. Solución amortiguadora de acético

Se agregaron 0,45 mL de ácido acético glacial a 40 mL de H₂O, luego se disolvieron 0,201 g de NaC₂H₃O₂ anhidro y se ajustó el pH a 4,0 con ácido acético glacial. El volumen se ajustó a 50 mL con H₂O.

3.1.5. Síntesis de nanopartículas de oro (NPAu)

Se sintetizaron nanopartículas de oro (NPAu) mediante una adaptación de la síntesis de citrato descrita por Turkevich (Turkevich 1951). Se disolvió 1 mg de HAuCl₄ en 10 mL de H₂O y se mantuvo a ebullición por 15 minutos con agitación. Luego se agregaron 250 µL de solución acuosa de citrato de sodio al 1% P/V. Se elevó la temperatura a ebullición y se mantuvo hasta la aparición de color, para luego enfriar con agitación. Al agregar la solución de citrato de sodio a la solución, ésta cambió de color de amarillo pálido a azul grisáceo. Se detuvo el calentamiento y se dejó la solución en agitación hasta observar cambio a color rojo rubí. Luego, se guardó en la heladera.

Las nanopartículas de oro tienen la habilidad de adsorber moléculas biológicas sin pérdida de su actividad, y promueven la transferencia electrónica entre moléculas electroactivas y electrodos (Xiao 2000). Además, las NPAu favorecen una adecuada distribución y orientación de los anticuerpos sobre la superficie del electrodo (Paiva 2017).

El tamaño de las NPAu sintetizadas se estimó por espectroscopía UV-visible a partir de la determinación de las absorbancias en el pico de resonancia de plasmón superficial (A_{spr}) y a 450 nm (A_{450}), según el procedimiento descrito por Haiss y col. (Haiss 2007).

Asimismo, el diámetro de las NPAu fue también determinado por microscopía de fuerza atómica (AFM).

3.1.6. Dispersión de nanotubos de carbono (NTC)

Se prepararon dispersiones de NTC/PEI agregando NTC a una solución de PEI. La concentración de NTC se varió en el intervalo de 0,5 a 2 mg mL⁻¹. Las soluciones de PEI se prepararon mezclando PEI 800, PEI 25K y PEI 750K en un intervalo de concentraciones entre 0,2 y 3 mg mL⁻¹ para cada uno de ellos. Las concentraciones finales de la dispersión

óptima fueron de 1 mg mL^{-1} de NTC, $2,20 \text{ mg mL}^{-1}$ de PEI 750K y $0,67 \text{ mg mL}^{-1}$ de PEI 25K.

Para preparar la dispersión, se pesó 1 mg de NTC en un tubo eppendorf. Por otro lado, se prepararon 1,5 mL de solución acuosa de PEI 750K y PEI 25K de concentraciones antes mencionada, se tomó 1 mL de ésta y se adicionó al eppendorf que contiene los NTC. Se llevó la dispersión al sonicador durante 15 minutos, agitándola manualmente cada 5 minutos. Cada dispersión se empleó durante dos meses aproximadamente y, antes de cada uso, se agitó en un vortex mixer durante 6 minutos, luego se colocó en el sonicador por un tiempo de 2 minutos, agitando cada 30 segundos.

PEI es un polímero ampliamente utilizado. Permite no sólo obtener dispersiones homogéneas de NTC de pared múltiple, sino también retener la actividad biológica de biomoléculas tales como enzimas, proteínas y anticuerpos. PEI es un polímero policatiónico, capaz de interactuar con los grupos carboxilatos presentes en las proteínas (Bai 2006, Horak 2015).

3.1.7. Conjugado ZEA-HRP

La síntesis del conjugado de ZEA-HRP se llevó a cabo mediante una adaptación del método desarrollado por Thouvenot y Morfin (Thouvenot 1983).

Se preparó una solución stock de ZEA de 2 mg mL^{-1} en ACN, debido a su buena solubilidad en el mismo. Se tomó una alícuota de 0,5 mL de la solución stock, se evaporó con argón y, luego, se redisolvió en 200 μL de piridina. Se agregaron 3 mg de glicina y se dejó reaccionar durante 24 hs a temperatura ambiente con agitación.

A continuación, se agregaron unas gotas de agua y el precipitado se redisolvió con NaOH, pH 8. Luego se realizaron tres particiones con benceno, descartándose la fase orgánica. La fase acuosa se llevó a pH 3 con HCl, produciéndose un precipitado de ZEA-glicina.

Se realizaron tres extracciones con acetato de etilo descartando la fase acuosa. La fase orgánica se evaporó con un burbujeo de argón, y los cristales de ZEA-glicina obtenidos se redisolvieron en 100 μL de N,N'-dimetilformamida.

Se preparó una solución de HRP, tipo VI, de concentración 1 mg mL^{-1} en SAF 10 mM pH 7. Esta solución se mezcló con la solución de ZEA-glicina en proporción 60:1. Luego se agregaron lentamente 30 mg de EDC y se ajustó a pH 6 con HCl diluido. La reacción se llevó a cabo durante 24 hs a temperatura ambiente y con agitación.

Posteriormente se agregaron 3 mg de EDC y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 24 hs más.

Finalmente, el producto se dializó frente a SAF 1 mM pH 7 por 96 horas con una membrana de diálisis de 10 kDa de cutoff.

El producto se analizó mediante espectroscopía UV-visible y test de ELISA.

3.1.8. Extracto de maíz

Se molieron aproximadamente 25 g de maíz estéril (no contaminado con ZEA) con un molinillo analítico y se secó en estufa a 40 °C durante 24 horas. Posteriormente, se pesó 1,4 g del maíz seco molido y fue agregado a 14 mL de MeOH/ACN 50:50. Se agitó en un agitador tipo vórtex durante 10 minutos, luego se extrajo el sobrenadante y se lo evaporó mediante un flujo de argón. A continuación, el sobrenadante se reconstituyó en 14 mL de SAF 1 mM, pH 7,5 y se filtró con papel de fibra de vidrio. Se almacenó a 4 °C hasta su uso. Para la realización de la curva de calibración empleando el inmunosensor electroquímico, al extracto reconstituido se le agregaron distintas concentraciones de ZEA a partir de una solución estándar.

3.1.9. Extracto de maíz contaminado con ZEA

Se pesaron 1,2 g de maíz molido y al mismo se le agregaron 1,2 µL de una solución estándar de ZEA $1,17 \times 10^{-3}$ M, lo que corresponde a una concentración de ZEA de 373 µg kg⁻¹. El maíz contaminado se agitó en un agitador tipo vórtex durante 10 minutos. A continuación, se agregaron 12 mL de una mezcla MeOH/ACN 50:50 y nuevamente se colocó en el agitador tipo vórtex durante 10 minutos más. Se recolectó el sobrenadante (9,5 mL) y se almacenó. El extracto se trató de una manera diferente para realizar los ensayos de recuperación con el inmunosensor electroquímico o con HPLC.

Para el ensayo de recuperación de ZEA con el inmunosensor electroquímico, se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se evaporó mediante un flujo de argón. El extracto se reconstituyó en 1 mL de SAF 1 mM, pH 7,5 y se almacenó a 4 °C hasta su uso. La concentración del extracto de ZEA reconstituido es, asumiendo una eficiencia de extracción del 100%, de $47,0 \pm 0,8$ ng mL⁻¹, idéntica a la concentración del extracto en MeOH/ACN 50:50.

Para el ensayo de recuperación de ZEA por HPLC, se tomó una alícuota de 500 µL del sobrenadante y se colocó en una columna de extracción en fase sólida (CEFS) previamente

tratada, agregándose a continuación 3 mL de MeOH/ACN 50:50. El eluyente se recolectó en fracciones de $\approx 500 \mu\text{L}$, conservándose las tres primeras fracciones y descartando el resto (ver más adelante en Sección 4.1.14). Las fracciones conservadas se unieron y el extracto resultante se almacenó a 4°C hasta su uso. El volumen exacto recolectado fue de 1,71 mL, determinado a partir del peso del volumen recolectado y de la densidad de la solución ($\delta = 0,7926 \text{ g mL}^{-1}$).

3.1.10. Extracto de jugo de manzana contaminado con PAT

El extracto de jugo de manzana contaminado con PAT se preparó utilizando el procedimiento descrito por Jalali y col. (Jalali 2010). A 40 mL de jugo de manzana se le agregó un volumen de stock de PAT para dar una concentración final de PAT de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$. Luego el jugo de manzana se mezcló con 20 mL de solución amortiguadora de acético y se pasó a través de una CEFS, la cual fue pre-lavada antes de su uso con 10 mL de MeOH, 3 mL de MeOH al 10% y 10 mL de H_2O , en ese orden. Después de agregada la mezcla de jugo de manzana y solución amortiguadora de acético, se lavó la CEFS con el agregado de 10 mL de *n*-hexano y, luego, se secó la misma con corriente de Ar durante 15 min. El eluido se descartó y se cambió de recipiente.

La CEFS se eluyó con tres fracciones, de 5 mL cada una, con la mezcla de solventes de elución (hexano/aceto de etilo/acetona en proporciones 1/5/4; 1/4/5 y 1/3/6, respectivamente). Para permitir un tiempo de contacto prolongado del solvente con la columna, el flujo de cada fracción se detuvo por aproximadamente 1 min. Luego, las tres soluciones se combinaron y se les agregó 1 gota de ácido acético glacial. Se evaporó con flujo de Ar y el residuo se disolvió en 3 mL de solución amortiguadora de acético.

3.2. Materiales

3.2.1. Electrodo

Se utilizaron electrodos impresos de carbono (EIC), adquiridos de PalmSens. EICs modelo ItalSens IS-C (Figura 12).

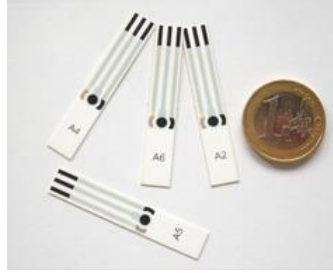


Figura 12. Electrodo impreso ItalSens IS-C.

Especificaciones:

- Sistema de electrodos: ET + ER + CE
- Electrodo de trabajo (ET): carbono
- Diámetro del ET: 3 mm
- Número de ETs: 1
- Contraelectrodo (CE): carbono
- Electrodo de pseudo-referencia (ER): Plata
- Material y dimensiones del soporte: poliéster, 8x30 mm

El potencial (E) aplicado es medido entre el ET y el ER, y la corriente (I) circula entre el ET y el CE. El uso de una celda de tres electrodos (es decir, que incluya un contraelectrodo) es recomendado para evitar la polarización del electrodo de referencia. El paso de corriente a través de la solución produce una caída de potencial igual a IR_s , donde I es la corriente que circula entre los electrodos y R_s es la resistencia de la solución. Se toma como criterio $IR_s > 1-2$ mV para emplear una celda de tres electrodos. En la Figura 13 se muestra una ilustración de una celda de tres electrodos (Bard 2000).

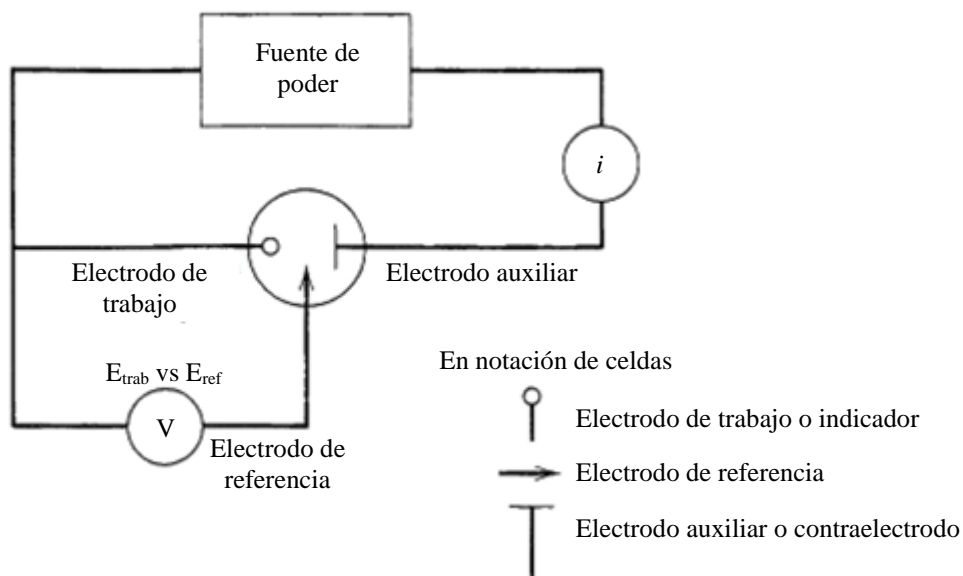


Figura 13. Esquema de una celda de tres electrodos y notación de los distintos electrodos (Bard 2000).

Antes de utilizarlos, a los EIC se les realizó un pretratamiento para activarlos, mediante una oxidación masiva de la superficie del ET, produciendo una superficie más hidrofílica y removiendo las impurezas propias del electrodo. Se realizó una electrólisis a potencial controlado (EPC) con NaOH 0,12 M a un potencial de 1,2 V durante 60 segundos, utilizando el método descrito por Anjo y col. (Anjo 1989). A la solución de NaOH se le realizó un agregado de NaCl saturado a fines de garantizar el comportamiento del electrodo de Ag como pseudo-referencia.

Además, también se utilizaron electrodos de carbono vítreo (ECV) marca CH Instruments (Figura 14), de 3 mm de diámetro, como electrodos de trabajo; electrodo de referencia de Ag/AgCl y alambre de Pt como contraelectrodo.



Figura 14. Electrodo de carbono vítreo.

3.2.2. Potenciostatos

El potenciostato es el equipo que se encarga de mantener el control sobre el voltaje entre el ET y el CE, ajustado de manera tal que la diferencia de potencial entre el ET y el ER se mantenga de acuerdo con el programa de potencial definido por el generador de la función, mediante un circuito de feedback de alta impedancia. En otras palabras, se encarga de hacer circular, a través del ET, la corriente necesaria para mantener el potencial deseado en todo momento (Figura 15) (Bard 2000).

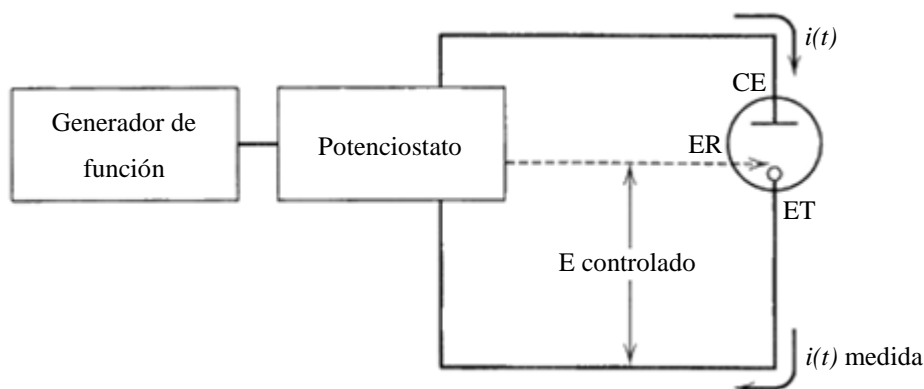


Figura 15. Representación esquemática de un dispositivo experimental para experimentos a potencial controlado.

Las medidas electroquímicas se efectuaron utilizando un potenciostato Autolab PGSTAT101, un potenciostato Autolab PGSTAT30 con módulo FRA, acoplados a una PC con el software NOVA 2.1 incorporado, un potenciostato marca BASi Epsilon, también acoplado a una PC con el software BASi Epsilon EC 1.60.70 incorporado y un potenciostato PalmSens 4 con módulo de impedancia acoplado a una PC con el software PStTrace 5.5 incorporado (Figura 16).



Figura 16. Potenciostatos: Autolab PGSTAT30 (izq. arr.), Palmsens 4 (izq. ab.), Autolab PGSTAT101 (centro), BASi Epsilon (der.).

3.2.3. Columnas de extracción en fase sólida (CEFS)

Las columnas de extracción de fase reversa utilizadas fueron cartuchos con sílice en su interior, recubierto con un compuesto orgánico hidrofóbico que constituye la fase sólida en una extracción sólido-líquido. Se utilizaron para eliminar los efectos de matriz y para preconcentrar el analito de interés (Razzazi-Fazeli 2011). Las columnas utilizadas fueron Strata-X poliméricas de fase reversa (3 mL), adquiridas de Phenomenex (Figura 17).



Figura 17. CEFS Strata-X.

3.2.4. Cromatógrafo líquido de alto rendimiento

Los equipos de HPLC son instrumentos complejos y costosos que son capaces de hacer circular solvente a presiones muy altas a través de una columna cromatográfica, donde se produce la separación de los componentes de una mezcla.

En este caso se empleó, por un lado, una columna C18 de fase reversa Phenomenex Luna 00G-4252-E0, que posee las siguientes especificaciones: diámetro de partícula de 5 μm , tamaño de poro de 100 \AA , longitud de 250 mm, y diámetro interno de 4,6 mm (Figura 18). Por el otro lado, se empleó una columna C18 de fase reversa Phenomenex PhenoSphere-NEXT 00G-4308-E0, que posee las siguientes especificaciones: diámetro de partícula de 5 μm , tamaño de poro de 120 \AA , longitud de 250 mm, y diámetro interno de 4,6 mm. Ambas columnas se utilizaron junto con una precolumna SecurityGuard AJ0-4287 C18 de fase reversa de 4 mm de longitud y diámetro interno de 3 mm en un soporte modelo KJ0-4282.



Figura 18. Columna Phenomenex Luna 00G-4252-E0.

Finalmente, al eluir de la columna el solvente pasa a través de un detector donde es analizado. Un esquema sencillo de un instrumento de HPLC se muestra en la Figura 19 (Skoog 2015).

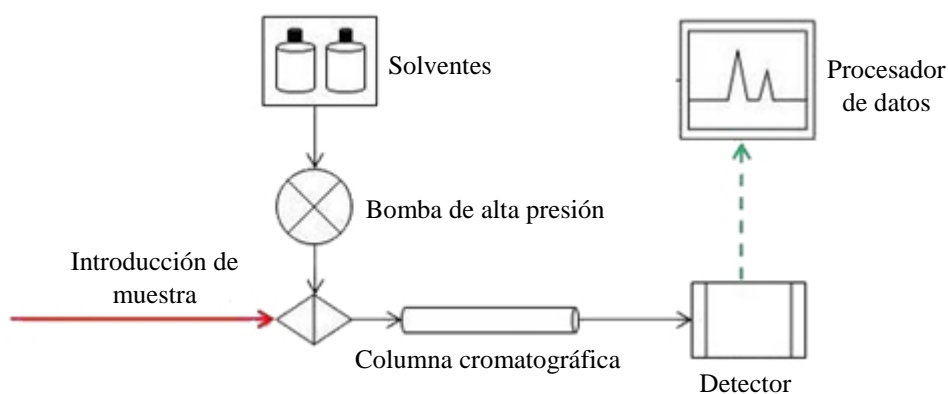


Figura 19. Esquema de los componentes de un equipo de HPLC.

Las determinaciones por cromatografía se realizaron utilizando un equipo Waters Alliance e2695 Separations Module (Figura 20).



Figura 20. Waters Alliance e2695 Separations Module.

3.3. Métodos

3.3.1. Técnicas electroquímicas

3.3.1.1. Cronoamperometría

La cronoamperometría se basa en aplicar un salto de potencial al electrodo de trabajo desde un potencial inicial E_1 , donde no ocurre proceso faradaico alguno a un potencial final E_2 , donde la concentración de la especie electroactiva en la cercanía del ET es cero, es decir que al potencial E_2 se produce la reacción de transferencia electrónica entre la molécula rédox y el electrodo. Si se utiliza un electrodo de trabajo estacionario en solución no agitada, y en presencia de un electrolito soporte, entonces el único modo de transferencia de masa que influye es la difusión, y se dice que la reacción está controlada por difusión.

Para una reacción del tipo $O + ne^- \rightarrow R$, la reducción de O al potencial aplicado origina un gradiente de concentración que produce un flujo de O desde el seno de la solución hacia el electrodo de trabajo. A medida que O se consume se produce un aumento gradual de la capa de difusión y la pendiente del perfil de concentración va disminuyendo, al igual que la corriente, que dependerá sólo de la difusión de O desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo (Figura 21).

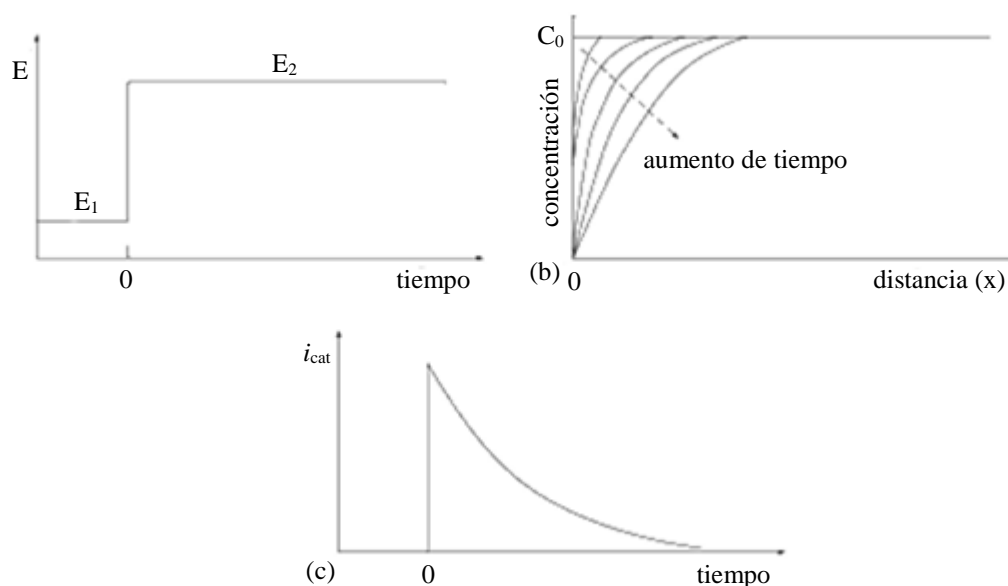


Figura 21. (a) variación del potencial en el tiempo, (b) cambio de los perfiles de concentración con el tiempo y (c) respuesta de la corriente de reducción con el tiempo (Wang 2006).

Como la corriente se registra en función del tiempo el proceso se conoce como *cronoamperometría* (Bard 2000).

Para un electrodo plano, el decaimiento de corriente viene dado por la *ecuación de Cottrell*:

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (1)$$

donde n es el número de electrones que participan en la hemirreacción, F es la constante de Faraday, A es el área electroactiva del electrodo, C es la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución y D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva (Bard 2000, Wang 2006).

A veces es de utilidad registrar la dependencia carga-tiempo, lo cual se puede hacer integrando la gráfica corriente vs tiempo. Este procedimiento se conoce como *cronocoulometría* (Bard 2000, Wang 2006).

3.3.1.2. Voltamperometría cíclica (VC)

La voltamperometría cíclica (VC) es una de las técnicas más utilizadas a la hora de realizar estudios electroquímicos en sistemas nuevos. Su popularidad se debe a que permite obtener una gran cantidad de información sobre el comportamiento termodinámico de

procesos rédox, la cinética de reacciones de transferencia electrónica heterogénea y de procesos de adsorción o reacciones químicas acopladas. Además, permite obtener, en forma sencilla, los potenciales rédox de las especies electroactivas.

El potencial del electrodo de trabajo varía linealmente con una forma de potencial triangular. El potenciostato registra la corriente resultante a medida que se barre el potencial del ET. El gráfico I vs E resultante se conoce como *voltamperograma cíclico*.

Consideremos la reacción de reducción sencilla $O + ne^- \rightleftharpoons R$. Inicialmente, en el sistema sólo está presente O . Al potencial inicial no ocurre proceso faradaico alguno, dado que este es bastante más positivo que $E^{\circ'}$ (potencial formal del par rédox). Se comienza a barrer el potencial en sentido negativo y, a medida que este se acerca a $E^{\circ'}$, comienza a producirse la reducción de O y su concentración sobre la superficie del ET disminuye, por lo que el flujo de O hacia éste y la corriente catódica se incrementan. Luego de pasar el $E^{\circ'}$, la concentración superficial decae a cero y el gradiente de concentración es máximo. La corriente alcanza su máximo valor llegando a la condición de control difusional. Así, por un efecto de agotamiento de O la corriente empieza a disminuir con una dependencia de $t^{-1/2}$. Como resultado se observa un pico en la curva de corriente-potencial.

Al invertir el barrido de potencial, las moléculas de R producidas se oxidan para dar O y se produce una corriente anódica con un pico de forma similar al anterior debido a las mismas razones (Figuras 22 y 23) (Bard 2000, Wang 2006).

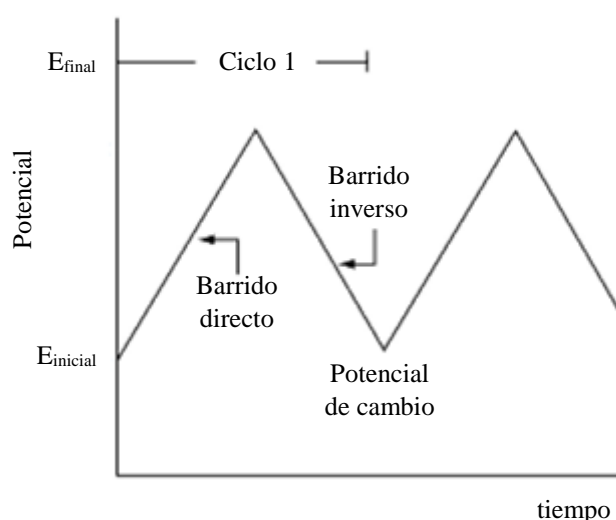


Figura 22. Programa de barrido de potencial en voltamperometría cíclica (Wang 2006).

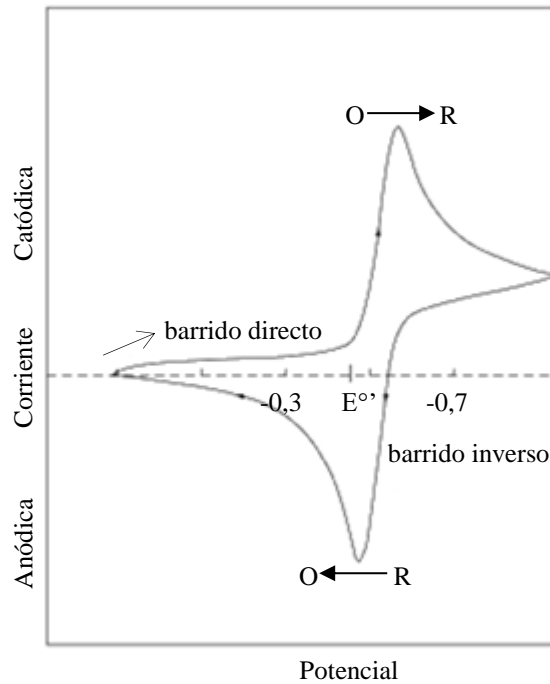


Figura 23. Voltamperograma cíclico típico (Wang 2006).

3.3.1.3. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) consiste en aplicar una variación de potencial (E) alterno de pequeña amplitud a un electrodo y medir su respuesta en corriente (I) a diferentes frecuencias. La impedancia (Z) varía en función de la velocidad angular ω de la función de E, y está relacionada al potencial y la corriente (E e I, respectivamente) por la siguiente ecuación:

$$Z(\omega) = \frac{E_0 \text{sen}(\omega t)}{I_0 \text{sen}(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\text{sen}(\omega t)}{\text{sen}(\omega t + \phi)} \quad (2)$$

Por lo tanto, la impedancia se puede expresar en términos de su valor absoluto, Z_0 , y su corrimiento de fase, Φ .

Debido a que Z es una función compleja esta puede expresarse en términos de una componente imaginaria, Z_{Im} , y una componente real, Z_{Re} .

Uno de los gráficos más utilizados para mostrar la variación de impedancia con la frecuencia es el gráfico de Nyquist, o diagrama de impedancia en el plano complejo, el cual consiste en graficar $-Z_{Im}$ vs. Z_{Re} . Los datos de bajas frecuencias se encuentran en el lado derecho del gráfico y los de altas frecuencias, en el izquierdo (Bard 2000).

Los gráficos de Nyquist han demostrado ser muy útiles a la hora de estimar parámetros de impedancia y, además, la forma del gráfico proporciona una visión acerca de posibles mecanismos de conducción o fenómenos controlados cinéticamente. Los espectros de impedancia usualmente presentan uno o varios arcos en el plano complejo. Si el arco es un semicírculo perfecto, la respuesta de impedancia es producida por un proceso controlado por una única energía de activación (o proceso de transferencia de carga). En cambio, un semicírculo deprimido denota la necesidad de un modelo más detallado para describir el sistema, mientras que bucles múltiples indican que se requiere más de una constante de tiempo para describir un proceso. A veces ocurre que dentro del intervalo de frecuencias analizadas no se ve el o los semicírculos completos sino solo una parte de los mismos.

La principal desventaja de los gráficos de Nyquist es que la información mostrada no es completa, dado que no explicita la frecuencia a la cual se mide la impedancia en cada punto y, además, dificulta bastante la determinación de valores de impedancia bajos (normalmente observados a frecuencias muy altas) (Lvovich 2012).

Las medidas de impedancia faradaica se realizan en presencia de un par redox reversible (como ferrocianuro/ferricianuro). La resistencia a la transferencia de carga de ese par redox depende de las características de la superficie del electrodo. Mientras más bloqueado se encuentre el acceso del par redox a la superficie del electrodo, la resistencia a la transferencia de carga se incrementa y la capacitancia disminuye.

Debido a la capacidad de esta técnica para detectar cambios en las propiedades interfaciales de los electrodos es muy utilizada como técnica de transducción en el campo de los inmunosensores (Knichel 1995, Pei 2001).

Los datos de impedancia se suelen analizar mediante ajuste con un circuito eléctrico equivalente, construido con elementos pasivos (resistores, capacitores y, a veces, inductancias). Los circuitos equivalentes deben ser seleccionados partiendo de una comprensión intuitiva del sistema electroquímico en estudio, siempre y cuando se basen en las propiedades físicas y químicas del sistema y no contengan elementos de circuito elegidos arbitrariamente, dado que lograr el mejor ajuste entre un modelo y los datos experimentales no significa necesariamente que el modelo de circuito equivalente utilizado tenga sentido físico.

El circuito de Randles es uno de los modelos de circuito equivalente más simple y ampliamente utilizado para describir soluciones acuosas iónicas. Incluye la resistencia de la solución (R_s), y una combinación en paralelo de la capacitancia de la doble capa eléctrica (C_{dl}) con el proceso faradaico, el cual es representado como una combinación en serie de la

resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) y el elemento de Warburg (W), tal como se muestra en la Figura 24 (Lvovich 2012).

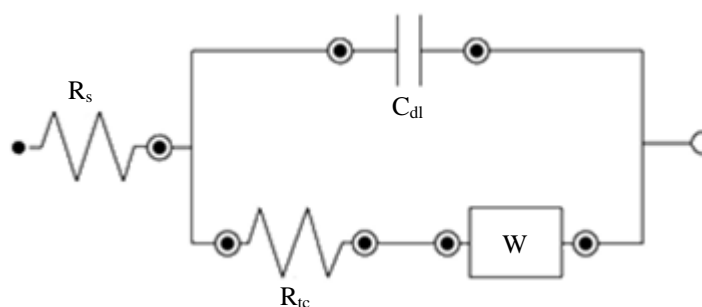


Figura 24. Circuito de Randles.

En gran parte de los sistemas reales se observa que la impedancia de la doble capa se comporta como una capacitancia no pura, motivo por el cual se la suele representar como un elemento de fase constante (CPE_{dl}). Este comportamiento es atribuido a diversos fenómenos tales como un diseño de celda no adecuado, rugosidad superficial, porosidad superficial o a reacciones que ocurren en varios pasos (Vig 2009).

El elemento de Warburg, o impedancia de difusión de Warburg, representa la resistencia al flujo de corriente de las especies electroactivas, bajo condiciones de difusión semi-infinita.

En los casos de régimen de difusión finita el elemento de Warburg es reemplazado por el elemento de Warburg short (W_s) o el elemento de Warburg open (W_o). El elemento W_s describe la impedancia para un sistema de difusión finita con frontera transmisiva, es decir, cuando las especies que difunden son instantáneamente consumidas sobre el electrodo. Por otro lado, el elemento W_o describe la impedancia para un sistema de difusión finita con frontera reflectiva, es decir, cuando la descarga del par rédox no ocurre y el electrodo es “bloqueado” totalmente.

A continuación, se muestra el gráfico de Nyquist para un par rédox bajo régimen de difusión semi-infinita.

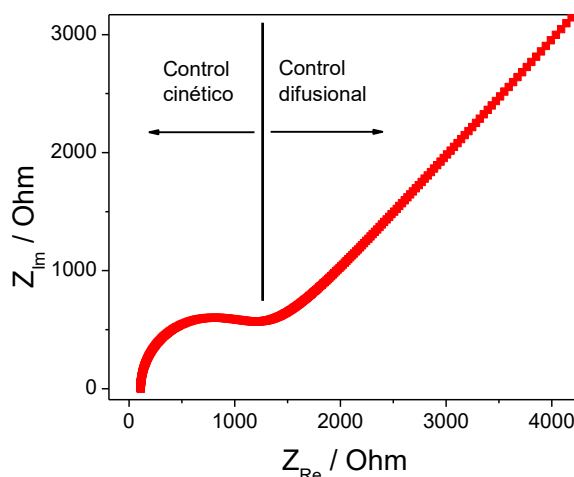


Figura 25. Gráfico de Nyquist para un par rédox bajo régimen de difusión lineal semi-infinita.

En el gráfico de Nyquist pueden identificarse claramente dos regiones, un semicírculo sobre el eje x seguido de una línea recta a 45 °C. En el intervalo de frecuencias altas se observa el semicírculo, el cual corresponde a un proceso controlado por transferencia de carga; mientras que en la región de frecuencias bajas se encuentra la línea recta, debida a los procesos controlados por difusión. La resistencia de la solución se puede encontrar leyendo el valor de la intersección sobre el eje real a frecuencias altas. A partir del espectro se puede obtener información sobre las características difusionales y cinéticas de transferencia de carga del sistema. De la intersección del semicírculo con el eje Z_{Re} se obtiene el valor de la resistencia de la solución (R_s), mientras que la resistencia a la transferencia de carga es igual al diámetro del semicírculo (Wang 2006).

3.3.2. Métodos cromatográficos

3.3.2.1. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

Según la definición de la IUPAC, la cromatografía es “*un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida*” (IUPAC 2014).

La fase móvil, que puede ser un solvente o mezcla de solventes de composición fija o variable, ingresa a la columna cromatográfica a presiones muy altas. En la columna entra en contacto con la fase estacionaria, inmisible con la anterior, que está unida mediante enlaces químicos a la columna. La separación de los componentes se produce por las distintas

velocidades de transporte que presentan en una fase móvil dada y por la afinidad del analito por la fase estacionaria y la fase móvil.

3.3.3. Inmunoensayos

3.3.3.1. ELISA no competitivo directo

El ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) es una técnica de screening ampliamente utilizada, la cual se fundamenta en la estereoespecificidad de los anticuerpos para reconocer y unirse al analito de interés (antígeno). En el ensayo ELISA no competitivo directo con antígeno marcado, los anticuerpos son inmovilizados sobre una superficie sólida, comúnmente sobre una placa de microtitulación (Figura 26). Se los incuba a 4 °C toda la noche. A continuación, se lava para remover los anticuerpos que no se inmovilizaron. Todos los lavados son con solución amortiguadora de fosfatos salina. Luego se agrega un agente bloqueante y se incuba. El fin del agente bloqueante es evitar la adsorción no específica (o *fouling*) del antígeno, es decir que el antígeno se adsorba sobre los sitios donde no hay anticuerpo. Finalizada la incubación del agente bloqueante se lava para remover el material que no se adhirió a la placa. Luego se agrega el antígeno, se incuba y se enjuaga la placa con solución amortiguadora para remover el antígeno no enlazado. Después se agrega el antígeno conjugado con la enzima (generalmente HRP) y se incuba. A continuación, se agrega el sustrato cromogénico. Durante la incubación la enzima cataliza la conversión del sustrato cromogénico, incoloro, en un compuesto coloreado. La reacción de desarrollo de color se detiene mediante la adición de una solución diluida de H₂SO₄ a cada plato y el punto final se puede analizar mediante un análisis visual o midiendo los valores de absorbancia con un espectrofotómetro, dependiendo del tipo de test (si es cuali o cuantitativo) (Crowther 1995, McCarthy 2003, Ji 2011, Sharma 2014b).

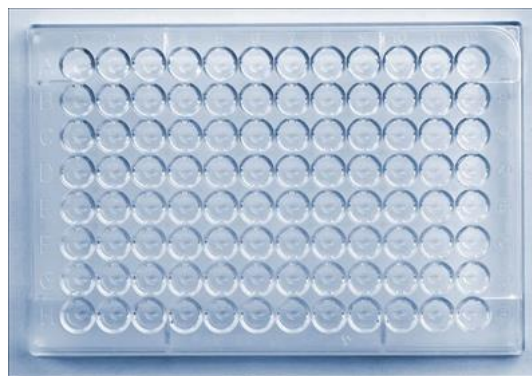


Figura 26. Placa de microtitulación para ensayos ELISA colorimétricos.

3.3.3.2. Inmunoensayo competitivo directo

En el inmunoensayo competitivo directo se inmoviliza el anticuerpo sobre una superficie sólida incubándolo a 4 °C toda la noche. Los anticuerpos que no se inmovilizaron se remueven mediante lavado y se incuban con un agente bloqueante para cubrir los sitios libres sobre los cuales se podría adsorber el antígeno en forma no específica. Todos los lavados son con solución amortiguadora de fosfatos salina. Luego se adiciona una solución que contiene una mezcla del antígeno y el antígeno conjugado con la enzima, los cuales compiten por los sitios de unión del anticuerpo libres. A continuación, se agrega el sustrato cromogénico y se incuban. Por último, se agrega una solución diluida de H₂SO₄ para detener la reacción de desarrollo de color y se analiza el punto final.

A mayor concentración de antígeno presente en la muestra menor cantidad de antígeno conjugado se unirá al anticuerpo, por lo tanto, la señal observada será menor. Así, la señal es inversamente proporcional a la concentración del mismo (Crowther 1995).

3.3.4. Herramientas complementarias

3.3.4.1. Diseño experimental

El diseño experimental es la forma más eficaz de hacer experimentos. Consiste en determinar qué experimentos se deben realizar y de qué manera para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder los interrogantes planteados (Gutiérrez Pulido 2008).

Desafortunadamente, el diseño experimental no es tan conocido y aplicado como debiera ser y, en muchas publicaciones, se encuentra que la “optimización” de un procedimiento es realizada a una variable por vez (OVAT, por sus siglas en inglés). El inconveniente es que esta forma de optimización no garantiza en lo absoluto hallar el óptimo real. Este enfoque es válido sólo en el caso de que las variables a ser optimizadas sean totalmente independientes unas de otras (Leardi 2009).

En todo sistema bajo estudio existe un cierto número de factores que producen un dado número de respuestas. El sistema actúa como una función desconocida que opera sobre las variables de entrada o factores (las cuales pueden ser variadas independientemente unas de otras) y produce las respuestas observadas como salida. El objetivo del diseño estadístico de experimentos es conocer esa función o al menos lograr aproximarla (Barros Neto 2001).

Así, para un sistema sencillo donde sólo se tienen dos factores, se puede obtener un modelo matemático que relacione la respuesta con las condiciones experimentales como el siguiente:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (3)$$

Una vez estimados la constante y los coeficientes de los términos lineales, de interacción y de los términos cuadráticos, al reemplazar los factores (X_1 y X_2) por valores reales se podrá predecir la respuesta para cualquier configuración posible del sistema dentro del dominio experimental (es decir, el “área” experimental que es investigada), incluso para aquellos experimentos que no se hayan realizado.

Al poder predecir la respuesta de cualquier punto del dominio experimental, se puede obtener de manera sencilla una representación gráfica.

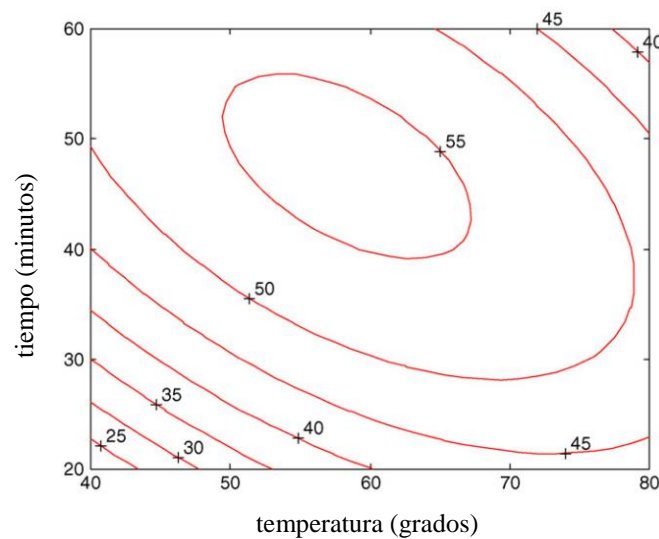


Figura 27. Gráfico de isorespuesta (Leardi 2009).

En la Figura 27 se muestra un ejemplo. En este ejemplo, el sistema es una reacción química con dos factores, temperatura y tiempo, cuya respuesta es el porcentaje de rendimiento de reacción. El gráfico obtenido permite comprender de manera sencilla el comportamiento general del sistema en estudio, así como encontrar de forma sencilla las condiciones que corresponden al máximo global. El gráfico de isorespuesta conecta todos los puntos que tienen la misma respuesta predicha. Al ver el gráfico, puede observarse que la temperatura óptima cambia de acuerdo al tiempo de reacción o, en otras palabras, existe

una interacción entre las dos variables, lo cual no podría haberse descubierto mediante una optimización OVAT (Leardi 2009).

En definitiva, realizar una optimización multivariada presenta ventajas con respecto a optimizar una variable a la vez, tales como tener en cuenta interacciones entre las variables, obtener un conocimiento global del sistema (dentro del dominio experimental), obtener información de mejor calidad en cada punto del dominio, y requerir de un menor número de experimentos.

Uno de los diseños más utilizados es el factorial, ya que permite estudiar el efecto de varios factores sobre una o más respuestas, investigando todas las combinaciones posibles de los niveles (valores) de los factores. Los diseños factoriales 2^k permiten estudiar efectos lineales y de interacción, y son los más utilizados a la hora de realizar estudios preliminares dado que son los más simples. En estos diseños, cada una de las k variables tiene dos niveles, y las mismas pueden ser cuantitativas o cualitativas.

Aunque menos empleados, dado que requieren realizar un mayor número de experimentos, los diseños 3^k pueden ser una buena alternativa cuando se tienen pocos factores, ya que además permiten estudiar efectos de curvatura. Esta clase de diseños pertenece al grupo de metodologías de superficies de respuesta (RSM), con los cuales es posible establecer un modelo cuadrático para el sistema en estudio y así determinar los valores máximos o mínimos de los factores. En un diseño factorial 3^2 se tienen dos factores con tres niveles cada uno, es decir, consiste en 9 tratamientos distintos (Gutiérrez Pulido 2008). Los nueve puntos de diseño se pueden representar en el siguiente plano de diseño, que delimita la región experimental.

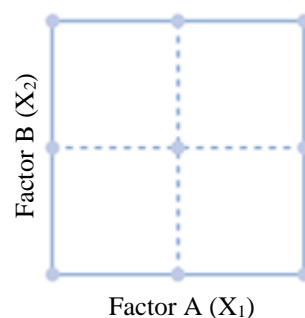


Figura 28. Representación en el plano del diseño 3^2 (Gutiérrez Pulido 2008).

La respuesta obtenida para el sistema se puede modelar de la siguiente manera:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 \quad (4)$$

Se debe notar que esta ecuación es la misma que se usó como ejemplo anteriormente. Dado que la respuesta del sistema es ajustada por un polinomio de segundo orden, esta clase de diseño se conoce como *diseño de segundo orden*, y la ventaja que presenta es que permite estudiar los efectos cuadráticos o de curvatura pura.

Los diseños 3^k son poco utilizados debido a su baja eficiencia, pero pueden ser una buena alternativa al tener sistemas con pocos factores (Ferreira 2018). En el caso de que se tengan más de dos factores es recomendable, desde el punto de vista económico (es decir, del número de experiencias requeridas), emplear diseños como el Box-Behnken o el diseño central compuesto (Gutiérrez Pulido 2008).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Zearalenona

4.1.1. Determinación del diámetro de las nanopartículas de oro

El tamaño de las NPAu sintetizadas se estimó por espectroscopía UV-visible a partir de la determinación de las absorbancias en el pico de resonancia de plasmón superficial (A_{spr}) y a 450 nm (A_{450}), según el procedimiento descrito por Haiss y col. (Haiss 2007). El espectro de absorción de las NPAu sintetizadas se muestra a continuación:

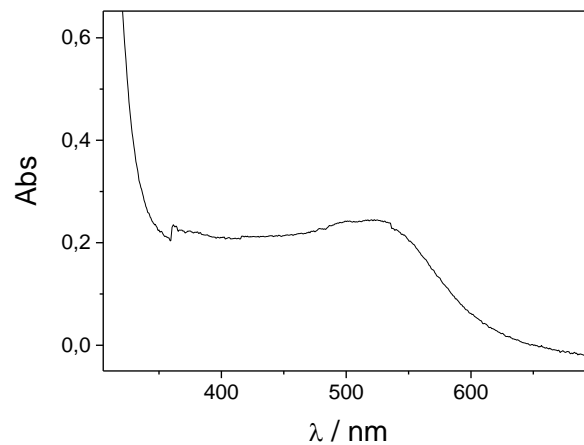


Figura 29. Espectro UV-visible de las nanopartículas de oro sintetizadas.

El diámetro (d) aproximado de las NPAu se obtiene por medio de la siguiente expresión:

$$d = \exp\left(B_1 \times \frac{A_{spr}}{A_{450}} - B_2\right) \quad (5)$$

Donde $B_1 = 3,00$ y $B_2 = 2,20$, son constantes (Haiss 2007). Por otro lado, de la Figura 29 se determinó que $A_{spr} = 0,24$ y $A_{450} = 0,21$, por lo que el diámetro de las nanopartículas es:

$$d = \exp\left(3,00 \times \frac{0,24}{0,21} - 2,20\right) = 3,41 \text{ nm}$$

Es decir, el diámetro de las mismas es de aproximadamente 3 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comprobar la estimación realizada, se determinó el tamaño de las nanopartículas sintetizadas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) utilizando un microscopio Agilent 5500 SPM (Agilent Technologies, Inc.) que funciona en modo de CA acústica y está equipado con un escáner de $9\ \mu\text{m} \times 9\ \mu\text{m}$. Las mediciones se realizaron en aire seco a temperatura ambiente utilizando sondas de silicón recubiertas en la parte posterior de aluminio (MikroMasch, HQ: NSC14 / AL BS) con un radio de punta de $8\ \text{nm}$ y una constante de resorte de $\sim 5\ \text{N/m}$. La muestra se preparó mediante deposición de la dispersión acuosa de nanopartículas de oro en una mica recién escindida y se secó en aire seco estático. La visualización de las imágenes y el análisis de la distribución del tamaño de las nanopartículas se realizó utilizando Gwyddion v2.39 (Nečas 2012).

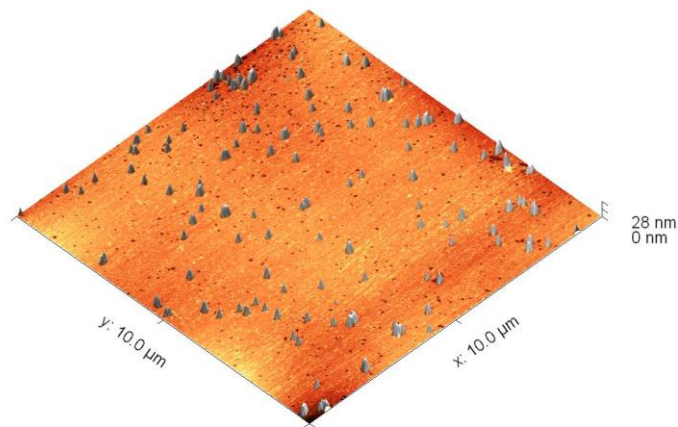


Figura 30. Imagen de AFM topográfica tridimensional de nanopartículas de oro inmovilizadas sobre mica.

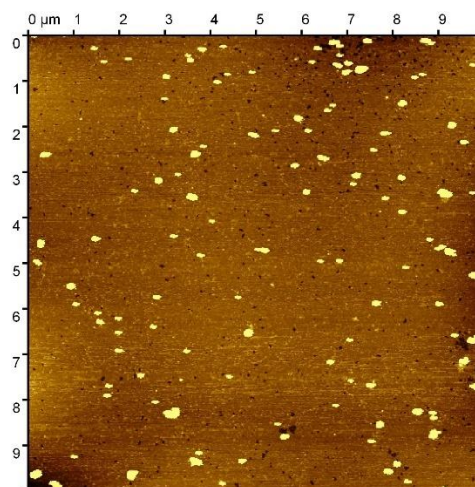


Figura 31. Imagen de AFM topográfica de nanopartículas de oro inmovilizadas sobre mica.

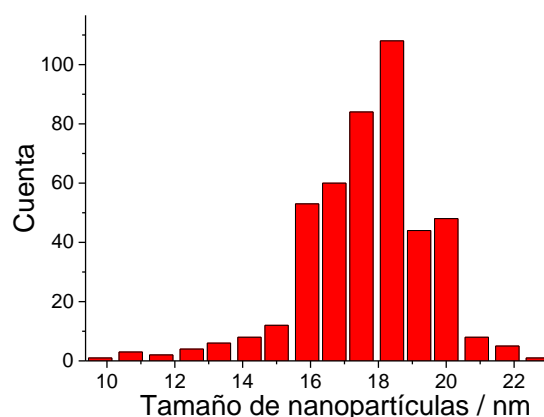


Figura 32. Histograma de altura de AFM para las nanopartículas de oro sintetizadas.

En las Figuras 30 y 31 se muestran las imágenes, tridimensional y en el plano, respectivamente, de las NPAu obtenidas. Al realizar un análisis de distribución de tamaños de las nanopartículas, se pudo determinar que el tamaño medio de las mismas es de 18 nm (Figura 32). Este tamaño, mayor que el que se estimó mediante el procedimiento anterior, fue determinado luego de la remoción del agente estabilizante mediante lavados repetidos con una gran cantidad de solvente y posterior recolección de las nanopartículas mediante centrifugación (Niu 2014).

4.1.2. Armado del inmunosensor electroquímico para la determinación de zearalenona

La construcción del inmunosensor electroquímico para la determinación de ZEA consistió, en primer lugar, en una modificación de la superficie del ET. Para ello, se agregaron 4 μ L de la dispersión de NTC, los que se secaron en una estufa a 41 °C durante 40 minutos. Los NTC son muy utilizados en el campo de los biosensores porque presentan una gran conductividad y alta actividad electrocatalítica que, sumado a su gran área superficial, permiten aumentar en forma significativa el área electroquímica del electrodo de trabajo y así obtener importantes corrientes voltamperométricas. Por otra parte, un aumento significativo del área del electrodo permite inmovilizar una mayor cantidad de anticuerpos sobre su superficie (Vidal 2013, Malhotra 2014).

A continuación, se agregaron sobre la superficie del electrodo de trabajo, modificada con la dispersión de NTC, 4 μ L de la solución de NPAu, las que también se secaron en estufa a 41 °C durante 40 minutos. Las NPAu tienen la habilidad de generar una inmovilización estable de los anticuerpos reteniendo su bioactividad.

Las NPAu tienen una alta relación superficie-volumen, alta energía superficial, la capacidad para disminuir la distancia entre proteínas y partículas metálicas, y funcionan como vías conductoras de electrones entre los grupos prostéticos y la superficie del electrodo. Esto es una gran ventaja para la preparación de biosensores (Pingarrón 2008). Existen estudios en literatura acerca de NPAu y proteínas mediante análisis de Scatchard. Para las NPAu estabilizadas con citrato, se asume que están cargadas negativamente y, las proteínas, tales como los anticuerpos, están unidas por fuerzas de atracción electrostáticas sobre la superficie de las NPAu. Por el otro lado, interacciones no electrostáticas tales como interacciones hidrofóbicas permiten trabajar con el complejo anticuerpo-NPAu en un pH cercano al punto isoeléctrico del anticuerpo. Finalmente, el peso molecular de la proteína es muy importante, es decir, para proteínas más grandes, existen un mayor número de interacciones y, así, el complejo proteína-NPAu es más estable comparado con proteínas de bajo peso molecular. Resumiendo, todas las interacciones entre las NPAu y los anticuerpos permiten la formación de un complejo estable (De Roe 1987). Además, también es posible la formación de enlaces entre grupos sulfhidrilos y las NPAu. Por otra parte, las NPAu poseen una alta conductividad eléctrica y aumentan la velocidad de transferencia electrónica mejorando la sensibilidad del ensayo electroquímico (Gopinath 2014, Warriner 2014).

Luego se agregaron 5 μ L de pAb-ZEA, en una dilución 1:80 en SAF 1 mM y se incubó durante 24 hs en cámara húmeda a 4 °C (Crowther 1995).

Posteriormente, se lavó el electrodo en SAF 1 mM para remover los anticuerpos no retenidos en la superficie y se agregaron 5 μ L de solución de BSA al 1% en SAF 1 mM. Se incubó 1 hora a 32 °C en ambiente húmedo. La BSA actúa como agente bloqueante evitando la adsorción no específica de ZEA e interferentes sobre la superficie del sensor (Gopinath 2014). Luego, se lavó el electrodo en SAF 1 mM y se adicionaron 2,5 μ L de ZEA-HRP, en una dilución 1:80 en SAF 1 mM y 2,5 μ L de una solución de ZEA en SAF 1 mM. Se incubó durante 1 hora a 32 °C en ambiente húmedo (etapa de competencia) y, posteriormente, se lavó el inmunosensor electroquímico con SAF 1 mM para retirar la ZEA-HRP y ZEA que no hayan interactuado con el anticuerpo inmovilizado. Luego se adicionó H₂O₂, el cual es consumido en parte por la enzima HRP y reducido electroquímicamente sobre la superficie del ET, en donde la corriente de reducción de H₂O₂ es proporcional a la concentración de ZEA.

A continuación, se muestra el esquema del inmunosensor (Figura 33):

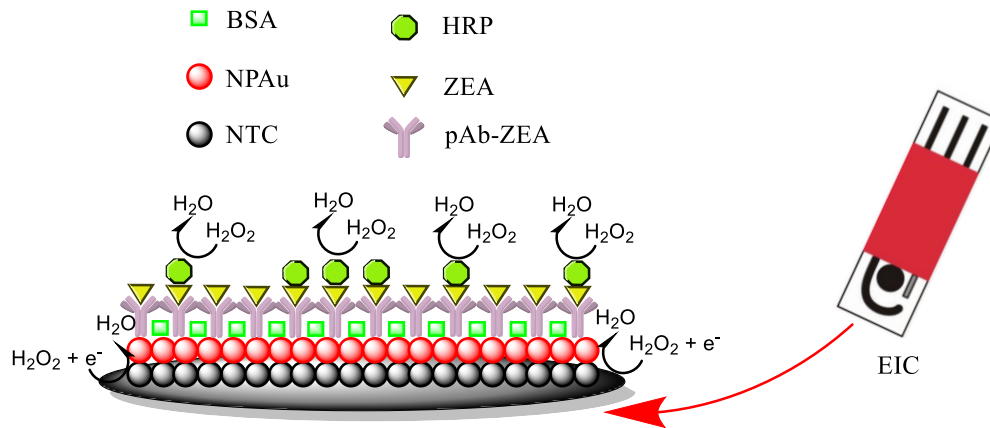


Figura 33. Esquema del inmunosensor electroquímico para la determinación de ZEA.

Inicialmente, las medidas con el inmunosensor se realizaron empleando el catecol (CAT) como mediador electroquímico. El catecol, en presencia de la HRP y H₂O₂, es oxidado mediante un ciclo catalítico formando una benzoquinona la que es reducida electroquímicamente sobre el electrodo por cronoamperometría. La oxidación del catecol por parte del H₂O₂ depende de la concentración de enzima presente en la muestra. Como la enzima se encuentra unida a ZEA (ZEA-HRP), su concentración es inversamente proporcional a la concentración de ZEA libre presente en la muestra. De esta forma, la corriente de reducción cronoamperométrica de la benzoquinona es directamente proporcional a la concentración de HRP e inversamente proporcional a la concentración de ZEA libre en la muestra.

Para ello, se trabajó con dos electrodos, los cuales fueron modificados como se indica Tabla 6, empleando el procedimiento descrito arriba:

Tabla 6. Esquema de modificación de los EIC, indicando los volúmenes de las distintas soluciones que se emplearon para modificarlos, donde a y b corresponden a dos EIC diferentes.

Electrodo	a	b
NTC	5 μL	5 μL
NPAu	5 μL	5 μL
pAb-ZEA 1:100	20 μL	NO
Leche desc. 3%	20 μL	20 μL
ZEA-HRP 1:80	10 μL	NO

Luego, a fines comparativos se tomaron voltamperogramas cíclicos en los dos electrodos modificados (uno con pAb-ZEA y ZEA-HRP presentes y otro sin ellos) y en un electrodo impreso de carbono desnudo. Para ello se empleó una solución de H₂O₂ 1 mM en SAC, pH = 5.

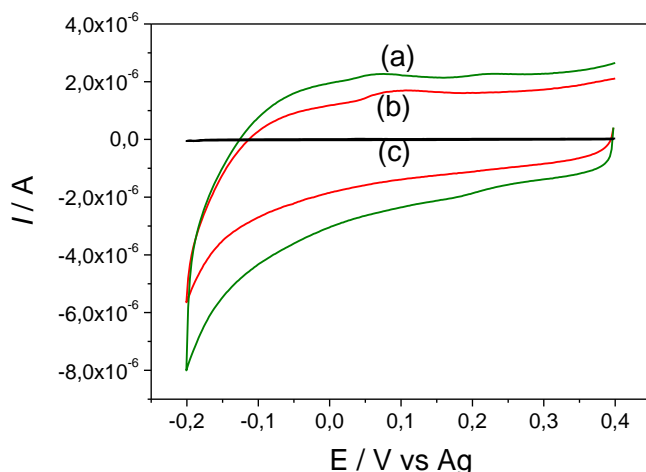


Figura 34. Voltamperograma cíclico de una solución de H_2O_2 1 mM, empleando EIC modificados con: (a) NTC+NPAu+leche, (b) NTC+NPAu+pAb-ZEA+leche+ZEA-HRP, (c) sin modificar. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

También se tomaron dos voltamperogramas cíclicos con los electrodos modificados en una solución de CAT 1 mM en SAC, pH = 5.

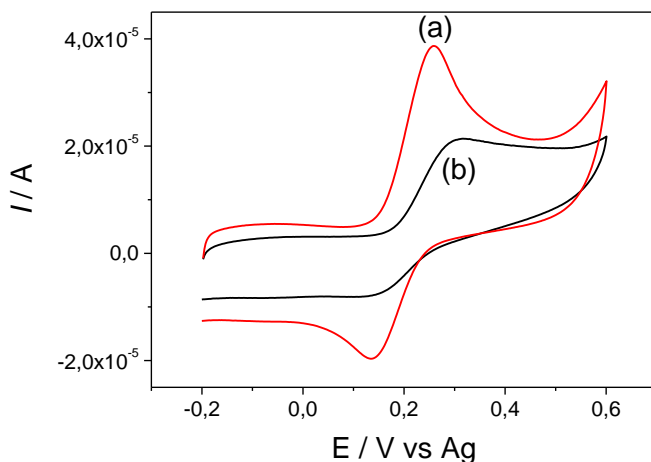


Figura 35. Voltamperograma cíclico de una solución de CAT 1 mM empleando EIC modificados con: (a) NTC+NPAu+leche, (b) NTC+NPAu+pAb-ZEA+leche+ZEA-HRP. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Como se puede ver en la Figura 34, la modificación del electrodo produce un aumento considerable de las corrientes capacitivas, debido a la dispersión de NTC. Además, el inmunosensor electroquímico mostró una gran corriente de reducción al límite catódico explorado, debido a la reducción del H_2O_2 , la cual se decidió profundizar. Por otra parte, como se ve en la Figura 35, la presencia de complejo pAb-ZEA y ZEA-HRP bloquea la superficie del electrodo y decae ligeramente la corriente capacitiva como consecuencia de

una disminución del área electroactiva, como así también una disminución en la corriente de oxidación y reducción del catecol.

4.1.3. Estudio de la actividad electrocatalítica de la dispersión de NTC hacia la reducción de H₂O₂

Se emplearon dos electrodos impresos de carbono, a los que a cada uno se los sometió a diferentes modificaciones, como describe la Tabla 7. Uno se modificó con NTC y el otro se modificó con NTC y NPAu, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Tabla 7. Esquema de modificación de los EIC, indicando los volúmenes de las distintas soluciones que se emplearon para modificarlos.

Electrodo	a	b
NTC	5 μ L	5 μ L
NPAu	0	5 μ L

Se prepararon soluciones de H₂O₂, en SAC, pH = 5, con concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 μ M.

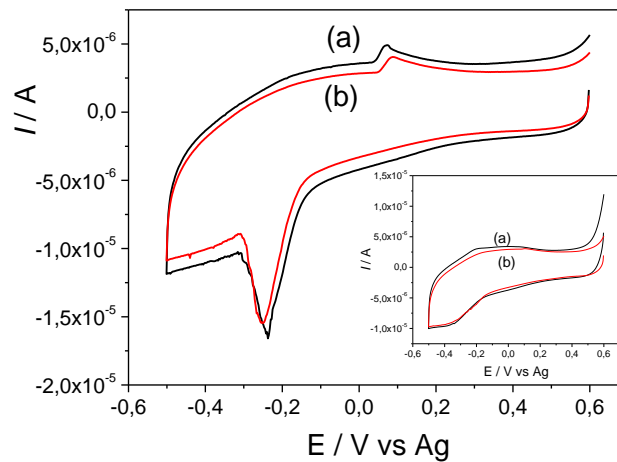


Figura 36. Voltamperogramas cíclicos utilizando EIC modificados con: (a) NTC, (b) NTC+NPAu. Solución 100 μ M de H₂O₂, SAC pH = 5. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$. Inserto: voltamperogramas cíclicos para (a) y (b) en SAC, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Como se muestra en la Figura 36, ambos voltamperogramas cíclicos presentan un pico de reducción característico de sistemas adsorbidos, indicando que la reducción de H₂O₂ se produce con una adsorción previa del mismo sobre la superficie del electrodo modificado. Por otra parte, cuando se invierte el barrido de potencial, aparece un pico de oxidación próximo a 0,1 V asignado a la oxidación de H₂O₂. Tanto el potencial de pico (E_p), centrado en -0,25 V, como los valores de corriente son similares, lo que demuestra la independancia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de la reducción de H_2O_2 hacia la presencia de las NPAu. Así, se puede afirmar que es la dispersión de NTC quien favorece la reducción electroquímica del H_2O_2 . Para potenciales más negativos se observa la descarga de PEI, la cual alcanza valores de corriente muy grandes a potenciales inferiores de $-0,4$ V. En las Figuras 37 y 38 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos con el electrodo impreso de carbono modificado con NTC y NTC+NPAu, respectivamente, para diferentes concentraciones de H_2O_2 .

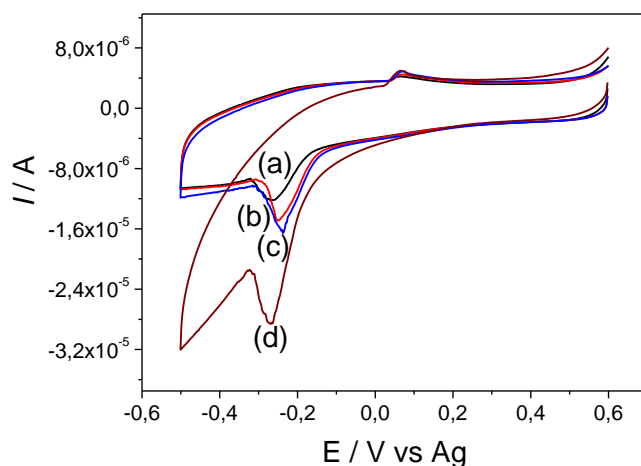


Figura 37. Voltamperogramas cíclicos empleando el EIC+NTC para concentraciones de H_2O_2 de (a) 1 μM , (b) 10 μM , (c) 100 μM , (d) 1000 μM ; SAC, pH = 5. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

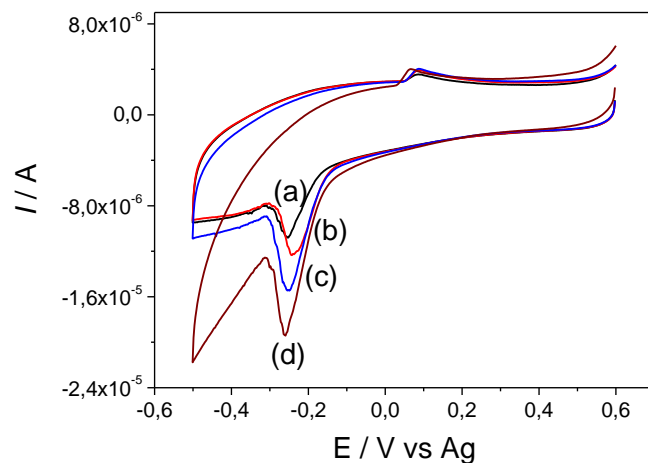


Figura 38. Voltamperogramas cíclicos empleando el EIC+NTC+NPAu para concentraciones de H_2O_2 de (a) 1 μM , (b) 10 μM , (c) 100 μM , (d) 1000 μM , SAC, pH = 5. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

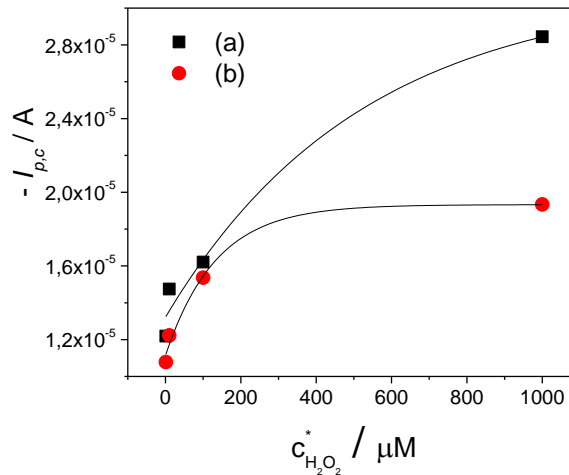


Figura 39. Corriente de pico catódica ($I_{p,c}$) en función de la concentración de H_2O_2 empleando electrodos impresos de carbono modificados con: (a) NTC, (b) NTC+NPAu.

En la Figura 39 se muestra la relación que presenta la corriente de pico catódica en función de la concentración. En el caso del EIC-NTC se observa un incremento de la $I_{p,c}$ a medida que aumenta la concentración de H_2O_2 . Para el EIC-NTC-NPAu se observa un comportamiento similar, aunque el incremento de la $I_{p,c}$ es menor cuando la concentración de H_2O_2 es superior a $100 \mu M$.

4.1.4. Optimización de las concentraciones de pAb-ZEA y ZEA-HRP por ELISA

Con la finalidad de obtener las concentraciones de pAb-ZEA y ZEA-HRP que muestren la mejor performance del inmunoensayo, se realizó un estudio colorimétrico en una placa de micro-titulación de 96 pocillos, como las empleadas en experiencias de inmunoensayos del tipo ELISA. El procedimiento realizado fue el siguiente:

Se trabajó con la mitad superior de una placa de microtitulación compuesta por 12 columnas (de 1 a 12) y 8 filas (de *a* a *h*). Se agregaron $50 \mu L$ de SAF 1 mM a cada plato. En la columna 12 se agregaron $50 \mu L$ de pAb-ZEA 1:20 en SAF 1 mM y se hicieron diluciones seriadas (es decir, diluciones de dos en dos) a lo largo de la fila. Luego se incubó toda la noche a $4^\circ C$. Se lavó tres veces con Tween 20 al 0,05% en SAF 1 mM (SAFT). Después se agregó BSA al 3% en SAF 1 mM, hasta completar cada plato ($\approx 270 \mu L$) y se incubó 1 hora a $37^\circ C$. Se enjuagó tres veces con SAFT y se agregaron a todos los platos $50 \mu L$ de BSA al 0,3% en SAF 1 mM. A continuación, se agregó a la fila A $50 \mu L$ de ZEA-HRP 1:20 en SAF 1 mM y se hicieron diluciones seriadas desde la fila A hasta la fila D y se incubó 1 hora a $37^\circ C$. Después de la incubación los pocillos se lavaron tres veces con SAFT y se reveló la placa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

con el reactivo orto-fenilendiamina (OPD) en SAC, pH = 5. El H₂O₂, en presencia de HRP es reducido mientras que la enzima cambia su estado de oxidación a un estado rédox superior. Para volver a su estado nativo, HRP es reducida mediante la oxidación de OPD. Así, OPD, que es incolora, en su forma oxidada cambia a un color amarillo-anaranjado. A los 10 minutos se agregaron 50 µL de H₂SO₄ 1 M para detener la reacción enzimática y así también detener la generación de color (Crowther 1995). Se pudo apreciar cómo varía el color de acuerdo a la concentración de pAb-ZEA y ZEA-HRP (Figura 40).

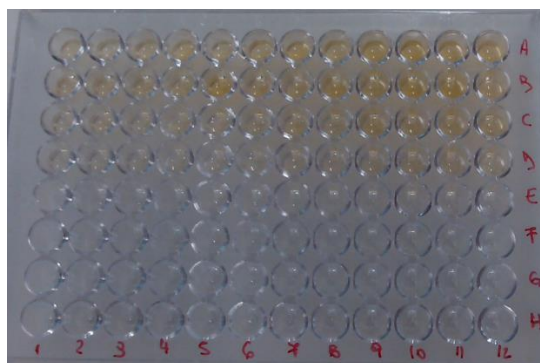


Figura 40. Placa de ELISA obtenida para la optimización de las concentraciones de pAb-ZEA y ZEA-HRP.

La reacción de formación del complejo antígeno-anticuerpo es una reacción que está gobernada por la ley de acción de masas. Es decir, para una concentración constante de anticuerpo, mientras más elevada sea la concentración de antígeno conjugado comparada a la concentración del analito, mayor será la formación del complejo anticuerpo-antígeno conjugado y menor la del complejo anticuerpo-antígeno. Por otro lado, si la concentración de antígeno conjugado es pequeña, se formará una pequeña cantidad de complejo anticuerpo-antígeno conjugado en comparación al complejo anticuerpo-antígeno, aún para pequeñas concentraciones de este último. Esto quiere decir que, en los extremos de altas y bajas concentraciones de antígeno conjugado, habrá una gran señal para el primer caso y una mínima señal para el segundo caso, no existiendo una competencia real con el analito. A fin de obtener una buena sensibilidad y un intervalo de concentraciones de trabajo considerable, se elige trabajar con concentraciones de antígeno marcado que arrojen una respuesta del 50 % del valor de la máxima respuesta, lo que equivale a decir, con una buena aproximación, que se corresponde a la concentración de antígeno libre encontrada cuando hay un 50 % de sitios de unión ocupados. Así, el 50 % de señal en un ensayo competitivo indica el intervalo donde el ensayo opera con una buena sensibilidad. Del análisis de la placa de ELISA resulta que las diluciones óptimas para trabajar fueron las siguientes:

ZEA-HRP = 1:80 – 1:160

pAb-ZEA = 1:80 – 1:160 – 1:320 – 1:640 – 1:1280

Estas concentraciones fueron llevadas al armado del inmunosensor electroquímico. Para poder determinar cuáles concentraciones de pAb-ZEA y ZEA-HRP utilizar en el armado del inmunosensor electroquímico, se tuvo que determinar qué par redox medir (por ejemplo, la reducción de benzoquinona generada enzimáticamente a partir de catecol, o la reducción del H₂O₂ que queda sin reaccionar con la enzima HRP).

4.1.5. Elección del par redox

Para medir el evento de la formación del inmunocomplejo entre pAb-ZEA y ZEA-HRP se plantearon dos alternativas. La primera, como se mencionó anteriormente, consiste en la reducción de la benzoquinona generada a partir de la participación del catecol como co-sustrato en el ciclo catalítico de la HRP en presencia de H₂O₂. Por otra parte, también se pensó la posibilidad de medir el consumo del H₂O₂ por la enzima HRP, la cual está formando parte del inmunocomplejo pAb-ZEA y ZEA-HRP, dado que la superficie mostró un potencial adecuado (bajo potencial catódico) para reducir el H₂O₂. Así, en primer lugar se estudió el comportamiento de la oxidación del catecol. Como se mostró en la Figura 35, la oxidación electroquímica de PC sobre el electrodo modificado tiene el aspecto de un proceso cuasi-reversible, característico de este tipo de compuestos. Así, primero se realizaron voltamperogramas cíclicos empleando los electrodos en sus distintas etapas de modificación, como así también sin modificar, para una concentración de catecol de 100 μM (Figura 41). Tal valor de concentración utilizado es debido a que a la hora de realizar la determinación de ZEA empleando el inmunoensayo, se debe trabajar a bajas concentraciones del co-sustrato para poder diferenciar pequeños cambios en la respuesta para pequeñas variaciones de la concentración de ZEA.

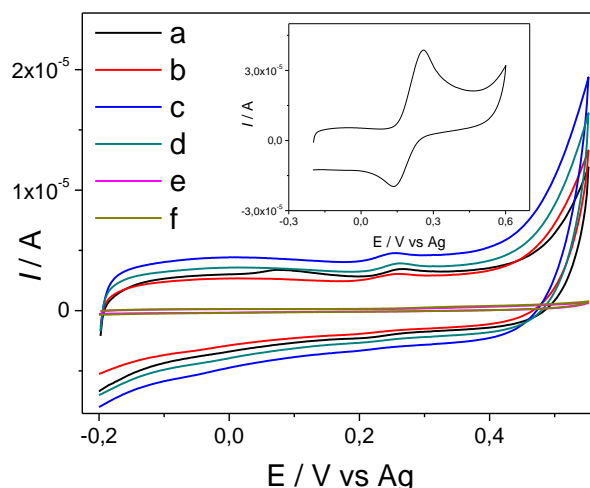


Figura 41. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para una solución de CAT 100 μM , SAC, pH = 5, empleando: (a y b) EIC+NTC, (c y d) EIC+NTC+NPAu, (e y f) EIC. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Inseto: voltamperograma cíclico para CAT 1 mM, SAC, pH = 5, empleando EIC+NTC+NPAu.

Así, aparece un pequeño pico de oxidación centrado en 0,28 V mientras que su correspondiente pico de reducción no se ve claramente (Figura 41).

Por otra parte, cuando se realiza un voltamperograma cíclico usando el electrodo modificado con NTC+NPAu en una solución compuesta por CAT 100 μM y H_2O_2 100 μM , todas ellas en SAC, pH = 5, se puede ver el mismo comportamiento para el CAT y que comienza a definirse, en el límite catódico de potencial aplicado, la reducción de H_2O_2 (Figura 42) Figura 42.

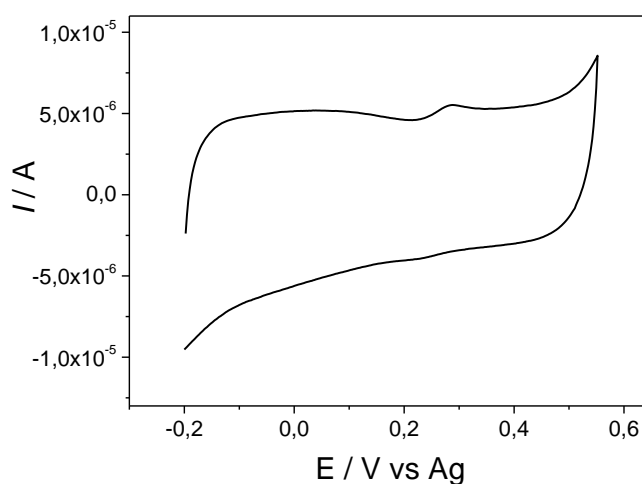


Figura 42. Voltamperograma cíclico obtenido empleando un EIC modificado con NTC+NPAu para una solución de CAT 100 μM + H_2O_2 100 μM , SAC, pH = 5. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Del análisis de los voltamperogramas cíclicos se determinó que el potencial óptimo para trabajar está comprendido entre 0,05 V y 0,1 V, optándose por elegir un potencial de 0,1 V. Potenciales menos anódicos no se aplicaron porque puede interferir la reducción de H₂O₂, más aún teniendo en cuenta que se preparan varios inmunosensores electroquímicos, en donde los electrodos de referencia de los EIC son en realidad de pseudo-referencia. Es bien sabido que estos electrodos presentan varias desventajas. Por un lado, la falta de un equilibrio termodinámico impide calcular su potencial y, por el otro, debido a que son electrodos no idealmente no polarizables, se produce un corrimiento de su potencial durante las mediciones que depende de la densidad de corriente aplicada (Inzelt 2013).

4.1.6. Optimización de la concentración de pAb-ZEA y ZEA-HRP

En función de los resultados obtenidos en la optimización de las concentraciones de pAb-ZEA y ZEA-HRP por ensayos ELISA en placa, se realizó la optimización de ambas concentraciones usando el inmunosensor electroquímico. Así, se modificaron nueve electrodos de la siguiente forma:

A cada ET de los EIC se le agregaron 5 µL de la dispersión de NTC y se dejó en estufa 40 minutos a 35 °C. A continuación, el ET se modificó con 5 µL de NPAu y se dejó en estufa bajo las mismas condiciones que los NTC. Luego se agregaron a cada ET 20 µL de la dilución de pAb-ZEA que se detalla en la Tabla 6, y se incubó un día en cámara húmeda a 4 °C. Finalizada la incubación se enjuagaron los electrodos en SAF 1 mM y se les agregaron 20 µL de leche descremada al 3% en SAF 1 mM y se incubaron 30 minutos a 35 °C. Posteriormente, se enjuagaron los electrodos con SAF 1 mM y se les agregaron 10 µL de una dilución de ZEA-HRP + ZEA en SAF 1 mM de las concentraciones que se detallan en la Tabla 8, y se incubaron 1 hora en ambiente húmedo a 35 °C. Finalmente se enjuagó con SAF 1 mM.

Tabla 8. Esquema de modificación de los EIC+NTC+NPAu, indicando las diluciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA utilizadas en cada uno de ellos.

Electrodo	a	b	c	d	e	g	h	i	k
pAb-ZEA	1:80	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160	1:320	1:320	1:320
ZEA-HRP	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
ZEA (ng mL ⁻¹)	10	50	100	10	50	100	10	50	100

Se realizó una cronoamperometría (CA) empleando una solución de CAT 100 µM en SAC, pH = 5. Los parámetros de la CA fueron:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Potencial aplicado (E_{apl}) = 100 mV, t = 300 s.

El volumen de CAT, de concentración 100 μ M, agregado al inmunosensor fue de 30 μ L. Una vez comenzada la cronoamperometría, a un t = 200 s se agregaron al inmunosensor 5 μ L de H₂O₂ 700 μ M en SAC, pH = 5, y se registró la corriente observada cada 10 segundos.

Luego se repitió el armado de los inmunosensores de la misma forma, pero cambiando la dilución de ZEA-HRP, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Esquema de modificación de los EIC+NTC+NPAu, indicando las diluciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA utilizadas en cada uno de ellos.

Electrodo	a	b	c	d	e	g	h	i	k
pAb-ZEA	1:80	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160	1:320	1:320	1:320
ZEA-HRP	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
ZEA (ng/mL)	10	50	100	10	50	100	10	50	100

Los valores de corriente observados a un tiempo t se presentan en las Tablas 10 y 11:

Tabla 10. Valores de I_{ee} observados en los EIC modificados según se indica en la Tabla 8.

t / s	pAb-ZEA 1:80	pAb-ZEA 1:80	pAb-ZEA 1:80	pAb-ZEA 1:160	pAb-ZEA 1:160	pAb-ZEA 1:160	pAb-ZEA 1:320	pAb-ZEA 1:320	pAb-ZEA 1:320
	ZEA-HRP 1:160	ZEA-HRP 1:160	ZEA-HRP 1:160	ZEA-HRP 1:160	ZEA-HRP 1:160	ZEA-HRP 1:160	ZEA-HRP 1:160	ZEA-HRP 1:160	ZEA-HRP 1:160
	ZEA 10 ng/mL	ZEA 50 ng/mL	ZEA 100 ng/mL	ZEA 10 ng/mL	ZEA 50 ng/mL	ZEA 100 ng/mL	ZEA 10 ng/mL	ZEA 50 ng/mL	ZEA 100 ng/mL
	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A
10	2,44X10 ⁻⁸	2,80X10 ⁻⁸	1,38X10 ⁻⁸	1,90X10 ⁻⁸	1,11X10 ⁻⁸	1,32X10 ⁻⁸	2,02X10 ⁻⁸	2,26X10 ⁻⁸	9,07X10 ⁻⁹
20	3,13X10 ⁻⁸	2,30X10 ⁻⁸	8,87X10 ⁻⁹	1,48X10 ⁻⁸	7,79X10 ⁻⁹	1,24X10 ⁻⁸	1,69X10 ⁻⁸	1,98X10 ⁻⁸	7,47X10 ⁻⁹
30	2,27X10 ⁻⁸	1,68X10 ⁻⁸	6,97X10 ⁻⁹	1,17X10 ⁻⁸	7,79X10 ⁻⁹	1,14X10 ⁻⁸	1,51X10 ⁻⁸	1,84X10 ⁻⁸	6,94X10 ⁻⁹
40	2,07X10 ⁻⁸	1,47X10 ⁻⁸	6,02X10 ⁻⁹	9,16X10 ⁻⁹	5,54X10 ⁻⁹	1,09X10 ⁻⁸	1,41X10 ⁻⁸	1,74X10 ⁻⁸	6,67X10 ⁻⁹
50	1,85X10 ⁻⁸	1,36X10 ⁻⁸	5,55X10 ⁻⁹	7,35X10 ⁻⁹	5,54X10 ⁻⁹	1,02X10 ⁻⁸	1,35X10 ⁻⁸	1,66X10 ⁻⁸	6,67X10 ⁻⁹
60	1,70X10 ⁻⁸	1,11X10 ⁻⁸	4,60X10 ⁻⁹	6,25X10 ⁻⁹	4,78X10 ⁻⁹	9,16X10 ⁻⁹	1,33X10 ⁻⁸	1,60X10 ⁻⁸	6,94X10 ⁻⁹
70	1,57X10 ⁻⁸	8,99X10 ⁻⁹	4,12X10 ⁻⁹	4,98X10 ⁻⁹	4,03X10 ⁻⁹	8,16X10 ⁻⁹	1,26X10 ⁻⁸	1,54X10 ⁻⁸	7,07X10 ⁻⁹
80	1,47X10 ⁻⁸	7,10X10 ⁻⁹	4,12X10 ⁻⁹	3,71X10 ⁻⁹	3,78X10 ⁻⁹	7,41X10 ⁻⁹	1,22X10 ⁻⁸	1,50X10 ⁻⁸	7,47X10 ⁻⁹
90	1,47X10 ⁻⁸	6,38X10 ⁻⁹	3,88X10 ⁻⁹	2,62X10 ⁻⁹	2,53X10 ⁻⁹	6,66X10 ⁻⁹	1,13X10 ⁻⁸	1,48X10 ⁻⁸	7,47X10 ⁻⁹
100	1,24X10 ⁻⁸	4,96X10 ⁻⁹	3,88X10 ⁻⁹		1,77X10 ⁻⁹	6,15X10 ⁻⁹	1,11X10 ⁻⁸	1,42X10 ⁻⁸	7,87X10 ⁻⁹
	1° MEJOR RESPUESTA			3° MEJOR RESPUESTA			2° MEJOR RESPUESTA		

Tabla 11. Valores de I_{ee} observados en los EIC modificados según se indica en la Tabla 9.

t / s	pAb-ZEA 1:80	pAb-ZEA 1:80	pAb-ZEA 1:80	pAb-ZEA 1:160	pAb-ZEA 1:160	pAb-ZEA 1:160	pAb-ZEA 1:320	pAb-ZEA 1:320	pAb-ZEA 1:320
	ZEA-HRP 1:80	ZEA-HRP 1:80	ZEA-HRP 1:80	ZEA-HRP 1:80	ZEA-HRP 1:80	ZEA-HRP 1:80	ZEA-HRP 1:80	ZEA-HRP 1:80	ZEA-HRP 1:80
	ZEA 10 ng/mL	ZEA 50 ng/mL	ZEA 100 ng/mL	ZEA 10 ng/mL	ZEA 50 ng/mL	ZEA 100 ng/mL	ZEA 10 ng/mL	ZEA 50 ng/mL	ZEA 100 ng/mL
	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A	-I / A
10	1,88X10 ⁻⁸	2,83X10 ⁻⁸	2,05X10 ⁻⁸	1,62X10 ⁻⁸	2,80X10 ⁻⁸	2,43X10 ⁻⁸	1,72X10 ⁻⁸	2,04X10 ⁻⁸	2,89X10 ⁻⁸
20	1,54X10 ⁻⁸	2,40X10 ⁻⁸	1,38X10 ⁻⁸	1,40X10 ⁻⁸	2,38X10 ⁻⁸	2,09X10 ⁻⁸	1,55X10 ⁻⁸	1,78X10 ⁻⁸	2,54X10 ⁻⁸
30	1,42X10 ⁻⁸	2,13X10 ⁻⁸	1,23X10 ⁻⁸	1,23X10 ⁻⁸	1,99X10 ⁻⁸	1,90X10 ⁻⁸	1,46X10 ⁻⁸	1,67X10 ⁻⁸	2,36X10 ⁻⁸
40	1,35X10 ⁻⁸	1,90X10 ⁻⁸	1,11X10 ⁻⁸	1,13X10 ⁻⁸	1,68X10 ⁻⁸	1,73X10 ⁻⁸	1,39X10 ⁻⁸	1,58X10 ⁻⁸	2,27X10 ⁻⁸
50	1,27X10 ⁻⁸	1,70X10 ⁻⁸	1,11X10 ⁻⁸	9,81X10 ⁻⁹	1,44X10 ⁻⁸	1,64X10 ⁻⁸	1,32X10 ⁻⁸	1,51X10 ⁻⁸	2,15X10 ⁻⁸
60	1,22X10 ⁻⁸	1,58X10 ⁻⁸	1,07X10 ⁻⁸	8,75X10 ⁻⁹	1,21X10 ⁻⁸	1,54X10 ⁻⁸	1,30X10 ⁻⁸	1,41X10 ⁻⁸	2,06X10 ⁻⁸
70	1,21X10 ⁻⁸	1,47X10 ⁻⁸	1,07X10 ⁻⁸	7,90X10 ⁻⁹	1,04X10 ⁻⁸	1,45X10 ⁻⁸	1,28X10 ⁻⁸	1,35X10 ⁻⁸	1,97X10 ⁻⁸
80	1,18X10 ⁻⁸	1,31X10 ⁻⁸	1,07X10 ⁻⁸	7,04X10 ⁻⁹	8,66X10 ⁻⁹	1,35X10 ⁻⁸	1,28X10 ⁻⁸	1,28X10 ⁻⁸	1,90X10 ⁻⁸
90	1,13X10 ⁻⁸	1,19X10 ⁻⁸	1,07X10 ⁻⁸	6,41X10 ⁻⁹	7,18X10 ⁻⁹	1,26X10 ⁻⁸	1,25X10 ⁻⁸	1,18X10 ⁻⁸	1,85X10 ⁻⁸
100	1,11X10 ⁻⁸	1,12X10 ⁻⁸	1,07X10 ⁻⁸	5,98X10 ⁻⁹	6,11X10 ⁻⁹	1,15X10 ⁻⁸	1,21X10 ⁻⁸	1,09X10 ⁻⁸	1,80X10 ⁻⁸

La fila resaltada de color amarillo corresponde a los valores de I observados 50 s después de la adición de H₂O₂ para los diferentes inmunosensores y, la fila resaltada de color rojo, corresponde a los valores observados 90 s después de la inyección. La relación entre la corriente I y la concentración de ZEA es inversamente proporcional, característica de un inmunoensayo competitivo directo con antígeno marcado. A un tiempo de 90 s se obtuvo una corriente de estado estacionario mejor definida, por lo que se utilizaron esos valores para optimizar las diluciones. Se puede observar que para una dilución de ZEA-HRP 1:160 se producen mayores variaciones de I_{ee} para diferentes concentraciones de ZEA que cuando se empleó una dilución de ZEA-HRP 1:80. Para esa dilución de ZEA-HRP, los mayores intervalos de I_{ee} para las tres concentraciones de ZEA libre se observaron para la dilución de pAb-ZEA 1:80. Así, las diluciones óptimas fueron:

pAb-ZEA: 1:80

ZEA-HRP: 1:160

4.1.7. Optimización de las concentraciones de CAT y H₂O₂

Se modificaron ocho electrodos siguiendo el procedimiento descrito en el paso anterior. Las concentraciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA fueron 1:80, 1:160 y 10 ng mL⁻¹, respectivamente. La CA se realizó en las mismas condiciones a las mencionadas anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones de las soluciones de CAT y H_2O_2 utilizadas con cada electrodo se prepararon en SAC, $\text{pH} = 5$ y sus concentraciones se muestran en la Tabla 12:

Tabla 12. Concentraciones finales de las soluciones de CAT y H_2O_2 empleadas en cada electrodo.

Electrodo	CAT	H_2O_2
a	1 μM	100 μM
b	10 μM	100 μM
c	100 μM	100 μM
d	1 mM	100 μM
e	100 μM	1 μM
g	100 μM	10 μM
h	100 μM	100 μM
i	100 μM	1 mM

Los cronoamperogramas obtenidos se muestran en las Figuras 43 y 44.

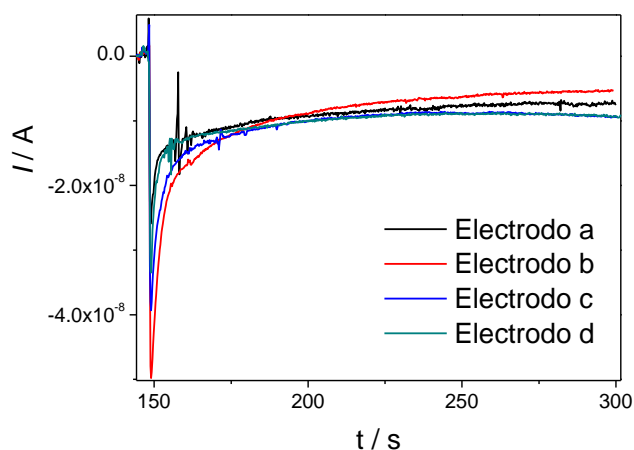


Figura 43. Cronoamperogramas obtenidos empleando los inmunosensores electroquímicos para concentraciones de CAT de: electrodo a) 1 μM , electrodo b) 10 μM , electrodo c) 100 μM , electrodo d) 1 mM. Concentración de H_2O_2 100 μM .

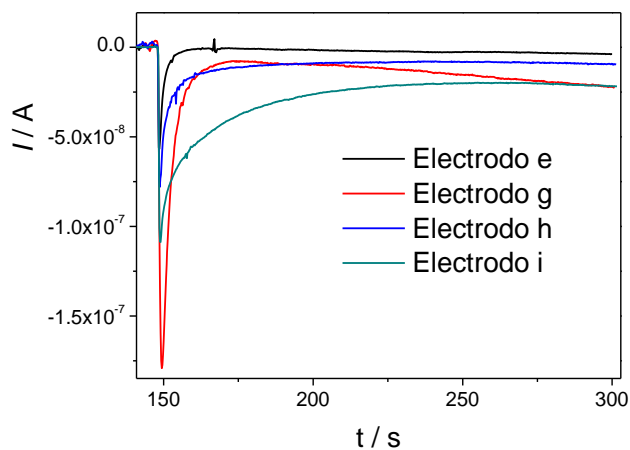


Figura 44. Cronoamperogramas obtenidos empleando los inmunosensores electroquímicos para concentraciones de H_2O_2 de: electrodo e) 1 μM , electrodo g) 10 μM , electrodo h) 100 μM y electrodo i) 1 mM. Concentración de CAT 100 μM .

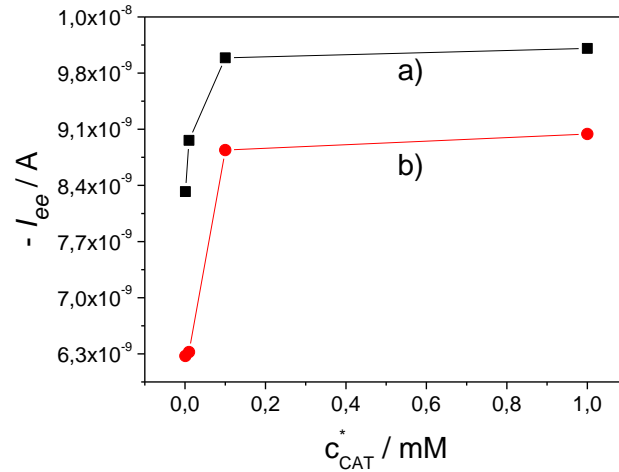


Figura 45. Variación de I_{ee} con la concentración de CAT, tras añadir H_2O_2 100 μM . Tiempo: a) 50 s, b) 100 s.

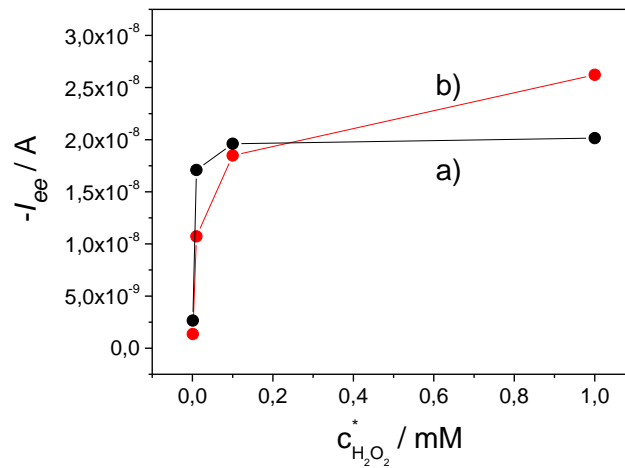


Figura 46. Variación de I_{ee} con la concentración de H_2O_2 para una concentración de CAT = 100 μM . Tiempo: a) 50 s, b) 100 s.

A partir de estos resultados, se eligió continuar trabajando con las concentraciones de CAT = 1 mM y H_2O_2 = 1 mM, ya que arrojaron los valores máximos de corriente.

4.1.8. Optimización del volumen de la celda

La corriente obtenida es proporcional a la concentración de benzoquinona (BQ) generada en el ciclo enzimático. Así, para una cantidad constante de BQ generada, si el volumen es menor, la concentración aumentará. Para optimizar el volumen de trabajo y ver cuál es el volumen mínimo operable, se modificaron cinco EIC. Se agregaron a cada ET de los EIC 5 μL de la dispersión de NTC y se dejaron en estufa 40 minutos a 38 $^\circ\text{C}$. A continuación, se agregaron 5 μL de NP Au y se secaron en estufa bajo las mismas condiciones que los NTC. Luego se agregaron 20 μL de pAb-ZEA 1:80 y se incubaron un día en cámara

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

húmeda a 4 °C. Finalizada la incubación, se enjuagaron los electrodos en SAF 1 mM y se les agregaron 20 μL de leche descremada al 3%, en SAF 1 mM, y se incubaron 30 minutos a 35 °C. Posteriormente se enjuagaron los electrodos con SAF 1 mM y se les agregaron 10 μL de una dilución de ZEA-HRP 1:160 + ZEA 10 ng mL^{-1} , en SAF 1 mM, y se incubaron 1 hora en ambiente húmedo a 35 °C y, finalmente, se enjuagaron con SAF 1 mM.

Se realizó una CA a una solución de CAT 1 mM en SAF bajo las condiciones optimizadas hasta el momento. A un tiempo de 150 s se agregó al inmunosensor H_2O_2 para dar una concentración final de 0,86 mM para ambos reactivos (Tabla 13). La Figura 47 muestra los correspondientes cronoamperogramas obtenidos.

Tabla 13. Volúmenes de celda empleados con cada inmunosensor electroquímico.

Electrodo	V CAT (μL)	V H_2O_2 (μL)	V Final (μL)
a	30	5	35
b	25,7	4,3	30
c	21,4	3,6	25
d	17,1	2,9	20

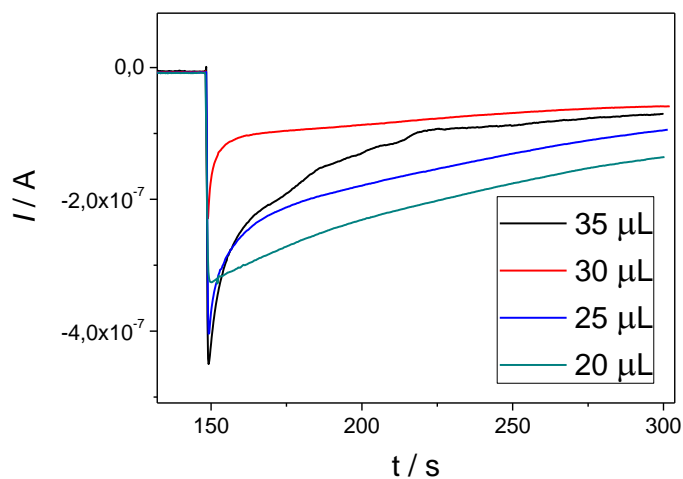


Figura 47. Cronoamperogramas obtenidos con el inmunosensor electroquímico para diferentes volúmenes de la celda. $c_{\text{CAT}} = 1 \text{ mM}$ y $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \text{ mM}$.

En la Figura 48 se muestra la I_{ee} en función del volumen de solución de CAT+ H_2O_2 . El volumen óptimo de solución es de 20 μL . Cabe aclarar que no se estudiaron volúmenes menores porque ya no se alcanzan a cubrir correctamente los tres electrodos del EIC.

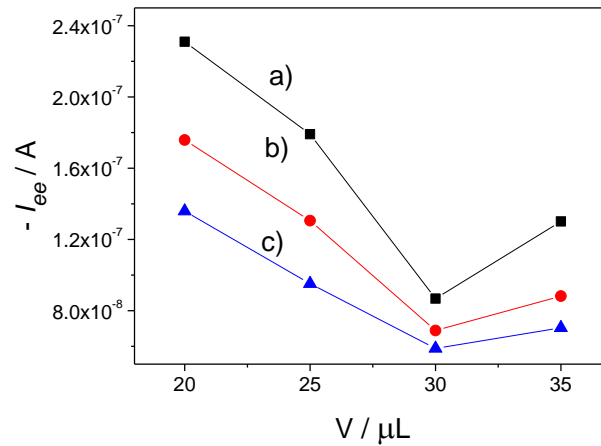


Figura 48. Variación de la I_{ee} en función del volumen de celda a diferentes tiempos de lectura: a) 50 s, b) 100 s, c) 150 s.

4.1.9. Estudio del inmunosensor mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)

Se realizó un estudio de las diferentes etapas de modificación del inmunosensor electroquímico mediante EIE, para corroborar las hipótesis planteadas acerca de las diferentes etapas de armado del inmunosensor. Para ello, se construyó un inmunosensor utilizando el procedimiento anterior.

Cada etapa de modificación del electrodo fue analizada mediante EIE. Para ello, se utilizó una solución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mM, en KCl 0,1 M.

Mediante voltamperometría cíclica se determinó el potencial de media onda ($E_{1/2}$) del par redox mencionada anteriormente y, luego, se realizaron las medidas de impedancia a este potencial.

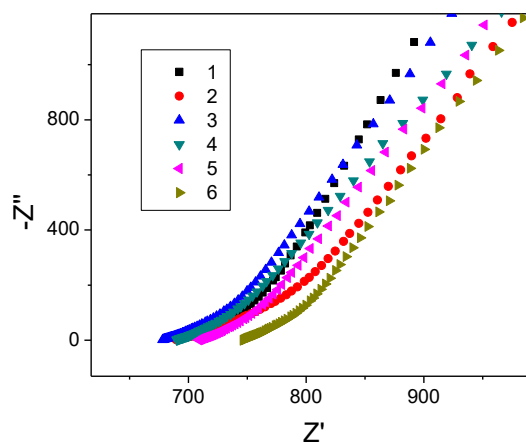


Figura 49. Gráfico de Nyquist de las diferentes etapas de construcción del inmunosensor: 1) EIC desnudo, 2) EIC-NTC, 3) EIC-NTC-NPAu, 4) EIC-NTC-NPAu-pAbZEA, 5) EIC-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA y 6) EIC-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA-ZEA-HRP. Intervalo de frecuencia mostrado comprendido entre 10 kHz y 6 Hz.

El mismo estudio fue realizado utilizando un electrodo de carbono vítreo (ECV), modificando su superficie de la misma manera en que se armó el inmunosensor sobre el EIC.

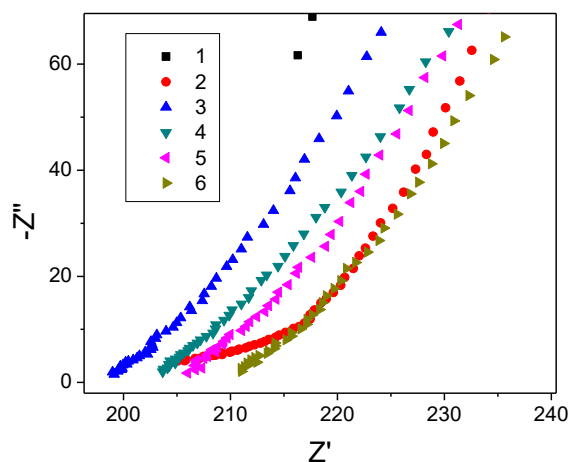


Figura 50. Gráfico de Nyquist de las diferentes etapas de construcción del inmunosensor: 1) ECV desnudo, 2) ECV-NTC, 3) ECV-NTC-NPAu, 4) ECV-NTC-NPAu-pAbZEA, 5) ECV-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA y 6) ECV-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA-ZEA-HRP.

Se puede apreciar en los gráficos de Nyquist mostrados que no se observa el característico semicírculo indicando el grado de resistencia a la transferencia de carga por modificaciones en la superficie. Tal comportamiento fue visto también en la literatura en el empleo de electrodos de carbono vítreo, de grafito y de pasta de carbono modificados con nanoestructuras de carbono (Rezaei 2011, Oliveira 2013, Tsierkezos 2015). La ausencia de un semicírculo completo en el plano de impedancia complejo ha sido atribuida a una alta conductividad iónica en la interface electrodo/electrolito (Tsierkezos 2015). Por lo tanto, se procedió a realizar una comparación entre los valores obtenidos a frecuencias más grandes (valores más pequeños de Z' y Z'') obtenidos en cada etapa de construcción de los inmunosensores empleando ambos electrodos (Figura 51).

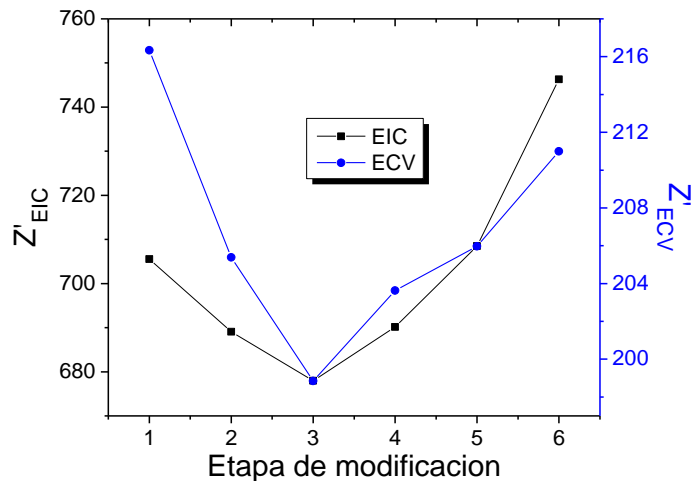


Figura 51. Gráfico del valor mínimo de la componente real de la impedancia obtenido para cada etapa de modificación de los inmunosensores. En negro: EIC. En azul: ECV. Etapas de modificación: 1) Electrodo desnudo, 2) EL.-NTC, 3) EL.-NTC-NPAu, 4) EL.-NTC-NPAu-pAbZEA, 5) EL.-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA, 6) EL.-NTC-NPAu-pAbZEA-BSA-ZEA-HRP.

Del análisis de la figura anterior se observa cómo los valores de Z' registrados para el inmunosensor construido sobre el electrodo de carbono vítreo fueron sensiblemente menores, debido a la mayor conductividad de este electrodo frente a un electrodo impreso de carbono.

Para ambos electrodos se observó un comportamiento similar de los cambios de Z' tras cada etapa de modificación. Al depositar la dispersión de NTC sobre la superficie de los electrodos se produce un aumento de conductividad y por ende Z' disminuye. Al depositar las NPAu la superficie se vuelve aún más conductora y Z' alcanza su valor mínimo. Las últimas tres etapas consisten en depositar diferentes proteínas sobre la superficie de los electrodos: pAb-ZEA, BSA y ZEA-HRP. Debido a la naturaleza no conductora de las mismas es de esperar que Z' vaya aumentando tras cada deposición de las mismas.

4.1.10. Caracterización de la superficie nanoestructurada por SEM

Se caracterizó la superficie nanoestructurada que se empleó en la construcción del inmunosensor electroquímico mediante micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figuras 52-54). Para obtener una mejor resolución de las micrografías se realizó un metalizado de las muestras.

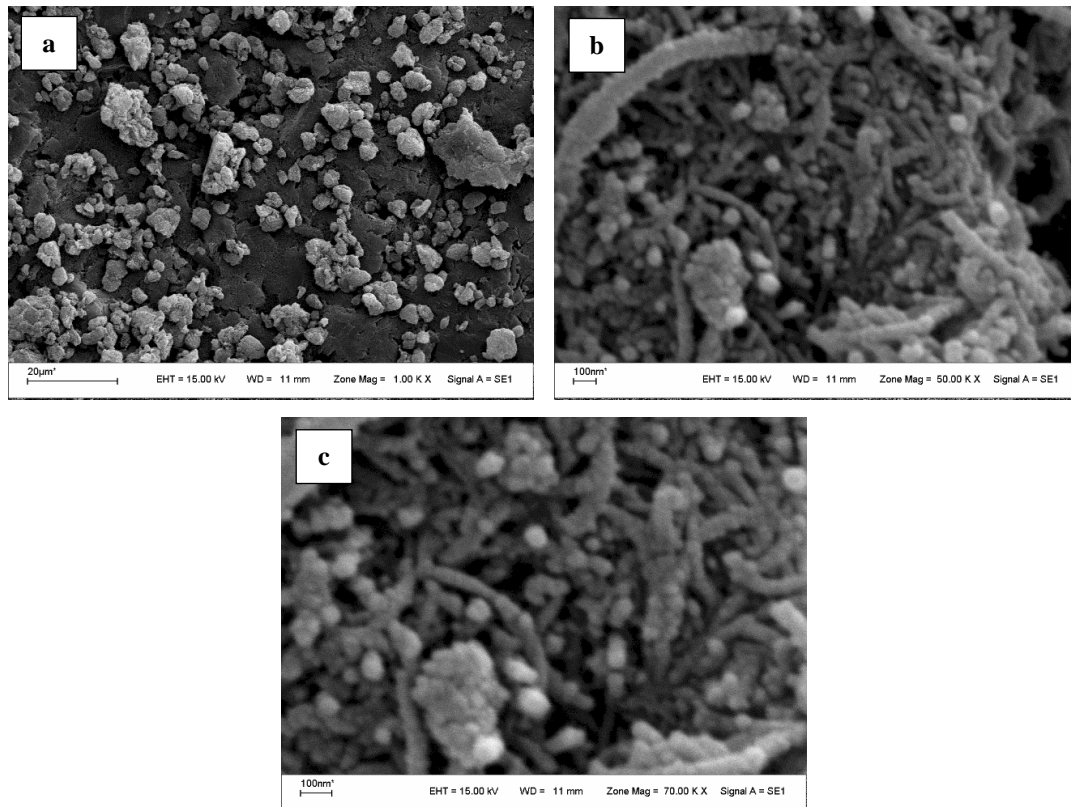


Figura 52. Micrografías del electrodo impreso de carbono modificado con NTC. Las imágenes poseen los siguientes aumentos: a): 1K x; b): 50K x; c): 70K x.

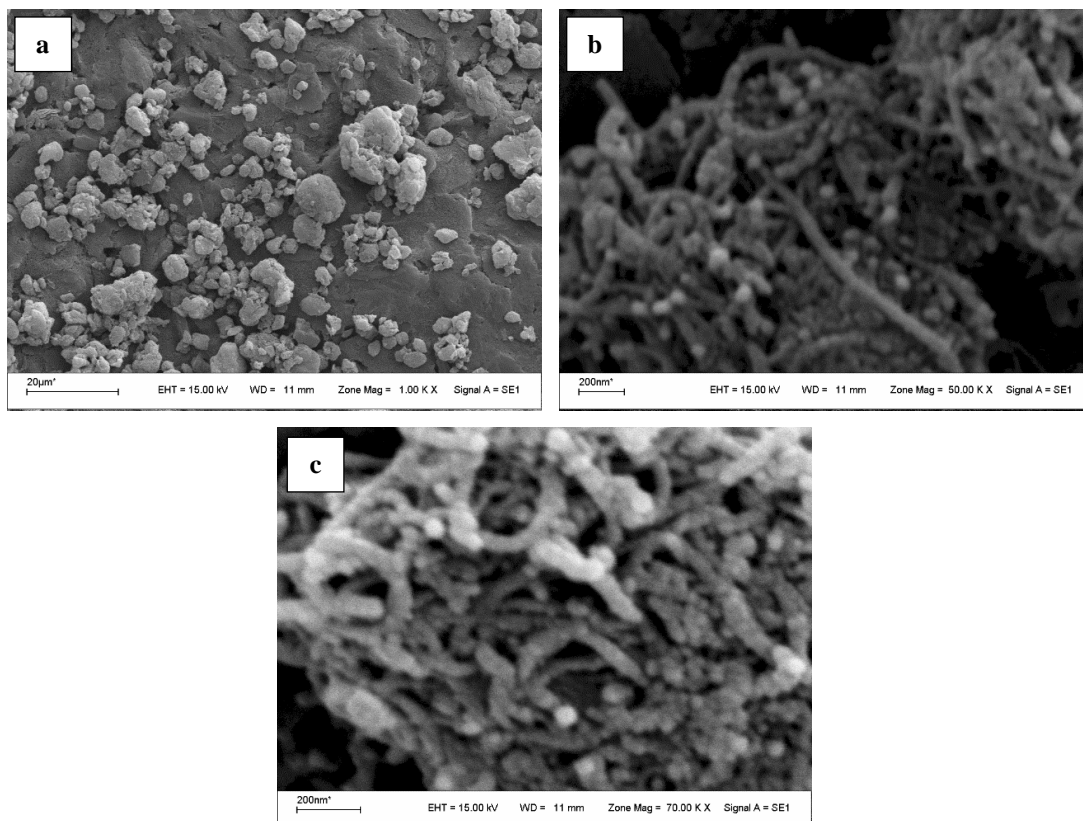


Figura 53. Micrografías del electrodo impreso de carbono modificado con NTC-NPAu. Las imágenes poseen los siguientes aumentos: a): 1K x; b): 50K x; c): 70K x.

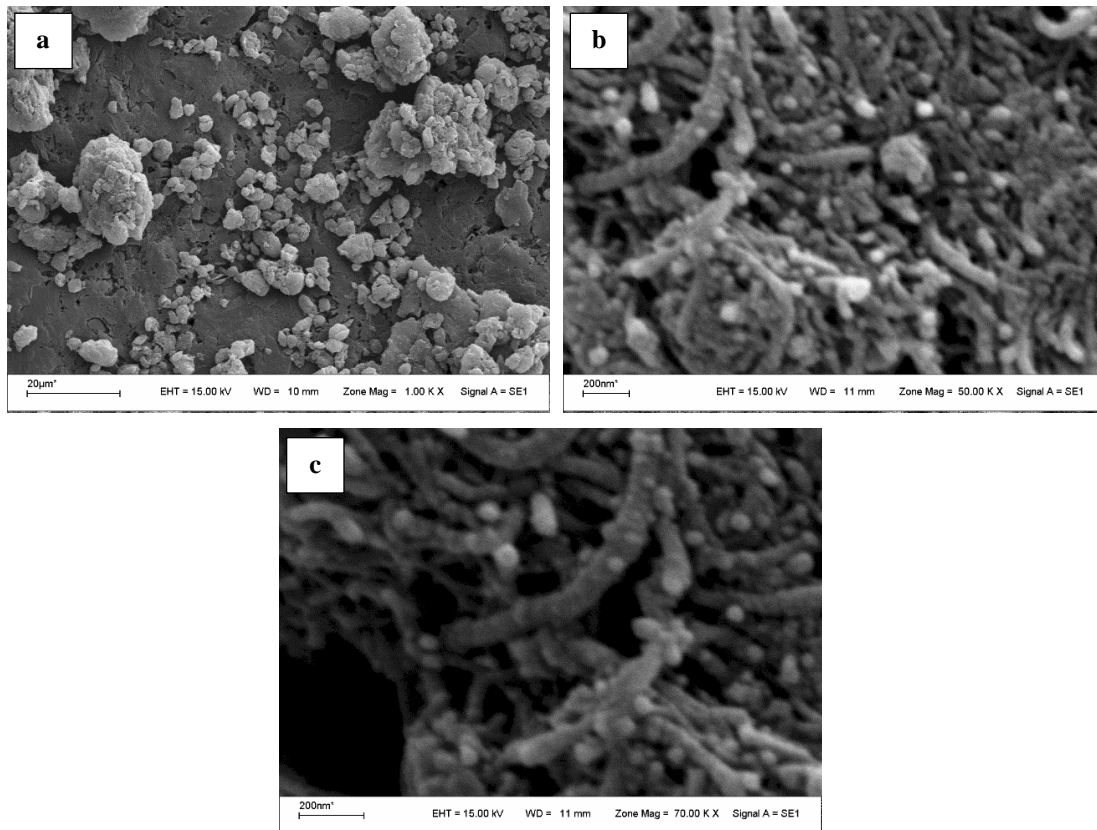


Figura 54. Micrografías del electrodo impreso de carbono modificado con NTC-NPAu-pAbZEA. Las imágenes poseen los siguientes aumentos: a): 1K x; b): 50K x; c): 70K x.

A partir de las imágenes, fundamentalmente a menor resolución, se puede inferir que la dispersión de nanotubos de carbono no fue muy homogénea, sino que se observan cúmulos de distintos tamaños. Al comparar las imágenes del EIC modificado con NTC con las que tienen además NTC-NPAu no se observa diferencia alguna en las imágenes, lo cual es de esperar dado que el diámetro de las nanopartículas (18 nm), es pequeño en comparación a la resolución de las micrografías. En las imágenes del electrodo que tiene NTC-NPAu-pAbZEA se observa, en la imagen de 70K x de resolución, la presencia de rugosidades de pequeño tamaño a lo largo de los NTC. Considerando el tamaño de las nanopartículas y el de una molécula de anticuerpo, que es de 10x10-15x2,5 nm para una IgG2 (Reth 2013), y, dado que las rugosidades no se notan en las otras superficies, se deduce que se deben a la unión de los anticuerpos sobre las NPAu.

4.1.11. Construcción de la curva de calibración en SAF 1 mM

Utilizando el procedimiento anterior y los parámetros optimizados, se procedió a realizar una curva de calibración. Para ello, se modificaron ocho electrodos, utilizando las

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

concentraciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA que se detallan a continuación en la Tabla 14:

Tabla 14. Diluciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA empleadas en el armado del inmunosensor electroquímico. pAb-ZEA: 1:80; ZEA-HRP: 1:160.

Electrodo	1	2	3	4	5	6	7	8
ZEA (ng mL ⁻¹)	-	9,36x10 ⁻⁶	9,36x10 ⁻⁵	9,36x10 ⁻⁴	9,36x10 ⁻³	9,36x10 ⁻²	0,936	93,6

Inicialmente se realizaron las medidas con el inmunosensor electroquímico empleando CAT y H₂O₂. Así, se mantuvieron optimizados el volumen de celda y las concentraciones de sustrato y cosustrato enzimático, agregando 17 µL de CAT 1 mM, sobre los cuales se realizó una cronoamperometría aplicando un potencial de 0,1 V. A un tiempo de 150 s se agregaron 2,86 µL de H₂O₂ 6 mM, y se registró el salto de corriente al final de la cronoamperometría.

Se observó una gran dispersión en las corrientes halladas para los distintos inmunosensores. Para tratar de reducir esta variación se decidió realizar las siguientes modificaciones:

- ✓ Se disminuyó el volumen de NTC y NPau empleados para modificar los ET de 5 µL a 4 µL, a fin de evitar la deposición fuera del electrodo de trabajo.
- ✓ Se aumentó la temperatura de secado de NTC y NPau de 35 °C a 41 °C a fin de acelerar el proceso.
- ✓ Se disminuyó el volumen de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA utilizados, pasando de 20 µL en el caso de pAb-ZEA y 10 µL en los otros dos, a utilizar 5 µL para todos, para evitar la deposición fuera del ET.
- ✓ Se cambió el uso de leche descremada por el de BSA como agente bloqueante, y se aumentó el tiempo de incubación de 30 min a 1 hora.

Se realizaron varias curvas de trabajo en las cuales, y a pesar de los cambios implementados, se seguían observando dispersiones en las corrientes obtenidas para las concentraciones de ZEA estudiadas. Uno de los probables factores que influyeron en la variación de la corriente fue que al potencial aplicado (0,1 V), como la celda no cuenta con un electrodo de referencia sino más bien con uno de pseudo-referencia como lo es la tinta de plata, puede estar comenzando a reducirse el H₂O₂ presente. Por tal motivo, se comenzó a estudiar la reducción del mismo.

Así, en lugar de utilizar el CAT como mediador electroquímico se decidió aprovechar las propiedades catalíticas que posee la dispersión de NTC para la reducción de H₂O₂ y así

medir directamente la corriente de reducción de esta última especie. Esto presenta la ventaja de que simplifica el sistema al eliminar el mediador electroquímico. De esta forma se elimina una posible fuente de error. El cambio más importante en cuanto a la relación entre I_{ee} y la concentración de ZEA es que ahora la I_{ee} pasa a ser directamente proporcional, ya que una menor concentración de ZEA implica que la concentración de H_2O_2 reducido enzimáticamente es mayor y, por lo tanto, es menor el H_2O_2 reducido electroquímicamente.

Para mantener el volumen de celda optimizado, se agregaron 17 μL de SAC pH 5 y el resto (3 μL) son de solución de H_2O_2 . A los efectos de favorecer la estabilización de la señal durante la reacción de reducción de H_2O_2 , primero se realizó un voltamperograma cíclico entre -0,2 V y 0,4 V y, a continuación, una amperometría durante 50 segundos aplicando un potencial de -0,3 V. Estas etapas involucran posibles procesos rédox y permiten un reacomodamiento de cargas de la compleja superficie.

Finalmente se realizó una cronoamperometría aplicando un potencial de -0,3 V durante 200 segundos. A un tiempo de 100 s se inyectan 3 μL de H_2O_2 6 μM y se registra el salto de corriente a 100 segundos después de la inyección. Se estudió la concentración de H_2O_2 a fin de obtener la mayor sensibilidad posible y el mayor grado de reproducibilidad de la respuesta. Así, concentraciones más altas de 6 μM arrojaron mayores valores de corriente, pero también causaron una inactivación de la enzima que dificultó la realización de réplicas en las determinaciones. Por otro lado, pequeñas concentraciones de H_2O_2 , si bien no envenenaron la enzima, presentaron una muy baja sensibilidad. Así, se decidió emplear una $c^*_{H_2O_2} = 6 \mu\text{M}$. En la Figura 55 se muestran los perfiles cronoamperométricos obtenidos para los inmunosensores electroquímicos para diferentes concentraciones de ZEA.

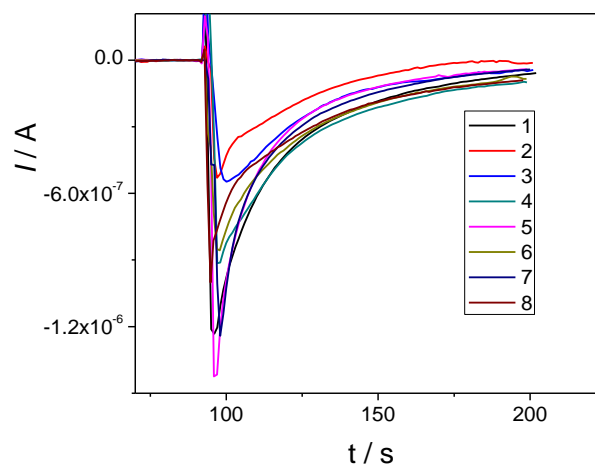


Figura 55. Cronoamperogramas obtenidos para diferentes concentraciones de ZEA en SAF 1 mM: 1) 0, 2) 1×10^{-5} ng mL^{-1} , 3) 1×10^{-4} ng mL^{-1} , 4) 1×10^{-3} ng mL^{-1} , 5) 1×10^{-2} ng mL^{-1} , 6) 0,1 ng mL^{-1} , 7) 1 ng mL^{-1} , 8) 100 ng mL^{-1} .

Cada etapa de modificación del ET para el armado del inmunosensor electroquímico va acompañada de una variación del área electroactiva del ET, con la consiguiente variación en la corriente de reducción de H₂O₂. Para tratar de eliminar esta fuente de error se decidió tratar los valores de corriente en función del área electroquímica de cada electrodo, es decir, se trabajó con *densidades de corriente (J)* en lugar de *corrientes netas*.

La superficie del ET modificado es una superficie porosa de la cual no se conoce su área electroquímica. Para conocer su valor se utilizó un par rédox cuyo coeficiente de difusión es conocido. La Figura 56 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos para una solución de K₃[Fe(CN)₆] 1 mM, 0,1 M de KCl. Del gráfico se puede inferir que los voltamperogramas cíclicos no son coincidentes para los distintos electrodos indicando, en principio, una falta de uniformidad de las áreas de los diferentes EIC. Por otro lado, no se observa un comportamiento difusional puro, el que se puede deber a una adsorción del par rédox o a un confinamiento del mismo en la estructura porosa de la superficie.

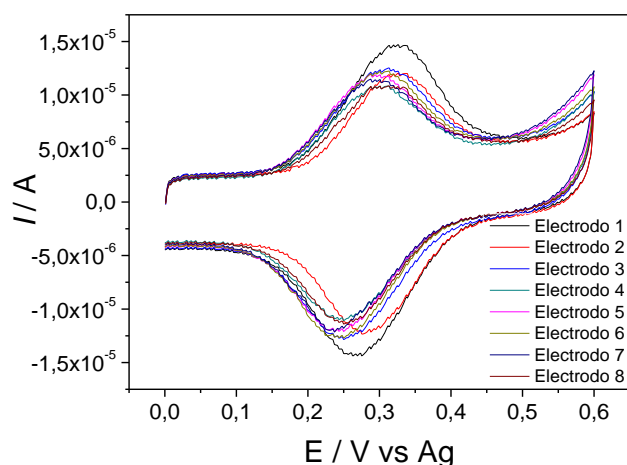


Figura 56. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para los diferentes inmunosensores electroquímicos en una solución de K₃[Fe(CN)₆] 1 mM en KCl 0,1 M. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Para determinar el área electroactiva del electrodo se realizó una cronocoulometría (Bott 2004). Para un sistema electroactivo dado, la carga total Q_{total} , viene dada por:

$$Q_{\text{total}} = Q_{\text{dc}} + Q_{\text{ads}} + Q_{\text{dif}} \quad (6)$$

$$Q_{\text{total}} = Q_{\text{dc}} + nFA\Gamma_{\text{O}} + \frac{2nFAC_{\text{O}}D_{\text{O}}^{1/2}}{1/2} t^{1/2} \quad (7)$$

donde Q_{dc} es la carga de la doble capa eléctrica, Q_{ads} es la carga del proceso rédox para la especie adsorbida sobre el ET y Q_{dif} es la carga obtenida para el proceso rédox difusional.

Así, graficando Q_{total} vs $t^{1/2}$ es posible determinar el área electroquímica del inmunosensor electroquímico a partir de su pendiente. La carga total, Q_{total} , se obtiene por integración del gráfico de I vs t .

Para determinar las áreas electroactivas de los diferentes inmunosensores electroquímicos se agregaron 17 μ L de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM, 0,1 M de KCl. Luego, se realizó una cronoamperometría aplicando un potencial $E = E_{p,a} + 0,1$ V durante 60 segundos, donde $E_{p,a}$ es el potencial de pico anódico. El perfil I vs t obtenido fue integrado con respecto a t para tener el valor de la carga (Q_{total}) en función del tiempo. El coeficiente de difusión utilizado fue de $7,38 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Konopka 1970). A partir del valor de la pendiente de la porción lineal del gráfico Q vs $t^{1/2}$ (ver Figura 57), se obtuvo el área electroquímica del inmunosensor electroquímico. Al valor de corriente obtenido para cada inmunosensor, se lo dividió por el área electroquímica y se determinó la densidad de corriente (J) para la reducción del H_2O_2 .

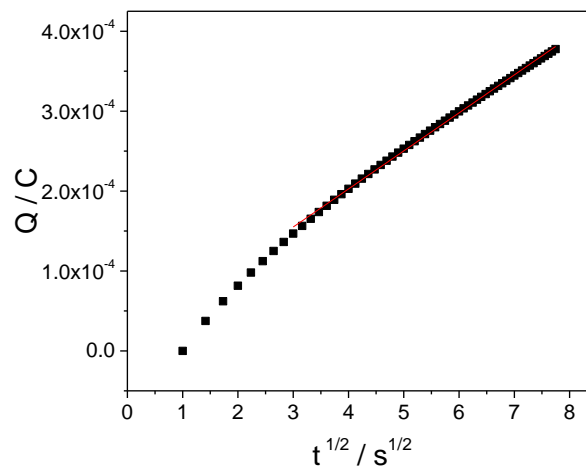


Figura 57. Gráfico típico de Q vs $t^{1/2}$ empleado en la determinación del área electroquímica de los electrodos.

A cada J_{ee} determinada se le restó la J_{ee} correspondiente a la respuesta obtenida en ausencia de ZEA, es decir, el blanco. La ausencia de ZEA implica que no existe inhibición de la señal. Al estar presentes ZEA y ZEA-HRP se produce una competencia por los sitios activos de unión del anticuerpo y, a medida que la concentración de ZEA aumenta, esta ocupa la mayoría de los sitios disponibles o, dicho de otro modo, la cantidad de ZEA-HRP unida al anticuerpo es menor. De esta manera, es menor el consumo de H_2O_2 por parte de la

enzima y así aumenta la reducción electroquímica de H₂O₂. En otras palabras, a mayor porcentaje de inhibición por la presencia de ZEA, mayor la J_{ee} . Los valores de J_{ee} fueron normalizados con respecto a la J_{ee} que corresponde a la máxima concentración de ZEA libre estudiada (100 ng mL⁻¹).

La curva de calibración se graficó como el grado de unión (B/B₀) en función de la concentración de ZEA, en escala logarítmica. B₀ es la densidad de corriente normalizada que corresponde a la máxima concentración de ZEA, es decir, la J_{ee} máxima, y B es la densidad de corriente normalizada a una dada concentración de ZEA. Los términos B y B₀ provienen del inglés *bounding*, y hacen referencia a la unión del antígeno con el anticuerpo.

Como la competencia entre ZEA y ZEA-HRP por los sitios de unión se encuentra gobernada por la ley de acción de masas (Crowther 1995), a bajas concentraciones de ZEA prácticamente todos los sitios del anticuerpo se encuentran ocupados por ZEA-HRP, y así se obtienen densidades de corriente que tienden a un valor mínimo y el grado de unión alcanza su valor mínimo. En el otro extremo, a altas concentraciones de ZEA la mayoría de los sitios de unión disponibles están ocupados, y así las densidades de corriente tienden a un valor máximo y el grado de unión tiende a 1. En la región intermedia, donde hay menor diferencia entre las concentraciones de ZEA y ZEA-HRP, una pequeña variación en la concentración de ZEA origina un cambio apreciable en el grado de unión.

La curva del gráfico (B/B₀) vs log c^{*}_{ZEA} mostrada en la Figura 58 presenta una forma sigmoidea característica de procesos gobernados por la ley de acción de masas, y puede ajustarse por una ecuación logística de cuatro parámetros de acuerdo a la Ecuación (8):

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log(x_0 - x)) \times p}} \quad (8)$$

donde A₁ y A₂ corresponden a los valores de B/B₀ máximo y mínimo, respectivamente, x₀ se corresponde a la SC₅₀, (también llamada EC₅₀), o sea la concentración de ZEA a la cual se produce un 50% de inhibición, x es la concentración de ZEA (c^{*}_{ZEA}), y p es la pendiente del punto medio de la curva sigmoidea (Rodbard 1974). El valor de SC₅₀ se suele tomar como la sensibilidad del método y, para este caso, se encontró un valor de SC₅₀ = 2,55 pg mL⁻¹, mientras que el límite de detección (LD), considerado como la concentración de ZEA que produce un 20% de inhibición (B/B₀ = 0,2) fue de 0,99 pg mL⁻¹.

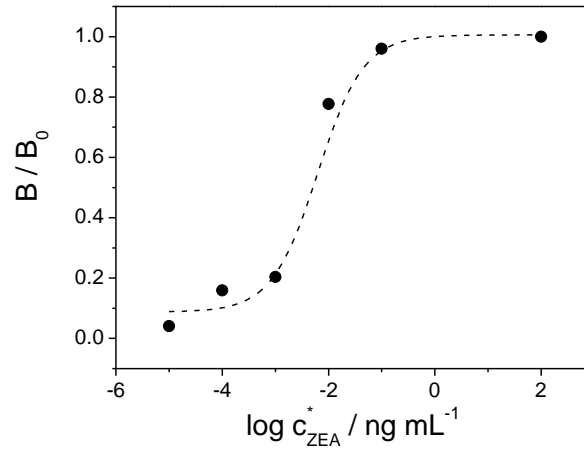


Figura 58. Curva de calibración para ZEA. Parámetros de la curva: $SC_{50} = 2,55 \text{ pg mL}^{-1}$, $LD = 0,99 \text{ pg mL}^{-1}$, $p = 1,92$.

4.1.12. Construcción de la curva de calibración en muestras de maíz

Para construir la curva de calibración se prepararon ocho inmunosensores empleando las concentraciones de pAb-ZEA, ZEA-HRP y ZEA que se indicaron en la Tabla 14.

A diferencia con la experiencia anterior, las soluciones de ZEA y la dilución de ZEA-HRP no se prepararon en SAF 1 mM sino en el extracto de maíz reconstituido en SAF 1 mM (ver sección 3.1.8), siendo el mismo extracto utilizado como blanco (Valcárcel 2000).

El procedimiento empleado fue el mismo que el anterior. Los cronoamperogramas obtenidos se muestran en la Figura 59.

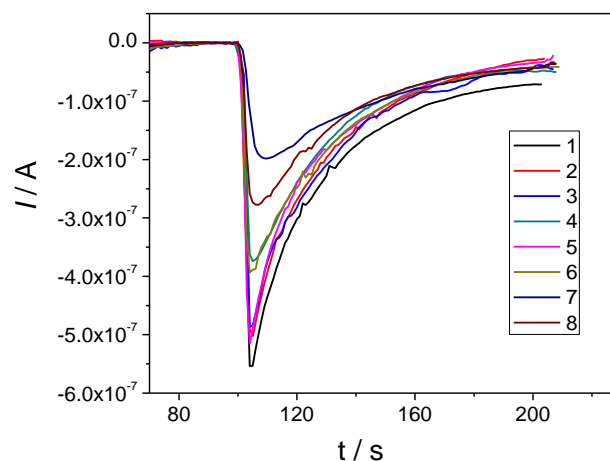


Figura 59. Cronoamperogramas obtenidos para diferentes concentraciones de ZEA en extracto de maíz en SAF 1 mM: 1) 0, 2) $9 \times 10^{-6} \text{ ng mL}^{-1}$, 3) $9 \times 10^{-5} \text{ ng mL}^{-1}$, 4) $9 \times 10^{-4} \text{ ng mL}^{-1}$, 5) $9 \times 10^{-3} \text{ ng mL}^{-1}$, 6) $9 \times 10^{-2} \text{ ng mL}^{-1}$, 7) $0,94 \text{ ng mL}^{-1}$, 8) $94,0 \text{ ng mL}^{-1}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los valores de corriente medidos a 100 segundos después de la inyección de H_2O_2 , se calcularon las correspondientes J_{ee} y, a partir de ellas, se determinaron los respectivos grados de unión para las distintas concentraciones de ZEA (Figura 60).

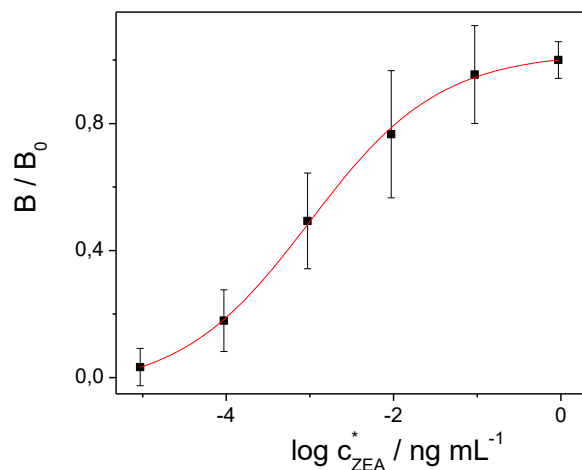


Figura 60. Curva de calibración de ZEA en muestra de maíz. Parámetros de la curva: $\text{SC}_{50} = 1,00 \text{ pg mL}^{-1}$, $\text{LD} = 0,11 \text{ pg mL}^{-1}$, $p = 0,560$.

Esta curva de calibración fue obtenida a partir de una determinación por triplicado. La misma presenta los parámetros siguientes:

$$\text{SC}_{50} = 1,00 \text{ pg mL}^{-1}, \text{LD} = 0,11 \text{ pg mL}^{-1}, \text{ y } p = 0,560.$$

Las diferencias observadas entre esta curva de calibración y la realizada en SAF fueron atribuidas a efectos producidos por los componentes de la matriz de la muestra.

4.1.13. Ensayo de recuperación

Para realizar el ensayo de recuperación se preparó un inmunosensor adicional utilizando las concentraciones de pAb-ZEA y ZEA-HRP utilizadas anteriormente, mientras que, en lugar de una solución patrón de ZEA en extracto de maíz, en este caso se utilizó el extracto de maíz contaminado con ZEA reconstituido en SAF (preparado según se indicó en sección 3.1.9), el cual fue diluido en un factor 1:1000 de forma tal de trabajar dentro del intervalo de la curva de calibración.

La concentración de ZEA en la muestra de maíz problema determinada mediante el inmunosensor fue de $(49 \pm 5) \text{ ng mL}^{-1}$, lo que equivale a un 105% de recuperación. La experiencia fue realizada por cuadruplicado.

4.1.14. Estudios de extracción de ZEA en fase sólida (EFS)

Con el objetivo de validar el inmunosensor electroquímico, se desarrolló una metodología de extracción de ZEA en muestras de maíz. Así, para purificar la muestra de maíz contaminada con ZEA previo a su determinación mediante HPLC se realizaron ensayos de extracción en fase sólida (EFS). Se planteó una alternativa al uso de columnas de separación previa por inmutioafinidad, con el objetivo de utilizar columnas más económicas, reutilizables y logrando encontrar la misma eficiencia en la separación.

Inicialmente se tomaron espectros UV-visible y de emisión de fluorescencia de soluciones de ZEA en una fase móvil de metanol/agua/acetonitrilo (MeOH/H₂O/ACN) 55:35:10.

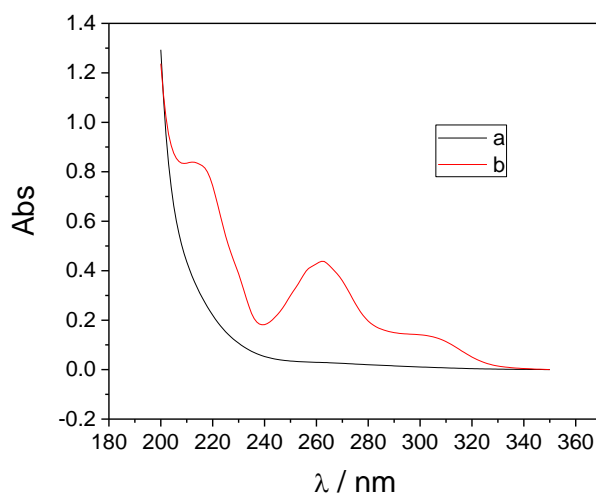


Figura 61. Espectros UV-visible en MeOH/H₂O/ACN 55:35:10 de: a) ZEA $3,93 \times 10^{-7}$ M, b) ZEA $1,96 \times 10^{-5}$ M.

A partir del análisis de la Figura 61 se infiere que es necesaria una concentración de ZEA mayor que 10^{-7} M para poder detectar su presencia mediante espectroscopía de UV-visible.

ZEA presentó tres máximos de absorción a 212, 262 y ≈ 300 nm, respectivamente, con coeficientes de absortividad molar (ϵ) en orden decreciente. Cabe indicar que el último máximo no aparece bien definido. Estos resultados están en concordancia con los mencionados por Urraca y col. (Urraca 2004).

Del análisis del espectro de emisión mostrado en la Figura 62 se determinó que para λ de excitación de 212 nm no se observó emisión de fluorescencia, mientras que para λ de excitación de 262, 271 y 300 nm se produce una banda de emisión de fluorescencia con máximo en ≈ 439 nm y con intensidad creciente en el orden de λ de excitación $262 \text{ nm} < 271 \text{ nm} < 300 \text{ nm}$.

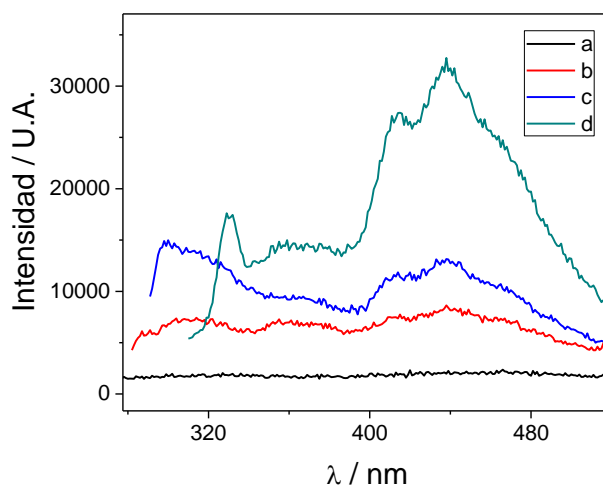


Figura 62. Espectros de emisión de fluorescencia de ZEA $1,96 \times 10^{-5}$ M en MeOH/H₂O/ACN 55:35:10 con λ de excitación de: a) 212 nm, b) 262 nm, c) 271 nm, d) 300 nm.

Una vez determinados los perfiles de los espectros de UV-visible y emisión de fluorescencia de ZEA se realizaron los ensayos de extracción en fase sólida. Se decidió realizar la determinación de ZEA únicamente por espectroscopía UV-visible y utilizando una celda de vidrio de 1 mL para evitar diluir el eluyente recolectado de la columna. Este tipo de celda posee el corte a ≈ 280 nm, con lo cual las dos bandas de mayor intensidad de ZEA se encuentran por debajo del mismo. No obstante, es posible realizar las determinaciones observando la banda de 300 nm.

Se tomaron espectros UV-visible a una solución de ZEA en MeOH/ACN 50:50 y a un blanco de la mezcla de estos solventes.

Luego se realizó un pretratamiento a la columna de EFS haciendo correr por la misma 1 mL de MeOH, 1 mL de H₂O y 2 mL de MeOH/ACN 50:50. Se recolectaron 400 μ L del eluyente de MeOH/ACN y se le tomó un espectro UV-vis.

A continuación, se inyectaron en la columna 500 μ L de la solución de ZEA y se obtuvo un espectro UV-vis del eluyente. Por último, se inyectaron 3 mL de MeOH/ACN 50:50, recolectando el eluyente en alícuotas de 500 μ L tomando un espectro UV-vis a cada una de ellas.

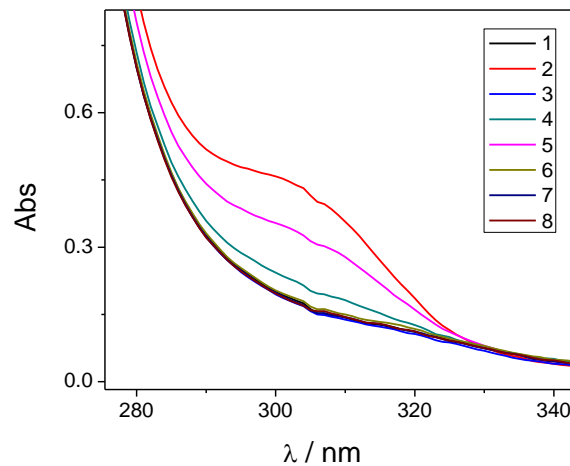


Figura 63. Espectros UV-vis de: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) ZEA en MeOH/ACN 50:50, 3) eluyente de MeOH/ACN 50:50 previo a la inyección de ZEA, 4) 1^{ra} fracción de eluyente luego de la inyección, 5) 2^{da} fracción, 6) 3^{ra} fracción, 7) 4^{ta} fracción, 8) 5^{ta} fracción.

Del espectro de la Figura 63 se observa que ZEA comienza a eluir por la columna de EFS en la 1^{ra} fracción, pero la mayor cantidad de ZEA queda retenida y eluye en la 2^{da} fracción. En la 3^{ra} fracción aún eluye una mínima cantidad de ZEA y, posteriormente, no se detecta más. Se registró el tiempo de elución de las alícuotas y se realizó una aproximación del tiempo de retención de ZEA, el cual resultó ser de aproximadamente 2 min 43 s en su concentración máxima. A partir de los espectros UV-vis de la solución de ZEA en MeOH/ACN 50:50 y de la mezcla de solventes se determinó, por diferencia entre ambos, la señal neta debida a la presencia de la micotoxina, es decir, el Δ Abs debido a ZEA (Figura 64).

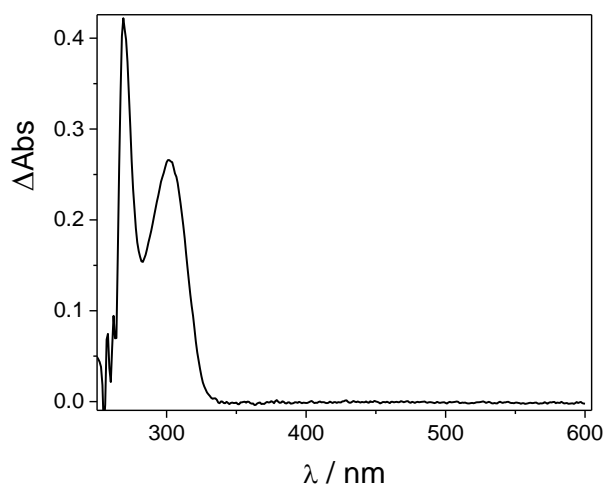


Figura 64. Δ Abs de ZEA obtenida entre el espectro de absorción del eluido de la columna conteniendo ZEA y sin contener ZEA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez aproximado el tiempo de retención de ZEA en solución MeOH/ACN, se repitió el procedimiento para un extracto de maíz con ZEA agregada exprofeso.

Se realizó el proceso de extracción en 0,2 g de maíz, previamente secado, con 2 mL de MeOH/ACN 50:50 mediante agitación en un vortex durante 10 minutos. Luego se tomó el sobrenadante y se separó en dos alícuotas de 1 mL, a una de las cuales se le agregó 10 μ L de la solución stock de ZEA y la otra se dejó tal cual estaba.

Se trabajó con dos columnas de EFS, las cuales recibieron un pretratamiento como se indicó anteriormente. En una de las columnas se inyectaron 0,5 mL del extracto de maíz sin ZEA y a continuación 3 mL de MeOH/ACN 50:50. En la otra columna se inyectaron 0,5 mL de la alícuota de ZEA en maíz y luego 3 mL de MeOH/ACN 50:50. En ambos casos se recolectó el eluyente en fracciones de 500 μ L y se le tomó un espectro UV-visible a cada una de ellas, además de realizar un blanco con MeOH/ACN 50:50.

En la Figura 65 se muestran los espectros de UV-vis obtenidos en los ensayos de extracción de la matriz de maíz, mientras que en la Figura 66 se muestran los correspondientes a la extracción de ZEA en maíz.

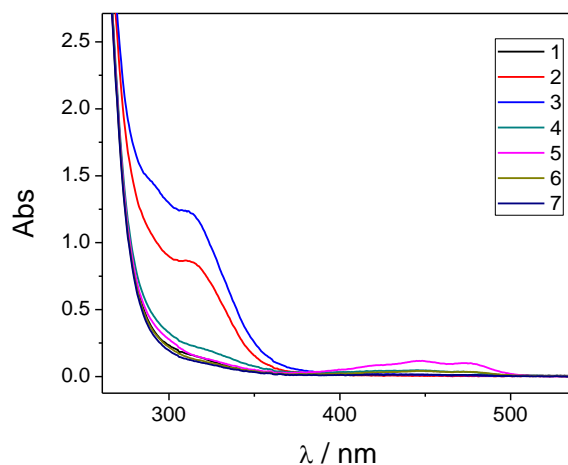


Figura 65. Espectros UV-vis de: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) 1^{ra} fracción de eluyente tras la inyección de la muestra de maíz, 3) 2^{da} fracción, 4) 3^{ra} fracción, 5) 4^{ta} fracción, 6) 5^{ta} fracción, 7) 6^{ta} fracción.

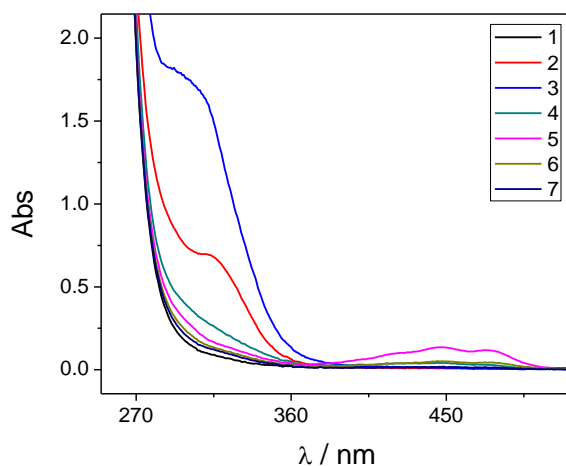


Figura 66. Espectros UV-vis de: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) 1^{ra} fracción de eluyente tras inyección de muestra de ZEA en maíz, 3) 2^{da} fracción, 4) 3^{ra} fracción, 5) 4^{ta} fracción, 6) 5^{ta} fracción, 7) 6^{ta} fracción.

Diferenciando entre ambas series de espectros (o sea, graficando el Δ Abs) se pudo determinar, de manera cualitativa, la presencia o no de ZEA en cada fracción de eluyente (Figura 67).

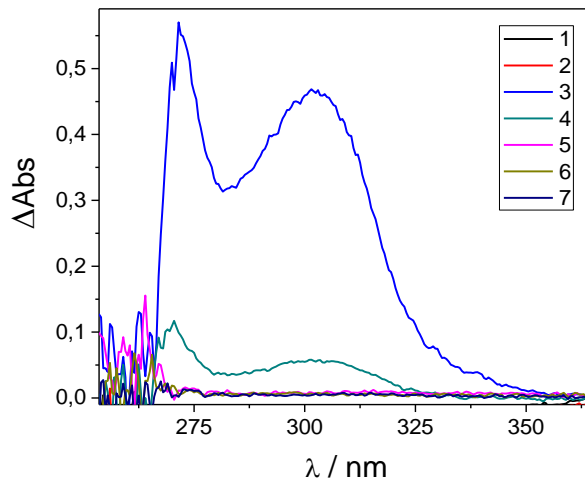


Figura 67. Δ Abs en 1) MeOH/ACN 50:50, 2) 1^{ra} fracción de eluyente tras inyección, 3) 2^{da} fracción, 4) 3^{ra} fracción, 5) 4^{ta} fracción, 6) 5^{ta} fracción, 7) 6^{ta} fracción.

Del análisis de este gráfico resultó que prácticamente toda la ZEA presente eluyó en la 2^{da} y 3^{ra} fracción. Estos datos concordaron muy bien con las experiencias realizadas en ausencia de matriz.

Cuando se comparó el espectro de absorción correspondiente a la 2^{da} fracción con la obtenida para ZEA en MeOH/ACN 50:50 (Figura 68), se halló que ambos son coincidentes,

con lo cual se pudo afirmar que efectivamente la banda de absorción es correspondiente a ZEA.

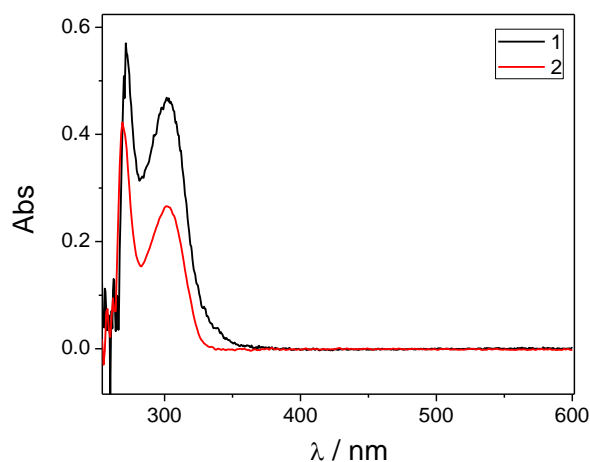


Figura 68. Δ Abs de ZEA en: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) eluyente de maíz contaminado ex profeso con ZEA.

Con lo expuesto hasta aquí se puede concluir que la mezcla de solventes MeOH/ACN 50:50 fue útil para realizar la extracción de ZEA. Para determinar la conveniencia de utilizar una columna de EFS como etapa previa de purificación de la muestra previa a su inyección en un cromatógrafo HPLC se analizaron los espectros UV-vis correspondientes a: MeOH/ACN 50:50, extracto de maíz (en el mismo solvente), y las fracciones de elución del extracto tras pasar a través de la columna (Figura 69). Se observó que la columna de EFS permite retener parte de los componentes presentes en el maíz que absorben a 300 nm, longitud de onda a la cual se realiza la determinación de ZEA, lo que muestra la potencial utilidad de la CEFS para purificar un extracto de una muestra de maíz que contenga ZEA.

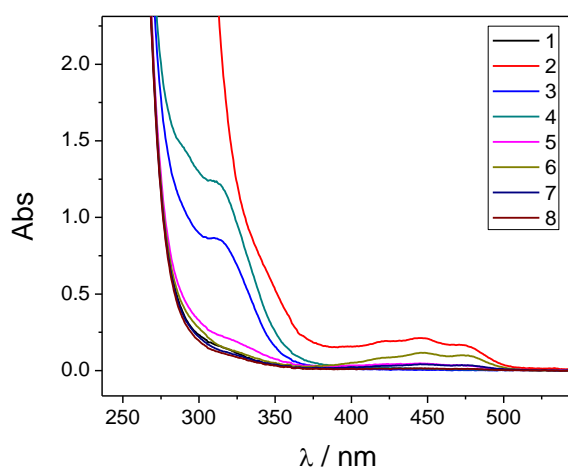


Figura 69. Espectros UV-vis de: 1) MeOH/ACN 50:50, 2) extracto de maíz en MeOH/ACN 50:50, 3) 1^{ra} fracción de eluyente de maíz tras inyección en la columna de EFS, 4) 2^{da} fracción, 5) 3^{ra} fracción, 6) 4^{ta} fracción, 7) 5^{ta} fracción, 8) 6^{ta} fracción.

4.1.15. Elección de la fase móvil para la determinación de ZEA por HPLC

Para la determinación de ZEA por HPLC se decidió utilizar una fase móvil binaria MeOH-ACN, adaptando la fase móvil ternaria descrita por Urraca y col. (Urraca 2004). Para determinar la composición óptima de la mezcla binaria se procedió a preparar cuatro soluciones de ZEA de concentración $1,6 \times 10^{-7}$ M en los siguientes solventes:

(a) MeOH, (b) MeOH-ACN 90:10, (c) MeOH-ACN 70:30, (d) MeOH-ACN 50:50.

A las cuatro soluciones de ZEA se les tomó un espectro de emisión de fluorescencia excitando a una longitud de onda $\lambda_{exc} = 272$ nm.

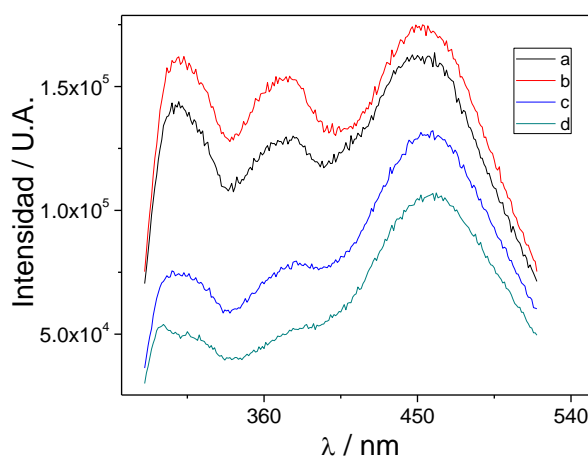


Figura 70. Espectros de emisión de fluorescencia de ZEA $1,6 \times 10^{-7}$ M en: a) MeOH, b) MeOH-ACN 90:10, c) MeOH-ACN 70:30, d) MeOH-ACN 50:50, excitando las muestras a 272 nm.

Como puede observarse en la Figura 70, la mayor intensidad de emisión de fluorescencia de ZEA se obtiene cuando la misma se encuentra disuelta en una mezcla de MeOH-ACN 90:10, con el máximo de emisión situado a 453 nm, por lo que se eligió esta fase móvil para realizar la cuantificación de ZEA por HPLC.

4.1.16. Determinación de zearalenona mediante HPLC

Inicialmente se realizó la determinación de ZEA en soluciones patrón en MeOH-ACN 90:10. Las cuantificaciones se llevaron a cabo en una columna Phenomenex Luna 00G-4252-E0, empleando como fase móvil una mezcla de MeOH-ACN 90:10, una velocidad de flujo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ y un volumen de inyección de muestra de $10 \mu\text{L}$. La detección se realizó por emisión de fluorescencia, donde las longitudes de onda de excitación y emisión fueron

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de 272 y 453 nm respectivamente. Cada corrida cromatográfica se desarrolló durante un tiempo de 10 minutos.

Las soluciones patrón de ZEA utilizadas en la determinación fueron las siguientes:

Tabla 15. Soluciones de ZEA preparadas para la determinación por HPLC.

Solución	Vol. de stock de ZEA / μL ⁽¹⁾	Vol. de MeOH-ACN 90:10 / μL	Vol. final / μL	c^*_{ZEA} / ng mL^{-1}
1	0	700	700	0
2	12	688	700	6,82
3	38	662	700	21,60
4	63	637	700	35,82
5	88	612	700	50,03

⁽¹⁾ Concentración de la solución stock de ZEA: 1,17 mM en ACN.

Los cromatogramas obtenidos para las soluciones de ZEA se muestran en la Figura 71.

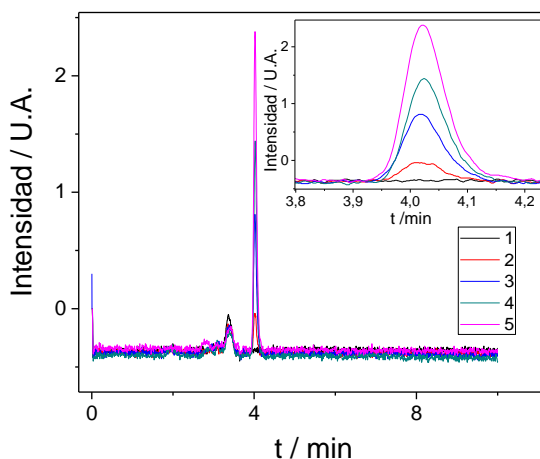


Figura 71. Cromatogramas de soluciones de ZEA en MeOH-ACN 90:10, para concentraciones de ZEA de: 1) 0, 2) 6,82, 3) 21,60, 4) 35,82, 5) 50,03 ng mL^{-1} .

Como se observa en la Figura 71, el pico centrado a un tiempo de retención de 4,02 minutos (ver gráfico inserto), se debe a la presencia de ZEA. Por otra parte, a un tiempo de retención de 3,69 min aparece sistemáticamente un pequeño pico de naturaleza desconocida, probablemente una impureza presente en el frasco comercial de ZEA.

Al graficar las áreas de estos picos cromatográficos en función de la correspondiente concentración de ZEA se obtuvo la curva de calibración siguiente:

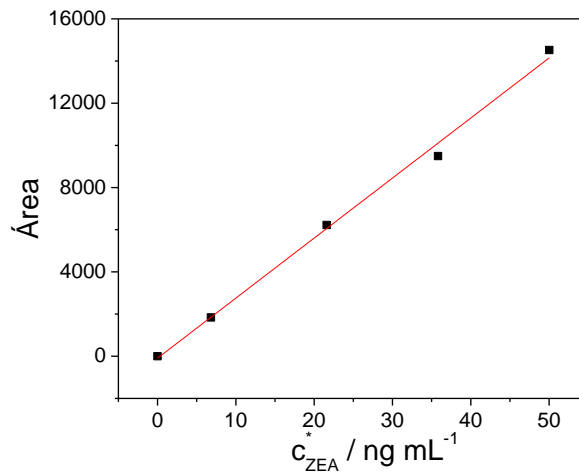


Figura 72. Curva de calibración de ZEA en MeOH/ACN 90:10.

Puede apreciarse que dentro del intervalo de concentraciones elegidas se cumplen las condiciones de linealidad.

Luego se procedió a realizar la determinación de ZEA en los extractos de maíz contaminados, preparados según se indica en la sección 3.1.9.

La determinación se realizó por quintuplicado empleando el método de las adiciones de estándar, para lo cual se prepararon las soluciones indicadas en la Tabla 16, obteniéndose los cromatogramas de la Figura 73.

Tabla 16. Soluciones de extracto de maíz contaminado por ZEA.

Solución	Vol. de extracto de maíz contaminado / μL	Vol. de stock de ZEA / μL ⁽¹⁾	Vol. de MeOH-ACN 90:10 / μL	Vol. final / μL	c_{ZEA}^* / ng mL ⁻¹
1	340	0	560	900	0
2	340	12	548	900	4,97
3	340	38	522	900	15,73
4	340	63	497	900	26,08
5	340	88	472	900	36,42

⁽¹⁾ Concentración de la solución stock de ZEA: 1,17 mM en ACN.

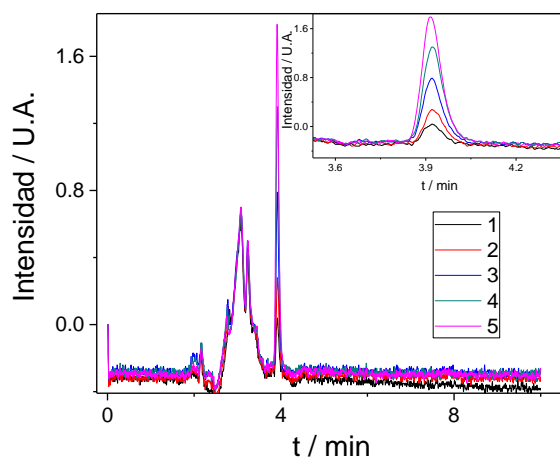


Figura 73. Cromatogramas de extractos de maíz contaminados ex profeso con soluciones de estándar de ZEA en MeOH-ACN 90:10. Las concentraciones de los estándares de ZEA fueron: 1) 0, 2) 4,97, 3) 15,73, 4) 26,08, 5) 36,42 ng mL⁻¹.

En la Figura 73 se observa que aparece un pico cromatográfico a un tiempo de retención de 3,92 min, cuya vista se encuentra ampliada en el gráfico inserto, correspondiente a ZEA, que se encuentra un poco desplazado (0,10 min) con respecto a las soluciones patrones de ZEA. Además, en este caso, se observa la aparición de nuevos picos que eluyen en el intervalo de tiempo de 2,53 a 3,82 minutos, los que corresponden a componentes de la matriz de maíz.

Al restar la contribución de la matriz (blanco), y graficar las áreas de los picos cromatográficos obtenidos a $t_R = 3,92$ min en función de la correspondiente concentración de solución estándar de ZEA se obtiene la curva de las adiciones de estándar siguiente (Figura 74).

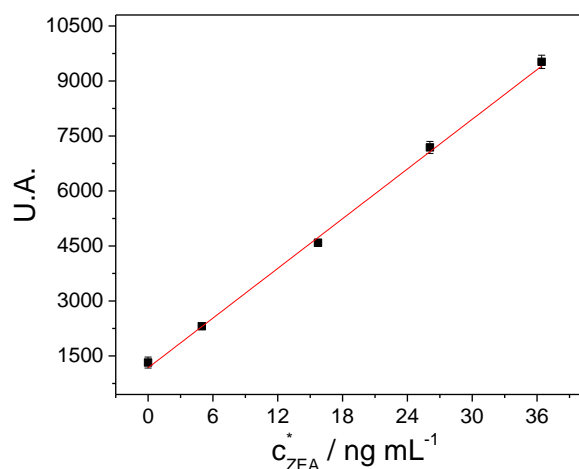


Figura 74. Curva de las adiciones de estándar de ZEA en extracto de maíz en MeOH/ACN 50:50. Pendiente = $(2,26 \pm 0,06) \times 10^2$ U.A. mL ng⁻¹. Ordenada al origen = $(1,12 \pm 0,08) \times 10^3$ U.A.

A partir de la curva de las adiciones de estándar de la Figura 74, y de las diluciones hechas a partir del extracto se pudo calcular la concentración de ZEA del mismo:

$$\frac{1178,5255}{225,91002} \times \frac{900}{340} \times \frac{1,71}{0,5} = 47,23 \text{ ng mL}^{-1}$$

Así, la concentración de ZEA del extracto fue de $(47 \pm 6) \text{ ng mL}^{-1}$. Esta concentración corresponde a una recuperación del 100,4 %. El límite de detección (LD), determinado como tres veces la señal del blanco (Olivieri 2007), fue de $3,11 \text{ ng mL}^{-1}$, y el límite de cuantificación (LC), obtenido como diez veces la señal del blanco (Olivieri 2007), fue $12,09 \text{ ng mL}^{-1}$.

Los resultados del ensayo de recuperación se indican en la Tabla 17.

Tabla 17. Concentración de ZEA determinada por HPLC y el inmunosensor electroquímico.

Método de determinación	Concentración de ZEA / ng mL^{-1}	Porcentaje de recuperación
--	47,0 ⁽¹⁾	--
HPLC	47,2	100,4%
Inmunosensor electroquímico	49,2	104,6%

⁽¹⁾ Concentración de ZEA esperada.

Como puede apreciarse, la performance del inmunosensor electroquímico fue más que satisfactoria, dado que la concentración determinada por el mismo fue muy cercana a la determinada mediante HPLC, la cual fue prácticamente el valor que se esperaba al preparar la muestra contaminada ex profeso. Por otra parte, puede apreciarse que la metodología de extracción mediante el uso de columnas de EFS fue muy satisfactoria.

El límite de detección logrado con el inmunosensor electroquímico es comparable a los logrados en publicaciones recientes. En la Tabla 18 se muestra el rendimiento del inmunosensor electroquímico frente a algunos de los métodos nombrados en la Tabla 4.

Tabla 18. Límites de detección de ZEA logrados en publicaciones recientes.

Matriz	LD	Técnica analítica	Año	Referencias
Alimentos	0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$	Voltamperometría de onda cuadrada	2016	(Afzali 2016)
Piensos	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	UPLC	2016	(Hu 2016)
Batata china	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	UPLC	2016	(Li 2016b)

Matriz	LD	Técnica analítica	Año	Referencias
Maíz	0,8 µg L ⁻¹	HPLC	2016	(Moreno 2016)
Leche y trigo	0,005 µg L ⁻¹	Biosensor basado en ADN	2016	(Sadrabadi 2016)
Maíz, trigo y arroz	6,5 ng L ⁻¹	Inmuno-PCR	2016	(Wang 2016a)
Solución reguladora	1,5 ng L ⁻¹	Inmunosensor	2017	(Liu 2017)
Maíz Cerveza	0,126 µg kg ⁻¹ 0,007 µg L ⁻¹	Aptasensor	2017	(Wu 2017)
Leche humana	0,093 µg L ⁻¹	HPLC	2018	(Braun 2018)
Orina	0,02 µg L ⁻¹	UPLC	2018	(Li 2018a)
Cereal	1,9 µg L ⁻¹	HPLC	2018	(Rai 2018)
Maíz	0,15 ng L⁻¹	Inmunosensor	2018	(Riberi 2018)
Orina	1 ng L ⁻¹	UPLC	2018	(Šarkanj 2018)
Maíz	59,15 ng L ⁻¹	Inmunocromatografía	2018	(Shao 2018)
Maíz y aceite de maíz	10 µg L ⁻¹	Aptasensor	2018	(Sun 2018a)

4.1.17. Discusión

Se encontró una dispersión de NTC adecuada para la modificación de la superficie de los electrodos impresos de carbono. Se optimizaron las concentraciones de anticuerpo policlonal anti-ZEA y ZEA-HRP. También se optimizó el volumen de trabajo, hallándose que un volumen más pequeño produce una señal de mayor intensidad, lo mismo que concentraciones mayores. El volumen empleado se disminuyó hasta el mínimo valor de la celda. En cuanto a la concentración de H₂O₂ se procuró no utilizar soluciones muy concentradas ya que estas causan el envenenamiento de la HRP. A fin de disminuir los efectos producidos en variaciones de área, se decidió trabajar con densidades de corriente en lugar de corrientes a fin de independizarse de las variaciones que presentan las áreas modificadas de los inmunosensores. También se decidió simplificar el sistema y no utilizar catecol como mediador electroquímico. En su lugar se decidió medir directamente la corriente de reducción de H₂O₂, aprovechando que la dispersión de NTC empleada es capaz de catalizar esta reacción. Se aplicaron estos cambios y se produjo una mejoría en las curvas de calibración.

Se realizaron curvas de calibración para la determinación de ZEA tanto en SAF, así como también en muestras de maíz contaminadas ex profeso. Para los estudios del inmunosensor en muestras de extractos de maíz se obtuvo una curva de calibración en la cual se logró una SC₅₀ de 1,00 pg mL⁻¹ y LD = 0,11 pg mL⁻¹, siendo estos valores

competitivos frente a los métodos oficiales establecidos por la AOAC, así como frente a trabajos desarrollados recientemente.

También se analizaron mediante espectroscopía de impedancia electroquímica los cambios en la superficie del inmunosensor producidos en cada etapa de su construcción, en donde los resultados obtenidos concuerdan muy bien respecto a la hipótesis inicial planteada, dando lugar a la confirmación satisfactoria del armado del inmunosensor electroquímico en cada una de sus etapas.

Se realizó un ensayo de recuperación sobre una muestra de maíz contaminada con ZEA la cual fue extraída utilizando el procedimiento de extracción desarrollado, obteniéndose una recuperación del 105 % con el inmunosensor electroquímico.

Por otra parte, se caracterizó la molécula de ZEA mediante espectroscopía UV-visible y de emisión de fluorescencia y se estudió la utilidad de una columna de extracción en fase sólida para extraer ZEA de una muestra de maíz. Se encontró una fase móvil para la extracción de ZEA en maíz consistente de una mezcla de MeOH/ACN que permitió la separación de ZEA de componentes presentes en el maíz que presentan picos de absorción a la misma longitud de onda que ZEA. Esta purificación previa es importante para facilitar la posterior determinación de ZEA mediante HPLC. Para la misma se utilizaron columnas de extracción de fase estacionaria compuesta por una cadena carbonada de 18 carbonos.

A partir de este procedimiento de extracción, y las caracterizaciones de la micotoxina realizadas, se realizó la cuantificación de ZEA en la muestra de maíz contaminada mediante HPLC. Se eligió la composición óptima de una mezcla de MeOH/ACN como fase móvil para la determinación de la molécula mediante emisión de fluorescencia y, finalmente, se realizó la determinación mediante el método de las adiciones de estándar, logrando un porcentaje de recuperación de 100,3 %, confirmando la efectividad del procedimiento de extracción, así como la validación de la performance del inmunosensor electroquímico.

Como estudio complementario, se realizó un análisis de la superficie del inmunosensor mediante microscopía electrónica de barrido, constatándose la presencia de nanotubos de carbono sobre la superficie del electrodo. No se observaron las nanopartículas de oro dado el pequeño tamaño de las mismas y el factor de amplificación del equipamiento óptico utilizado. En cambio, si fue posible observar unas pequeñas protuberancias sobre los nanotubos de carbono que pueden ser atribuidas a la presencia de anticuerpos depositados sobre su superficie.

4.2. Optimización de la superficie nanoestructurada del inmunosensor

A los efectos de lograr la optimización de una plataforma futura de inmunosensor electroquímico, se decidió realizar un estudio acerca de los efectos que presentan la dispersión de los nanotubos de carbono y nanopartículas de oro depositados en el electrodo de trabajo sobre la corriente de pico de reducción del H_2O_2 , así como de la resistencia a la transferencia de carga del par redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1 mM en KCl 0,1 M. La finalidad del estudio fue encontrar la superficie que optimice la respuesta en corriente, para luego poder aumentar la sensibilidad del inmunosensor electroquímico. Se decidió realizar una optimización multivariable, dadas las ventajas que presenta esta clase de optimización. Como se trabajó con dos variables, se optó por un diseño experimental full factorial de tres niveles.

La superficie de los EIC fue modificada añadiendo dispersiones de NTC y NPAu, es decir, estas son las dos variables del experimento, mientras que los tres niveles elegidos fueron 4, 8 y 12 μL . El nivel más bajo que se eligió fue 4 μL , porque este es el volumen mínimo que alcanza a cubrir completamente el electrodo de trabajo. Por otro lado, hay que tener en cuenta que volúmenes mayores, 8 y 12 μL , fueron añadidos por etapas (de 4 μL cada una) y, en cada etapa, se realizó el secado en estufa tal cual se hizo durante la construcción del inmunosensor, por lo cual cada una de estas insumía un tiempo de 40 minutos, además de que volúmenes muy grandes pueden ocasionar el desprendimiento del nanocompósito. Así, aunque en principio se podría haber planteado trabajar con volúmenes mayores a 12 μL o incluso haber planteado un diseño factorial con más de tres niveles, se optó por emplear sólo 3 niveles (4, 8 y 12 μL) teniendo en cuenta estas consideraciones. Por lo tanto, el experimento requirió de la construcción de electrodos modificados donde los volúmenes de NTC y NPAu depositados variaran entre 4 y 12 μL .

En la Tabla 19 se muestra la matriz del diseño full factorial 3^2 , la cual indica las nueve modificaciones diferentes de la superficie de los EIC. Todas las modificaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 19. Volúmenes de dispersión de NTC y NPAu usados en la modificación de los EIC.

Electrodo	Vol. de NTC / μL	Vol. de NPAu / μL
EIC 1	4	4
EIC 2	4	8
EIC 3	4	12

Electrodo	Vol. de NTC / μL	Vol. de NPAu / μL
EIC 4	8	4
EIC 5	8	8
EIC 6	8	12
EIC 7	12	4
EIC 8	12	8
EIC 9	12	12

El diseño experimental se planteó eligiendo como señales de respuestas las corrientes de pico catódica y la resistencia a la transferencia de carga del par redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

4.2.1. Superficie de respuesta obtenida para la $I_{p,c}$

La metodología de superficies de respuesta (RSM) es una forma de analizar la influencia que las variables experimentales ejercen sobre la respuesta del sistema. La RSM es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que se utilizan para analizar y modelar la manera en que las variables de interés son influenciadas por otras (Box 1951). El objetivo es diseñar un experimento que pueda proporcionar valores razonables de la respuesta y así poder encontrar el modelo matemático que ajuste mejor los datos experimentales.

Las $I_{p,c}$ fueron determinadas para una solución 1 mM de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,1 M en KCl, mediante VC a una velocidad de barrido (v) de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ en el intervalo de -0,3 V a 0,45 V.

La Figura 75 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos para los EIC modificados con las dispersiones de NTC y NPAu a diferentes volúmenes tal como se indicaron en la Tabla 19. Las flechas indican la dirección del barrido de potencial.

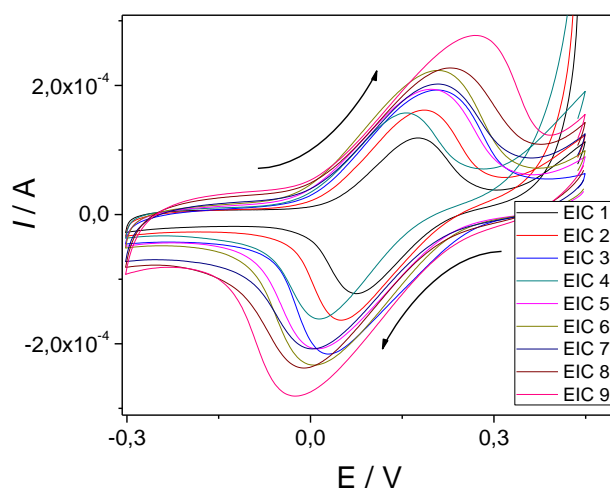


Figura 75. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para EIC modificados con diferentes volúmenes de dispersión de NTC y NPAu, utilizando $c^* = 1 \text{ mM}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Los valores de $I_{p,c}$ obtenidos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Corrientes de pico catódica ($I_{p,c}$) y diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico (ΔE_p) obtenidas para cada electrodo. Cada valor representa la media de tres medidas replicadas.

Electrodo	$I_{p,c} / \mu\text{A}$	Desv. estándar	$\Delta E_p / \text{mV}$	Desv. estándar
EIC 1	132,4	26,1	102	2
EIC 2	165,0	14,1	112	3
EIC 3	189,0	2,8	162	2
EIC 4	156,5	21,9	143	2
EIC 5	183,5	2,1	186	3
EIC 6	205,5	0,7	220	2
EIC 7	162,0	8,5	205	1
EIC 8	178,8	17,0	240	2
EIC 9	209,0	22,6	295	4

Los valores de $I_{p,c}$ aumentan al incrementarse los volúmenes de NTC y NPAu, mostrando un efecto de ambas dispersiones depositadas en los EIC sobre los valores de $I_{p,c}$. Los valores más grandes de $I_{p,c}$ se obtuvieron para los volúmenes más grandes de NTC y NPAu, debido a un incremento del área electroactiva. Por otro lado, la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico (ΔE_p) aumenta en el intervalo de 102 a 295 mV cuando se incrementan los volúmenes de NTC y NPAu depositados, entre los volúmenes mínimos y máximos, respectivamente. El incremento del ΔE_p se debe al incremento en la

resistencia a la transferencia de carga para la reacción electroquímica del par rédox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$.

La superficie de respuesta obtenida para los valores de $I_{p,c}$ se muestra en la Figura 76. La misma se ajustó utilizando un modelo lineal.

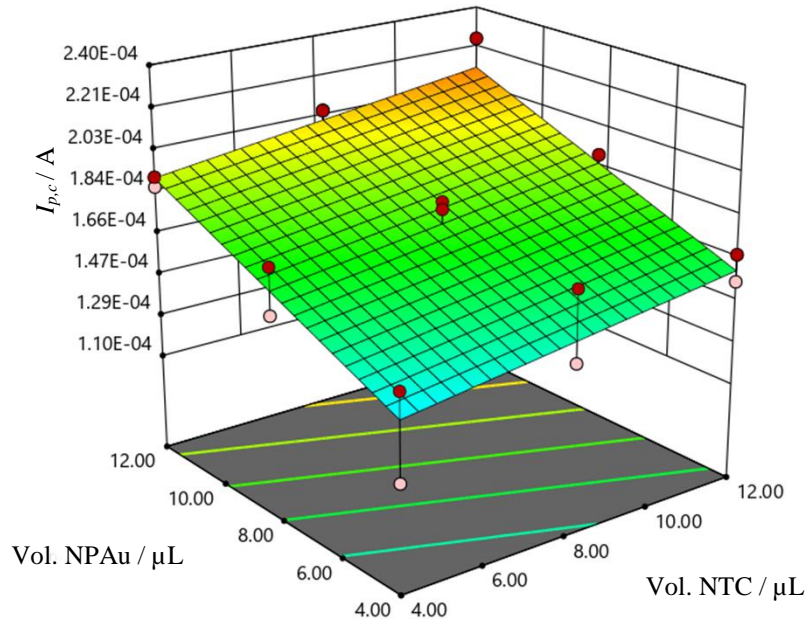


Figura 76: Gráfico de superficie de respuesta de $I_{p,c}$ como función del volumen de dispersión de NTC y NPAu. Las esferas son los valores experimentales obtenidos para cada electrodo.

El polinomio lineal utilizado para ajustar la $I_{p,c}$ del sistema para diferentes modificaciones de los EIC es:

$$I_{p,c} = 1,041 \times 10^{-4} + 2,6 \times 10^{-6} * V_{NTC} + 6,4 \times 10^{-6} * V_{NPAu} \quad (9)$$

Donde V_{NTC} y V_{NPAu} son los volúmenes de dispersión de NTC y NPAu. Como se observa en la ecuación precedente, el efecto de las variaciones de los volúmenes de dispersión de NTC y NPAu son independientes entre sí y no existen efectos cuadráticos, por lo tanto, se puede afirmar que ambas variables son independientes. Una hipótesis que justifica dicho comportamiento es el aumento del área electroactiva del electrodo debido a la conectividad eléctrica producida en el ensamblado de los NTCs y NPAu.

Los parámetros estadísticos del modelo se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Parámetros estadísticos obtenidos por el ajuste de la superficie de respuesta usando el modelo lineal.

	F	Prob. valor p > F
Modelo	24,12	< 0,0001
Falta de ajuste	0,32	0,9078
$R^2 = 0,7312$		

Utilizando este modelo lineal para ajustar se obtuvo un R^2 ajustado de 0,7312. El valor F del modelo de 24,12, lo que implica que el modelo es significativo. El valor F de la falta de ajuste del modelo fue de 0,32, lo que implica que la falta de ajuste es no significativa en relación al error puro.

4.2.2. Superficie de respuesta obtenida para la R_{tc}

La EIE tiene la ventaja de investigar al sistema bajo condiciones cuasi estacionarias, en comparación con las técnicas amperométricas, y arroja valiosa información acerca de las propiedades interfaciales de la superficie de los electrodos modificados. La EIE se realizó para analizar los cambios en las propiedades superficiales del electrodo cuando se agregaron las dispersiones de NTC y NPAu. Los espectros de impedancia fueron realizados al potencial de circuito abierto (E_{ca}) con una amplitud de onda de 0,010 V en el intervalo de frecuencias de 50 kHz a 500 mHz. Los gráficos de Nyquist se utilizaron para determinar los valores de R_{tc} . El circuito equivalente que se muestra en la Figura 77 fue utilizado para ajustar los espectros de impedancia.

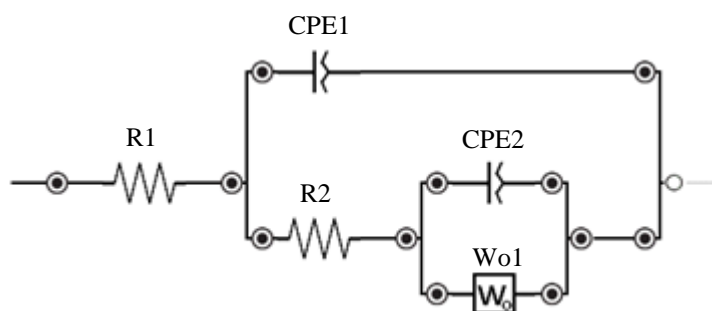


Figura 77. Circuito eléctrico equivalente utilizado para ajustar los espectros.

Este circuito equivalente tiene en cuenta la modificación de la superficie. CPE1 es un elemento de fase constante que representa un capacitor no ideal, y se puede considerar como una combinación en serie de la capacitancia de la doble capa eléctrica y la capacitancia

debida a la modificación de la superficie; CPE2 representa otro elemento de fase constante relacionado con los grupos funcionales oxigenados presentes en los NTC; y Wo1 es el elemento de Warburg open asociado con la difusión finita a través de la estructura de los NTC. R1 y R2 son la resistencia de la solución y a la transferencia de carga, respectivamente (Casero 2012).

En la Figura 78 se muestran los gráficos de Nyquist obtenidos junto con los correspondientes espectros ajustados para los electrodos modificados según se indica en la Tabla 19.

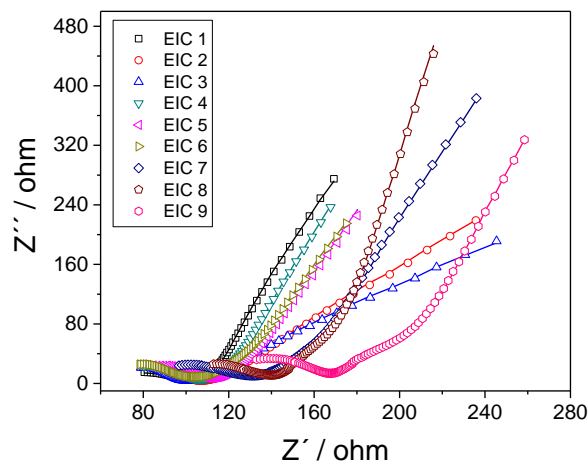


Figura 78. Espectros de impedancia de los EIC modificados.

En la región de altas frecuencias (entre 50 kHz y 250 Hz aprox.), se encuentra un semicírculo característico de una etapa de transferencia de carga bajo control cinético sobre la superficie del electrodo. A frecuencias menores de 10 Hz, los gráficos de Nyquist muestran una relación lineal entre Z' y Z'' , lo que indica que el sistema se encuentra bajo control difusional. Del diámetro del semicírculo se obtiene el valor de R_{tc} . Un cambio en la R_{tc} se debe a la modificación de la superficie del electrodo, así, cuando la superficie del electrodo se bloquea parcialmente, el valor de R_{tc} aumenta con respecto con respecto a la superficie menos bloqueada. Por otro lado, de la intersección del semicírculo con el eje de Z' se obtiene el valor de R_s . El valor de R_s que se obtuvo, en promedio para todos los electrodos, fue de 35 ± 5 ohm, cercano al obtenido por medidas de conductividad (Bockris 2002), lo que indica el correcto rendimiento del sistema electroquímico. Los valores de R_{tc} obtenidos para todas las modificaciones de los EIC junto con sus desviaciones estándar se muestran en la Tabla 22. No se aprecia una dependencia lineal entre los valores de R_{tc} y el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

volumen de dispersión de NTC y NPAu lo que, en principio, indicaría la existencia de interacciones entre los NTC y NPAu.

Tabla 22. Resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) obtenidas para cada electrodo. Cada valor representa la media de tres medidas replicadas.

Electrodo	R_{tc} / ohm	Desv. estándar
EIC 1	68,8	0,2
EIC 2	74,4	2,4
EIC 3	68,5	3,7
EIC 4	77,0	10,7
EIC 5	81,2	8,5
EIC 6	77,2	5,3
EIC 7	114,1	3,5
EIC 8	112,6	3,6
EIC 9	139,6	0,9

La superficie de respuesta de la resistencia a la transferencia de carga se ajustó a partir de un modelo cuadrático, obteniéndose la superficie mostrada en la Figura 79. Los parámetros estadísticos del ajuste se muestran en la Tabla 23.

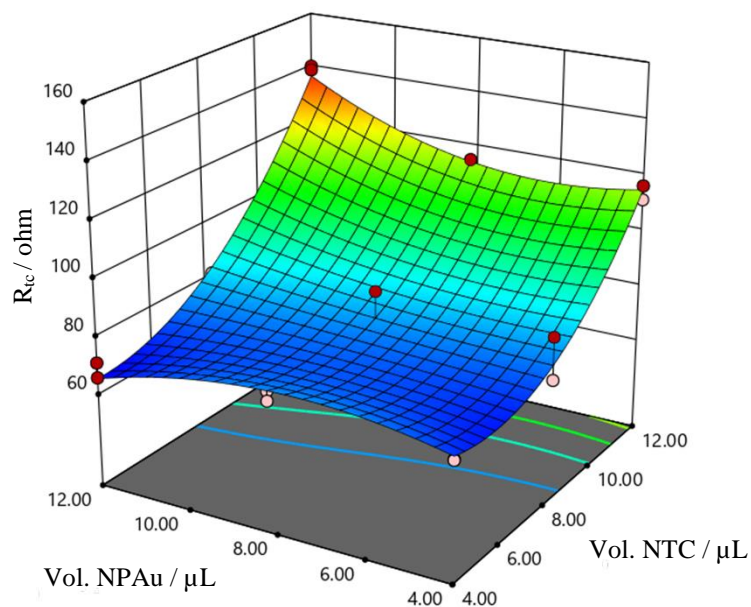


Figura 79. Gráfico de superficie de respuesta de R_{tc} como función del volumen de dispersión de NTC y NPAu. Las esferas son los valores experimentales obtenidos para cada electrodo.

Esta superficie se ajustó mediante el siguiente polinomio de segundo orden:

$$R_{tc} = 54,10 - 6,34 * V_{NTC} + 16,34 * V_{NPAu} - 2,09 * V_{NTC} * V_{NPAu} + 1,12 * V_{NTC}^2 - 1,16 * V_{NPAu}^2 + 0,16 * V_{NTC} * V_{NPAu}^2 \quad (10)$$

Tabla 23. Parámetros estadísticos obtenidos por el ajuste de la superficie de respuesta utilizando el modelo cuadrático.

	F	Prob. valor p > F
Modelo	43,56	< 0,0001
Falta de ajuste	2,8	0,1108
R ² = 0,9376		

Los valores de F obtenidos indican que el modelo es significativo y que la falta de ajuste es no significativa en relación al error puro. La cinética a la transferencia de carga del par redox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ disminuye al aumentar R_{tc} , cuando aumenta el volumen de NTC depositados sobre la superficie del electrodo. Este comportamiento es consistente con el aumento de ΔE_p al aumentar el volumen de NTC. Así, uno puede suponer que cuanto mayor es el volumen de NTC, se genera una superficie más resistiva, con mayor área, para la descarga del par redox bajo estudio. Además, del ajuste realizado se observa la existencia de interacciones entre ambos factores (NTC y NPAu), así como la existencia de efectos cuadráticos (Vera Candiotti 2014). Por otra parte, el volumen de NPAu no ejerce un efecto apreciable sobre la resistencia.

4.2.3. Determinación de la superficie óptima

La mejor composición de NTC+NPAu (en el intervalo de volúmenes estudiado) para la modificación de la superficie de los EIC, se determinó en base a dos factores, $I_{p,c}$ y R_{tc} . Una mayor cantidad de NTC sobre la superficie del electrodo incrementa el área, lo cual permite una mayor inmovilización de NPAu y, por lo tanto, de anticuerpos. Así, se pueden desarrollar inmunosensores electroquímicos con un intervalo analítico más amplio. No obstante, cuando aumenta la cantidad de NTC sobre la superficie, la R_{tc} también se incrementa. Por lo tanto, es necesario hallar la mejor relación entre NTC y NPAu que permita una menor R_{tc} y una mayor $I_{p,c}$ cuando se diseña un inmunosensor electroquímico.

Por tal motivo, se analizó la función deseabilidad, buscando maximizar la $I_{p,c}$ y minimizar la R_{tc} del par redox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. Esta función permite hallar las condiciones que cumplan con los criterios de todas las respuestas involucradas y proporciona

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los mejores valores de compromiso en la región de respuesta conjunta deseable. La función deseabilidad obtenida se muestra en la Figura 80.

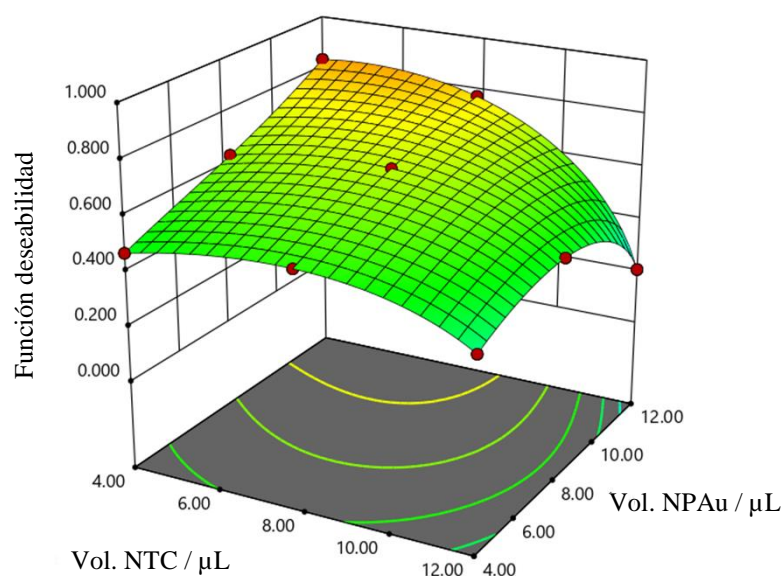


Figura 80. Función deseabilidad para los EIC modificados con dispersiones de NTC y NPAu. Las esferas son los valores obtenidos para cada electrodo.

Un intervalo de volúmenes de dispersión de NTC entre 5 y 5,5 μL y un volumen de 12 μL de dispersión de NPAu son los que alcanzan un máximo de la función deseabilidad (Tabla 24). Una superficie modificada con estos volúmenes de NTC y NPAu permite, en primer lugar, una corriente máxima y una resistencia a la transferencia de carga mínima y, en segundo lugar, una superficie con alta concentración de NPAu que va a permitir la inmovilización de mayores concentraciones de anticuerpo.

Tabla 24. Combinaciones de volúmenes de NTC y NPAu que producen mayores valores de la función deseabilidad.

Volumen de NTC / μL	Volumen de NPAu / μL
4,99	12
5,09	12
5,41	12

4.2.4. Discusión

Se realizaron estudios para comprender como varían la respuesta amperométrica y la resistencia a la transferencia de carga en función de la composición de la superficie. La optimización se realizó empleando un planteo de diseño experimental full factorial con dos

factores de tres niveles (3^2), en los cuales se variaron simultáneamente los volúmenes de NTC y NPAu empleados en la modificación del electrodo de trabajo y se registró la correspondiente respuesta. Como producto de este análisis se obtuvo una superficie de respuesta que mostró que la corriente de pico de reducción del par rédox aumenta a medida que la cantidad de NTC y NPAu empleados aumenta, y que ambos factores son independientes entre sí. Al estudiar la resistencia a la transferencia de carga, la respuesta se modeló empleando un modelo cuadrático, y se encontró la existencia de interacciones entre el volumen de NTC y NPAu utilizados, así como la presencia de efectos cuadráticos. En rasgos generales, se encontró que un mayor volumen de NTC ocasionó un incremento en la resistencia a la transferencia de carga mientras que las NPAu no presentaron un efecto muy marcado. Finalmente, y en vista a estos resultados, a la hora de realizar una optimización del inmunosensor electroquímico, se decidió considerar una situación de compromiso entre una mayor señal amperométrica y la menor resistencia a la transferencia de carga posible, para lo cual se graficó la función deseabilidad considerando estos parámetros. Se encontró, como valores óptimos, 5 μL de dispersión de NTC y 12 μL de dispersión de NPAu. Esta superficie nanoestructurada parece ser prometedora para la construcción de futuros inmunosensores.

4.3. Patulina

Continuando en la línea de los estudios realizados por el Dr. Gerardo Chanique en el marco de su tesis doctoral, en la que se realizaron estudios acerca del comportamiento electroquímico de PAT y se desarrollaron metodologías analíticas basadas en técnicas voltamperométricas para su determinación en alimentos (Chanique 2012, Chanique 2013), se procedió a la construcción de un inmunosensor impedimétrico para cuantificar PAT en muestras reales.

4.3.1. Construcción del inmunosensor impedimétrico para la detección de PAT

Los sensores impedimétricos son un tipo de sensores que vienen ganando cada vez mayor importancia. Aunque no lleguen a alcanzar las sensibilidades logradas por los sensores voltamperométricos y amperométricos, los sensores impedimétricos presentan una gran ventaja por sobre los anteriores, y es que permiten la construcción de sensores sin necesidad de tener que marcar el analito. Así, se pueden construir inmunosensores electroquímicos sin marcar el antígeno (o el anticuerpo, según la manera en que esté

construido el sensor) y llevar a cabo un inmunoensayo en un formato no competitivo. Esto es una ventaja muy importante, dado que por lo general los antígenos, y en especial los anticuerpos, son reactivos costosos y no siempre se dispone de ellos en cantidad. Al cambiar la cantidad de antígeno (o anticuerpo) depositado sobre la superficie del inmunosensor electroquímico, este cambio se traduce en una variación de la R_{tc} que puede ser registrada.

Para construir el inmunosensor impedimétrico para determinar PAT, se decidió modificar la superficie del electrodo de carbono vítreo (ECV) con óxido de grafeno (OG). Así, se agregaron 5 μL de la dispersión de OG:H₂O 2:1 (ver sección 3.1) y se secó en estufa a 41°C durante 15 minutos. El grafeno es un nanomaterial que consiste en nanoláminas de carbono de pocas capas en las cuales los átomos de carbono están ordenados en una estructura hexagonal 2D. Uno de los derivados de grafeno es el óxido de grafeno (OG), el cual es una forma de grafeno oxidada parcialmente que posee unidos de forma covalente grupos funcionales oxigenados como hidroxilos, epoxi y carboxilos. Estos grupos funcionales le confieren al OG una mayor hidrofiliidad. Además, estos grupos constituyen sitios reactivos que permiten de manera sencilla la funcionalización del OG (Wang 2017). El grafeno, el OG y otros derivados, son materiales muy interesantes y utilizados en el campo de los biosensores debido a sus propiedades estructurales y físico-químicas. Poseen una alta movilidad electrónica, altas velocidades de transferencia electrónica y una gran relación superficie-volumen, lo que los vuelve muy útiles como sustrato para anclar elementos de biorreconocimiento de sensores electroquímicos (Zambare 2017, Zhang 2017a).

Para inmovilizar el pAb-PAT sobre el OG, con la finalidad de generar un inmunosensor electroquímico para la detección y cuantificación de PAT, sobre la superficie del ECV modificado con óxido de grafeno se agregaron 5 μL de NHS 50 mM y 5 μL de EDC 100 mM, ambas en SAF 0,1 M, pH 7,5 y se lo dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. La EDC reacciona con los grupos carboxilos presentes en el OG formando un éster reactivo intermediario (*O*-acilisourea), el cual reacciona con NHS para producir un éster semi-estable reactivo a grupos amino. Esta estrategia de activación permite la posterior unión covalente de los grupos funcionales amino presentes en las inmunoglobulinas, resultando en la formación de enlaces amida entre el OG y los anticuerpos (Maraldo 2007, Roy 2011, Vashist 2012, Li 2016a, Sharma 2017, Welch 2017).

Se enjuagaron los electrodos con SAF 0,1 M, pH 7,5 para eliminar el exceso de NHS/EDC que permaneció sin reaccionar y, a continuación, se agregaron a cada electrodo 5 μL de una dilución de pAb-PAT 1:40 en SAF 0,1 M pH 7,5 y se incubó en cámara húmeda

a 4 °C durante 24 hs (Crowther 1995). Los grupos -NH₂ libres de los anticuerpos son capaces de unirse covalentemente a los grupos que contienen oxígeno activados previamente mediante NHS/EDC, asegurando la fijación de los anticuerpos a la superficie de ECV-OG. A continuación, se volvió a enjuagar el electrodo con SAF 0,1 M y se agregaron a cada electrodo 5 µL de una solución de PAT en SAF 0,1 M. Se incubó durante 1 hora a 32 °C y, al finalizar la incubación, se lavó el inmunosensor impedimétrico con SAF 0,1 M para remover la patulina que no haya formado complejo con el anticuerpo inmovilizado sobre la superficie del ECV.

Las determinaciones impedimétricas del analito se realizaron utilizando una celda electroquímica de tres electrodos, empleando un electrodo de Ag/AgCl como referencia y un contraelectrodo de alambre de platino. Como prueba rédox se utilizó una solución de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 10 mM en KCl 0,1 M.

A continuación, se presenta el esquema del inmunosensor impedimétrico (Figura 81).

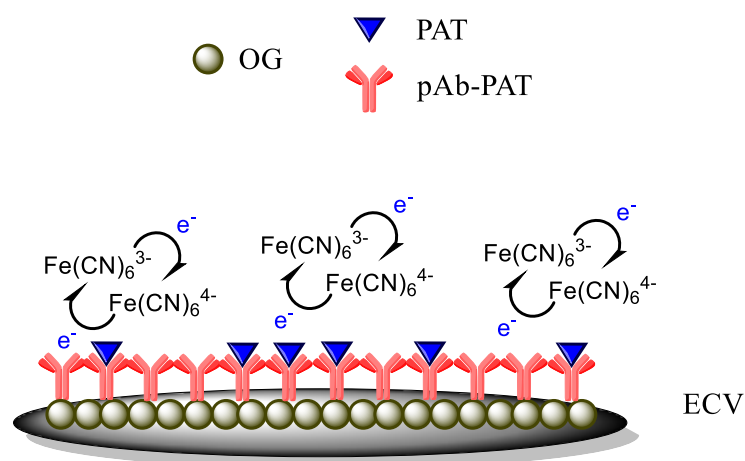


Figura 81. Esquema del inmunosensor impedimétrico para la detección de PAT.

Previo a realizar la curva de calibración y optimizar la dilución de anticuerpo, se analizaron los efectos de cada etapa de construcción del inmunosensor impedimétrico mediante VC y EIE.

Se tomaron voltamperogramas cíclicos al par rédox K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 10 mM, 0,1 M KCl, sobre ECV y ECV-OG (Figura 82). Los voltamperogramas fueron registrados bajo las siguientes condiciones: E_i = -0,3 V; E_f = 0,7 V; velocidad de barrido = 50 mV/s.

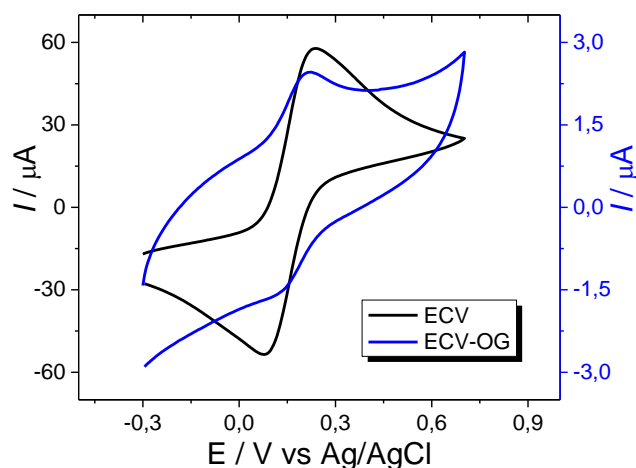


Figura 82. Voltamperogramas cíclicos del par rédox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M sobre ECV y ECV-OG.

Como se puede observar, al modificar el ECV con OG se produce una pasivación de la superficie, conduciendo a una abrupta disminución de la corriente. La corriente de pico anódica, por caso, disminuye desde los 60 μA hasta casi 2,5 μA . Además, se observa una disminución en el ΔE_p tras agregar OG, lo cual indica que parte del par ferrocianuro/ferricianuro se adsorbe sobre la superficie porosa y nanoestructurada de ECV-OG. Los análisis de EIE se realizaron sobre el mismo par rédox mencionado anteriormente. Los espectros se registraron al potencial de circuito abierto E_{ca} (determinado tras un registro del potencial de 240 s) con 10 mV de perturbación, y un intervalo de frecuencias desde 200 kHz a 100 mHz. Se analizaron los siguientes electrodos: ECV; ECV-OG; ECV-OG-pAb-PAT (1:160); y ECV-OG-pAb-PAT (1:160)-PAT (100 ng mL⁻¹) (Figura 83).

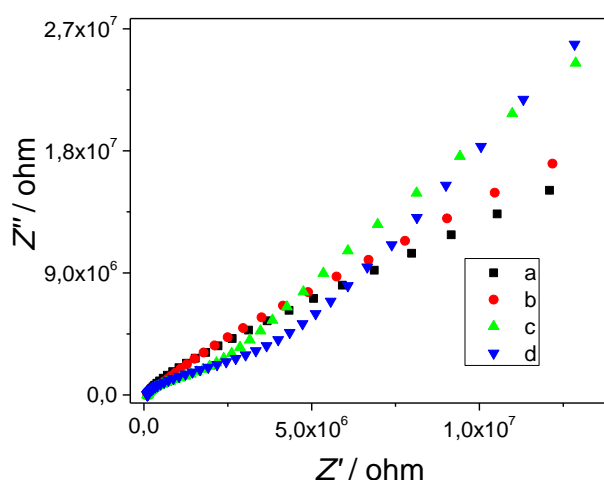


Figura 83. Espectros de impedancia del par rédox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ sobre: a) ECV; b) ECV-OG; c) ECV-OG-pAbPAT 1:160; d) ECV-OG-pAbPAT 1:160-PAT 100 ng mL⁻¹.

Al analizar los gráficos de Nyquist anteriores no se observan diferencias significativas entre ECV y ECV-OG en los semicírculos (región de altas frecuencias), aunque sí hay una pequeña diferencia en las pendientes en la región de control difusional. Al agregar el anticuerpo pAb-PAT dilución 1:160 se produce un aumento en la resistencia del sensor, y aparece el semicírculo correspondiente a la resistencia a la transferencia de carga. Al incubar PAT de concentración de 100 ng mL^{-1} sobre el sensor anterior, el mismo se vuelve menos conductor tras la formación del complejo Ab-Ag, y se produce un aumento en la R_{tc} .

El conjunto de estudios anteriores permite confirmar que las etapas de construcción del inmunosensor para la detección de PAT fueron exitosas.

4.3.2. Optimización de la dilución de pAb-PAT

Corroborada la correcta construcción del inmunosensor, se procedió a optimizar la dilución de pAb-PAT utilizada. Para ello se construyeron 3 sensores modificando los ECV como se indica en la Tabla 25.

Tabla 25. Esquema de modificación de los ECV, indicando la dilución de pAb-PAT utilizada.

ECV	1	2	3
OG	SI	SI	SI
dilución pAb-PAT	1:160	1:80	1:40
PAT 100 ng mL^{-1}	SI	SI	SI

Se tomaron espectros de impedancia antes y después de la etapa de incubación de PAT, utilizando el par rédox previamente mencionado. Los espectros se registraron al potencial de circuito abierto E_{ca} , con una perturbación de 10 mV, y un intervalo de frecuencias entre 200 kHz y 100 mHz. Los espectros obtenidos se muestran en las Figuras 84-86.

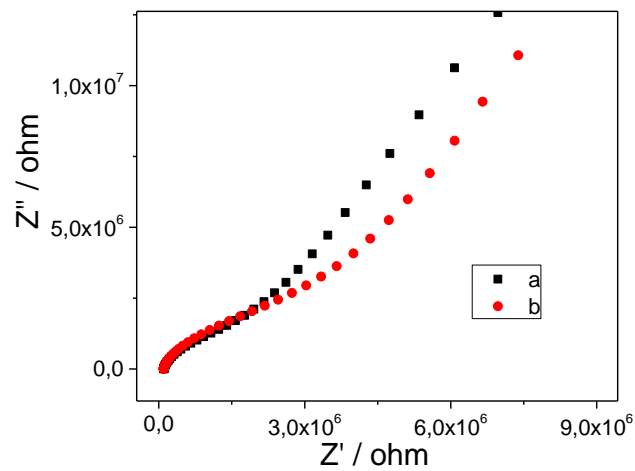


Figura 84. Espectros de impedancia sobre: a) ECV-OG-pAbPAT 1:160; b) ECV-OG-pAbPAT 1:160-PAT 100 ng mL⁻¹.

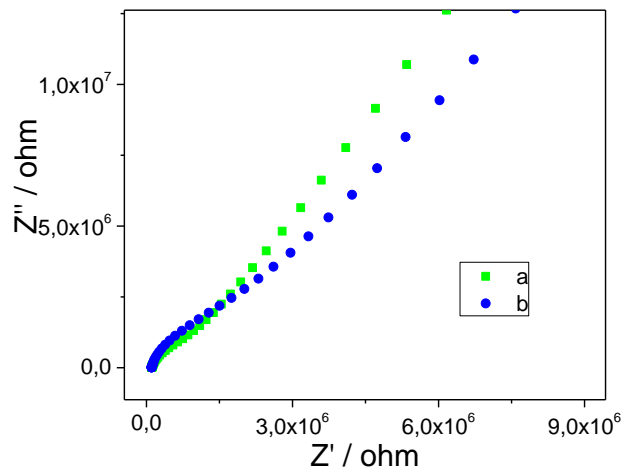


Figura 85. Espectros de impedancia sobre: a) ECV-OG-pAbPAT 1:80; b) ECV-OG-pAbPAT 1:80-PAT 100 ng mL⁻¹.

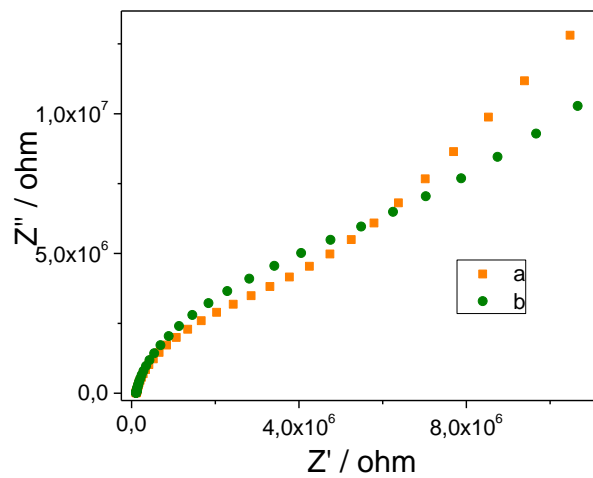


Figura 86. Espectros de impedancia sobre: a) ECV-OG-pAbPAT 1:40; b) ECV-OG-pAbPAT 1:40-PAT 100 ng mL⁻¹.

Se observa que para las tres diluciones de pAb-PAT empleadas se produce un aumento en la R_{tc} tras la incubación de PAT, lo cual es el comportamiento esperado. Entre las diluciones del anticuerpo 1:160 y 1:80 no se aprecia una gran diferencia de tamaño en los semicírculos del gráfico de Nyquist, lo cual puede deberse a que los anticuerpos se encuentran bastante diluidos. En cambio, al pasar a la dilución de 1:40, se puede apreciar un cambio debido al aumento en la R_{tc} , dado que existe mayor concentración de anticuerpo, el que consiste en una macromolécula no conductora, y produce una mayor pasivación en la superficie del sensor y el mismo se vuelve más resistivo. Además, y probablemente debido a esta misma razón, en la dilución 1:40 de pAb-PAT es donde se produce un mayor aumento en la R_{tc} luego de la incubación de PAT 100 ng mL^{-1} , lo que parece indicar que en las diluciones de anticuerpo más bajas la saturación con PAT se alcance a muy bajas concentraciones.

En vista de estos resultados, se decidió construir el inmunosensor impedimétrico empleando una dilución de pAb-PAT de 1:40.

4.3.3. Construcción de la curva de calibración en SAF 1 mM

Utilizando el procedimiento descrito en la sección 4.3, y habiendo optimizado la dilución de pAb-PAT, se realizó una curva de calibración. Para ello se trabajó con seis ECV, utilizando pAb-PAT en una dilución 1:40 en SAF 1 mM, pH 7,5, y las concentraciones de PAT que se detallan en la Tabla 26, preparadas en la misma solución reguladora.

Tabla 26. Concentraciones de PAT empleadas en la construcción del inmunosensor impedimétrico.

ECV	1	2	3	4	5	6
PAT (ng mL^{-1})	1×10^{-3}	1×10^{-2}	0,1	1	10	100

Construidos los inmunosensores, se registraron los espectros de impedancia electroquímica previa y posteriormente a la incubación de PAT para cada electrodo, utilizando el par rédox mencionado.

Previo a medir cada espectro, se tomó un voltamperograma cíclico a la misma solución con cada uno de los electrodos para estabilizar las cargas superficiales de los mismos. Los voltamperogramas cíclicos fueron realizados con las condiciones siguientes: $t_{\text{equil.}} = 10 \text{ s}$; $E_i = -0,3 \text{ V}$; $E_f = 0,7 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; N° de ciclos = 5.

En las Figuras 87 y 88 se muestran los voltamperogramas correspondientes al último ciclo de los sensores sin PAT y con PAT, respectivamente.

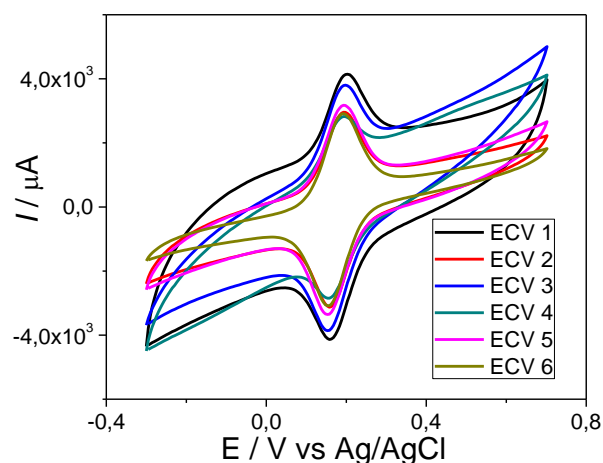


Figura 87. Voltamperogramas cíclicos de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40, sin PAT.

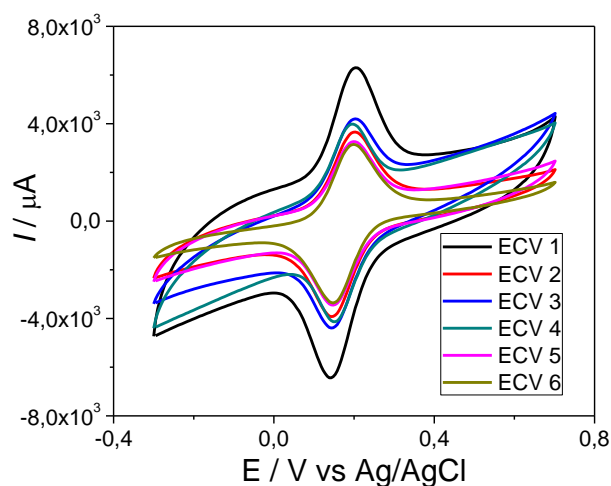


Figura 88. Voltamperogramas cíclicos de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40. Concentración de PAT: 1) $1 \times 10^{-3} \text{ ng mL}^{-1}$; 2) $1 \times 10^{-2} \text{ ng mL}^{-1}$; 3) $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$; 4) 1 ng mL^{-1} ; 5) 10 ng mL^{-1} ; 6) 100 ng mL^{-1} .

Se puede observar en los voltamperogramas anteriores la gran adsorción de la sonda rédox sobre la superficie del sensor, sin duda debido a la presencia del óxido de grafeno.

Los espectros obtenidos sin PAT y con PAT se muestran en las Figuras 89 y 90, respectivamente.

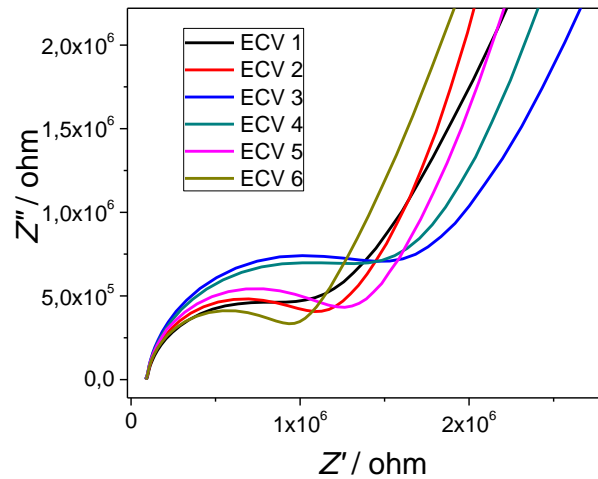


Figura 89. Espectros de impedancia electroquímica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M sobre: ECV 1-6: pAb-PAT 1:40, sin PAT. $E = E_{ca}$.

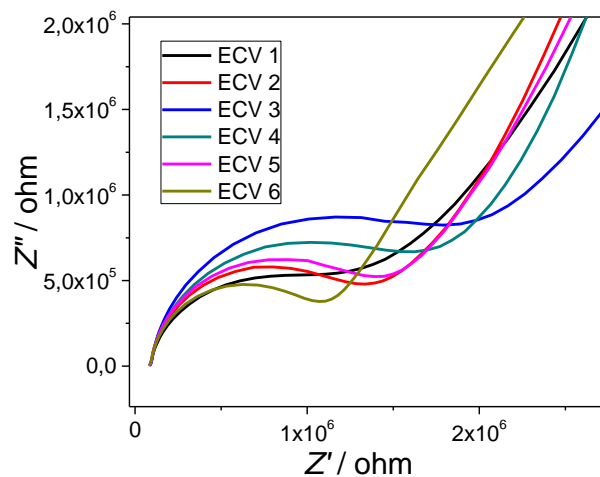


Figura 90. Espectros de impedancia electroquímica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $E = E_{ca}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40. Concentración de PAT: 1) 1×10^{-3} ng mL $^{-1}$; 2) 1×10^{-2} ng mL $^{-1}$; 3) 0,1 ng mL $^{-1}$; 4) 1 ng mL $^{-1}$; 5) 10 ng mL $^{-1}$; 6) 100 ng mL $^{-1}$.

Los espectros fueron ajustados mediante el circuito eléctrico equivalente mostrado en la Figura 77, utilizando el software EIS Analyzer. Como se observa en la Figura 89, existen variaciones en las R_{tc} de inmunosensor a inmunosensor, aun cuando han sido modificados de la misma manera. Estas variaciones fueron atribuidas a una modificación no uniforme de la superficie del electrodo en los diferentes inmunosensores preparados a causa de problemas inherentes para depositar las soluciones de manera homogénea. Por tal motivo, se decidió normalizar la R_{tc} obtenida para cada concentración de PAT con respecto a cada inmunosensor previo a la incubación de PAT.

En la Tabla 27 se muestran los valores de los parámetros determinados mediante el ajuste con el circuito eléctrico equivalente junto con el ΔE_p , para una de las mediciones.

Tabla 27. Parámetros del circuito equivalente determinados para una medición de la curva de calibración.

ECV		1	2	3	4	5	6
R_{tc} / ohm	sin PAT	632	1850	1073	1258	1456	1099
	con PAT	768	2204	1258	1452	1751	1268
R_s / ohm	sin PAT	104	102	99	98	100	98
	con PAT	97	97	95	96	96	99
P1 / F	sin PAT	1,77x10 ⁻⁶	1,02x10 ⁻⁶	1,12x10 ⁻⁶	1,29x10 ⁻⁶	1,25x10 ⁻⁶	1,41x10 ⁻⁶
	con PAT	1,64x10 ⁻⁶	1,03x10 ⁻⁶	1,21x10 ⁻⁶	1,41x10 ⁻⁶	1,37x10 ⁻⁶	1,13x10 ⁻⁶
n1	sin PAT	0,89	0,91	0,92	0,91	0,92	0,92
	con PAT	0,90	0,92	0,92	0,91	0,91	0,94
P2 / F	sin PAT	7,56x10 ⁻⁵	7,36x10 ⁻⁵	7,58x10 ⁻⁵	5,40x10 ⁻⁵	5,25x10 ⁻⁵	5,25x10 ⁻⁵
	con PAT	7,01x10 ⁻⁵	8,69x10 ⁻⁵	7,78x10 ⁻⁵	6,55x10 ⁻⁵	5,97x10 ⁻⁵	1,52x10 ⁻⁴
n2	sin PAT	0,69	0,70	0,69	0,74	0,76	0,79
	con PAT	0,60	0,63	0,66	0,71	0,72	0,54
Wor1 / ohm s^{-0,5}	sin PAT	5480	16686	11928	11045	11266	10781
	con PAT	4899	14230	13067	9648	11140	4240
Woc1	sin PAT	0,73	0,66	0,54	0,56	0,64	0,53
	con PAT	0,89	0,88	0,76	0,74	0,84	4,46
ΔE_p / mV	sin PAT	40,24	50,32	35,24	35,24	35,24	35,24
	con PAT	45,31	65,47	45,31	40,24	55,39	110,70

Al analizar como varían cada uno de los parámetros del circuito equivalente tras el agregado de PAT, se observa que la R_s permanece constante (alrededor de los 100 ohm), lo cual es de esperar ya que no existen cambios en la composición de la solución. Lo mismo se observa para los parámetros P1 y n1, que son constituyentes del elemento de fase constante CPE1, el cual representa a la capacitancia de la doble eléctrica, donde P1 es un factor pre-exponencial (expresado en F), y n1 es el término exponencial. Los parámetros P2 y n2 constituyen el término CPE2, que representa la contribución de los grupos oxidados sobre la superficie; mientras que los términos Wor1 y Woc1 representan el elemento de impedancia de Warburg open, siendo Wor1 un factor pre-exponencial (de unidades ohm s^{-0,5}) y Woc1 un término exponencial. Los parámetros P2 y n2 permanecen esencialmente sin cambios tras el agregado de PAT, lo mismo los elementos difusionales, salvo para el caso del electrodo 6. En cambio, la variación en la R_{tc} tras el agregado de PAT es más importante (en términos relativos), y se observa una tendencia definida, ya que al agregar PAT la R_{tc} aumenta, lo cual es el comportamiento esperado. El comportamiento constante de los parámetros del circuito equivalente, a excepción de la R_{tc} , indica que la variación de la respuesta es debida a la presencia de PAT, no así de alguna etapa de formación del inmunosensor.

Para la realización de la curva de calibración, cada punto fue realizado por triplicado. La curva se construyó como el grado de unión B/B_0 en función de la concentración de PAT, en escala logarítmica (Figura 91). B es la R_{tc} normalizada (R_{tc} del inmunosensor con PAT sobre R_{tc} del inmunosensor sin PAT) para una concentración de PAT dada y B_0 es la R_{tc} normalizada que corresponde a la menor concentración de PAT.

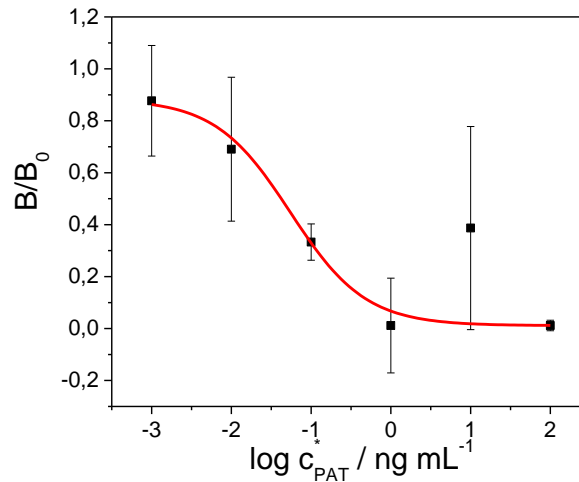


Figura 91. Curva de calibración para PAT. Parámetros de la curva: $IC_{50} = 54,8 \text{ pg mL}^{-1}$, $LD = 4,61 \text{ pg mL}^{-1}$, $p = -0,922$.

Se observa que el comportamiento de la curva de grado de unión es opuesto a lo que, generalmente, se esperaría para una curva basada en medidas de EIE, en la cual se espera que a medida que aumenta la concentración de antígeno se produzca un incremento en la R_{tc} . Al formarse el complejo antígeno-anticuerpo la R_{tc} aumenta respecto a la R_{tc} del inmunosensor sin PAT (blanco). En la Figura 92 se muestra la diferencia entre la R_{tc} del inmunosensor con PAT y la R_{tc} del blanco (ΔR_{tc}). Sin embargo, a medida que la concentración de PAT crece, en vez de aumentar el valor de R_{tc} se observa una disminución del mismo, con el valor de R_{tc} del inmunosensor con PAT tendiendo al valor de R_{tc} del blanco. Este comportamiento puede adjudicarse a, probablemente, un reajuste del complejo antígeno-anticuerpo. Este reajuste conlleva a que la transferencia electrónica del par redox se vea menos afectada, es decir, disminuye la R_{tc} , ya que no existen cambios significativos en los parámetros obtenidos en el circuito equivalente. Existen antecedentes en los cuales el aumento en la concentración de analito conduce a una disminución en la R_{tc} (Rushworth 2014), aunque la disminución de R_{tc} es desde el valor mismo obtenido del blanco, no como en este caso.

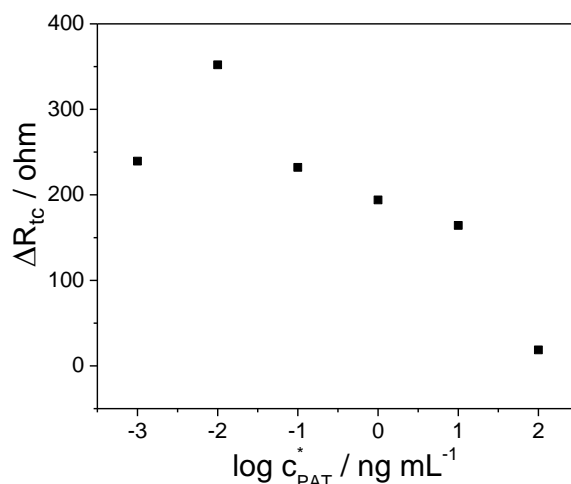


Figura 92. Aumento de R_{ct} producido por el agregado de PAT.

La curva de grado de unión de la Figura 91 muestra una forma sigmoidea típica de los procesos que están gobernados por la ley de acción de masas, por lo que se puede ajustar mediante la Ecuación 5. Las cifras de mérito del ajuste de la curva de calibración precedente son: $IC_{50} = 54,8 \text{ pg mL}^{-1}$ (IC_{50} es la inhibición que produce una disminución del 50% de la señal), $LD = 4,61 \text{ pg mL}^{-1}$, considerado como la concentración de PAT que produce un 80% de inhibición ($B/B_0 = 0,8$) y $p = -0,922$.

4.3.4. Construcción de la curva de calibración en jugo de manzana

Se tomaron alícuotas de una muestra de jugo de manzana comercial, marca Cepita, y se contaminaron ex profeso con PAT. Estas muestras fueron analizadas mediante el empleo de seis inmunosensores impedimétricos, utilizando el mismo protocolo que se empleó para la determinación de PAT en SAF. Las muestras de jugo de manzana se contaminaron con las concentraciones de PAT que se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Concentraciones de PAT en las muestras de jugo de manzana.

ECV	1	2	3	4	5	6
PAT (ng mL^{-1})	1×10^{-3}	1×10^{-2}	0,1	1	10	100

Las determinaciones se realizaron por triplicado, registrando para cada muestra los espectros de impedancia antes y después de la incubación de PAT. Los espectros obtenidos para las muestras de jugo de manzana sin PAT y con PAT se muestran en las Figuras 93 y 94, respectivamente.

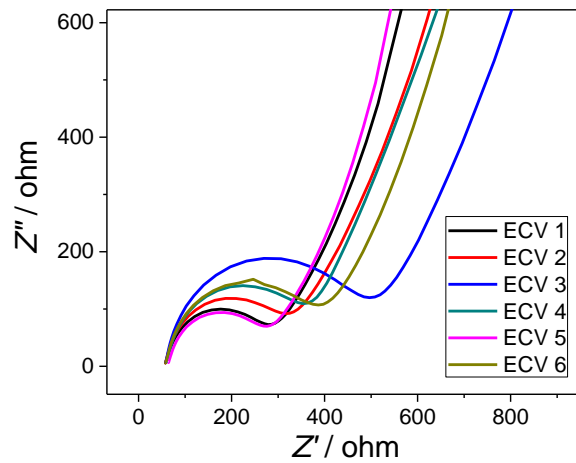


Figura 93. Espectros de impedancia electroquímica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $E = E_{ca}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40; sin PAT.

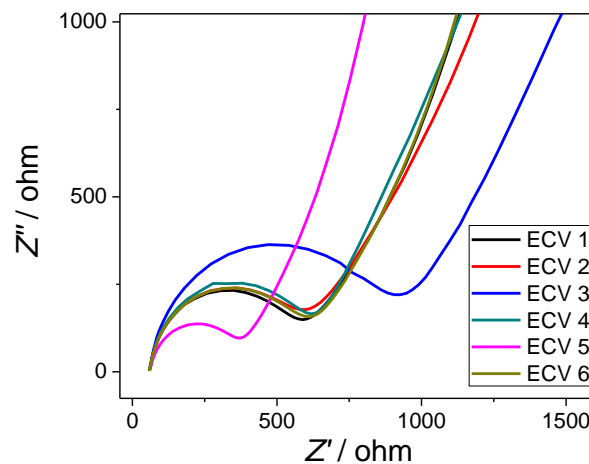


Figura 94. Espectros de impedancia electroquímica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0,1 M. $E = E_{ca}$. ECV 1-6: pAb-PAT 1:40. Concentración de PAT en jugo de manzana: 1) 1×10^{-3} ng mL⁻¹; 2) 1×10^{-2} ng mL⁻¹; 3) 0,1 ng mL⁻¹; 4) 1 ng mL⁻¹; 5) 10 ng mL⁻¹; 6) 100 ng mL⁻¹.

Un ajuste de los espectros mediante el circuito eléctrico equivalente previamente mencionado permitió calcular la R_{tc} para cada inmunosensor antes y después del agregado de PAT. A partir de los respectivos valores de resistencia normalizados, determinados por quintuplicado, se construyó una curva de grado de unión análoga a la determinada para los patrones de PAT en SAF. Esta nueva curva de calibración tiene la ventaja de tener en cuenta el efecto producido por la matriz de la muestra.

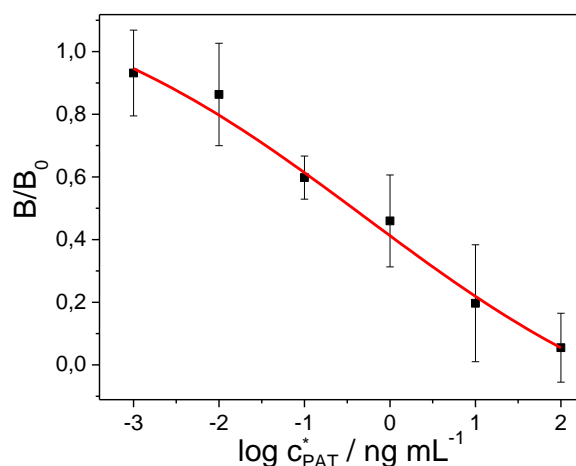


Figura 95. Curva de calibración para PAT en jugo de manzana. Cifras de mérito: $IC_{50} = 370 \text{ pg mL}^{-1}$, $LD = 9,82 \text{ pg mL}^{-1}$, $p = -0,225$.

En la Figura 95 se muestra la curva de calibración obtenida para las muestras de jugo de manzana contaminadas ex profeso. La misma presenta un comportamiento similar al observado para los patrones de PAT. El ajuste correspondiente proporciona las cifras de mérito siguientes: $IC_{50} = 370 \text{ pg mL}^{-1}$; $LD = 9,82 \text{ pg mL}^{-1}$, considerado como la concentración de PAT que produce un 80% de inhibición ($B/B_0 = 0,8$); $p = -0,225$. El LD es ligeramente superior al obtenido en SAF, indicando que existe un pequeño efecto de la matriz de la muestra.

El LD logrado con el inmunosensor impedimétrico es comparable a los logrados en publicaciones recientes. La Tabla 29 muestra el rendimiento del inmunosensor electroquímico frente a algunos de los métodos nombrados en la Tabla 5. Se puede observar que el inmunosensor desarrollado tiene uno de los límites de detección más bajos, con la ventaja de que el valor obtenido fue determinado en la misma matriz de la muestra.

Tabla 29. Límites de detección de PAT logrados en publicaciones recientes.

Matriz	LD	Técnica analítica	Año	Referencias
Jugo de manzana Jugo de pera Escamas de espino	$3,1 \mu\text{g L}^{-1}$	MIP-sensor MCC	2016	(Fang 2016)
Jugo de manzana	48 ng L^{-1}	Aptasensor	2016	(Wu 2016)
Jugo de manzana Jugo de pera Jugo de espino	$0,5 \mu\text{g L}^{-1}$	MIPs-SPE-HPLC	2016	(Yang 2016)
Jugo de manzana	$15 \mu\text{g L}^{-1}$ $6 \mu\text{g L}^{-1}$	On-line MISPE-HPLC Off-line MISPE-HPLC	2017	(Lhotská 2017)

Matriz	LD	Técnica analítica	Año	Referencias
Jugo de manzana	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	MSPE-HPLC	2017	(Yu 2017)
Solución reguladora	0,27 ng L^{-1}	Aptasensor	2018	(He 2018)
Jugo de manzana	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	SD-LLLME/HPLC	2018	(Li 2018c)
Jugo de manzana y uva	0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$	Aptasensor	2018	(Ma 2018)
Solución reguladora	3 ng L^{-1}	Aptasensor	2018	(Wu 2018)
Jugo de manzana	9,8 ng L^{-1}	Inmunosensor	2018	Presente trabajo

4.3.5. Ensayo de recuperación

El ensayo de recuperación se realizó construyendo un inmunosensor adicional al cual se le incubó una solución de PAT en jugo de manzana de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$. La concentración de PAT determinada en la muestra problema se muestra en la Tabla 30.

Tabla 30. Ensayo de recuperación de PAT.

$c^*_{\text{PAT}} \text{ real}$	$c^*_{\text{PAT}} \text{ determinada}$	% recuperación
$0,5 \text{ ng mL}^{-1}$	$(0,4 \pm 0,1) \text{ ng mL}^{-1}$	86%

La determinación, realizada por duplicado, mostró un porcentaje de recuperación del 86%, lo que indica el buen funcionamiento del inmunosensor impedimétrico, el cual se presenta como una herramienta potencialmente valiosa para la determinación de muestras reales de diferente naturaleza.

4.3.6. Determinación de patulina mediante HPLC

Para validar el funcionamiento del inmunosensor impedimétrico se determinó la concentración de PAT de una muestra de jugo de manzana contaminada con $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de PAT. Los 3 mL de extracto obtenidos según se indicó en la sección 3.1.10, se dividieron en 5 alícuotas de $600 \mu\text{L}$ con las cuales se prepararon igual cantidad de soluciones para realizar la determinación mediante el método de las adiciones de estándar (Tabla 31). Estas soluciones se prepararon adicionando $1000 \mu\text{L}$ de soluciones estándar de PAT en solución amortiguadora de acético.

Tabla 31. Soluciones de extracto de jugo de manzana contaminado con PAT.

Solución	Vol. de extracto de jugo de manzana fortificado / μL	Vol. de stock de PAT / μL	Vol. final / μL	$c^*_{\text{PAT}} / \text{ng mL}^{-1}$
1	600	1000	1600	1,56
2	600	1000	1600	2,50
3	600	1000	1600	3,44
4	600	1000	1600	6,25
5	600	1000	1600	15,63

Las medidas de HPLC se realizaron utilizando los parámetros descritos por Jalali y col. (Jalali 2010), esto es, fase móvil ACN/H₂O (1/10 v/v), flujo de 1,0 mL min⁻¹, volumen de inyección de 20 μL y detector de UV a 276 nm. En la Figura 96 se muestran los cromatogramas obtenidos.

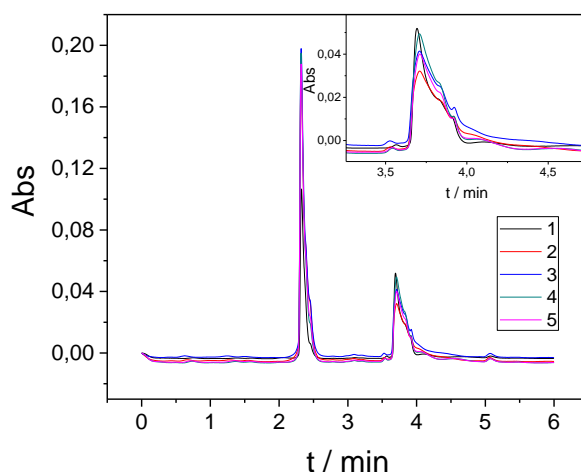


Figura 96. Cromatogramas de soluciones de PAT en ACN/H₂O (1/10 v/v), para concentraciones de PAT de: 1) 1,56, 2) 2,50, 3) 3,44, 4) 6,25, 5) 15,63 ng mL⁻¹.

En los cromatogramas se observan dos picos, el primero centrado a 2,38 min y el segundo a 3,80 min (ver gráfico inserto). El primer pico corresponde al 5-hidroximetilfurfural, compuesto que es el interferente más común en la determinación de PAT en jugos de manzana y productos derivados, y que normalmente está en concentraciones más elevadas que PAT por lo que puede ser una fuente de error importante (Chanique 2013). El segundo pico, a 3,80 min, es el correspondiente a PAT. Al graficar el área del pico de PAT en función de la concentración se obtuvo la siguiente curva de las adiciones de estándar, para una determinación realizada por triplicado:

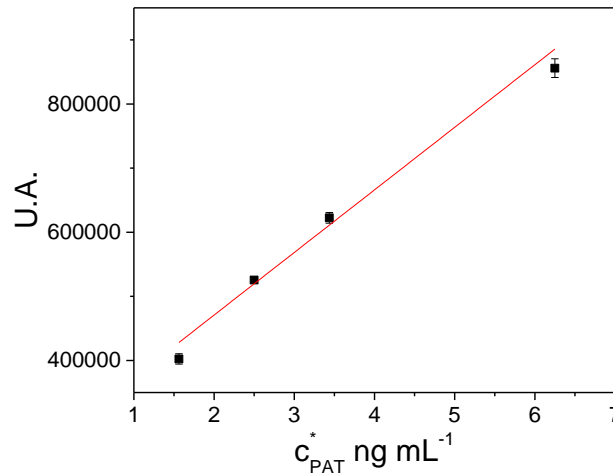


Figura 97. Curva de las adiciones estándar de PAT en ACN/H₂O 1/10 v/v. Pendiente = $(9,76 \pm 1,01) \times 10^4$ U.A. mL ng⁻¹. Ordenada al origen = $(2,76 \pm 0,29) \times 10^5$ U.A.

A partir de las cifras de mérito de la Figura 97 y de las diluciones hechas a partir del extracto se calculó la concentración de PAT de la muestra de jugo contaminada:

$$c_{PAT}^* = \frac{275573,60}{97614,94} \times \frac{1,6}{0,6} \times \frac{3}{40} = 0,565 \text{ ng mL}^{-1}$$

Es decir, la concentración determinada de PAT del jugo de manzana fue de $(0,6 \pm 0,1)$ ng mL⁻¹. Esta concentración se corresponde a una recuperación del 113%.

La comparación entre los resultados del inmunosensor impedimétrico y de HPLC se indican en la Tabla 32.

Tabla 32. Concentración de PAT determinada por HPLC y por el inmunosensor impedimétrico.

Método de determinación	Concentración de PAT / ng mL ⁻¹	Porcentaje de recuperación
--	0,50 ⁽¹⁾	--
HPLC	0,56	113%
Inmunosensor impedimétrico	0,43	86%

⁽¹⁾ Concentración de PAT esperada.

La determinación mediante HPLC permite corroborar el buen funcionamiento del inmunosensor impedimétrico al aplicarlo a la determinación de PAT en muestras naturales.

4.3.7. Discusión

Se logró construir exitosamente un inmunosensor impedimétrico para la determinación de PAT empleando OG para crear una superficie nanoestructurada sobre la cual anclar los anticuerpos pAb-PAT. Mediante activación de los grupos funcionales del OG se logró la unión covalente de los anticuerpos correspondientes sobre la superficie del inmunosensor, cuya dilución fue posteriormente optimizada.

Mediante estudios de EIE y VC, se corroboraron las distintas etapas de construcción del inmunosensor. El inmunoensayo desarrollado con estos dispositivos fue del tipo no competitivo directo, como es el caso de buena parte de los inmunosensores impedimétricos. Este tipo de ensayos evita la necesidad de tener que utilizar un conjugado del analito de interés.

Debido a la existencia de variaciones en la resistencia a la transferencia de carga entre los inmunosensores, se decidió normalizar la R_{tc} determinada para cada concentración de PAT con respecto a la R_{tc} obtenida en ausencia de la micotoxina. Estos valores de resistencia se obtuvieron mediante un ajuste empleando un circuito eléctrico equivalente. La curva de calibración para la determinación de PAT arrojó una sensibilidad de $54,8 \text{ pg mL}^{-1}$ y un $LD = 4,61 \text{ pg mL}^{-1}$ en SAF.

Por otra parte, se construyó una curva de calibración para determinar PAT en jugo de manzana, la cual mostró como cifras de mérito una sensibilidad de 370 pg mL^{-1} y un $LD = 9,82 \text{ pg mL}^{-1}$.

Se encontró que la formación del complejo antígeno-anticuerpo produce un aumento en la resistencia a la transferencia de carga, siendo este el comportamiento esperado de los inmunosensores impedimétricos, ya que la superficie del electrodo se encuentra más impedida para que se descargue el par rédox. No obstante, a medida que aumenta la concentración de PAT el incremento en la resistencia a la transferencia de carga es cada vez menor, lo que indica que la formación del inmunocomplejo PAT-anticuerpo facilita, de alguna manera, la descarga del par rédox.

Finalmente, se realizó un ensayo de recuperación en muestras de jugo de manzana contaminadas con PAT. La determinación se realizó por duplicado y se obtuvo un porcentaje de recuperación del 86%, confirmando el buen funcionamiento del inmunosensor impedimétrico y la potencialidad del mismo para su aplicación en muestras de diferente naturaleza.

Para validar el inmunosensor impedimétrico, la muestra de jugo de manzana contaminada con PAT también se analizó por HPLC, a partir de un procedimiento mediante

EFS reportado en bibliografía. La determinación se realizó por triplicado y se obtuvo un 113% de recuperación, cercano al obtenido con el inmunosensor impedimétrico, lo que indica que la metodología desarrollada es apta para realizar la determinación de PAT en muestras reales.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

En la presente Tesis de Doctorado, se llevaron a cabo estudios acerca del desarrollo de inmunosensores electroquímicos para la determinación de zearalenona y patulina, como también estudios sobre la modificación superficial de electrodos. Las conclusiones pueden dividirse en tres partes.

En cuanto al inmunosensor electroquímico para la determinación de ZEA, se encontró una dispersión de NTC adecuada para modificar la superficie de los electrodos impresos de carbono y se optimizaron varios parámetros, como las concentraciones de anticuerpo policlonal anti-ZEA y ZEA-HRP, y el volumen de trabajo. Para lograr una mayor reproducibilidad en los resultados se procuró no utilizar soluciones de H_2O_2 muy concentradas, trabajar con densidades de corriente en lugar de corrientes, y no utilizar catecol como mediador electroquímico, sino medir directamente la corriente de reducción de H_2O_2 , aprovechando las propiedades de la dispersión de NTC. Se aplicaron estos cambios y se produjo una mejoría en las curvas de calibración.

Las curvas de calibración para la determinación de ZEA se realizaron tanto en SAF, como también en muestras de maíz contaminadas ex profeso. Para los estudios del inmunosensor en muestras de extractos de maíz se obtuvo una curva de calibración en la cual se logró una SC_{50} de $1,00 \text{ pg mL}^{-1}$ y $LD = 0,11 \text{ pg mL}^{-1}$, siendo estos valores competitivos frente a los métodos oficiales establecidos por la AOAC, así como frente a trabajos desarrollados recientemente.

Las etapas de construcción del inmunosensor se analizaron mediante EIE, obteniéndose resultados que confirman el ensamblado satisfactorio del inmunosensor electroquímico en cada una de sus etapas.

Se realizó un ensayo de recuperación sobre una muestra de maíz, contaminada con ZEA, que fue extraída utilizando el procedimiento de extracción desarrollado, para la que se obtuvo una recuperación del 105 % con el inmunosensor electroquímico.

Para validar el funcionamiento del inmunosensor electroquímico se analizó la misma muestra mediante una técnica cromatográfica. Para ello, se caracterizó la molécula de ZEA mediante espectroscopía UV-visible y de emisión de fluorescencia y se empleó una columna de extracción en fase sólida para extraer ZEA de una muestra de maíz, la cual posee una fase estacionaria compuesta por una resina que tiene una cadena lineal de 18 carbonos (C18). Se encontró una fase móvil para la extracción de ZEA consistente en una mezcla de

CONCLUSIONES

MeOH/ACN, que permitió la separación de la micotoxina de componentes presentes en el maíz que presentan picos que interfieren con los de ZEA. Esta purificación previa es importante y facilitó la posterior determinación de ZEA mediante HPLC.

A continuación de este procedimiento de extracción, se realizó la cuantificación de ZEA en la muestra de maíz contaminada mediante HPLC. Se eligió la composición óptima de una mezcla de MeOH/ACN como fase móvil para la determinación de la molécula mediante emisión de fluorescencia y, se determinó ZEA mediante el método de las adiciones de estándar, logrando un porcentaje de recuperación de 100,3 %, confirmando la efectividad del procedimiento de extracción, así como la validación de la performance del inmunosensor electroquímico.

Finalmente, se realizó un análisis de la superficie del inmunosensor mediante microscopía electrónica de barrido como estudio complementario. No se observaron las nanopartículas de oro a causa del pequeño diámetro de las mismas y del factor de amplificación del equipamiento utilizado. En cambio, si fue posible observar unas pequeñas protuberancias sobre los nanotubos de carbono que pueden ser atribuidas a la presencia de anticuerpos depositados sobre las nanopartículas de oro.

En una segunda optimización de la superficie nanoestructurada del electrodo, se realizaron estudios para determinar el efecto de la composición de la superficie sobre la resistencia a la transferencia de carga y la respuesta amperométrica. La optimización se realizó empleando un planteo de diseño experimental full factorial con dos factores de tres niveles (3^2), en los que se variaron en simultáneo los volúmenes de NTC y NPAu utilizados en la construcción de la superficie nanoestructurada y se registró la respuesta correspondiente. Mediante el análisis de las superficies de respuesta obtenidas se demostró que la corriente de pico de reducción del par rédox aumenta a medida que la cantidad de NTC y NPAu empleados aumenta, y que ambos factores son independientes entre sí. Para la resistencia a la transferencia de carga, la respuesta se modeló empleando un modelo cuadrático, y se encontró la existencia de interacciones entre el volumen de NTC y NPAu utilizados, así como la presencia de efectos cuadráticos. Se observó que un mayor volumen de NTC produce un aumento de la resistencia a la transferencia de carga mientras que las NPAu no producen un efecto muy marcado. Finalmente, y considerando las propiedades deseadas para la superficie del inmunosensor electroquímico, se consideró una situación de compromiso entre una mayor señal amperométrica y la menor resistencia a la transferencia de carga posible, graficándose la función deseabilidad en base a estos criterios. Los valores

óptimos hallados fueron de 5 μL de dispersión de NTC y 12 μL de dispersión de NPAu. Esta superficie nanoestructurada luce prometedora para construir futuros inmunosensores.

Por otra parte, se construyó un inmunosensor impedimétrico para la determinación de PAT de manera exitosa, utilizando OG para crear una superficie nanoestructurada sobre la cual anclar los anticuerpos pAb-PAT. Los grupos funcionales del OG se activaron y los anticuerpos se unieron covalentemente sobre la superficie del inmunosensor. La dilución de anticuerpos utilizada fue optimizada y, mediante estudios de EIE y VC, se corroboraron las distintas etapas de construcción del inmunosensor. Al igual que en la mayoría de los inmunosensores impedimétricos, el inmunoensayo utilizado fue del tipo no competitivo directo, el cual presenta como principal virtud el hecho de poder prescindir de la necesidad de conjugar el analito de interés.

Utilizando un circuito eléctrico equivalente apropiado se pudieron determinar las R_{tc} de los inmunosensores. Para minimizar la dispersión entre los mismos, se normalizó la R_{tc} determinada para cada concentración de PAT con respecto a la R_{tc} obtenida en ausencia de la micotoxina. Se obtuvo una curva de calibración para la determinación de PAT con una sensibilidad de 54,8 pg mL^{-1} y un LD = 4,61 pg mL^{-1} en SAF. Posteriormente se construyó una curva de calibración para determinar PAT en jugo de manzana, la que mostró como cifras de mérito una sensibilidad de 370 pg mL^{-1} y un LD = 9,82 pg mL^{-1} .

La formación del complejo antígeno-anticuerpo produjo un aumento en la resistencia a la transferencia de carga, debido a que la superficie del inmunosensor se encuentra más impedida para que se descargue el par rédox. No obstante, a medida que la concentración de PAT aumenta el incremento en la R_{tc} es cada vez menor, lo que indica que la formación del inmunocomplejo PAT-anticuerpo facilita, de alguna manera, la descarga del par rédox.

Para finalizar, el inmunosensor fue validado mediante ensayos de recuperación en muestras de jugo de manzana contaminadas ex profeso con PAT y ensayos paralelos por la técnica de HPLC.

Este estudio de tesis doctoral dio lugar a dos publicaciones científicas en revistas indexadas, las cuales se detallan a continuación:

1. Riberi, W.I.; Tarditto, L.V.; Zon, M.A.; Arévalo, F.J.; Fernández, H.

Development of an electrochemical immunosensor to determine zearalenone in maize using carbón screen printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes / polyethyleneimine dispersions.

Sensors and Actuators B: Chem. (2018), 254, 1271-1277.

CONCLUSIONES

2. Riberi, W.I.; Zon, M.A.; Fernández, H; Arévalo, F.J.

Optimization of a nanostructured surface for the development of electrochemical immunosensors.

Journal of Electroanalytical Chemistry (2019), 836, 38-44.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- Adley, C. C. y Ryan, M. P. (2015). 14 - Conductometric biosensors for high throughput screening of pathogens in food. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment*. Bhunia, A. K., Kim, M. S. y Taitt, C. R., Woodhead Publishing: 315-326.
- Afzali, D. y Fathirad, F. (2016). Determination of zearalenone with a glassy carbon electrode modified with nanocomposite consisting of palladium nanoparticles and a conductive polymeric ionic liquid. *Microchimica Acta* **183**(9): 2633-2638.
- Al-Taher, F., Cappozzo, J., Zweigenbaum, J., Lee, H. J., Jackson, L. y Ryu, D. (2017). Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Food Control* **72, Part A**: 27-35.
- Anjo, D. M., Kahr, M., Khodabakhsh, M. M., Nowinski, S. y Wanger, M. (1989). Electrochemical activation of carbon electrodes in base: minimization of dopamine adsorption and electrode capacitance. *Anal. Chem.* **61**(23): 2603-2608.
- ANVISA (2011). RDC 7/2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde, Brasil. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Bagheri, N., Khataee, A., Habibi, B. y Hassanzadeh, J. (2018). Mimetic Ag nanoparticle/Zn-based MOF nanocomposite (AgNPs@ZnMOF) capped with molecularly imprinted polymer for the selective detection of patulin. *Talanta* **179**: 710-718.
- Bai, Y., Koh, C. G., Boreman, M., Juang, Y.-J., Tang, I. C., Lee, L. J. y Yang, S.-T. (2006). Surface modification for enhancing antibody binding on polymer-based microfluidic device for enzyme-linked immunosorbent assay. *Langmuir* **22**(22): 9458-9467.
- Bánáti, H., Darvas, B., Fehér-Tóth, S., Czéh, Á. y Székács, A. (2017). Determination of mycotoxin production of *Fusarium* species in genetically modified maize varieties by quantitative flow immunocytometry. *Toxins* **9**(2): 70.
- Barad, S., Sionov, E. y Prusky, D. (2016). Role of patulin in post-harvest diseases. *Fungal Biology Reviews* **30**(1): 24-32.
- Bard, A. J. y Faulkner, L. R. (2000). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. New York, Wiley.
- Barros Neto, B. d., Spacino Scarminio, I. y Edward Bruns, R. (2001). *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas, Editora da Unicamp.

BIBLIOGRAFÍA

- Beloglazova, N. V., Foubert, A., Gordienko, A., Tessier, M. D., Aubert, T., Drijvers, E., Goryacheva, I., Hens, Z. y De Saeger, S. (2016). Sensitive QD@SiO₂-based immunoassay for triplex determination of cereal-borne mycotoxins. *Talanta* **160**: 66-71.
- Beloglazova, N. V., Sobolev, A. M., Tessier, M. D., Hens, Z., Goryacheva, I. Y. y De Saeger, S. (2017). Fluorescently labelled multiplex lateral flow immunoassay based on cadmium-free quantum dots. *Methods* **116**: 141-148.
- Bennett, J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia* **100**(1): 3-5.
- Bianchini, A. y Bullerman, L. B. (2014). Mycotoxins | Classification. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press: 854-861.
- Bockris, J. O. M. y Reddy, A. K. N. (2002). *Modern Electrochemistry 1 : Ionics*. New York, Kluwer Academic Publishers.
- Bosco, F. y Mollea, C. (2012). Mycotoxins in Food. *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. Valdez, B., InTech: 169-200.
- Bott, A. W. y Heineman, W. R. (2004). Chronocoulometry. *Curr. Sep.* **20**(4): 121-126.
- Box, G. E. P. y Wilson, K. B. (1951). On the experimental attainment of optimal conditions. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* **13**: 1-38.
- Brase, S., Glaser, F., Kramer, C. S., Lindner, S., Linsenmeier, A. M., Masters, K. S., Meister, A. C., Ruff, B. M. y Zhong, S. (2013). *The Chemistry of Mycotoxins*, Springer.
- Braun, D., Ezekiel, C. N., Abia, W. A., Wisgrill, L., Degen, G. H., Turner, P. C., Marko, D. y Warth, B. (2018). Monitoring Early Life Mycotoxin Exposures via LC-MS/MS Breast Milk Analysis. *Anal. Chem.* **90**(24): 14569-14577.
- Byrne, B., Gilmartin, N., Lakshmanan, R. S. y O'Kennedy, R. (2015). 3 - Antibodies, enzymes, and nucleic acid sensors for high throughput screening of microbes and toxins in food. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment*. Bhunia, A. K., Kim, M. S. y Taitt, C. R., Woodhead Publishing: 25-80.
- Cabañes, F. J., Abarca, M. L., Bragulat, M. R. y Castellá, G. (2007). Especies productoras de micotoxinas. *Micotoxinas en alimentos*. Soriano del Castillo, J. M. Madrid, Díaz de Santos: 29-62.
- Casero, E., Parra-Alfambra, A. M., Petit-Domínguez, M. D., Pariente, F., Lorenzo, E. y Alonso, C. (2012). Differentiation between graphene oxide and reduced graphene by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). *Electrochem. Commun.* **20**: 63-66.
- Chandelier, A., Michelet, J.-Y., Tangni, E., Baert, K., Moons, E. y Vinkx, C. (2004). Mycotoxins survey in Belgium and toxigenic *Fusarium* in belgian wheat. *An Overview on*

Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe. Logrieco, A. y Visconti, A., Springer Netherlands: 11-32.

- Chanique, G. D. (2012). *Estudios sobre el comportamiento electroquímico de la micotoxina patulina y desarrollo de metodologías electroanalíticas para su determinación en alimentos*. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto.

- Chanique, G. D., Arévalo, A. H., Zon, M. A. y Fernández, H. (2013). Electrochemical reduction of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in both neutral and acid non-aqueous media. Their electroanalytical determination in apple juices. *Talanta* **111**: 85-92.

- Cheli, F., Campagnoli, A., Pinotti, L. y Dell'Orto, V. (2011). Rapid methods as analytical tools for food and feed contaminant evaluation: Methodological implications for mycotoxin analysis in cereals. *Food Production - Approaches, Challenges and Tasks*. Aladjadjyan, A., InTech: 185-204.

- Chen, F., Luan, C., Wang, L., Wang, S. y Shao, L. (2017a). Simultaneous determination of six mycotoxins in peanut by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *J. Sci. Food Agric.* **97**(6): 1805-1810.

- Chen, Y., Chen, Q., Han, M., Zhou, J., Gong, L., Niu, Y., Zhang, Y., He, L. y Zhang, L. (2016). Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut. *Food Chem.* **213**: 478-484.

- Chen, Y., Fu, Q., Li, D., Xie, J., Ke, D., Song, Q., Tang, Y. y Wang, H. (2017b). A smartphone colorimetric reader integrated with an ambient light sensor and a 3D printed attachment for on-site detection of zearalenone. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**(28): 6567-6574.

- Crowther, J. R. (1995). *ELISA. Theory and practice*. Totowa, Humana Press.

- Curtui, V., Seidler, C., Schneider, E. y Usleber, E. (2004). Mycotoxins in food in Germany. *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Logrieco, A. y Visconti, A., Springer Netherlands: 109-121.

- D'Orazio, G., Hernández-Borges, J., Herrera-Herrera, A. V., Fanali, S. y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2016). Determination of estrogenic compounds in milk and yogurt samples by hollow-fibre liquid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**(26): 7447-7459.

- Dagnac, T., Latorre, A., Fernández Lorenzo, B. y Llompart, M. (2016). Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the

assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain. *Food Addit. Contam., Part A* **33**(12): 1850-1863.

- De Clercq, N., Van Pamel, E., Van Coillie, E., Vlaemynck, G., Devlieghere, F., De Meulenaer, B. y Daeseleire, E. (2016). Optimization and validation of a method without alkaline clean-up for patulin analysis on apple puree agar medium (APAM) and apple products. *Food Analytical Methods* **9**(2): 370-377.

- De Roe, C., Courtoy, P. J. y Baudhuin, P. (1987). A model of protein-colloidal gold interactions. *J. Histochem. Cytochem.* **35**(11): 1191-1198.

- Diniz Andrade, P., Rodrigues Dantas, R., Silva de Moura-Alves, T. L. d. y Dutra Caldas, E. (2017). Determination of multi-mycotoxins in cereals and of total fumonisins in maize products using isotope labeled internal standard and liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive ionization. *J. Chromatogr. A* **1490**: 138-147.

- Fang, G., Wang, H., Yang, Y., Liu, G. y Wang, S. (2016). Development and application of a quartz crystal microbalance sensor based on molecularly imprinted sol-gel polymer for rapid detection of patulin in foods. *Sens. Actuators, B Chem.* **237**: 239-246.

- FAO (2004). *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Roma, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Ferreira, S. L. C., Lemos, V. A., de Carvalho, V. S., da Silva, E. G. P., Queiroz, A. F. S., Felix, C. S. A., da Silva, D. L. F., Dourado, G. B. y Oliveira, R. V. (2018). Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchem. J.* **140**: 176-182.

- Flores-Flores, M. E. y González-Peñas, E. (2017). An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. *Food Chem.* **218**: 378-385.

- Funes, G. J. y Resnik, S. L. (2009). Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control* **20**(3): 277-280.

- García-Fonseca, S. y Rubio, S. (2016). Restricted access supramolecular solvents for removal of matrix-induced ionization effects in mass spectrometry: application to the determination of Fusarium toxins in cereals. *Talanta* **148**: 370-379.

- Garrido, C. E., González, H. H. L., Salas, M. P., Resnik, S. L. y Pacin, A. M. (2013). Mycoflora and mycotoxin contamination of Roundup Ready soybean harvested in the Pampean Region, Argentina. *Mycotoxin Res.* **29**(3): 147-157.

- Ge, N., Xu, J., Li, F., Peng, B. y Pan, S. (2017). Immobilization of inactivated microbial cells on magnetic Fe₃O₄@CTS nanoparticles for constructing a new biosorbent for removal of patulin in fruit juice. *Food Control* **82**: 83-90.

- Geary, P. A., Chen, G., Kimanya, M. E., Shirima, C. P., Oplatowska-Stachowiak, M., Elliott, C. T., Routledge, M. N. y Gong, Y. Y. (2016). Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study. *Food Control* **68**: 337-343.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M. T. y Patiño, B. (2014). Mycotoxins | Toxicology. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press: 887-892.
- Goldschmidt, M. C. (2014). Biosensors – Scope in Microbiological Analysis. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press: 274-287.
- González, L. y Soriano, J. M. (2007). Patulina. *Micotoxinas en alimentos*. Soriano del Castillo, J. M. Madrid, Díaz de Santos: 239-254.
- González Pereyra, M. L., Chiacchiera, S. M., Rosa, C. A. R., Sager, R., Dalcero, A. M. y Cavaglieri, L. (2011a). Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. *J. Sci. Food Agric.* **91**(8): 1474-1481.
- González Pereyra, M. L., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M. y Cavaglieri, L. R. (2011b). Mycobiota and mycotoxins in malted barley and brewer's spent grain from Argentinean breweries. *Lett. Appl. Microbiol.* **53**(6): 649-655.
- Gopinath, S. C. B., Tang, T.-H., Citartan, M., Chen, Y. y Lakshmi Priya, T. (2014). Current aspects in immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* **57**(0): 292-302.
- Goryacheva, I. Y. y De Saeger, S. (2011). 5 - Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection in food and feed. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*. Saeger, S. D., Woodhead Publishing: 135-167.
- Guo, W., Pi, F., Zhang, H., Sun, J., Zhang, Y. y Sun, X. (2017). A novel molecularly imprinted electrochemical sensor modified with carbon dots, chitosan, gold nanoparticles for the determination of patulin. *Biosens. Bioelectron.* **98**: 299-304.
- Gursoy, N. y Bicici, M. (2004). A review on current situation of toxigenic fungi and mycotoxins formation in Turkey. *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Logrieco, A. y Visconti, A., Springer Netherlands: 237-246.
- Gutiérrez Pulido, H. y Vara Salazar, R. d. I. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México, McGraw-Hill.
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. y Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.* **79**(11): 4215-4221.

BIBLIOGRAFÍA

- Han, Z., Jiang, K., Fan, Z., Diana Di Mavungu, J., Dong, M., Guo, W., Fan, K., Campbell, K., Zhao, Z. y Wu, Y. (2017). Multi-walled carbon nanotubes-based magnetic solid-phase extraction for the determination of zearalenone and its derivatives in maize by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control* **79**: 177-184.
- He, B. y Dong, X. (2018). Aptamer based voltammetric patulin assay based on the use of ZnO nanorods. *Microchimica Acta* **185**(10): 462.
- Horak, J., Dincer, C., Qelibari, E., Bakirci, H. y Urban, G. (2015). Polymer-modified microfluidic immunochip for enhanced electrochemical detection of troponin I. *Sens. Actuators, B Chem.* **209**: 478-485.
- Hossain, M. Z. y Maragos, C. M. (2018). Gold nanoparticle-enhanced multiplexed imaging surface plasmon resonance (iSPR) detection of *Fusarium* mycotoxins in wheat. *Biosens. Bioelectron.* **101**: 245-252.
- Hu, X., Hu, R., Zhang, Z., Li, P., Zhang, Q. y Wang, M. (2016). Development of a multiple immunoaffinity column for simultaneous determination of multiple mycotoxins in feeds using UPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**(22): 6027-6036.
- IARC (1983). *Some Food Additives, Feed Additives and Naturally Occurring Substances*. France, International Agency for Research on Cancer.
- IARC (1993). *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. UK, International Agency for Research on Cancer.
- Inzelt, G. (2013). Pseudo-reference electrodes. *Handbook of reference electrodes*. Inzelt, G., Lewenstam, A. y Scholz, F. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 331-332.
- Iqbal, S. Z., Asi, M. R., Nisar, S., Zia, K. M., Jinap, S. y Malik, N. (2016). A limited survey of aflatoxins and zearalenone in feed and feed ingredients from Pakistan. *J. Food Prot.* **79**(10): 1798-1801.
- Ittu, M., Trif, A. y Belc, N. (2004). Toxigenic fungi and mycotoxins in Romania: Challenges and approaches. *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Logrieco, A. y Visconti, A., Springer Netherlands: 185-194.
- IUPAC (2014). *Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*. McNaught, A. D., Wilkinson, A., Nic, M. y col. Oxford, International Union of Pure and Applied Chemistry: 1622.
- Jalali, A., Khorasgani, Z. N., Goudarzi, M. y Khoshlesan, N. (2010). HPLC determination of patulin in apple juice: a single center study of Southwest area of Iran. *Journal of Pharmacology and Toxicology* **5**(5): 208-214.

- Jettanajit, A. y Nhujak, T. (2016). Determination of mycotoxins in brown rice using QuEChERS sample preparation and UHPLC–MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **54**(5): 720-729.
- Ji, F., Li, H., Xu, J. y Shi, J. (2011). Enzyme-linked immunosorbent-assay for deoxynivalenol (DON). *Toxins* **3**(8): 968-978.
- Ji, X., Li, R., Yang, H., Qi, P., Xiao, Y. y Qian, M. (2017). Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China. *Food Control* **78**: 100-107.
- Jiang, K., Huang, P., Luan, L., Fan, K., Guo, W., Zhao, Z., Wu, Y. y Han, Z. (2017). Iron (II, III) oxide/multi-walled carbon nanotube composite as solid-phase extraction sorbent followed by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous determination of zearalenone and type A trichothecenes in *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (Danshen). *J. Chromatogr. A* **1482**: 1-10.
- Jooste, P. J. y Anelich, L. E. C. M. (2008). Safety and quality of dairy products. *Advanced Dairy Science and Technology*, Blackwell Publishing Ltd: 153-182.
- Juan, C., Covarelli, L., Beccari, G., Colasante, V. y Mañes, J. (2016). Simultaneous analysis of twenty-six mycotoxins in durum wheat grain from Italy. *Food Control* **62**: 322-329.
- Kim, D.-H., Hong, S.-Y., Kang, J., Cho, S., Lee, K., An, T., Lee, C. y Chung, S. (2017). Simultaneous determination of multi-mycotoxins in cereal grains collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins* **9**(3): 106.
- Knichel, M., Heiduschka, P., Beck, W., Jung, G. y Göpel, W. (1995). Utilization of a self-assembled peptide monolayer for an impedimetric immunosensor. *Sens. Actuators, B Chem.* **28**(2): 85-94.
- Konopka, S. J. y McDuffie, B. (1970). Diffusion coefficients of ferri- and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry. *Anal. Chem.* **42**(14): 1741-1746.
- La Barbera, G., Capriotti, A., Cavaliere, C., Foglia, P., Montone, C., Chiozzi, R. y Laganà, A. (2017). A rapid magnetic solid phase extraction method followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis for the determination of mycotoxins in cereals. *Toxins* **9**(4): 147.
- Leardi, R. (2009). Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **652**(1): 161-172.
- Lhotská, I., Gajdošová, B., Solich, P. y Šatínský, D. (2018). Molecularly imprinted vs. reversed-phase extraction for the determination of zearalenone: a method development and

critical comparison of sample clean-up efficiency achieved in an on-line coupled SPE chromatography system. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**(14): 3265-3273.

- Lhotská, I., Holznerová, A., Solich, P. y Šatínský, D. (2017). Critical comparison of the on-line and off-line molecularly imprinted solid-phase extraction of patulin coupled with liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **40**(23): 4599-4609.

- Li, C., Deng, C., Zhou, S., Zhao, Y., Wang, D., Wang, X., Gong, Y. Y. y Wu, Y. (2018a). High-throughput and sensitive determination of urinary zearalenone and metabolites by UPLC-MS/MS and its application to a human exposure study. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**(21): 5301-5312.

- Li, G., Zhu, M., Ma, L., Yan, J., Lu, X., Shen, Y. y Wan, Y. (2016a). Generation of small single domain nanobody binders for sensitive detection of testosterone by electrochemical impedance spectroscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**(22): 13830-13839.

- Li, L., Chen, H., Lv, X., Wang, M., Jiang, X., Jiang, Y., Wang, H., Zhao, Y. y Xia, L. (2018b). Paper-based immune-affinity arrays for detection of multiple mycotoxins in cereals. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**(8): 2253-2262.

- Li, M., Kong, W., Li, Y., Liu, H., Liu, Q., Dou, X., Ou-yang, Z. y Yang, M. (2016b). High-throughput determination of multi-mycotoxins in Chinese yam and related products by ultra fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry after one-step extraction. *J. Chromatogr. B* **1022**: 118-125.

- Li, X., Li, H., Li, X. y Zhang, Q. (2017a). Determination of trace patulin in apple-based food matrices. *Food Chem.* **233**: 290-301.

- Li, X., Li, H., Ma, W., Guo, Z., Li, X., Li, X. y Zhang, Q. (2018c). Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **257**: 1-6.

- Li, X., Peng, X., Wang, Q., Zuo, H., Meng, X. y Liu, B. (2017b). Effective detoxification of patulin from aqueous solutions by immobilized porcine pancreatic lipase. *Food Control* **78**: 48-56.

- Li, Y., Chen, Q., Xu, X., Jin, Y., Wang, Y., Zhang, L., Yang, W., He, L., Feng, X. y Chen, Y. (2018d). Microarray surface enhanced Raman scattering based immunosensor for multiplexing detection of mycotoxin in foodstuff. *Sens. Actuators, B Chem.* **266**: 115-123.

- Liu, H., Luo, J., Kong, W., Liu, Q., Hu, Y. y Yang, M. (2016). UFLC-ESI-MS/MS analysis of multiple mycotoxins in medicinal and edible Areca catechu. *Chemosphere* **150**: 176-183.

- Liu, N., Nie, D., Tan, Y., Zhao, Z., Liao, Y., Wang, H., Sun, C. y Wu, A. (2017). An ultrasensitive amperometric immunosensor for zearalenones based on oriented antibody

immobilization on a glassy carbon electrode modified with MWCNTs and AuPt nanoparticles. *Microchimica Acta* **184**(1): 147-153.

- Lucci, P., Moret, S., Bettin, S. y Conte, L. (2017). Selective solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer for the analysis of patulin in apple-based foods. *J. Sep. Sci.* **40**(2): 458-465.

- Lvovich, V. F. (2012). *Impedance spectroscopy. Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena*. Hoboken, Wiley.

- Ma, L., Guo, T., Pan, S. y Zhang, Y. (2018). A fluorometric aptasensor for patulin based on the use of magnetized graphene oxide and DNase I-assisted target recycling amplification. *Microchimica Acta* **185**(10): 487.

- Malhotra, B. D., Srivastava, S., Ali, M. A. y Singh, C. (2014). Nanomaterial-based biosensors for food toxin detection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**(3): 880-896.

- Maraldo, D. y Mutharasan, R. (2007). Optimization of antibody immobilization for sensing using piezoelectrically excited-millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors. *Sens. Actuators, B Chem.* **123**(1): 474-479.

- Marsol-Vall, A., Balcells, M., Eras, J. y Canela-Garayoa, R. (2016). A rapid gas chromatographic injection-port derivatization method for the tandem mass spectrometric determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices. *J. Chromatogr. A* **1453**: 99-104.

- Martínez, M., Castañares, E., Dinolfo, M. I., Pacheco, W. G., Moreno, M. V. y Stenglein, S. A. (2014). Presencia de *Fusarium graminearum* en muestras de trigo destinado al consumo humano. *Revista Argentina de Microbiología* **46**(1): 41-44.

- McCarthy, J. (2003). 11 - Immunological techniques: ELISA. *Detecting Pathogens in Food*. McMeekin, T. A., Woodhead Publishing: 241-258.

- Meneely, J. P. y Elliott, C. T. (2014). Rapid surface plasmon resonance immunoassays for the determination of mycotoxins in cereals and cereal-based food products. *World Mycotoxin Journal* **7**(4): 491-505.

- MERCOSUR (2002). Resolución GMC N° 25/02. MERCOSUR. http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_025_002_RT_M_Aflatoxinas%20en%20Lech-Man%20C3%AD-Ma%20C3%ADz_Acta%20_02.PDF.

- MGAP (2006). Decreto N° 155/006 - MERCOSUR. Reglamento técnico sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz. Se declara aplicable al derecho interno. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

<http://www.elderechodigital.com.uy/notas/PPLA12.html>, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Uruguay.

- Miró-Abella, E., Herrero, P., Canela, N., Arola, L., Borrull, F., Ras, R. y Fontanals, N. (2017). Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **229**: 366-372.
- Morales Valle, H. (2011). Mohos productores de micotoxinas. *Micotoxinas y micotoxicosis*. Ramos, A. J., AMV Ediciones: 19-44.
- Moreno, V., Zougagh, M. y Ríos, Á. (2016). Hybrid nanoparticles based on magnetic multiwalled carbon nanotube-nanoC₁₈SiO₂ composites for solid phase extraction of mycotoxins prior to their determination by LC-MS. *Microchimica Acta* **183**(2): 871-880.
- Moss, M. (2009). 28 - Toxigenic fungi. *Foodborne Pathogens*. Blackburn, C. d. W. y McClure, P. J., Woodhead Publishing: 1042-1059.
- Munitz, M. S., Resnik, S. L., Pacin, A., Salas, P. M., Gonzalez, H. H. L., Montti, M. I. T., Drunday, V. y Guillin, E. A. (2014). Mycotoxigenic potential of fungi isolated from freshly harvested Argentinean blueberries. *Mycotoxin Res.* **30**(4): 221-229.
- Nečas, D. y Klapetek, P. (2012). Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics* **10**(1): 181-188.
- Nichea, M., Palacios, S., Chiacchiera, S., Sulyok, M., Krska, R., Chulze, S., Torres, A. y Ramirez, M. (2015a). Presence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in native grasses from a wetland ecosystem in Argentina intended for grazing cattle. *Toxins* **7**(8): 3309.
- Nichea, M. J., Cendoya, E., Zachetti, V. G. L., Chiacchiera, S. M., Sulyok, M., Krska, R., Torres, A. M., Chulze, S. N. y Ramirez, M. L. (2015b). Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed. *World Mycotoxin Journal* **8**(4): 451-457.
- Niu, Z. y Li, Y. (2014). Removal and utilization of capping agents in nanocatalysis. *Chem. Mater.* **26**(1): 72-83.
- Oliveira, T. M. B. F., Barroso, M. F., Morais, S., de Lima-Neto, P., Correia, A. N., Oliveira, M. B. P. P. y Delerue-Matos, C. (2013). Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. *Talanta* **106**: 137-143.
- Olivieri, A. C. y Goicoechea, H. C. (2007). *La calibración en química analítica*. Santa Fe, Universidad Nacional del Litoral.

- Orlov, A. V., Burenin, A. G., Massarskaya, N. G., Betin, A. V., Nikitin, M. P. y Nikitin, P. I. (2017). Highly reproducible and sensitive detection of mycotoxins by label-free biosensors. *Sens. Actuators, B Chem.* **246**: 1080-1084.
- Osteresch, B., Viegas, S., Cramer, B. y Humpf, H.-U. (2017). Multi-mycotoxin analysis using dried blood spots and dried serum spots. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**(13): 3369-3382.
- Ostry, V., Malir, F., Cumova, M., Kyrova, V., Toman, J., Grosse, Y., Pospichalova, M. y Ruprich, J. (2018). Investigation of patulin and citrinin in grape must and wine from grapes naturally contaminated by strains of *Penicillium expansum*. *Food Chem. Toxicol.* **118**: 805-811.
- Oteiza, J. M., Khaneghah, A. M., Campagnollo, F. B., Granato, D., Mahmoudi, M. R., Sant'Ana, A. S. y Gianuzzi, L. (2017). Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. *LWT* **80**: 200-207.
- Paiva, T. O., Almeida, I., Marquês, J. T., Liu, W., Niu, Y., Jin, G. y Viana, A. S. (2017). Nanostructured interfaces with site-specific bioreceptors for immunosensing. *Appl. Surf. Sci.* **412**: 455-463.
- Pajewska, M., Łojko, M., Cendrowski, K., Sawicki, W., Kowalkowski, T., Buszewski, B. y Gadzała-Kopciuch, R. (2018). The determination of zearalenone and its major metabolites in endometrial cancer tissues. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**(5): 1571-1582.
- Paschoal, F. N., de Azevedo Silva, D., von Sperling de Souza, R., de Oliveira, M. S., Pereira, D. A. A. y de Souza, S. V. C. (2017). A rapid single-extraction method for the simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, fumonisin B1, and zearalenone in corn meal by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods* **10**(6): 1631-1644.
- Pei, R., Cheng, Z., Wang, E. y Yang, X. (2001). Amplification of antigen–antibody interactions based on biotin labeled protein–streptavidin network complex using impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* **16**(6): 355-361.
- Pepeljnjak, S. y Šegvić, M. (2004). An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Croatia. *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Logrieco, A. y Visconti, A., Springer Netherlands: 33-50.
- Pereyra, C. M., Cavaglieri, L. R., Chiacchiera, S. M. y Dalcero, A. M. (2011). Mycobiota and mycotoxins contamination in raw materials and finished feed intended for fattening pigs production in eastern Argentina. *Veterinary Research Communications* **35**(6): 367-379.

BIBLIOGRAFÍA

- Pidenko, P., Zhang, H., Lenain, P., Goryacheva, I., De Saeger, S. y Beloglazova, N. (2018). Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone. *Anal. Chim. Acta* **1040**: 99-104.
- Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P. y González-Cortés, A. (2008). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* **53**(19): 5848-5866.
- Pitt, J. I. (2014). *Penicillium* and *Talaromyces*: Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press. **3**: 6-13.
- Rai, A., Dixit, S., Singh, S. P., Gautam, N. K., Das, M. y Tripathi, A. (2018). Presence of Zearalenone in Cereal Grains and Its Exposure Risk Assessment in Indian Population. *J. Food Sci.* **83**(12): 3126-3133.
- Rai, M. y Varma, A. (2010). *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, Springer.
- Ramos Girona, A. J., Rosa, C. A. D. R., Cavaglieri, L. R. y Guedes, C. A. (2011). Legislación e impacto económico de las micotoxinas. *Micotoxinas y micotoxicosis*. Ramos, A. J., AMV Ediciones: 427-462.
- Razzazi-Fazeli, E. y Reiter, E. V. (2011). 2 - Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: principles, applications and recent developments. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*. Saeger, S. D., Woodhead Publishing: 37-70.
- Reth, M. (2013). Matching cellular dimensions with molecular sizes. *Nature Immunology* **14**: 765.
- Rezaei, B., Zare, S. Z. M. y Ensafi, A. A. (2011). Square wave voltammetric determination of dexamethasone on a multiwalled carbon nanotube modified pencil electrode. *J. Braz. Chem. Soc.* **22**: 897-904.
- Riberi, W. I., Tarditto, L. V., Zon, M. A., Arévalo, F. J. y Fernández, H. (2018). Development of an electrochemical immunosensor to determine zearalenone in maize using carbon screen printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes/polyethyleneimine dispersions. *Sens. Actuators, B Chem.* **254**: 1271-1277.
- Rodbard, D. (1974). Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* **20**(10): 1255-1270.
- Romera, D., Mateo, E. M., Mateo-Castro, R., Gómez, J. V., Gimeno-Adelantado, J. V. y Jiménez, M. (2018). Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC–MS/MS and UPLC–QTOF–MS. *Food Chem.* **267**: 140-148.
- Roy, S., Sooin, N., Bajpai, R., Misra, D. S., McLaughlin, J. A. y Roy, S. S. (2011). Graphene oxide for electrochemical sensing applications. *J. Mater. Chem.* **21**(38): 14725-14731.

- Rubinstein, H. R. y Theumer, M. G. (2011). Principales micotoxinas. *Micotoxinas y micotoxicosis*. Ramos, A. J., AMV Ediciones: 45-72.
- Rushworth, J. V., Ahmed, A., Griffiths, H. H., Pollock, N. M., Hooper, N. M. y Millner, P. A. (2014). A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers. *Biosens. Bioelectron.* **56**: 83-90.
- Sadok, I., Szmagara, A. y Staniszevska, M. M. (2018). The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. *Food Chem.* **245**: 364-370.
- Sadrabadi, N. R., Ensafi, A. A., Heydari-Bafrooei, E. y Fazilati, M. (2016). Screening of food samples for zearalenone toxin using an electrochemical bioassay based on DNA-zearalenone interaction. *Food Analytical Methods* **9**(9): 2463-2470.
- Salvat, A. E., Moschini, R. C., Comerio, R. M., Balbuena, O., Rosello Brajovich, J. E., Cristos, D., Rojas, D., Ricca, A. y Salerno, J. C. (2016). Zearalenone content in animal fodder samples in relation to weather conditions in Colonia Benítez, northeastern Argentina. *Australasian Plant Pathology* **45**(3): 251-259.
- Sampietro, D. A., Apud, G. R., Belizán, M. M. E., Vattuone, M. A. y Catalán, C. A. N. (2013). Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* isolated from maize of northwest Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology* **44**: 417-422.
- Šarkanj, B., Ezekiel, C. N., Turner, P. C., Abia, W. A., Rychlik, M., Krska, R., Sulyok, M. y Warth, B. (2018). Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Anal. Chim. Acta* **1019**: 84-92.
- Sarubbi, F., Formisano, G., Auriemma, G., Arrichiello, A. y Palomba, R. (2016). Patulin in homogenized fruit's and tomato products. *Food Control* **59**: 420-423.
- Sawyer, D. T., Sobkowiak, A. y Roberts, J. L. (1995). *Electrochemistry for chemists*. New York, Wiley.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (2007). Alimentos Argentinos. Resolución 302/2007. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Argentina. <http://www.infoleg.gov.ar/infolegInternet/anexos/130000-134999/134107/norma.htm>.
- Senyuva, H. Z. y Gilbert, J. (2011). 6 - Official methods and performance criteria for determining mycotoxins in food and feed. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*. Saeger, S. D., Woodhead Publishing: 171-193.
- Shao, Y., Duan, H., Guo, L., Leng, Y., Lai, W. y Xiong, Y. (2018). Quantum dot nanobead-based multiplexed immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B1 and zearalenone. *Anal. Chim. Acta* **1025**: 163-171.

BIBLIOGRAFÍA

- Sharma, A., Gautam, S. y Bandyopadhyay, N. (2014a). Enzyme immunoassays: Overview. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press: 680-687.
- Sharma, A., Kumar, A. y Khan, R. (2017). Electrochemical immunosensor based on poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified with gold nanoparticle to detect aflatoxin B₁. *Materials Science and Engineering: C* **76**: 802-809.
- Sharma, A., Pillai, M. R. A., Gautam, S. y Hajare, S. N. (2014b). Mycotoxins | Immunological techniques for detection and analysis. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press: 869-879.
- Sharmili, K., Jinap, S. y Sukor, R. (2016). Development, optimization and validation of QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of multimycotoxin in vegetable oil. *Food Control* **70**: 152-160.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. y Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. México D.F., Thomson.
- Smiley, R. D. (2014). Identification Methods | Immunoassay. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press: 318-325.
- Socas-Rodríguez, B., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J. y Rodríguez Delgado, M. Á. (2016). Application of multiwalled carbon nanotubes as sorbents for the extraction of mycotoxins in water samples and infant milk formula prior to high performance liquid chromatography mass spectrometry analysis. *Electrophoresis* **37**(10): 1359-1366.
- Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., Hernández-Borges, J. y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2017). Multiresidue determination of estrogens in different dairy products by ultra-high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1496**: 58-67.
- Sun, S., Zhao, R., Feng, S. y Xie, Y. (2018a). Colorimetric zearalenone assay based on the use of an aptamer and of gold nanoparticles with peroxidase-like activity. *Microchimica Acta* **185**(12): 535.
- Sun, S., Zheng, P., Zhao, S., Liu, H., Wang, Z., Peng, T., Wang, J., Yao, K., Wang, S., Zeng, Y. y Jiang, H. (2018b). Time-resolved fluorescent immunochromatographic assay-based on three antibody labels for the simultaneous detection of aflatoxin B₁ and zearalenone in Chinese herbal medicines. *Food Addit. Contam., Part A* **35**(12): 2434-2442.
- Sun, X., Tang, Q., Du, X., Xi, C., Tang, B., Wang, G. y Zhao, H. (2017). Simultaneous determination of ractopamine, chloramphenicol, and zeranol in animal-originated foods by LC-MS/MS analysis with immunoaffinity clean-up column. *Food Analytical Methods*.

- Thongprapai, P., Cheewasedtham, W., Chong, K. F. y Rujiralai, T. (2018). Selective magnetic nanographene oxide solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography and fluorescence detection for the determination of zearalenone in corn samples. *J. Sep. Sci.* **41**(23): 4348-4354.
- Thouvenot, D. y Morfin, R. F. (1983). Radioimmunoassay for zearalenone and zearalanol in human serum: Production, properties, and use of porcine antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(1): 16-23.
- Thrane, U. (2014). Fusarium. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press: 76-81.
- Tolosa, J., Graziani, G., Gaspari, A., Chianese, D., Ferrer, E., Mañes, J. y Ritieni, A. (2017). Multi-mycotoxin analysis in durum wheat pasta by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Toxins* **9**(2): 59.
- Torović, L., Dimitrov, N., Assunção, R. y Alvito, P. (2017). Risk assessment of patulin intake through apple-based food by infants and preschool children in Serbia. *Food Addit. Contam., Part A* **34**(11): 2023-2032.
- Tothill, I. E. (2011). 14 - Emerging bio-sensing methods for mycotoxin analysis. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*. Saeger, S. D., Woodhead Publishing: 359-384.
- Tsierkezos, N. G., Ritter, U., Thaha, Y. N. y Downing, C. (2015). Application of multi-walled carbon nanotubes modified with boron oxide nanoparticles in electrochemistry. *Ionics* **21**(11): 3087-3095.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C. y Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**(0): 55-75.
- Urraca, J. L., Marazuela, M. D. y Moreno-Bondi, M. C. (2004). Analysis for zearalenone and α -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **524**(1-2): 175-183.
- Uruguay (1994). Reglamento Bromatológico Nacional, Decreto N° 315/994. Uruguay, https://extranet.who.int/nutrition/gina/sites/default/files/URY%201994%20Reglamento%20Bromatol%C3%B3gico%20Nacional_0.pdf.
- Vaclavikova, M., Dzuman, Z., Lacina, O., Fenclova, M., Veprikova, Z., Zachariasova, M. y Hajslova, J. (2015). Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC–MS/MS analytical procedure. *Food Control* **47**: 577-584.
- Valcárcel, M. (2000). *Principles of Analytical Chemistry: A Textbook*. España, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

BIBLIOGRAFÍA

- Valle-Algarra, F. M., Mateo-Castro, R., Mateo, E. M., Gimeno-Adelantado, J. V. y Jiménez, M. (2014). Mycotoxins | Detection and analysis by classical techniques. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C. A. y Tortorello, M. L. Oxford, Academic Press: 862-868.
- Varga, J., Tóth, B., Mesterházy, Á., Téren, J. y Fazekas, B. (2004). Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in foods and feeds in Hungary. *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Logrieco, A. y Visconti, A., Springer Netherlands: 123-139.
- Vashist, S. K. (2012). Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics* **2**(3): 23-33.
- Vera Candioti, L., De Zan, M. M., Cámara, M. S. y Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* **124**: 123-138.
- Vidal, J. C., Bonel, L., Ezquerro, A., Hernández, S., Bertolín, J. R., Cubel, C. y Castillo, J. R. (2013). Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosens. Bioelectron.* **49**(0): 146-158.
- Vig, A., Radoi, A., Muñoz-Berbel, X., Gyemant, G. y Marty, J.-L. (2009). Impedimetric aflatoxin M1 immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition. *Sens. Actuators, B Chem.* **138**(1): 214-220.
- Volpe, G., Palleschi, G. y Turner, A. P. F. (2003). 14 - New biosensors for microbiological analysis of food. *Detecting Pathogens in Food*. McMeekin, T. A., Woodhead Publishing: 294-331.
- Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry*. New York, Wiley.
- Wang, X., He, Q., Xu, Y., Liu, X., Shu, M., Tu, Z., Li, Y., Wang, W. y Cao, D. (2016a). Anti-idiotypic VHH phage display-mediated immuno-PCR for ultrasensitive determination of mycotoxin zearalenone in cereals. *Talanta* **147**: 410-415.
- Wang, Y., Dong, Y.-j., Li, Z.-m., Deng, L.-g., Guo, C.-y., Zhang, S.-q., Li, D.-p. y Zhao, S.-c. (2016b). Fast determination of multi-mycotoxins in corn by dispersive solid-phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Integrative Agriculture* **15**(7): 1656-1666.
- Wang, Y., Wen, Y. y Ling, Y.-C. (2017). Graphene oxide-based magnetic solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography for determination of patulin in apple juice. *Food Analytical Methods* **10**(1): 210-218.

- Warriner, K., Reddy, S. M., Namvar, A. y Neethirajan, S. (2014). Developments in nanoparticles for use in biosensors to assess food safety and quality. *Trends Food Sci. Technol.* **40**(2): 183-199.
- Waśkiewicz, A. (2014). Mycotoxins | Natural occurrence of mycotoxins in food. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Tortorello, C. A. B. L. Oxford, Academic Press: 880-886.
- Weidenbörner, M. (2001). *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Berlin, Springer.
- Welch, N. G., Scoble, J. A., Muir, B. W. y Pigram, P. J. (2017). Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays. *Biointerphases* **12**(2): 02D301.
- Whitaker, T. B., Slate, A. B., Doko, M. B., Maestroni, B. M. y Cannavan, A. (2010). *Sampling Procedures to Detect Mycotoxins in Agricultural Commodities*. Netherlands, Springer.
- Wright, S. A. I. (2015). Patulin in food. *Current Opinion in Food Science* **5**: 105-109.
- Wu, S., Duan, N., Zhang, W., Zhao, S. y Wang, Z. (2016). Screening and development of DNA aptamers as capture probes for colorimetric detection of patulin. *Anal. Biochem.* **508**: 58-64.
- Wu, Z., Xu, E., Chughtai, M. F. J., Jin, Z. y Irudayaraj, J. (2017). Highly sensitive fluorescence sensing of zearalenone using a novel aptasensor based on upconverting nanoparticles. *Food Chem.* **230**: 673-680.
- Wu, Z., Xu, E., Jin, Z. y Irudayaraj, J. (2018). An ultrasensitive aptasensor based on fluorescent resonant energy transfer and exonuclease-assisted target recycling for patulin detection. *Food Chem.* **249**: 136-142.
- Xiao, Y., Ju, H.-X. y Chen, H.-Y. (2000). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a colloid/cysteamine-modified gold electrode. *Anal. Biochem.* **278**(1): 22-28.
- Xing, Y., Meng, W., Sun, W., Li, D., Yu, Z., Tong, L. y Zhao, Y. (2016). Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 21 mycotoxins in *Radix Paeoniae Alba* by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. *J. Chromatogr. B* **1031**: 202-213.
- Yang, Y., Li, Q., Fang, G. y Wang, S. (2016). Preparation and evaluation of novel surface molecularly imprinted polymers by sol-gel process for online solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography to detect trace patulin in fruit derived products. *RSC Advances* **6**(59): 54510-54517.

BIBLIOGRAFÍA

- Yu, Y. y Fan, Z. (2017). Determination of patulin in apple juice using magnetic solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam., Part A* **34**(2): 273-281.
- Zambare, R. S., Dhopte, K. B., Patwardhan, A. V. y Nemade, P. R. (2017). Polyamine functionalized graphene oxide polysulfone mixed matrix membranes with improved hydrophilicity and anti-fouling properties. *Desalination* **403**: 24-35.
- Zhang, F., Liu, B., Liu, G., Sheng, W., Zhang, Y., Liu, Q. y Wang, S. (2018). Novel magnetic nanobeads-based fluoroimmunoassays for zearalenone detection in cereals using protein G as the recognition linker. *Sens. Actuators, B Chem.* **270**: 149-157.
- Zhang, H., Zhang, H., Aldalbahi, A., Zuo, X., Fan, C. y Mi, X. (2017a). Fluorescent biosensors enabled by graphene and graphene oxide. *Biosens. Bioelectron.* **89**: 96-106.
- Zhang, W., Han, Y., Chen, X., Luo, X., Wang, J., Yue, T. y Li, Z. (2017b). Surface molecularly imprinted polymer capped Mn-doped ZnS quantum dots as a phosphorescent nanosensor for detecting patulin in apple juice. *Food Chem.* **232**: 145-154.
- Zhao, H., Chen, X., Shen, C. y Qu, B. (2017). Determination of 16 mycotoxins in vegetable oils using a QuEChERS method combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam., Part A* **34**(2): 255-264.

