







VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA



iata

Instituto de Agroquímica  
y Tecnología de Alimentos

**Programa de Doctorado en Química (3154, R.D. 99/2011)**

# **Producción de anticuerpos y generación de metodologías inmunoquímicas para la detección de biotoxinas**

**Hadyn Duncan**

Trabajo realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia bajo la dirección del Dr. Antonio Abad Somovilla y en el Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo la dirección del Dr. Antonio Abad Fuentes para optar al grado de Doctor en Química.

Valencia, junio de 2022



**Antonio Abad Somovilla**, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia

y

**Antonio Abad Fuentes**, Investigador Científico del Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)

### **CERTIFICAN**

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Producción de anticuerpos y generación de metodologías inmunoquímicas para la detección de biotoxinas**”, ha sido realizada bajo su dirección por el Graduado en Química **Hadyn Duncan** en el Departamento de Química Orgánica (Universidad de Valencia) y en el Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) y autorizan su presentación para que sea calificada como tal.

Y para que así conste a los efectos oportunos y a petición del interesado, se expide el presente certificado en Burjassot, junio de 2022.

Fdo. Dr. Antonio Abad Somovilla

Fdo. Dr. Antonio Abad Fuentes



## AGRADECIMIENTOS

Es bien sabido que la realización de una tesis doctoral requiere de esfuerzo y mucha dedicación por el autor y los directores de la misma. Aún así, el desarrollo de esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo y motivación de todas y cada una de las personas que a continuación me gustaría dedicar unas líneas de agradecimiento.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Antonio Abad Somovilla y al Dr. Antonio Abad Fuentes, por la posibilidad de poder realizar este trabajo en vuestro grupo de investigación. Gracias a ello, he tenido la oportunidad de adquirir una seria de conocimientos de carácter competitivo en el mundo laboral y, además, vuestros consejos, sugerencias, correcciones y apoyo, me han ayudado crecer a nivel personal y aprovechar oportunidades que no se presentan todos los días. Os agradezco enormemente por ello.

A la Dra. Consuelo Agulló por su formación en mis primeros días en el laboratorio y por los recordatorios en cuanto al orden a lo largo de estos años. Gracias a usted, he aprendido la importancia de cuidar los detalles y exigir cierta calidad en la preparación de productos.

Por otro lado, al Dr. Josep Vicent Mercader por su ayuda y formación en mis primeras conjugaciones y ensayos ELISA. Agradezco profundamente tus sugerencias y conocimientos, sobre todo a largo de este último año.

Gracias al ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por la ayuda predoctoral FPI (BES-2016-078159), por el sustento económico y por permitirme llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Daniel López Puertollano, quien empezó esta aventura conmigo y me ha ayudado muchísimo en diversas etapas de esta tesis. Tus consejos y sugerencias (también las críticas) me han motivado avanzar con este proyecto en mis momentos de agobio. Agradezco tu apoyo, amistad y todo lo que he aprendido contigo.

Gracias a mis compañeros, los que me motivaron a empezar en esta línea de formación, Núria, Víctor, Amparo, Carlos, a los con que compartí momentos a lo largo de estos años, Marta, Ruth, Jaume, Ricardo, Laura, Jennifer, Patricia, Guillermo, y a mis compañeros/amigos de laboratorio (y fuera del laboratorio), Javi (gracias por tu ayuda y consejos en el laboratorio, como agradecimiento he decidido que este año nos tocará el gordo), Luis (por las conversaciones, cotilleos y distracciones en momentos de agobio), Diego (por mantenerme a tanto de todas las novedades), Ismael (por tu consejo y los numerosos cafés que te debo), Anna (por ser temporalmente mi minion, demasiado rápido crecen hoy en día), Giovanni (por los ánimos y el buen rollo en el laboratorio), Michael (por

apuntarse a todo y animarnos a hacer planes) y, por último, Paula (agradezco muchísimo todo tu ayuda y esfuerzo a lo largo de estos años, además de las miles de conversaciones).

También he de agradecer a mis amigos que tuvieron que soportar mis agobios, nervios, quejas, etc... A los residentes de Castellar-Oliveral (incluyendo el Tremolar) agradezco las distracciones y el hecho de no tomar nada en serio, sin vosotros la vida sería aburrida. A mis mejores amigas Laura y Pilar, por estar allí desde mis primeros días en España, me habéis apoyado en cada uno de mis logros, os lo agradezco profundamente. A mis nuevos compañeros sevillanos (y alrededores) por los ánimos en esta recta final.

Para finalizar, me gustaría agradecer a mi familia. Sin el apoyo de mi madre y mis hermanos pequeños, este camino habría sido mucho más complicado. Hemos pasado por mucho estos últimos años, pero siempre hemos encontrado las fuerzas para seguir adelante. A Sonia, un miembro más de la familia. Por tu apoyo, ánimo, ayuda, amistad, buenos momentos, recuerdos, mensajes de buenos días y simplemente por estar allí, te lo agradezco muchísimo.

Alberto, mi vida cambió aquel día que nos encontramos. No sé cómo poner en palabras cuánto te agradezco por estar allí estos años. Has celebrado conmigo los buenos momentos y me has animado en los malos. No sé si somos increíbles, pero me hace increíblemente feliz tenerte a mi lado.







## RESUMEN

La patulina es un metabolito secundario tóxico producido por diferentes hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Xylaria*. Su presencia en la cadena alimentaria se debe a la contaminación de una gran variedad de alimentos con hongos productores, entre los cuales *P. expansum*, que infecta fundamentalmente manzanas, es considerado el principal hongo productor de patulina. A raíz de su reactividad con compuestos nucleofílicos a nivel celular y sus efectos tóxicos agudos reportados en riñones, intestino y el sistema inmunitario de vertebrados, la patulina se encuentra en la corta lista de micotoxinas vigiladas y reguladas mundialmente. Los límites máximos para patulina establecidos por la UE son 50 µg/kg para zumos, 25 µg/kg para productos sólidos y 10 µg/kg para alimentos destinados al consumo infantil. De modo similar a otros contaminantes relevantes, son muchos los procedimientos analíticos desarrollados para la detección de patulina en alimentos. No obstante, dichas metodologías se basan principalmente en técnicas cromatográficas, no existiendo métodos inmunoanalíticos que permitan su determinación fiable.

El enfoque principal de esta tesis doctoral se ha basado en la síntesis de nuevos derivados funcionalizados de patulina y su aplicación para el desarrollo de inmunoensayos que permitan detectar la micotoxina de modo cuantitativo en diferentes matrices alimentarias.

En una primera aproximación, los análogos estructurales, denominados haptenos, fueron sintetizados introduciendo un brazo espaciador que permitiera su acoplamiento posterior a proteínas portadoras, manteniendo lo más intacto posible el esqueleto original de la toxina. Con este propósito, se prepararon tres haptenos convencionales, los cuales fueron finalmente empleados para la preparación de bioconjugados tras su caracterización mediante técnicas espectroscópicas. Empleando estrategias previamente descritas en la bibliografía, se sintetizaron los haptenos **C4** y **C7**, mientras que el hapteno **C6** se obtuvo mediante una aproximación novedosa. Una vez preparados y caracterizados los conjugados, se llevó a cabo evaluación de la respuesta inmunitaria generada por cada hapteno mediante la inmunización de conejos.

Ante la ausencia de una adecuada respuesta inmunitaria y por tanto de anticuerpos con suficiente afinidad hacia la patulina, se decidió evaluar la viabilidad de un método de derivatización de la micotoxina que permitiera producir anticuerpos frente a un derivado estable. Para ello, se desarrollaron dos estrategias de derivatización aprovechando la reactividad de patulina con grupos nucleofílicos. El uso de diferentes compuestos aromáticos monotiolados como reactivos para la derivatización permitió obtener seis

aductos, y la funcionalidad de esta aproximación se estimó mediante la inmunización con el conjugado BSA-V y su análogo, el conjugado BSA-V4. La obtención de anticuerpos anti-V impulsó el desarrollo del segundo método de derivatización, el cual estuvo basado en la formación de derivados de patulina empleando compuestos aril-1,2-ditiol. Como resultado, se produjeron y caracterizaron un total de 5 aductos, empleando finalmente derivados proteicos de los aductos **VII**, **VIII** y **XI** para la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales. Los haptenos **VIIa**, **VIIIa**, **XIa** y **XIb** permitieron la obtención de un grupo amplio de anticuerpos, los cuales fueron exhaustivamente caracterizados y empleados exitosamente para el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos (ELISA) y de tiras inmunocromatográficas. Por último, la aplicación de ambas técnicas a muestras reales permitió demostrar su utilidad para el análisis de patulina a niveles legislativamente relevantes. En definitiva, esta tesis doctoral ha permitido el desarrollo de los primeros métodos rápidos basados en anticuerpos para la determinación de patulina, la única micotoxina regulada para la que no existían aproximaciones analíticas de este tipo.





## INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Patulina .....	3
1.1.1	Biosíntesis de patulina .....	3
1.1.2	Síntesis química de patulina .....	5
1.1.3	Reactividad y toxicidad de patulina.....	8
1.1.4	Marco legal.....	9
1.1.5	Incidencia en alimentos .....	10
1.2	Análisis de patulina en alimentos.....	14
1.2.1	Métodos cromatográficos .....	15
1.2.2	Métodos inmunoquímicos .....	16
1.3	Desarrollo de métodos inmunoquímicos.....	19
1.3.1	Síntesis de haptenos.....	20
1.3.2	Preparación de conjugados proteicos.....	22
1.3.3	Generación de anticuerpos específicos .....	24
1.3.3.1	Estructura y tipos de inmunoglobulina .....	28
1.3.3.2	Tipos de anticuerpos .....	29
1.3.3.3	Generación de anticuerpos monoclonales.....	30
1.4	Desarrollo de inmunoensayos .....	33
1.4.1	Caracterización de anticuerpos .....	33
1.4.1.1	ELISA .....	33
1.4.1.2	Tiras inmunorreactivas .....	39
1.4.2	Optimización del inmunoensayo .....	41
1.4.3	Validación analítica del ensayo desarrollado.....	42
2	OBJETIVOS.....	43

3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
3.1	Estrategia convencional para la generación de anticuerpos frente a la micotoxina patulina.....	47
3.1.1	Síntesis de los haptenos <b>C4</b> y <b>C7</b> .....	47
3.1.2	Diseño y síntesis del hapteno <b>C6</b> .....	49
3.1.3	Preparación de bioconjugados de los haptenos <b>C4</b> , <b>C7</b> y <b>C6</b> .....	52
3.1.4	Generación de anticuerpos policlonales .....	56
3.2	Aproximación alternativa basada en la derivatización de patulina con monotoles aromáticos	61
3.2.1	Preparación de haptenos y bioconjugados de los aductos ditiolados de patulina .....	64
3.2.2	Generación y caracterización de anticuerpos policlonales.....	67
3.3	Reacción de patulina con aril-1,2-ditioles.....	69
3.4	Generación de inmunorreactivos para patulina-aril-1,2-ditiol .....	74
3.4.1	Preparación de bioconjugados de los aductos patulina-aril-1,2-ditiol .....	74
3.4.2	Producción y caracterización de anticuerpos policlonales.....	86
3.4.3	Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales.....	88
3.4.1	Optimización y desarrollo del ELISA .....	93
3.4.1.1	Condiciones de ensayo.....	94
3.4.1.2	Condiciones para la derivatización .....	97
3.4.1.3	Condiciones finales de los ensayos desarrollados.....	100
3.4.1.4	Aplicación a muestras .....	103
3.4.2	Desarrollo de tiras inmunorreactivas .....	109
3.4.2.1	Condiciones de ensayo.....	112
3.4.2.2	Validación de tiras inmunorreactivas.....	113
3.5	Aplicación del método de derivatización al desarrollo de técnicas cromatográficas instrumentales.....	120
3.5.1	Caracterización del aducto <b>VII</b> por espectrometría de masas de alta resolución.....	121
3.5.2	Desarrollo y validación del método LC-QTOF-MS .....	123
4	CONCLUSIONES.....	127
5	EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	131
5.1	Reagents, instruments and techniques.....	131
5.1.1	Hapten preparation .....	131
5.1.2	Buffers and solutions .....	132
5.1.3	Conjugate preparation.....	133
5.1.4	Antibody production and cell culture .....	133
5.1.5	Immunoassays .....	134
5.1.6	High resolution mass spectrometry (QTOF-MS) .....	135
5.2	Hapten and adduct synthesis.....	136
5.2.1	Synthesis of haptens <b>C4</b> and <b>C7</b> .....	136
5.2.2	Synthesis of hapten <b>C6</b> .....	142
5.2.3	Synthesis of adducts <b>I-VI</b> .....	151
5.2.3.1	Preparation of adduct <b>V</b> .....	151
5.2.3.2	Preparation of adducts <b>I-IV</b> and <b>VI</b> .....	152
5.2.4	Synthesis of hapten <b>V4</b> .....	155
5.2.5	Preparation of adducts <b>VII-XII</b> .....	157



5.2.5.1	Preparation and methylation of adduct <b>VII</b> .....	157
5.2.5.2	Preparation of adduct <b>VIII</b> .....	159
5.2.5.3	Preparation of adduct <b>IX</b> .....	161
5.2.5.4	Preparation of adduct <b>X</b> .....	162
5.2.5.5	Preparation of adduct <b>XI</b> .....	163
5.2.5.6	Preparation of adduct <b>XII</b> .....	164
5.2.6	Synthesis of haptens <b>VIIa</b> , <b>VIIIa</b> and <b>XIa</b> .....	165
5.2.6.1	Synthesis and methylation of hapten <b>VIIa</b> .....	165
5.2.6.2	Synthesis of hapten <b>VIIIa</b> .....	167
5.2.6.3	Synthesis of hapten <b>XIa</b> .....	169
5.2.7	Spacer arm synthesis .....	171
5.2.8	Synthesis of haptens <b>VIIb</b> , <b>VIIIb</b> and <b>XIb</b> .....	172
5.3	Preparation of protein–hapten conjugates .....	174
5.3.1	Conjugation of carboxylate-based haptens .....	174
5.3.2	Conjugation of azide-based haptens .....	175
5.3.2.1	Preparation of alkyne-modified proteins.....	175
5.3.2.2	Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction.....	175
5.3.3	Storage and conjugate characterization .....	175
5.4	Generation of polyclonal antibodies .....	176
5.5	Generation of monoclonal antibodies .....	177
5.6	Preparation of lateral flow immunoassay components.....	179
5.7	Competitive immunoassays .....	179
5.7.1	Competitive ELISA .....	179
5.7.2	Competitive immunostrip .....	180
5.7.3	Signal processing.....	180
5.8	Immunoassay optimization .....	181
5.8.1	pH and ionic strength evaluation .....	181
5.8.2	Matrix effects evaluation .....	181
5.9	Assay validation.....	182
6	REFERENCES .....	183
7	ANNEXES .....	201
7.1	Hapten synthesis and NMR spectra .....	201
7.2	ELISA data .....	231
7.3	Patent and publications .....	232



## ABREVIATURAS

A <sub>0</sub>	Absorbancia en ausencia de analito
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
A <sub>max</sub>	Absorbancia máxima de ensayo
A <sub>min</sub>	Absorbancia mínima de ensayo
BSA	Seroalbúmina bovina
CALB	Lipasa acrílica de <i>Candida antarctica</i>
CCF	Cromatografía en capa fina
CE	Comisión Europea
CuAAC	Cicloaddición azida-alquino catalizada por cobre (I)
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GAM	Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón
GAR	Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo
HAT	Suplemento o medio de cultivo con hipoxantina, aminopterina y timidina
HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)etano-1-sulfónico
HFCS	Suplemento de fusión y clonaje para hibridomas
HPLC	Cromatografía líquida de elevada eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HT	Suplemento o medio de cultivo con hipoxantina y timidina
I	Fuerza iónica
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
IC <sub>20,50,80,90</sub>	Concentración de analito que reduce en un 80, 50, 20 o 10% la señal máxima
Ig	Inmunoglobulina
LC	Línea control
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LT	Línea test
LT/LC	Relación de señal de línea test y línea control
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
mAb	Anticuerpo monoclonal
MALDI	Desorción-ionización láser asistida por matriz
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
Mw	Peso molecular
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NP	Nanopartícula
OD	Densidad óptica
OPD	o-Fenilenediamina
OVA	Ovoalbúmina
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
R	Coefficiente de recuperación
RAM	Anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón
rAs	Antisuero de conejo
RGB	Red, Green, Blue
RM	Relación molar hapteno/proteína
RMN	Resonancia magnética nuclear
SPR	Resonancia de plasmones superficiales

STC	Screening Target Concentration
THPTA	Tris(3-hidroxiopropiltriazolilmetil)amina
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
TOF	Detector de tiempo de vuelo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UE	Unión Europea
vLOD	Límite de detección visual





# 1 INTRODUCCIÓN

La presencia de contaminantes en la cadena alimentaria, especialmente en productos destinados a la población infantil, es uno de los riesgos que más preocupación genera entre los consumidores y las autoridades sanitarias europeas.<sup>1</sup> Entre los diferentes tipos de contaminantes potencialmente presentes en alimentos, las toxinas de origen natural ocupan un lugar destacado a causa de su inevitable aparición en todo tipo de productos y su amplia diversidad en cuanto a función biológica y toxicidad. Estas toxinas, o más comúnmente denominadas biotoxinas, pueden ser simplemente derivados de desecho o productos de protección y defensa.<sup>2</sup> En particular, las micotoxinas son consideradas como productos naturales producidos por especies fúngicas, en condiciones favorables de temperatura y humedad, que pueden ocasionar una respuesta tóxica a bajas concentraciones en vertebrados superiores y otros animales.<sup>3</sup> En consecuencia, la contaminación de alimentos y piensos con micotoxinas ha sido reconocida como una amenaza potencial para la salud humana y animal, ya sea por contaminación directa de materiales vegetales o sus productos, o en tejidos animales, leche y huevos tras la ingestión de pienso contaminado. Además de la variedad de efectos adversos para la salud provocados por la exposición aguda y crónica a las micotoxinas, su presencia representa una carga económica para el sector agroalimentario, resultando en pérdidas anuales millonarias a nivel internacional.<sup>4</sup>

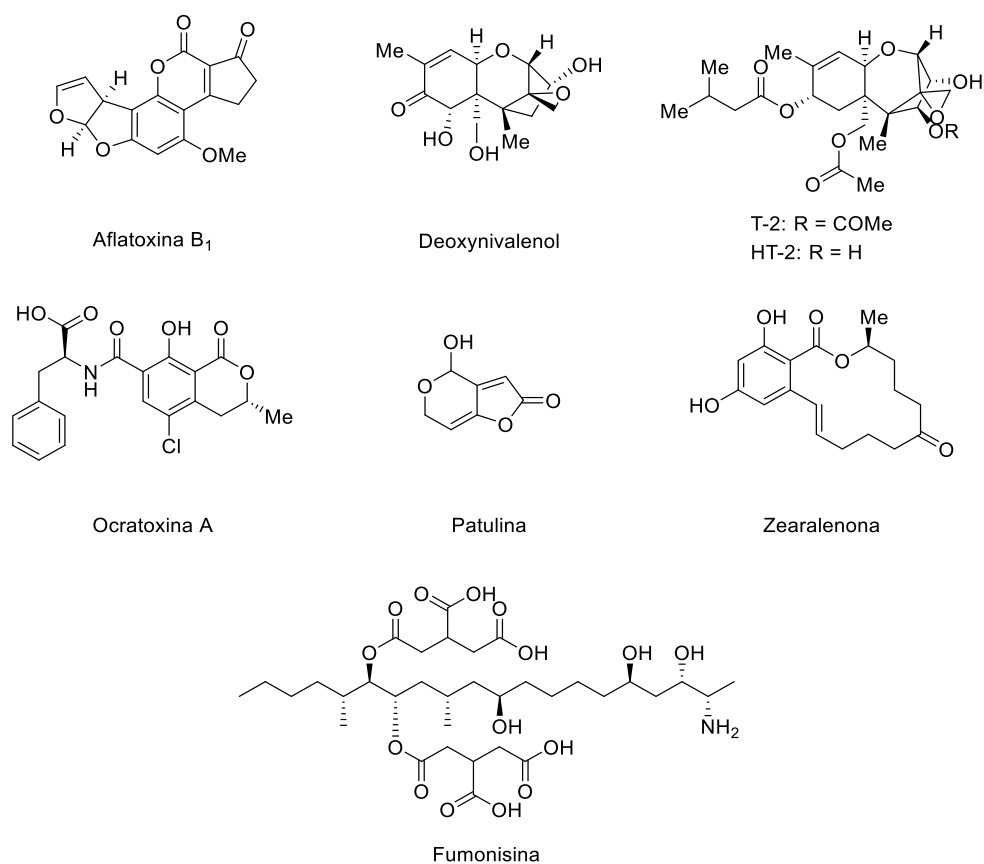
Entre los principales hongos productores de micotoxinas se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Claviceps*. Hasta el momento, se han identificado más de 400 micotoxinas con gran diversidad estructural, si bien sólo una



# INTRODUCCIÓN

minoría resultan problemáticas desde una perspectiva de seguridad alimentaria (**Figura 1.1**). Consecuentemente, numerosos organismos sanitarios nacionales e internacionales han establecido regulaciones estrictas sobre los límites máximos para este grupo de micotoxinas en alimentos y piensos. Una de estas legislaciones es el reglamento 1881/2006, del 19 de diciembre de 2006, emitido por la Comisión Europea (CE).<sup>5</sup>

En 1985, la *Food and Agriculture Organization* (FAO) estimó que alrededor del 25% de los cultivos mundiales están afectados por el crecimiento de hongos productores de micotoxinas.<sup>6</sup> Ahora bien, datos actuales apuntan a que esta estimación podría ser incluso mayor (60-80%), y se predice un crecimiento constante del número de cultivos infectados como consecuencia del calentamiento global.<sup>7</sup>



**Figura 1.1.** Estructura de las micotoxinas incluidas en el reglamento 1881/2006 de la Unión Europea.<sup>5</sup>

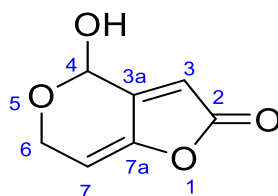
En la actualidad, las intoxicaciones agudas por ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas son pocos comunes; sin embargo, históricamente su presencia causó numerosas intoxicaciones con elevadas tasas de mortalidad, incluso en regiones con condiciones ambientales poco favorables para la proliferación de hongos.<sup>8</sup> El primer caso históricamente registrado de micotoxicosis en humanos se puede datar en la Edad Media, donde la contaminación de cereales por los alcaloides del cornezuelo del centeno provocó



intoxicaciones masivas. Otro ejemplo relevante, esta vez en animales, se dio en Gran Bretaña en los años 60, donde se produjo la muerte de pavos y patos por la contaminación de harinas con *Aspergillus flavus*, hongo productor de la micotoxina aflatoxina.<sup>9</sup>

## 1.1 Patulina

La patulina [4-hidroxi-4H-furo[3.2-c]piran-2(6H)-ona] (**Figura 1.2**) es un metabolito secundario tóxico cuya presencia en la cadena alimentaria se debe a la contaminación de cereales, frutas, verduras o derivados de los mismos con diferentes hongos productores pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Xylaria* (ver sección 1.1.1). Como consecuencia de su toxicidad (ver sección 1.1.3) e incidencia en una amplia gama de productos a nivel global (ver sección 1.1.5), se encuentra en la corta lista de micotoxinas vigiladas mundialmente.



**Figura 1.2.** Estructura de la micotoxina patulina.

La patulina se aisló por primera vez en 1943 a partir de cultivos de *Penicillium griseofulvum* y *Penicillium expansum* a raíz de un cribado encaminado a identificar nuevos compuestos naturales con actividad biológica. Aunque su descubrimiento generó gran interés por las posibles propiedades terapéuticas para combatir el resfriado común, rápidamente surgieron evidencias sobre sus efectos negativos sobre la salud.<sup>10,11</sup> Desde entonces, diferentes organismos internacionales han manifestado sus inquietudes en cuanto a la exposición de patulina a través de la dieta, estableciendo límites máximos en alimentos destinados al consumo humano en numerosos países (ver sección 1.1.4).

### 1.1.1 Biosíntesis de patulina

Como se ha mencionado previamente, los géneros de hongos productores de patulina son *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Xylaria*, siendo destacable el elevado número de especies conocido con capacidad de producir esta micotoxina.<sup>12,13</sup> No obstante, *P. expansum*, un hongo que infecta fundamentalmente manzanas, es considerado el principal hongo productor de patulina. Algunas de las especies productoras, como *P. compactum*, *P. novaezeelandiae* y *P. samsonianum*, son hongos del suelo y del pasto, o, como *P. gladioli* y *P. glandicola*, se hallan en bulbos de flores y bellotas no destinados al consumo humano o a la elaboración de pienso animal. Otras especies productoras son capaces de infectar una

# INTRODUCCIÓN

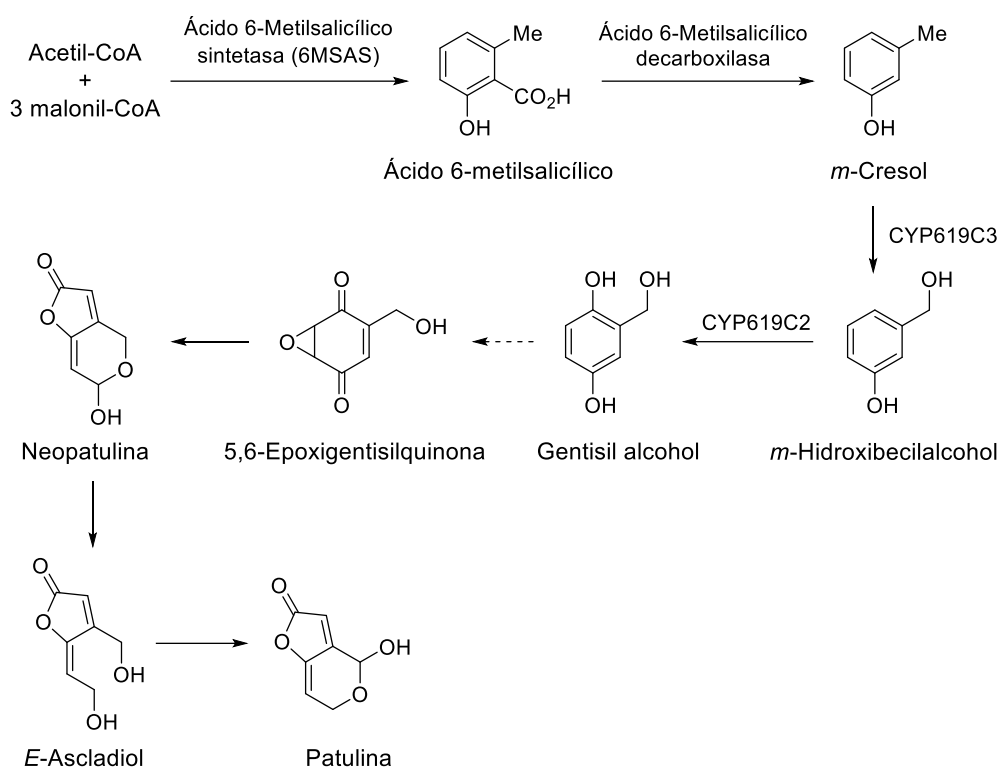
amplia gama de alimentos, siendo destacable la presencia de esta micotoxina en la cadena alimentaria como resultado de la contaminación de patata dulce con *P. sclerotigenum*, cereales con *P. griseofulvum* o marisco con *P. antarcticum*, entre otros. En cuanto a los géneros *Aspergillus* y *Paecilomyces*, la cantidad de especies corroboradas como productoras de patulina es algo más reducida, aunque, entre ellas, cabe destacar a las especies *A. clavatus*, *P. fulvus* y *P. niveus* como potenciales responsables de una exposición a esta micotoxina a través de la contaminación de cereales, fresas y manzanas, respectivamente. En la **Tabla 1.1** se recogen las principales especies de hongos productores de patulina y la matriz con mayor incidencia detectada.

**Tabla 1.1.** Principales especies confirmadas como productoras de patulina. Entre paréntesis se recoge la principal matriz contaminada con cada hongo.<sup>12</sup>

<b>Género <i>Aspergillus</i></b>		
<i>A. clavatus</i> (I, II, III)	<i>A. giganteus</i> (I, II)	<i>A. longivesica</i> (I, II)
<b>Género <i>Paecilomyces</i></b>		
<i>P. fulvus</i> (IV)	<i>P. niveus</i> (V)	<i>P. saturatus</i> (VIII, IX, X)
<b>Género <i>Penicillium</i></b>		
<i>P. antarcticum</i> (XIII, XIV)	<i>P. carneum</i> (VI, III, VII)	<i>P. clavigerum</i> (I, II)
<i>P. compactum</i> (I)	<i>P. concentricum</i> (I)	<i>P. coprobium</i> (I, II)
<i>P. dipodomycicola</i>	<i>P. expansum</i> (V, VIII, IX, X)	<i>P. gladioli</i> (XI, XII)
<i>P. glandicola</i> (XI, XII)	<i>P. griseofulvum</i> (III)	<i>P. marinum</i> (XIII, XIV)
<i>P. novaezeelandiae</i> (I)	<i>P. paneum</i> (III)	<i>P. psychrosexualis</i> (V)
<i>P. samsonianum</i> (I)	<i>P. sclerotigenum</i> (XV)	<i>P. vulpinum</i> (I, II)
<b>Género <i>Xylaria</i></b>		
<i>X. longiana</i> (XVI)		

<sup>I</sup> Suelo. <sup>II</sup> Estiércol. <sup>III</sup> Cereales. <sup>IV</sup> Fresas. <sup>V</sup> **Manzana**. <sup>VI</sup> Carne. <sup>VII</sup> Queso. <sup>VIII</sup> Frutas de pepita. <sup>IX</sup> Frutas de hueso. <sup>X</sup> Frutos pequeños. <sup>XI</sup> Bulbos de flores. <sup>XII</sup> Bellotas. <sup>XIII</sup> Algas marinas. <sup>XIV</sup> Marisco. <sup>XV</sup> Patata dulce. <sup>XVI</sup> Madera.

Con respeto a la síntesis bioquímica de patulina, la secuencia está muy documentada y se resume esquemáticamente en la **Figura 1.3**. La ruta comienza con la formación del ácido 6-metilsalicílico mediante la reducción y descarboxilación del producto de la condensación de un grupo acetil-CoA y tres grupos malonil-CoA.<sup>14</sup> Posteriormente, por medio de una descarboxilación, el ácido 6-metilsalicílico es convertido enzimáticamente en *m*-cresol.<sup>15</sup> Tras la oxidación bencílica del *m*-cresol e hidroxilación del anillo bencénico, se forma gentisil alcohol,<sup>16</sup> el cual experimenta una serie de transformaciones dando secuencialmente 5,6-epoxigentisilquinona, neopatulina y finalmente *E*-ascladiol, precursor directo de patulina.<sup>17-19</sup>



**Figura 1.3.** Ruta biosintética de patulina

La secuenciación del genoma de diferentes especies de *Penicillium* ha permitido determinar el clúster de genes involucrado en la producción de patulina.<sup>20</sup> La identificación de dicho clúster, compuesto por un total de quince genes, ha permitido discriminar aquellas especies incapaces de producir patulina, tal como ocurre con *P. roqueforti* que sólo dispone parcialmente del clúster necesario.<sup>12</sup> No obstante, también se ha observado que la mera presencia de este clúster no es determinante en su producción, habiendo otros factores involucrados.

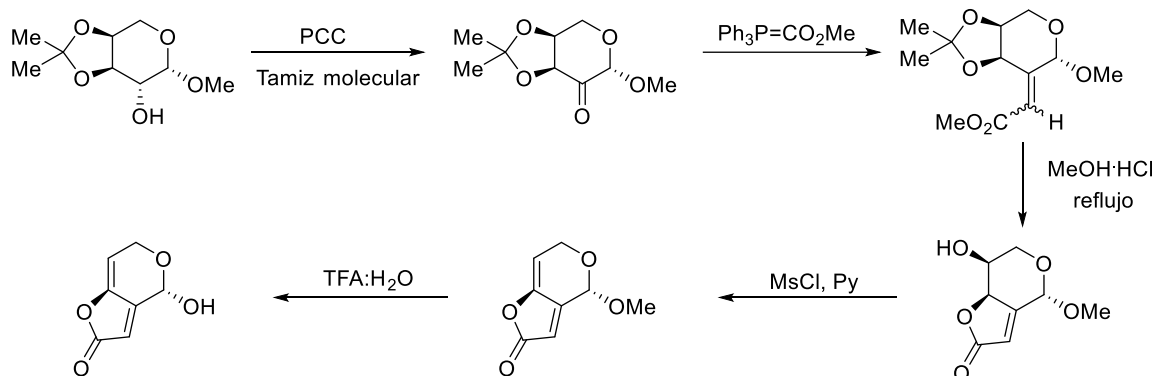
Diversos precursores en la secuencia biosintética de patulina, como el *E*-Ascladiol, la neopatulina, la isopatulina y el ácido desoxipatulínico, también se consideran micotoxinas, si bien su toxicidad es muy inferior a la de patulina.<sup>21</sup> De hecho, estudios recientes han propuesto emplear aditivos que favorecen la degradación de patulina, o impiden su formación a partir de *E*-Ascladiol, como medio de reducir los niveles de contaminación (ver sección 1.1.5).

## 1.1.2 Síntesis química de patulina

La preparación sintética de patulina ha sido descrita por varios autores a través de diferentes aproximaciones. Pese a que su descubrimiento se produjo en 1943, la primera síntesis total no fue descrita hasta 1950, confirmando así la correcta asignación estructural llevada a cabo un año antes.<sup>22</sup> Es más, hasta el final de los años 80 no se publicaron mejoras

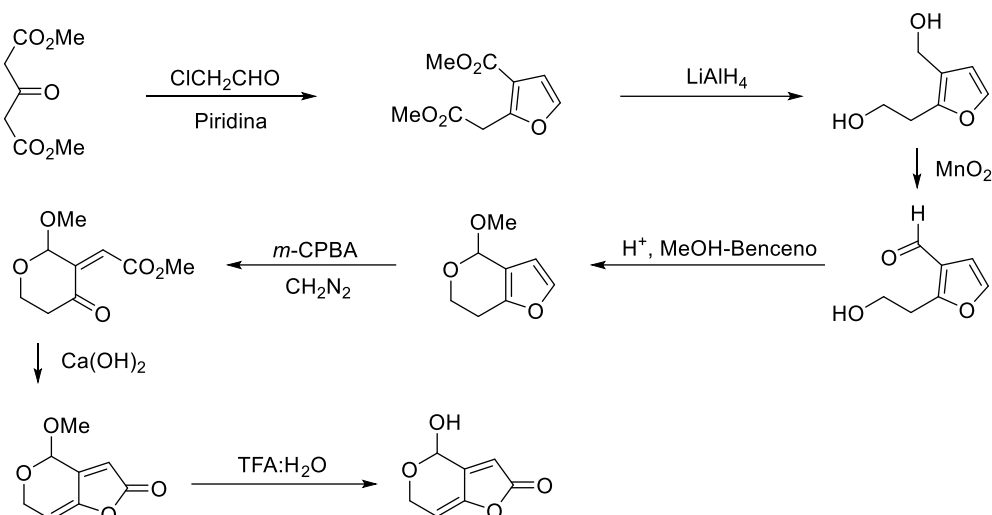
## INTRODUCCIÓN

en la síntesis total inicialmente descrita, basándose estas aproximaciones en rutas partiendo de la *L*-arabinosa.<sup>23,24</sup> La ruta descrita en 1989 por Seijas *et al.*<sup>24</sup> se inicia con la oxidación del grupo hidroxilo secundario de la metil 3,4-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -*L*-arabinosa al correspondiente grupo carbonilo, seguido de una reacción de Wittig, para obtener un éster  $\alpha,\beta$ -insaturado como una mezcla 3:1 de isómeros *E/Z*. El tratamiento ácido de esta mezcla promueve la hidrólisis de la agrupación dimetil-1,3-dioxolano y la formación concomitante del anillo de  $\gamma$ -lactona. Finalmente, la eliminación del grupo hidroxilo en C-7 y posterior hidrólisis del grupo metoxiacetálico en C-4 completa la síntesis de patulina, en un total de 7 etapas con un rendimiento global del 23% (**Figura 1.4**).



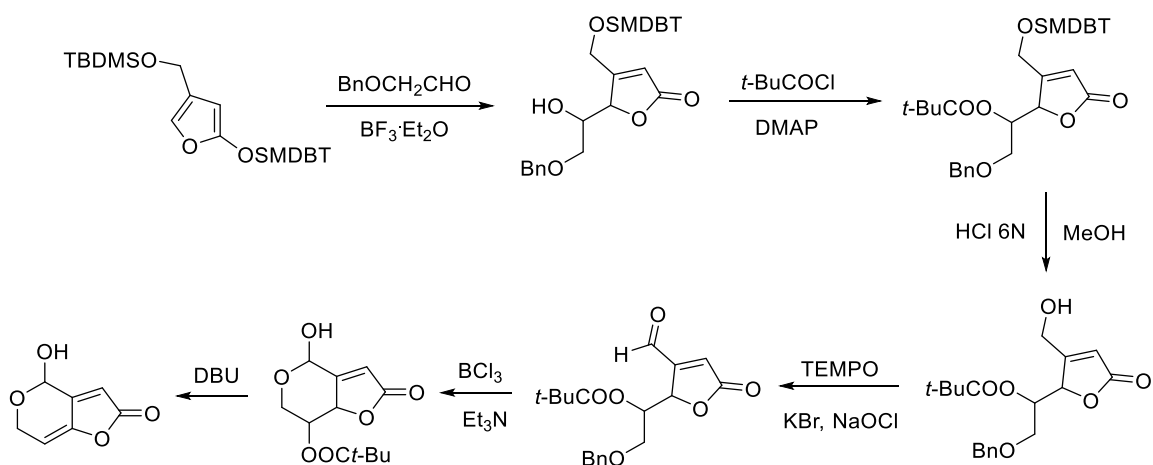
**Figura 1.4.** Síntesis de patulina descrita por Seijas *et al.*<sup>24</sup>

En 1994 se describió una aproximación alternativa empleando el 3-oxopentano-diato de dimetilo como material de partida (**Figura 1.5**).<sup>25</sup> La primera etapa de esta nueva ruta implica la formación de un anillo de furano convenientemente sustituido mediante la reacción de 3-oxopentano-diato de dimetilo y cloroacetaldehído en medio básico. La reducción con  $\text{LiAlH}_4$  de ambos grupos metoxycarbonilo del furano obtenido en esta etapa y la oxidación quimioselectiva del hidroxilo alílico con  $\text{MnO}_2$  dio lugar al aldehído correspondiente, el cual se trató con medio ácido para favorecer la formación del correspondiente hemiacetal. Tras la oxidación del anillo de furano con *m*-CPBA y metilación del ceto-ácido resultante con diazometano, se obtuvo el respectivo ceto-éster. La lactona  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$  insaturada característica del esqueleto de patulina se obtuvo mediante el tratamiento catalítico con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Por último, una hidrólisis ácida de metoxipatulina dio lugar a patulina en 7 etapas con un rendimiento global del 8%.



**Figura 1.5.** Síntesis de patulina descrita por Tada *et al.*<sup>25</sup>

Más adelante, Boukouvalas y Maltais propusieron en 1995 otra ruta alternativa que mejoraba los rendimientos globales obtenidos hasta entonces, obteniendo patulina en 6 etapas con un rendimiento global del 41% (**Figura 1.6**).<sup>26</sup> Esta aproximación se inicia con una reacción aldólica entre el *tert*-butil((5-((*tert*-butildimetilsilil)oxifuran-3-il)metoxi)dimetilsilano y el 2-(benciloxi)acetaldehído, seguido de la protección del hidroxilo secundario. La desprotección quimioselectiva del grupo hidroxilo primario en medio ácido y su oxidación empleando cantidades catalíticas de TEMPO, y posterior tratamiento con tricloruro de boro dio lugar al correspondiente hemiacetal precursor de patulina. La síntesis total de la micotoxina se completa con un simple tratamiento con DBU para favorecer la eliminación del grupo (benciloxi)metilo.



**Figura 1.6.** Síntesis de patulina descrita por Boukouvalas *et al.*<sup>26</sup>

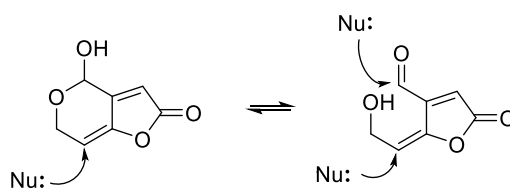
Gracias a las aportaciones de todos estos autores, actualmente la síntesis química de patulina se puede realizar de modo relativamente sencillo y eficiente. No obstante, cabe

# INTRODUCCIÓN

destacar que la patulina disponible comercialmente proviene de cultivos de *P. expansum*, dada la alta capacidad de producción del hongo.

## 1.1.3 Reactividad y toxicidad de patulina

La patulina está clasificada como un policétido, y está formada estructuralmente por un anillo de furopirano que incorpora como funcionalización un grupo  $\gamma$ -lactónico insaturado y una agrupación hemiacetálica. Además de poseer un bajo peso molecular (154.14), es una molécula electrofílica que experimenta con gran facilidad adiciones nucleofílicas tipo Michael por la posición C-7, particularmente cuando el nucleófilo es un grupo sulfhidrilo.<sup>27-30</sup> El modo de reacción inicialmente propuesto por algunos autores fue definitivamente confirmado en el año 2000, cuando Ralph Fliege y Manfred Metzler estudiaron con detalle la reactividad de patulina con diversos nucleófilos (**Figura 1.7**).<sup>31</sup> En sus estudios observaron una desaparición prácticamente total de patulina en tan solo cinco minutos al incubar la micotoxina en un medio acuoso con diferentes compuestos nucleofílicos, particularmente tioles, resultando en el aislamiento y caracterización de hasta dieciséis aductos. A raíz de ello, propusieron un posible mecanismo de degradación basado en el equilibrio inicial entre sus dos tautómeros naturales, la forma hemiacetálica y la forma abierta hidroxi-aldehídica. Al objeto de comprobar la implicación del mencionado equilibrio en el proceso de degradación, estos autores estudiaron la reactividad de la patulina acetilada en posición C-4 en condiciones análogas. La consecuencia del bloqueo de la posición hemiacetálica es una menor reactividad del sistema conjugado frente a la adición nucleofílica, aunque no impide que se produzca también la degradación completa del sistema de furopirano resultando en la formación muy mayoritaria de solo tres productos de degradación.



**Figura 1.7.** Reactividad con grupos nucleófilos descrita por Fliege *et al.*, 2000.<sup>31</sup>

Como se ha mencionado previamente, tras su aislamiento en 1943, se consideró a patulina como un potencial antibiótico dada su efectividad contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Investigaciones posteriores mostraron que dicha efectividad farmacéutica podría estar asociada con su elevada capacidad de formar derivados covalentes con compuestos biológicos que contienen grupos sulfhidrilo. No obstante, también reportaron que la reactividad de patulina no era exclusiva sobre las bacterias, y que podría presentar

efectos tóxicos en diversos sistemas biológicos, existiendo por tanto un riesgo potencial para la salud humana.<sup>20,32</sup>

Los estudios sobre la toxicidad de patulina en humanos se han llevado a cabo *in vitro* y apuntan a una principal reactividad a nivel celular. Como consecuencia de su capacidad de reacción con compuestos que contienen grupos sulfhidrilo, esta micotoxina puede ocasionar una reducción de los niveles de glutatión, induciendo así la producción de especies de oxígeno reactivo (EOR), cuyo exceso puede provocar estrés oxidativo sistémico, causando finalmente apoptosis (muerte celular programada).<sup>21,33</sup> Otro efecto tóxico descrito de esta micotoxina es la inducción de la autofagia como resultado de la degradación de proteínas citoplasmáticas y orgánulos específicos. Del mismo modo, se ha descrito una pérdida de actividad biológica de diferentes proteínas y enzimas, incluyendo la ARN polimerasa, la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa, la aminoacil-ARNt sintetasa, y la aldolasa muscular, entre otras.<sup>34-41</sup> En definitiva, se ha reportado que una ingesta continuada de patulina puede ocasionar a largo plazo problemas crónicos como inmunosupresión, genotoxicidad, neurotoxicidad y teratogenicidad.<sup>42-45</sup>

Ahora bien, dada la ausencia de tumores cancerígenos en ratones tras la administración oral de patulina y la falta de evidencias sobre la carcinogenicidad en humanos, la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha clasificado a patulina en el grupo 3, es decir, como una sustancia que no se puede considerar cancerígena para el ser humano.<sup>46-48</sup> Aun así, se ha descrito que una exposición aguda de patulina puede causar náuseas, congestión pulmonar, hemorragia intestinal y ulceraciones, entre otros síntomas.<sup>49-52</sup> Finalmente, cabe mencionar que la dosis letal (LD<sub>50</sub>) de patulina en ratas y ratones varía entre 20 a 100 mg/Kg, cantidades en principio superiores a las que estarán expuestos los seres vivos en condiciones ordinarias.<sup>53</sup>

### 1.1.4 Marco legal

En vista de los posibles efectos adversos sobre la salud que puede ocasionar la presencia de patulina en alimentos, esta está sujeta tanto a regulación nacional como internacional. Si bien la toxicidad de patulina es conocida desde hace varias décadas, no fue hasta los años 90 cuando se publicaron las primeras recomendaciones para esta micotoxina. En 1990, el *Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants* (JECFAC) estableció una ingesta semanal tolerable provisional (PTWI, *provisional tolerable weekly intake*) de 7 µg/kg basándose en las conclusiones realizadas por la IARC y estudios de toxicidad crónica en ratas.<sup>54</sup> Poco después, en 1995, se reevaluó el posible peligro teniendo en cuenta estudios más recientes, modificando la PTWI a una ingesta diaria máxima tolerable provisional (PMTDI, *provisional maximum tolerable daily intake*) de 0.4 µg/kg.<sup>55</sup>

# INTRODUCCIÓN

En la UE, el *Scientific Committee on Food* (SCF) respaldó en marzo de 2000 la PMTDI recomendada.<sup>56</sup> Más adelante, en 2003, el comité científico europeo publicó una serie de recomendaciones para reducir su presencia en alimentos, además de recomendar un límite máximo de 50 µg/kg en zumos de manzana.<sup>57</sup> Finalmente, esta recomendación fue reemplazada por el Reglamento No 1881/2006 del 19 de diciembre de 2006, donde se establecen los límites máximos de patulina en cualquier zumo de frutas, así como en bebidas alcohólicas derivadas de manzanas y productos sólidos de manzana, incluyendo compotas y purés. Paralelamente, el reglamento estableció un límite más restrictivo de 10 µg/kg si el producto está destinado a la población infantil. A día de hoy, el reglamento sigue vigente para los 27 Estados Miembros de la UE.<sup>5</sup> A nivel mundial, otros países han adoptado una regulación similar a la establecida en la UE, siendo el límite máximo de 50 µg/kg de patulina en alimentos aceptado en la mayoría de los países (**Tabla 1.2**).

**Tabla 1.2.** Contenido máximo regulado a nivel mundial para patulina en alimentos.<sup>a</sup>

<b>China</b> <sup>58</sup>	
Fruta, zumo de frutas y verduras, licor.	50
<b>Unión Europea</b> <sup>5</sup>	
Zumos de fruta, zumos de fruta a partir de concentrado y néctar de fruta; bebidas alcohólicas, sidra y otros derivados fermentados de manzana.	50
Productos sólidos de manzana, incluyendo compota de manzana y puré de manzana con destino a consumo directo.	25
Zumo de manzana y productos sólidos de manzana, incluyendo compota y puré de manzana para consumo infantil; alimentos infantiles no elaborados a base de cereales.	10
<b>Japón</b> <sup>59</sup>	
Zumo de manzana.	50
<b>Federación de Rusia</b> <sup>60</sup>	
Manzana, tomate, espino cerval de mar; bebidas sin alcohol, incluyendo zumo conteniendo manzana, tomate o espino cerval de mar; verduras, zumos de fruta, bebidas y concentrados de manzana, tomate, espino cerval de mar; pulpa de tomate y pulpa de manzana; mermeladas, pasta de frutas, confitura y combinados de frutas con azúcar de manzana y espino cerval de mar.	50
<b>Estados Unidos</b> <sup>59</sup>	
Zumo de manzana, zumo de manzana concentrado y el zumo de manzana de alimentos que contengan zumo de manzana como un ingrediente.	50

<sup>a</sup> Concentración expresada en µg/kg.

## 1.1.5 Incidencia en alimentos

Previamente se ha mencionado que existe un amplio espectro de especies de hongos productores de patulina que puede contaminar diversos productos destinados al consumo humano. Por regla general, este tipo de contaminación puede ser evitada o minimizada si se siguen escrupulosamente los principios de las buenas prácticas agrícolas y de fabricación.





Ahora bien, la incidencia de patulina reportada en diferentes productos a nivel internacional muestra que en ocasiones estos principios no se aplican íntegramente o resultan insuficientes. Una visión general de dicha incidencia se recoge en la **Tabla 1.3**, donde se muestran los resultados de diferentes estudios recientes en los que se informa de la presencia de patulina en diferentes alimentos, en ocasiones a niveles superiores al límite establecido en la UE.

**Tabla 1.3.** Incidencia de patulina en estudios realizados entre 2017-2022.

Matriz alimentaria	Positivos (%)	Rango detectado <sup>a</sup>	>EU <sup>b</sup>	País
Productos de manzana	8 (61)	2.4-59.9	2	Corea del Sur <sup>61</sup>
Jujube	22 (88)	<LOQ -50.6	-	China <sup>62</sup>
Baya de goji	9 (75)	<LOQ -43.2	-	
Pasas	1 (7)	<LOQ-35.9	-	
Zumo de uva	3 (43)	0.9-16.0	-	China <sup>63</sup>
Cerveza	2 (20)	42.9-43.5	-	España <sup>64</sup>
Vino	10 (50)	15.4-88.2	-	
Cava	7 (70)	14.7-24.7	-	
Sidra	2 (20)	21.7-29.9	-	
Zumo de manzana	2 (5)	11.1-13.8	-	China <sup>65</sup>
<i>Apple sour</i>	39 (100)	20-1416	37	Turquía <sup>66</sup>
Malta <i>Omalodu</i>	1 (2)	<LOQ-57.7	1	Namibia <sup>67</sup>
Malta <i>Otombo</i>	2 (6)	81.8-284.3	2	
Zumo de manzana	54 (74)	1.0-65.4	1	Serbia <sup>68</sup>
Zumo de manzana	8 (20)	1.7-9.5	-	Tailandia <sup>69</sup>
Zumo de albaricoque	4 (10)	2.0-6.3	-	
Zumo de melocotón	3 (8)	3.7-5.6	-	
Zumo de uva	7 (18)	1.9-3.5	-	
Higos secos	13 (65)	25.0-276.9	12	China <sup>70</sup>
Mermelada de manzana	2 (10)	1.0-11.0	-	

<sup>a</sup> Valores expresados en µg/L o µg/kg. <sup>b</sup> Número de muestras que superan el límite máximo establecido por la UE ( 50 µg/kg).

Además de la incidencia reportada a nivel académico, en los últimos años se han notificado seis alertas a través del *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) de la UE por exceder la cantidad regulada de patulina en zumos de manzana procedentes de países europeos (**Tabla 1.4**).<sup>71</sup> Más aún, este mismo periodo de tiempo presenta un número importante de productos retirados del mercado en diferentes países por presentar niveles alarmantes de patulina (**Tabla 1.5**), lo que pone de manifiesto la incidencia del problema y la necesidad de sistemas de autocontrol para esta micotoxina.

# INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.4.** Alertas emitidas por RASFF entre los años 2020 y 2022 por la presencia de patulina en alimentos.

Producto	País	Fecha	[PAT] <sup>a</sup>
Zumo de manzana y cereza	Rumanía	5 de mayo de 2022	154
Zumo de manzana	Dinamarca	3 de diciembre de 2021	66-67
Zumo de manzana ecológico	Alemania	24 de septiembre de 2021	285
Zumo de manzana	Países Bajos	14 de octubre de 2020	200
Zumo de manzana	Serbia	22 de julio de 2020	79
Zumo de manzana	España	31 de enero de 2020	123-162

<sup>a</sup> Valores de patulina detectada expresados en µg/L o µg/kg.

**Tabla 1.5.** Productos retirados del mercado por superar el límite establecido de patulina entre 2020-2022.<sup>78</sup>

Producto	País	Fecha
Puré de manzana y albaricoque	Francia	22 de febrero de 2022
Zumo de manzana	Dinamarca	6 de diciembre de 2021
Zumo de manzana "Ceres"	Singapur	18 de octubre de 2021
Zumo de manzana	Francia	23 de agosto de 2021
Zumo de manzana "Appletiser"	Sudáfrica	1 de octubre de 2021
Zumo de manzana "Appletiser"	Australia	22 de septiembre de 2021
Zumo de manzana	Australia	1 de septiembre de 2021
Puré de manzana	Francia	23 de agosto de 2021
Puré de manzana	Francia	2 de agosto de 2021
Puré de manzana	Francia	27 de julio de 2021
Compota de manzana y fresa	Francia	13 de julio de 2021
Compota de manzana y fresa	Francia	30 de junio de 2021
Zumo de manzana, pera y fresa	Bélgica	28 de junio de 2021
Zumo de manzana	Bélgica	26 de febrero de 2021
Zumo de manzana "Nudie"	Australia	4 de enero de 2021
Zumo de manzana "Nudie"	Australia	24 de diciembre de 2020
Zumo de manzana ecológico	Irlanda	10 de diciembre de 2020
Zumo de manzana	Bélgica	16 de octubre de 2020
Zumo de manzana	Hong Kong	3 de junio de 2020
Zumo de manzana "Aldi"	Australia	21 de mayo de 2020
Zumo de manzana y frambuesa	Singapur	1 de mayo de 2020
Zumo de manzana y grosella	Australia	29 de abril de 2020
Zumo de manzana	Hong Kong	21 de abril de 2020
Zumo de manzana	Hong Kong	9 de abril de 2020

En el momento en que un alimento se contamina con una especie productora de patulina, la reducción o eliminación de esta micotoxina, sin alterar las propiedades del alimento, se convierte en un reto importante. Este hecho se debe principalmente a la elevada solubilidad de patulina en medios acuosos y a su alta estabilidad en medios relativamente ácidos, de ahí su notable presencia en zumos procedentes de frutas infectadas.<sup>29</sup> Es más, su resistencia a altas temperaturas es otra de las características causantes de su incidencia en zumos,

dificultando así su eliminación por métodos tradicionales de pasteurización.<sup>72</sup> Por consiguiente, la aproximación más importante para controlar la acumulación de patulina es la inhibición del crecimiento de los hongos productores. A tal efecto, se ha reportado el tratamiento con agua caliente para contener la germinación de esporas o el uso de luz ultravioleta a fin de inactivar el hongo, aunque, hasta la fecha, el almacenamiento refrigerado es el método más empleado para productos poscosecha. Alterativamente, en el caso de manzanas, fungicidas como el fludioxonil, imazalil o tiabendazol son ampliamente utilizadas en postcosecha para prevenir la infección de hongos productores, pero su utilización plantea otros problemas, como el incremento en la aparición de resistencias frente al patógeno o la presencia de residuos de productos fitosanitarios en un momento en el que crece la demanda de alimentos más ecológicos.<sup>73</sup>

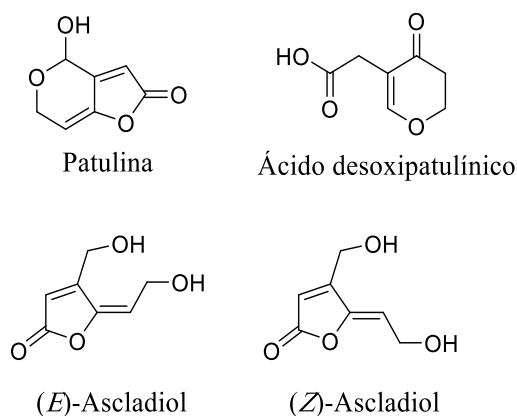
Como se ha comentado en el apartado anterior, uno de los objetivos prioritarios de las comisiones reguladoras es garantizar la salud del consumidor. A tal efecto, el Reglamento No 1881/2006 del 19 de diciembre de 2006 establece que una vez detectada la presencia de patulina en un alimento que supera el máximo regulado, este ha de ser descartado, quedando expresamente prohibida la reducción de la contaminación mediante su mezcla con otros productos alimentarios ni su uso como ingrediente en otros alimentos.<sup>5</sup> Es más, estos criterios se extienden a los productos destinados a la alimentación animal, recogidos en el artículo 5 de la directiva 2002/32/CE de 7 de mayo de 2002.<sup>74</sup>

No obstante, las importantes pérdidas económicas que pueden suponer el descarte o retirado del mercado de un producto contaminado con patulina ha impulsado el desarrollo de diferentes metodologías en el ámbito académico para su reducción o posible eliminación. En el caso de los productos de manzana, en concreto zumo de manzana, estos estudios han mostrado que procesos como la selección manual de manzanas sanas, el lavado con agua a alta presión, la clarificación, la filtración o la adsorción, pueden reducir significativamente los niveles de patulina.<sup>75</sup> Entre ellas, la adsorción se ha considerado como una estrategia sencilla y económica, permitiendo una disminución importante de patulina al tratar zumos contaminados con gel de alginato, nanotubos de carbono magnéticos o adsorbentes funcionalizados con cisteína.<sup>76</sup> Asimismo, también está descrito una reducción casi total de la cantidad de patulina al irradiar muestras con luz ultravioleta.<sup>77</sup> No obstante, la aplicabilidad de estas estrategias sigue en estudio dada la posible contaminación secundaria en el caso de los adsorbentes o los cambios en las propiedades del zumo una vez irradiado.

La detoxificación de patulina mediante aditivos químicos, tales como amoníaco, ácido ascórbico, dióxido de azufre u ozono, también ha sido investigada, pero considerando los posibles residuos mutagénicos y las variaciones en la calidad del zumo, estas

# INTRODUCCIÓN

aproximaciones tampoco se han implementado en la industria. Finalmente, algunos autores han aportado información sobre el rendimiento de diferentes aditivos biológicos, como levaduras o bacterias, para eliminar patulina de zumos. Por ejemplo, se ha observado que *Saccharomyces cerevisiae* o *Enterococcus faecium* puede reducir considerablemente los niveles de contaminación mediante adsorción, mientras que la adición de levaduras como *Rhodosporidium kratochvilovae*, *Rhodosporidium paludigenum* o *Rhodosporidium mucilaginoso* puede provocar la biodegradación de patulina a ácido desoxipatulínico, o en el caso de *S. cerevisiae*, *Kodameae ohmeri* o *Pichia caribbica*, su transformación a ascladiol, ambos con una toxicidad inferior a la de patulina (**Figura 1.8**). Estos hallazgos están respaldados por los bajos niveles de contaminación en productos fermentados, como por ejemplo la sidra, en cuya fabricación interviene *Saccharomyces bayanus*, responsable de la fermentación alcohólica. Aunque diversos estudios han demostrado una reducción del 99% de patulina tras un tratamiento con *S. bayanus*, a fecha de hoy es frecuente su detección en estos productos como resultado de la adición posterior de zumo de manzana para obtener una sidra con mayor dulzor.<sup>20,21,73</sup>



**Figura 1.8.** Estructuras de los principales productos de degradación de patulina.

## 1.2 Análisis de patulina en alimentos

El cumplimiento de los restrictivos límites establecidos por los organismos reguladores es fundamental para preservar la seguridad de los productos que llegan al consumidor, siendo imprescindible disponer de métodos analíticos con suficiente sensibilidad y selectividad para su detección en alimentos. Dentro de los programas de vigilancia, los métodos cromatográficos han sido adoptados como la metodología de referencia para la determinación de micotoxinas. No obstante, los métodos basados en el reconocimiento molecular donde se utilizan biorreceptores específicos son también ampliamente utilizados en la industria y en laboratorios de control.

## 1.2.1 Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos para la determinación de micotoxinas en alimentos varían de una simple cromatografía en capa fina hasta los más modernos y complejos, como son la cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD) o la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Como es bien sabido, el análisis cromatográfico se basa en la separación de los componentes de una muestra por interacción dinámica entre dos fases, una fase estacionaria y otra móvil. Estos métodos de análisis son altamente fiables, reproducibles y sensibles, pero su principal virtud es la posibilidad de determinar simultáneamente un gran número de analitos en una misma muestra, es decir, son ideales para el análisis multiresiduo.<sup>79</sup> La serie de ventajas que ofrecen estos métodos hace que sean los preferidos en programas oficiales de control de contaminantes. No obstante, a pesar de su elevado potencial analítico, las técnicas cromatográficas no están exentas de inconvenientes y limitaciones, ya que requieren de instrumentación sofisticada con mantenimiento constante y coste elevado, además de personal cualificado para su uso. Es más, tal como ocurre en el caso de patulina, la gran mayoría de estas metodologías requieren de etapas de extracción y limpieza empleando disolventes orgánicos, repercutiendo esto en el tiempo de análisis, seguridad del operario y coste del proceso.

Tomando en consideración los límites establecidos para patulina en alimentos, es imprescindible disponer de técnicas altamente fiables, sensibles y específicas. El bajo peso molecular y alta polaridad de la patulina, unido a la complejidad de muchas de las matrices alimentarias, supone un importante reto para su determinación. Los métodos instrumentales más habituales para la determinación de patulina están basados en sistemas de HPLC acoplados a detección ultravioleta o espectrometría de masas, siendo el primero el recomendado como método oficial por la *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*.<sup>80-89</sup> Ahora bien, estos métodos no están exentos de limitaciones. Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de patulina mediante HPLC-UV, se emplea una longitud de onda de 276 nm. Se da la circunstancia de que el 5-hidroximetilfurfural, compuesto presente en zumos de manzana, presenta similitudes en cuanto al máximo de absorción y al tiempo de retención con patulina, lo que conduce frecuentemente a un solapamiento de los picos cromatográficos y por tanto a una pérdida de selectividad.<sup>86,90</sup> De manera similar, la determinación mediante LC-MS también tiene sus limitaciones, presentando en ocasiones insuficiente sensibilidad a causa de la baja capacidad de ionización de patulina y la supresión de señal debido a la complejidad de las matrices analizadas.

# INTRODUCCIÓN

---

Considerando los inconvenientes mencionados, es habitual el uso de etapas de limpieza y preconcentración para llegar a los niveles de sensibilidad requeridos. Para ello, se han desarrollado diferentes procedimientos de pretratamiento para minimizar todo lo posible las interferencias de la matriz, siendo una extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) el procedimiento adoptado por la AOAC *International*.<sup>87</sup> No obstante, dado los grandes volúmenes de disolvente empleados en la LLE, el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) se utiliza cada vez en mayor medida.<sup>91</sup> Adoptando esta metodología se han publicado diversos resultados satisfactorios en el análisis de esta toxina en frutas como manzanas, peras, plátanos, fresas, entre otras.<sup>85,88,92,93</sup>

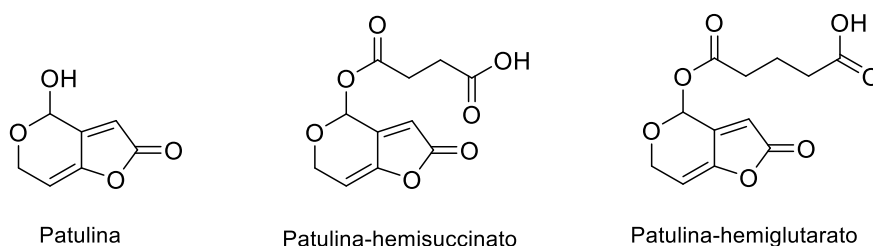
## 1.2.2 Métodos inmunoquímicos

Estos métodos analíticos, basados en las excepcionales cualidades de reconocimiento molecular de los anticuerpos y en la alta especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo, desempeñan un papel complementario a las técnicas convencionales cromatográficas dado que sus principales virtudes coinciden con las limitaciones de las técnicas anteriores. La gran selectividad que presenta el reconocimiento antígeno-anticuerpo posibilita el análisis directo de muestras líquidas sin tratamiento previo e incluso en presencia de moléculas con propiedades físico-químicas similares, minimizando las etapas previas de pretratamiento de la muestra o pudiendo llegar incluso a prescindir de ellas. Más aun, la sensibilidad de estos métodos es generalmente equiparable a la obtenida con los cromatográficos, lo que unido a su rapidez, portabilidad y sencillez los convierte en herramientas analíticas de gran utilidad en los departamentos de control en la industria alimentaria.

La tecnología de estos llamados inmunoensayos surgió a finales de 1950, con el desarrollo del primer ensayo inmunoquímico para la detección y cuantificación de la insulina humana.<sup>94</sup> En años posteriores, el uso de esta tecnología en los campos de la bioquímica y de la química clínica se extendió ampliamente, llegando a aplicarse en una gran variedad de análisis, como muestras clínicas, ambientales y alimentarias. Gracias a la versatilidad y facilidad de adaptación que presentan los anticuerpos, hoy en día existe una gran diversidad de formatos de ensayo, siendo sin duda los más usados el *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), con diferentes modos de detección (colorimétrico, fluorescente y quimioluminiscente), y el *Lateral Flow Immunoassay* (LFIA).<sup>95</sup>

En el campo del control de micotoxinas, las técnicas inmunoanalíticas están ampliamente implementadas en laboratorios de todo el mundo, existiendo una importante cantidad de empresas que comercializan pruebas de inmunodiagnóstico para el control y detección rápido de las micotoxinas reguladas, con la remarcable excepción de patulina.

El primer intento documentado de producir anticuerpos para patulina se remonta a 1986.<sup>96</sup> La estrategia consistió en introducir un espaciador carboxilado en la posición C-4 de la molécula mediante la reacción de patulina con anhídrido succínico (**Figura 1.9**). Sin embargo, los títulos obtenidos fueron bajos y el reconocimiento hacia patulina fue muy pobre. Esta aproximación fue posteriormente seguida por otros autores, pero utilizando como hapteno patulina-hemiglutarato, con resultados igualmente decepcionantes.<sup>97-99</sup>

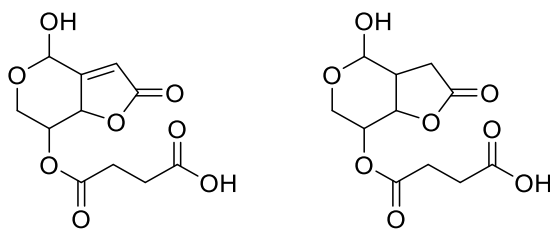


**Figura 1.9.** Estructura de patulina, patulina-hemisuccinato y patulina-hemiglutarato.

Dada la dificultad en obtener anticuerpos anti-patulina con suficiente afinidad para el desarrollo de un inmunoensayo a partir de inmunógenos que mantienen íntegra la agrupación diénica electrofílica de patulina, de Champdoré *et al.* publicaron en 2007 una estrategia alternativa empleando análogos estructurales de la micotoxina. Estos análogos mantienen el esqueleto de la toxina e incorporan una cadena hidrocarbonada en la posición C-7 a través de una función oxigenada, suprimiendo el doble enlace en esta posición, e incluso el sistema diénico completo, reduciendo así la reactividad electrofílica de la molécula (**Figura 1.10**). A partir de estos haptenos, los autores prepararon conjugados proteicos con lo que obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo. Tras determinar los títulos de los antiseros mediante ELISA, y por motivos no aclarados en el artículo, los autores optaron por una metodología poco habitual en este campo para la evaluación de su afinidad hacia patulina. Tras inmovilizar en un lecho cromatográfico el derivado de patulina, introdujeron en la columna los anticuerpos marcados con un fluoróforo (isotiocianato de tetrametilrodamina), los cuales deberían quedar retenidos por interacción con el hapteno. A continuación, se añadía la muestra a analizar, de forma que si esta contenía patulina se produciría la elución de los anticuerpos marcados, cuya concentración se podría determinar mediante fluorescencia. Según los autores, mediante este ensayo competitivo atípico sería posible cuantificar patulina entre 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ .<sup>100,101</sup>

## INTRODUCCIÓN

---



**Figura 1.10.** Estructura de los derivados descritos por de Champdoré *et al.*<sup>100</sup>

Varios años después, estos mismos autores utilizaron los antiseros obtenidos anteriormente para desarrollar un inmunosensor basado en SPR (*Surface Plasmon Resonance*) y un inmunoensayo homogéneo de fluorescencia polarizada.<sup>102,103</sup> En estos trabajos se afirma que fue posible determinar patulina en zumo de manzana a niveles inferiores a 0.1 µg/L. No obstante, es necesario señalar que ninguno de los artículos describe la realización de estudios de recuperación, análisis de muestras reales o validación frente a un método de referencia, lo que sin duda les resta credibilidad.

Por otro lado, se ha descrito el desarrollo de ensayos a partir de anticuerpos comerciales cuyo procedimiento de obtención es desconocido. Entre ellos, merece la pena destacar un anticuerpo policlonal de conejo suministrado por Agrisera (Vännäs, Suecia) que ha sido ampliamente utilizado en este contexto. Así, en 2014, el grupo de Raffaele Velotta publicó en *Biosensors and Bioelectronics* el desarrollo de un inmunosensor QCM (*Quartz-Crystal Microbalance*) capaz de determinar patulina en puré de manzana. Quizás lo más sorprendente de este trabajo no es la aceptable sensibilidad que se logra (aproximadamente 20 µg/L), sino que la detección de patulina se lleva a cabo mediante un formato *sandwich*, en el que dos moléculas de anticuerpo interactúan simultáneamente con la micotoxina, cuestionando así el fundamento esencial en el que descansan todos los métodos inmunoanalíticos para compuestos de bajo peso molecular.<sup>104</sup> Es más, este principio de detección inaudito fue utilizado de nuevo en 2019 por Song *et al.*, quienes publicaron en *Microchimica Acta* un inmunoensayo no competitivo basado en la interacción entre liposomas cargados con un fluoróforo y partículas magnéticas mediante el marcaje de ambos con inmunoglobulinas anti-patulina.<sup>105</sup> Este mismo grupo ha publicado recientemente en una revista tan prestigiosa como *Food Chemistry* el desarrollo de un inmunosensor electroquímico capaz de determinar patulina a 5 µg/L mediante la interacción directa entre la micotoxina y anticuerpos inmovilizados en el electrodo. Dejando a un lado que el trabajo no demuestra el desempeño del sistema bajo condiciones reales, el principal problema es que el inmunosensor responde con la misma sensibilidad a la BSA, lo que incita a pensar que puedan estar determinando el conjugado BSA-patulina en lugar de patulina libre. Por último, Riberi *et al.* publicaron en 2020 en *Microchemical Journal*,



empleando el antisuero comercializado por Agrisera, el desarrollo de un inmunosensor electroquímico no competitivo, es decir, también basado en la detección directa de la interacción entre patulina en disolución y el anticuerpo inmovilizado en el electrodo, un principio de funcionamiento que no cuenta con precedentes fiables en la bibliografía sobre inmunoanálisis de haptenos.<sup>106,107</sup>

En definitiva, hay que señalar que el desarrollo de métodos inmunoquímicos basados en las estrategias expuestas está limitado a unas pocas publicaciones en las que además no se demuestra de manera fehaciente la capacidad de los sistemas propuestos para determinar patulina a niveles relevantes. Estas dudas razonables, surgidas en algunos casos por la utilización de principios inmunoquímicos inéditos y por la falta de controles adecuados en otros, se ven fortalecidas por tres ausencias destacables: (i) sorprendentemente, no se ha descrito hasta la fecha la producción de anticuerpos monoclonales para patulina; (ii) en ninguno de los trabajos publicados los anticuerpos implicados se utilizan para desarrollar métodos inmunoanalíticos contrastados, como ELISA, inmunocromatografía de flujo lateral o columnas de inmunoafinidad para la purificación de la micotoxina; y (iii) ninguna de las principales empresas de inmunodiagnóstico alimentario comercializa métodos rápidos para la determinación de patulina, a diferencia de lo que ocurre con el resto de micotoxinas reguladas.

### **1.3 Desarrollo de métodos inmunoquímicos**

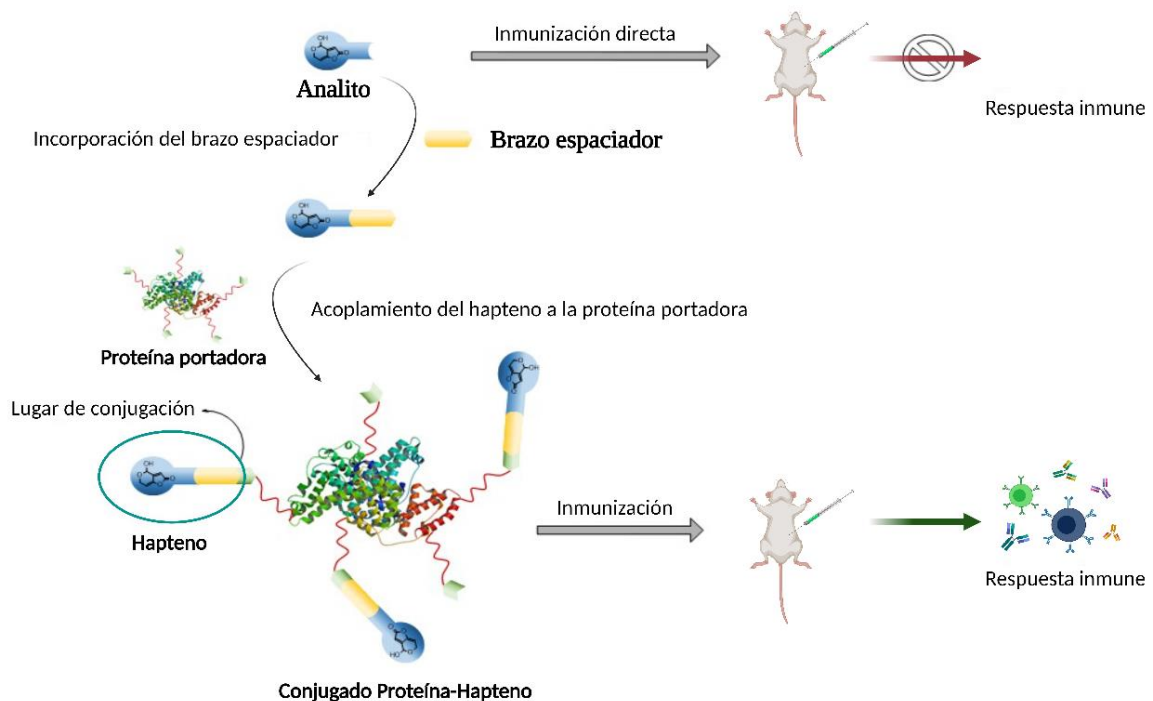
El desarrollo de un método inmunoquímico descansa en la disponibilidad de anticuerpos frente al analito en estudio, preferentemente de elevada afinidad y especificidad. En cuanto a la situación de patulina, algo parece haber fallado durante el proceso de producción de anticuerpos, por lo que resulta de interés revisar los principios básicos involucrados en el desarrollo de un inmunoensayo para así plantear una posible solución. Para moléculas de bajo peso molecular, como es el caso de patulina, existe una serie de directrices bien establecidas. En primer lugar, se comienza el proceso con el diseño y síntesis de haptenos, seguido por la preparación de conjugados proteicos y el uso de estos para la generación de anticuerpos anti-analito. Una vez los anticuerpos han sido aislados y purificados, se evalúan sus propiedades de reconocimiento mediante ensayos competitivos y se determinan las condiciones óptimas del ensayo que se pretende desarrollar. Finalmente, los procedimientos seleccionados son aplicados al análisis de muestras fortificadas y reales y validados mediante diferentes métodos de análisis y estadísticos. A continuación, se describen más detalladamente estas etapas.

# INTRODUCCIÓN

## 1.3.1 Síntesis de haptenos

Los agentes biológicos de gran tamaño, como virus, bacterias o proteínas, son capaces de desencadenar una respuesta adaptiva por sí solas al entrar en contacto con el sistema inmunitario de un organismo si dicho agente es reconocido como extraño. Por tanto, sería suficiente una inmunización periódica para obtener anticuerpos capaces de reconocer a estas macroestructuras. Asimismo, al poseer un tamaño elevado, estas presentarían varios dominios con los que interaccionar con los componentes del sistema inmunitario.

Por el contrario, moléculas pequeñas, como fármacos, plaguicidas o micotoxinas, son antígenos que carecen de la capacidad de inducir una reacción inmunitaria específica por sí mismos y acaban siendo metabolizados y excretados por el organismo. Desde un punto de vista inmunológico, estas moléculas, generalmente con un peso molecular inferior a 1000 Da, reciben el nombre de haptenos.<sup>108</sup> La patulina, con un peso molecular de 154 Da, constituiría por tanto un ejemplo de hapteno.<sup>109</sup> Con el fin de inducir una respuesta inmunitaria frente a este tipo de compuestos que no presentan función de epítipo inmunogénico, es necesario realizar su conjugación a una molécula de mayor tamaño, donde el hapteno pasa a ser uno de los epítopos del portador, resultando así accesible para el sistema inmunitario (**Figura 1.11**).<sup>110</sup>



**Figura 1.11.** Proceso esquematizado de generación de respuesta inmunitaria frente a moléculas de pequeño tamaño.

Para que sea posible la unión covalente a un portador, es necesario que el hapteno disponga de un grupo funcional a través del cual llevar a cabo el acoplamiento.<sup>111</sup> Grupos funcionales tales como los grupos carboxilo, hidroxilo, amino o sulfhidrilo pueden ser adecuados para este objetivo. Ahora bien, la conjugación directa del hapteno puede provocar modificaciones significativas de las propiedades electrónicas y/o conformacionales del mismo. Como consecuencia, el uso del propio analito diana para el proceso de conjugación no suele ser la estrategia más recomendable.

El diseño y preparación de análogos estructurales de un analito, además de permitir la introducción de sitios de unión con una funcionalización específica, evita el bloqueo de posibles grupos inmunogénicamente importantes.<sup>112</sup> Esta etapa crítica y determinante para la obtención de bioconjugados que conduzcan a la generación de anticuerpos es la que más incertidumbre genera debido a la gran variedad de posibles derivados sintéticos y su aplicación real en el proceso de inmunización. En esencia, estos derivados, a los que también se denomina haptenos, son producto de la unión de tres elementos básicos: un esqueleto principal lo más similar al analito diana, un grupo funcional terminal por el cual se llevará a cabo la unión covalente al portador, y un brazo espaciador. Dada la importancia que tiene la estructura del hapteno en la producción de anticuerpos, existen diferentes herramientas para el diseño racional de estos. Entre ellas, dos recursos que resultan de gran ayuda son la modelización molecular y los estudios de Landsteiner.

De los trabajos realizados por Landsteiner se sabe que la inmunogenicidad depende principalmente de cuatro características del inmunógeno: alteridad, tamaño molecular, complejidad química y susceptibilidad a procesamiento y presentación de antígeno. La influencia de estas características en la síntesis de un hapteno se ve reflejada en la selectividad, es decir, la capacidad de reconocimiento que tiene un anticuerpo hacia un analito en concreto y no a otro con similitudes estructurales.<sup>108</sup> En este sentido, el conocido como “Principio de Landsteiner” establece que un anticuerpo interacciona en mayor medida con la parte del hapteno más alejada del brazo espaciador que lo conecta con la proteína transportadora. La consecuencia de este principio es que modificaciones sobre la estructura del analito en la parte más cercana a la proteína portadora deberían afectar menos a la interacción con el anticuerpo, posibilitando así el reconocimiento de análogos del analito que presenten cambios en esa parte de la estructura. Paralelamente, la modelización molecular es una técnica que permite determinar de modo teórico las similitudes estructurales, electrónicas y conformacionales entre el analito diana y los haptenos diseñados.<sup>113</sup> Para ello se realiza una búsqueda conformacional extensiva, calculando los conformeros de menor energía de ambos, con el fin de seleccionar como hapteno “ideal”

# INTRODUCCIÓN

---

aquel cuyo confórmero más estable se asemeje lo más posible al del analito en cuestión.<sup>114</sup> No obstante, aunque estas herramientas nos pueden orientar sobre la idoneidad de un hapteno, cabe recordar que en muchas ocasiones estas aproximaciones teóricas se ven limitadas por la posibilidad y/o dificultad de la ruta sintética, la propia estabilidad de los haptenos o la relación coste-beneficio, entre otras.

Por su parte, el uso de un brazo espaciador permite una mejor exposición del esqueleto completo del analito al sistema inmunitario, separándolo de la molécula portadora y así evitando posibles enmascaramientos estéricos por parte de otros epítomos naturales del portador. Es más, para maximizar la probabilidad de generación de anticuerpos específicos, la incorporación del brazo espaciador debe hacerse de manera que se preserve las principales propiedades estereoelectrónicas del analito diana, tales como grupos funcionales más relevantes, distribución electrónica y propiedades hidrofóbicas.<sup>115</sup>

Dado que la función del brazo espaciador es facilitar la exposición del analito de interés, las propiedades químicas de dicho brazo son de gran importancia.<sup>112</sup> Para evitar que la respuesta inmunitaria se desvíe hacia el reconocimiento del brazo espaciador, es esencial que no presente grupos fuertemente inmunogénicos, tales como heteroátomos, dobles o triples enlaces, anillos aromáticos, grupos polares o halógenos. Habitualmente el uso de cadenas hidrocarbonadas alifáticas lineales de entre 4 y 6 átomos de carbono es la estrategia más utilizada para la generación de anticuerpos frente al analito diana.<sup>116</sup> Esta longitud de brazo permite una exposición óptima del hapteno, ya que el uso de una cadena más larga corre el riesgo de plegarse sobre sí misma, mientras que una demasiado corta podría facilitar el enmascaramiento del hapteno por parte de la molécula portadora. Por otro lado, el grupo funcional terminal del brazo se debe escoger de manera que permita su acoplamiento al portador sin inducir modificaciones en la estructura del analito. Como ya se ha comentado, los grupos funcionales más comúnmente empleados son los grupos carboxilo, amino, sulfhidrilo e hidroxilo, presentando cada uno de ellos una estrategia de conjugación propia.

## 1.3.2 Preparación de conjugados proteicos

Una vez preparados los derivados sintéticos, la siguiente etapa consiste en su acoplamiento a un portador de mayor tamaño. Los portadores más empleados en el proceso de producción de anticuerpos son generalmente de tipo proteico, los cuales permiten realizar la unión covalente del hapteno a diferentes grupos funcionales de los aminoácidos que los componen. Los grupos funcionales más frecuentemente utilizados para la conjugación son

los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina, los grupos carboxilato de los residuos de aspartato y glutamato, y los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína.

Como regla general, cualquier proteína exógena al sistema inmune del animal con suficientes residuos de aminoácidos accesibles del tipo deseado es válida para llevar a cabo la conjugación. Dentro de las proteínas más empleadas se encuentran las seroalbúminas bovina (BSA) y humana (HSA), la ovoalbúmina (OVA), y las hemocianinas de la lapa *Megathura crenulata* (KLH, *keyhole limpet hemocyanin*) y del cangrejo herradura *Limulus polyphemus* (HCH, *horseshoe crab hemocyanin*). El uso de una proteína frente a otra se basa sobre todo en su inmunogenicidad, solubilidad y potencial de conjugación. Entre ellas, la proteína BSA es utilizada con gran frecuencia en los procesos de inmunización de animales de laboratorio debido a que a las características mencionadas se añade su disponibilidad comercial y precio asequible, además de que presenta una razonable tolerancia a diferentes disolventes orgánicos, permitiendo el uso de codisolventes como DMSO o DMF, en los que son solubles los haptenos.<sup>117</sup>

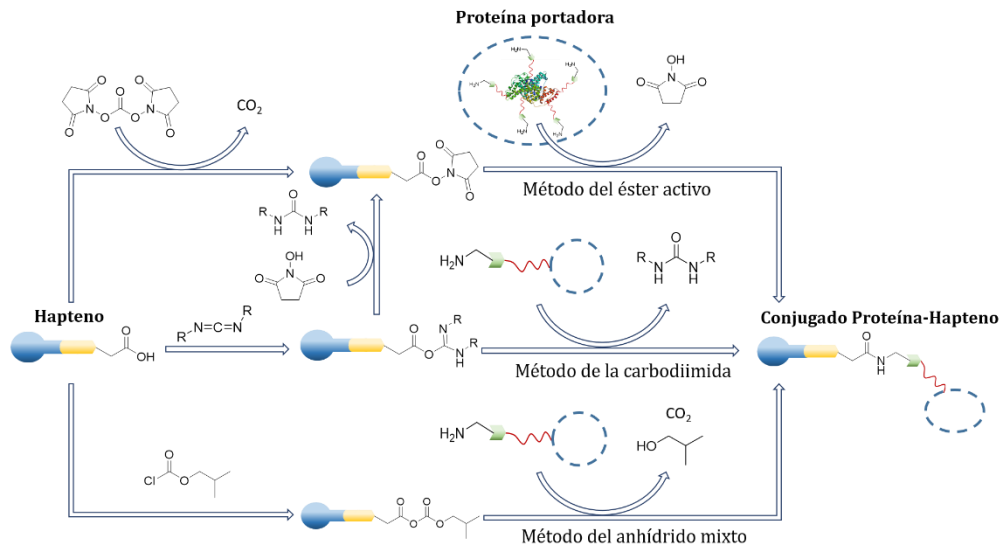
Como se adelantó previamente, existen diferentes estrategias de conjugación directa, siendo habitualmente el grupo funcional terminal del brazo espaciador el factor determinante del uso de una metodología u otra (**Figura 1.12**).<sup>118</sup> De modo general, la técnica más empleada es la preparación de haptenos con un grupo carboxilo terminal, formando un enlace amida con grupos amino de los residuos de lisina. Debido a que la reactividad del grupo carboxílico es relativamente baja frente a adiciones nucleofílicas, la formación del enlace amida en condiciones suaves se ve favorecida por una etapa previa de activación del hapteno. Para llevar a cabo dicha activación se dispone de diversos métodos, siendo frecuente emplear el éster activo de succinimidilo, gracias a su aceptable estabilidad que posibilita la purificación del producto previa a su conjugación, un aspecto relevante puesto que permite evitar posibles reacciones secundarias indeseadas durante el proceso de conjugación, además de posibilitar un control más preciso de la relación molar hapteno-proteína (RM).<sup>119</sup>

Una vez preparada y purificada la forma activa del hapteno, se hace reaccionar con la proteína en un medio neutro o ligeramente básico. Posteriormente, el conjugado proteína-hapteno se aísla, purifica y procesa para verificar y cuantificar la eficacia de la conjugación. El parámetro RM de un conjugado corresponde al número de moléculas de hapteno unidas por molécula de proteína, siendo su valor óptimo variable según la finalidad de los conjugados. Mediante una determinación previa de los coeficientes de extinción molar de los haptenos, siempre y cuando estos absorban suficientemente en UV/Vis, se puede estimar la RM obtenida en los conjugados mediante espectrofotometría UV/Vis. Sin

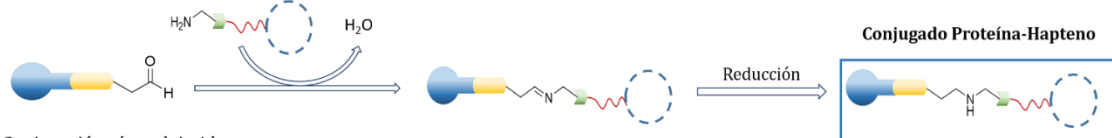
# INTRODUCCIÓN

embargo, el uso de técnicas más avanzadas como la espectrometría de masas MALDI-TOF permite estimar de modo más preciso la densidad hapténica de un conjugado mediante la diferencia de masa entre el conjugado y la proteína de referencia.<sup>120</sup>

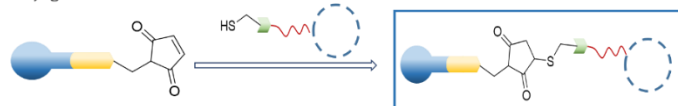
-Conjugación de haptenos con grupos carboxilatos



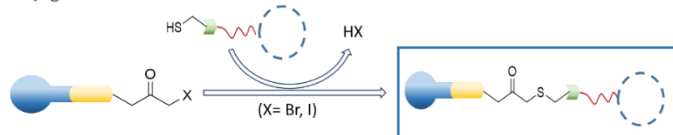
-Conjugación vía base de Schiff



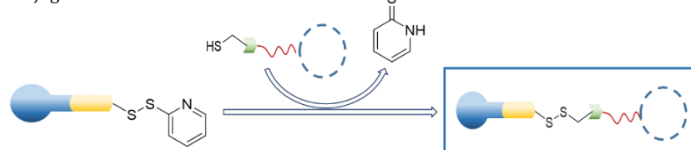
-Conjugación vía maleimida



-Conjugación vía haloacetilo



-Conjugación vía intercambio de disulfuro:



**Figura 1.12.** Métodos más comunes para la preparación de conjugados proteína-hapteno.

## 1.3.3 Generación de anticuerpos específicos

La activación del sistema inmunitario a través de un estímulo antigénico específico inicia la producción y secreción masiva de anticuerpos por parte de células especializadas del sistema inmunitario.<sup>121</sup> Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Ig), tienen una elevada afinidad hacia el antígeno frente al que se han generado, y su unión facilita la metabolización del agente extraño mediante diversos procesos de eliminación. De

modo tradicional, la inoculación periódica de un inmunógeno acompañado de un agente inmunopotenciador es el método habitual para la generación de anticuerpos frente a un antígeno. Los animales de laboratorio comúnmente empleados para dicha inoculación de modo controlado son ratones, conejos y cabras.

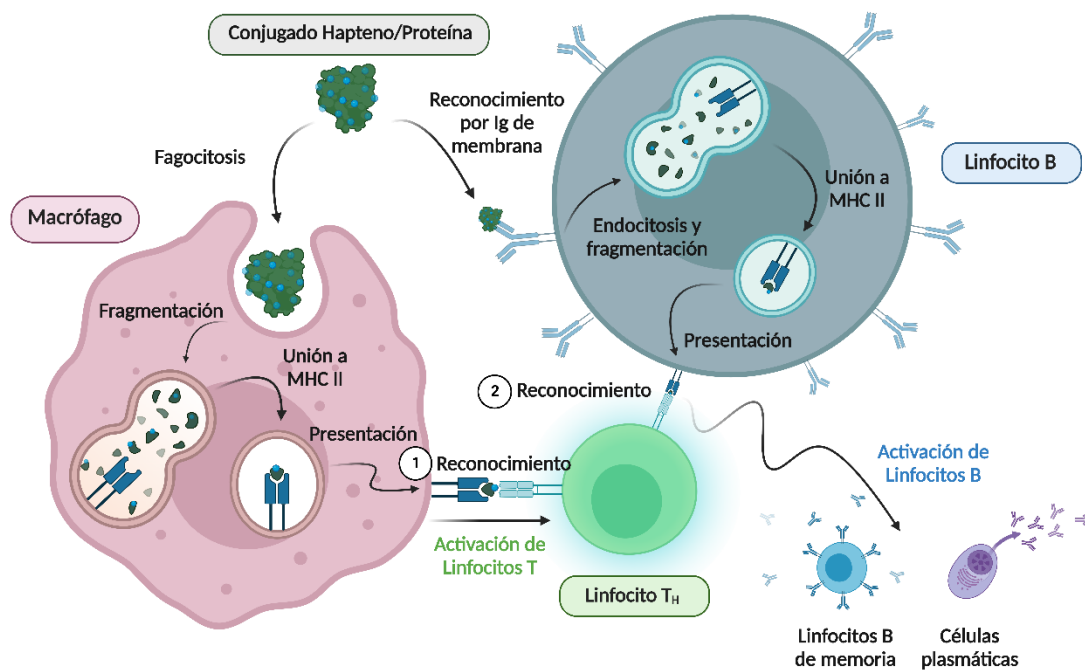
La generación de una respuesta inmune frente a un elemento exógeno es un proceso complejo que involucra a un gran número de componentes inmunitarios. Al presentar al sistema inmunitario un agente extraño, el primer mecanismo de defensa que se activa es la eliminación rápida e inespecífica de dicho agente. Esta primera línea de defensa se conoce como la inmunidad innata y se basa en la protección del organismo vía barreras tanto anatómicas y fisiológicas como humorales y celulares.

A nivel celular, el sistema del complemento y la fagocitosis del antígeno por parte de los leucocitos juegan papeles muy importantes en esta primera acción de protección. El sistema del complemento está formado por un grupo de proteínas séricas inactivas, las cuales, tras su activación por diferentes vías, ya sea mediante la unión de un anticuerpo o reacción con moléculas superficiales de microorganismos, son capaces de promover diferentes procesos para destruir el antígeno. Por otro lado, los leucocitos vigilan constantemente al organismo, estando disponibles en el caso de aparición de un antígeno, encargándose de la fagocitosis y degradación intracelular del mismo. La fagocitosis por parte de macrófagos o células dendríticas es también el punto de partida para la adquisición de inmunidad específica frente a una sustancia extraña, dando lugar a la respuesta inmunitaria adaptiva (**Figura 1.13**).

En cuanto un elemento exógeno es detectado por una célula presentadora de antígeno (APC, *antigen-presenting cell*), es ingerido mediante su adhesión a la membrana y su invaginación a través de la extensión de los pseudópodos. Una vez enjaulado, la fusión de esta vesícula con un lisosoma provoca su degradación por parte de las enzimas hidrolíticas contenidas en el lisosoma, conduciendo a la formación de oligopéptidos de unos 10 aminoácidos de longitud. A pesar de que el macrófago elimina gran parte del antígeno degradado, una parte de los péptidos formados se vinculan con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II), dirigiéndose a la membrana del macrófago. El MHC II es una glucoproteína formado por dos cadenas polipeptídicas diferentes unidas mediante interacciones no covalentes. Estructuralmente, estas cadenas peptídicas se distribuyen para formar una hendidura que permite la unión del péptido, además de contener en un extremo una región hidrofóbica que posibilita su anclaje a la membrana de la célula con el fin de presentar al exterior el péptido unido.

# INTRODUCCIÓN

La presentación del antígeno en la superficie de la APC da lugar al reconocimiento por un linfocito T auxiliar ( $T_H$ , *T helper cells*) a través de su receptor específico de antígeno, formado por la unión de dos cadenas polipeptídicas con un dominio constante y otro variable, siendo el variable el sitio de unión del antígeno. Gracias a la enorme variabilidad del sitio de unión, existe una gran posibilidad de reconocimiento de cualquier complejo péptido/MHC II. No obstante, cada una de estas células  $T_H$  sólo expresan un modelo de receptor específico para cada complejo péptido/MHC II, por lo que la activación de estas sólo ocurre cuando hay un reconocimiento eficaz.



**Figura 1.13.** Mecanismo de la respuesta inmunitaria frente a un antígeno peptídico (figura elaborada con biorender.com).

Como consecuencia de la activación, el linfocito  $T_H$  experimenta una expansión clonal y se diferencia en células T de memoria y células T efectoras. Adicionalmente, el linfocito  $T_H$  activado secreta diversas citoquinas, moléculas encargadas de activar otras células inmunitarias importantes como los linfocitos T citotóxicos ( $T_C$ ) y los linfocitos B, siendo ambos específicos al antígeno. Los linfocitos  $T_C$  presentan la función vital de vigilar las células del organismo y llevar a cabo la destrucción celular de cualquiera que exhiba antígeno (respuesta inmunitaria celular). En cambio, los linfocitos B activados son encargados de la generación de anticuerpos específicos para el agente exógeno (respuesta inmunitaria humoral).

Los linfocitos B también poseen la capacidad de incorporar antígenos mediante endocitosis mediada por los anticuerpos que posee en la membrana. Como se ha mencionado en el caso



de los linfocitos  $T_H$ , los linfocitos B también presentan la característica de un posible reconocimiento a prácticamente cualquier antígeno, expresando cada uno de ellos un sólo tipo de Ig receptor específico de membrana. El complejo anticuerpo-antígeno formado mediante la endocitosis es procesado y degradado de formar equivalente a lo que ocurre en cualquier otra APC, resultando en pequeños péptidos, los cuales posteriormente son capturados y presentados por una molécula de MCH II.

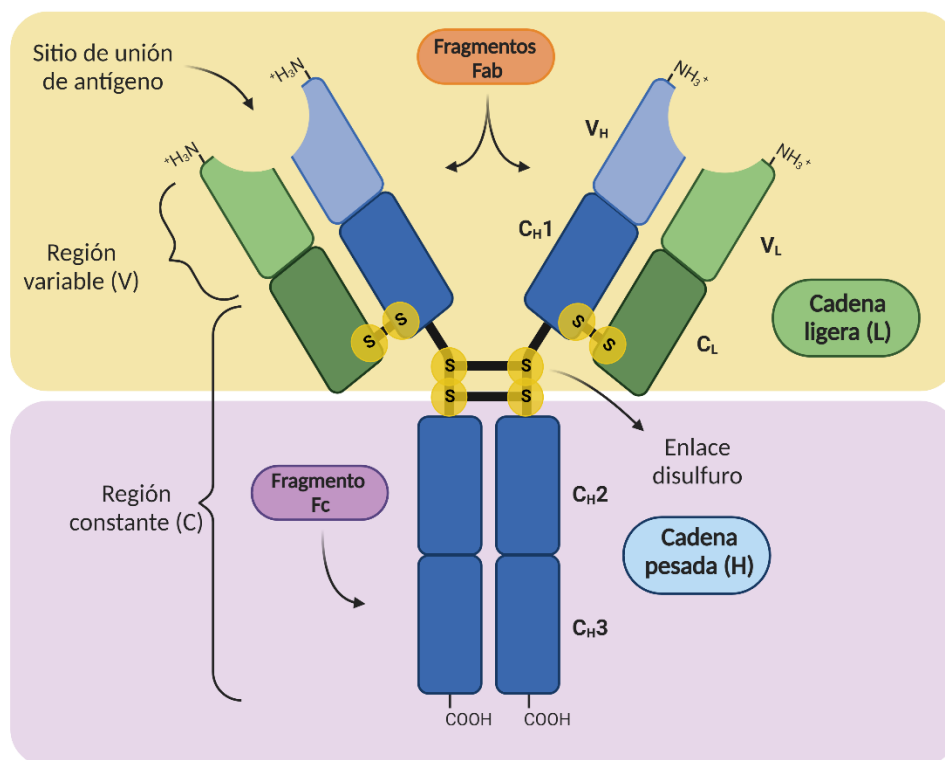
La activación de un linfocito B se da cuando un linfocito  $T_H$  previamente activado reconoce el complejo péptido-MCH II presentado por el linfocito B. Dicha activación conduce a la expansión clonal del mismo y a su diferenciación en células plasmáticas y linfocitos B de memoria. La función principal de las células plasmáticas es la secreción masiva de Igs con la misma capacidad de reconocimiento frente al antígeno que los anticuerpos de membrana del linfocito B original. Dado que los anticuerpos secretados sólo perduran unos pocos días en el organismo, la función de los linfocitos B de memoria es constituir y asegurar la base de la inmunidad a largo plazo. Gracias al proceso de maduración de la afinidad y la especificidad de los anticuerpos que tiene lugar en los linfocitos B, la producción de estas células de memoria permite una respuesta más eficaz frente a una posible reexposición al antígeno.

Con la intención de conseguir mayor eficiencia en el proceso de fagocitosis, además de una respuesta inmunitaria más potente, durante la inoculación de proteínas o conjugados proteína-hapteno es frecuente el uso de adyuvantes, sustancia o mezcla de sustancias capaces de inducir una respuesta inmunitaria innata.<sup>122</sup> Existen varios tipos de adyuvantes destinados específicamente a la generación de anticuerpos, siendo los más comunes las sales de aluminio, para la preparación de geles, y los aceites minerales, con capacidad de formar emulsiones. El adyuvante a base de aceites minerales más empleado en experimentación animal es el adyuvante de Freund, compuesto por una combinación de aceite de parafina, monooleato de manosa y, en su forma completa, formas inactivadas de las bacterias *Mycobacterium tuberculosis* o *M. butyricum*.<sup>123</sup> La inoculación de la emulsión formada mediante la mezcla vigorosa del antígeno en medio acuoso y el adyuvante, da lugar a depósitos insolubles que permiten la liberación lenta del antígeno. La activación inmunitaria con la versión completa aumenta las posibilidades de la invaginación del antígeno por una APC, resultando en su procesado y exposición, mientras que la inmunización posterior con la versión incompleta es suficiente para madurar dicha respuesta en cuanto a afinidad y especificidad.

# INTRODUCCIÓN

## 1.3.3.1 Estructura y tipos de inmunoglobulina

Como hemos visto a lo largo de este apartado, los anticuerpos juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria. A pesar de existir diferentes tipos de inmunoglobulinas, todas estas glicoproteínas presentan una estructura común. Para dar una visión más detallada de la estructura de estas Igs, se usará como modelo una Ig del tipo G (**Figura 1.14**), las más abundantes en el suero sanguíneo, representando aproximadamente el 80% de las inmunoglobulinas séricas. Por lo general, los anticuerpos son heterodímeros formados por cuatro cadenas peptídicas. Las IgG presentan un peso aproximado de 150 kDa y están constituidas por la unión de dos cadenas pesadas (H) idénticas de 50 kDa y dos cadenas ligeras (L) idénticas de 25 kDa. Las cadenas pesadas se unen entre sí mediante dos enlaces disulfuro, mientras que un único enlace une a las cadenas ligeras. La disponibilidad de dos centros de unión en los paratopos localizados en los extremos N-terminal de ambas cadenas (H y L) hace que estas inmunoglobulinas sean receptores divalentes.<sup>124</sup>



**Figura 1.14.** Representación gráfica simplificada de una inmunoglobulina G (IgG) (figura elaborada con biorender.com).

Estructuralmente los anticuerpos están formados por diferentes dominios, presentando una parte constante y otra, de unos 100-110 aminoácidos, variable. Las cadenas pesadas están formadas por cuatro dominios, mientras que las ligeras sólo presentan dos. La variación de aminoácidos entre anticuerpos se centra principalmente en la región amino

terminal de una cadena ligera y de una cadena pesada, y recibe el nombre de dominio variable (V). La región restante del anticuerpo se denomina dominio constante (C). Por lo tanto, las cadenas ligeras presentan los dominios  $V_L$  y  $C_L$ , mientras que las cadenas pesadas están constituidas por los dominios  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . La agrupación de estos dominios da lugar a la formación de tres lóbulos que originan la forma característica en “Y” de los anticuerpos. En la parte central de las inmunoglobulinas se encuentra la región bisagra, llamada así por su alta flexibilidad, que permite la movilidad de los diferentes lóbulos.

La fragmentación de la estructura primaria de las IgG mediante el uso de enzimas proteolíticas, papaína o pepsina, resulta en dos tipos de fragmentos. El primer tipo es el que posee capacidad de reconocimiento molecular, por lo que se denomina Fab (*fragment antigen binding*). El segundo fragmento está formado por los dominios  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ , y recibe el nombre de Fc por su capacidad para cristalizar (*fragment crystallizable*). Variaciones en las secuencias de las regiones constantes de las Ig dan lugar a cambios en su tamaño, carga, solubilidad y función. Estas variaciones originan diversos tipos de cadenas pesadas y ligeras que permite clasificar las Ig en distintas subclases. Existen cinco variaciones para las cadenas pesadas ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  o  $\mu$ ), mientras que en las cadenas ligeras sólo son dos ( $\kappa$  o  $\lambda$ ). La función de una Ig no se ve afectada por la cadena ligera, sino que está estrechamente relacionada con el tipo de cadena pesada, por lo que cada tipo de cadena pesada da lugar a una clase o isotipo de Ig: IgA (cadena  $\alpha$ ), IgD (cadena  $\delta$ ), IgE (cadena  $\epsilon$ ), IgG (cadena  $\gamma$ ) e IgM (cadena  $\mu$ ).

### 1.3.3.2 Tipos de anticuerpos

El desarrollo de un inmunoensayo puede estar basado en el uso de diferentes tipos de anticuerpos, los cuales se clasifican básicamente en tres grupos según su método de generación. El modo más rápido, sencillo y económico se basa en el aislamiento de estos a partir del suero sanguíneo de un animal inmunizado. Estos anticuerpos, denominados **anticuerpos policlonales**, o también antisueros, están constituido por una mezcla de inmunoglobulinas con diferentes propiedades de unión y representan por tanto un promedio de la respuesta inmunitaria global del animal inmunizado frente a un antígeno.<sup>125</sup> Entre los principales inconvenientes del uso de estas inmunoglobulinas para el desarrollo de métodos inmunoanalíticos figuran que el volumen de suero es limitado y que diferentes animales inmunizados con el mismo inmunógeno producen antisueros con diferentes características, lo que se traduce en una escasa reproducibilidad. A pesar de ello, el uso de anticuerpos policlonales sigue siendo una práctica muy extendida que además permite evaluar la idoneidad de un inmunógeno de modo relativamente rápido.

## INTRODUCCIÓN

---

Como solución al carácter finito de los anticuerpos policlonales, la producción *in vitro* de inmunoglobulinas a partir de una única línea celular da lugar a los llamados **anticuerpos monoclonales**. Estas inmunoglobulinas provienen de un clon de linfocito B del animal inmunizado, presentando características en cuanto a afinidad y especificidad bien establecidas. Mediante la tecnología de generación de hibridomas, el aislamiento de una línea celular inmortal permite la obtención de este tipo de anticuerpos de manera ilimitada y totalmente reproducible.<sup>126</sup> En cambio, este método es mucho más costoso y lento, estando habitualmente reservado para los inmunógenos con más potencial de generar anticuerpos con elevada afinidad y selectividad.

Por último, las técnicas de biología molecular permiten el aislamiento de los genes codificantes de las inmunoglobulinas y su expresión en otros sistemas biológicos, dando lugar así al tercer grupo de anticuerpos, los **anticuerpos recombinantes**.<sup>127</sup> Una ventaja de estos anticuerpos de tercera generación es que posibilitan, mediante mutagénesis, modificar las propiedades de unión al antígeno, e incluso prescindir de los animales de laboratorio si se utilizan librerías sintéticas para su producción.

### 1.3.3.3 Generación de anticuerpos monoclonales

Para superar las limitaciones que presenta el uso de antiseros en cuanto a reproducibilidad y cantidad, en 1975 surgió una nueva tecnología basada en la generación de una línea celular estable y secretora de un único tipo de inmunoglobulina mediante la fusión de dos células diferentes.<sup>126</sup> Para ello, un linfocito B de un animal previamente inoculado se fusiona con una célula tumoral de mieloma de la misma especie, resultando en la formación de una célula inmortal, denominada hibridoma, con capacidad prácticamente ilimitada de producir un único tipo de anticuerpo (**Figura 1.15**).

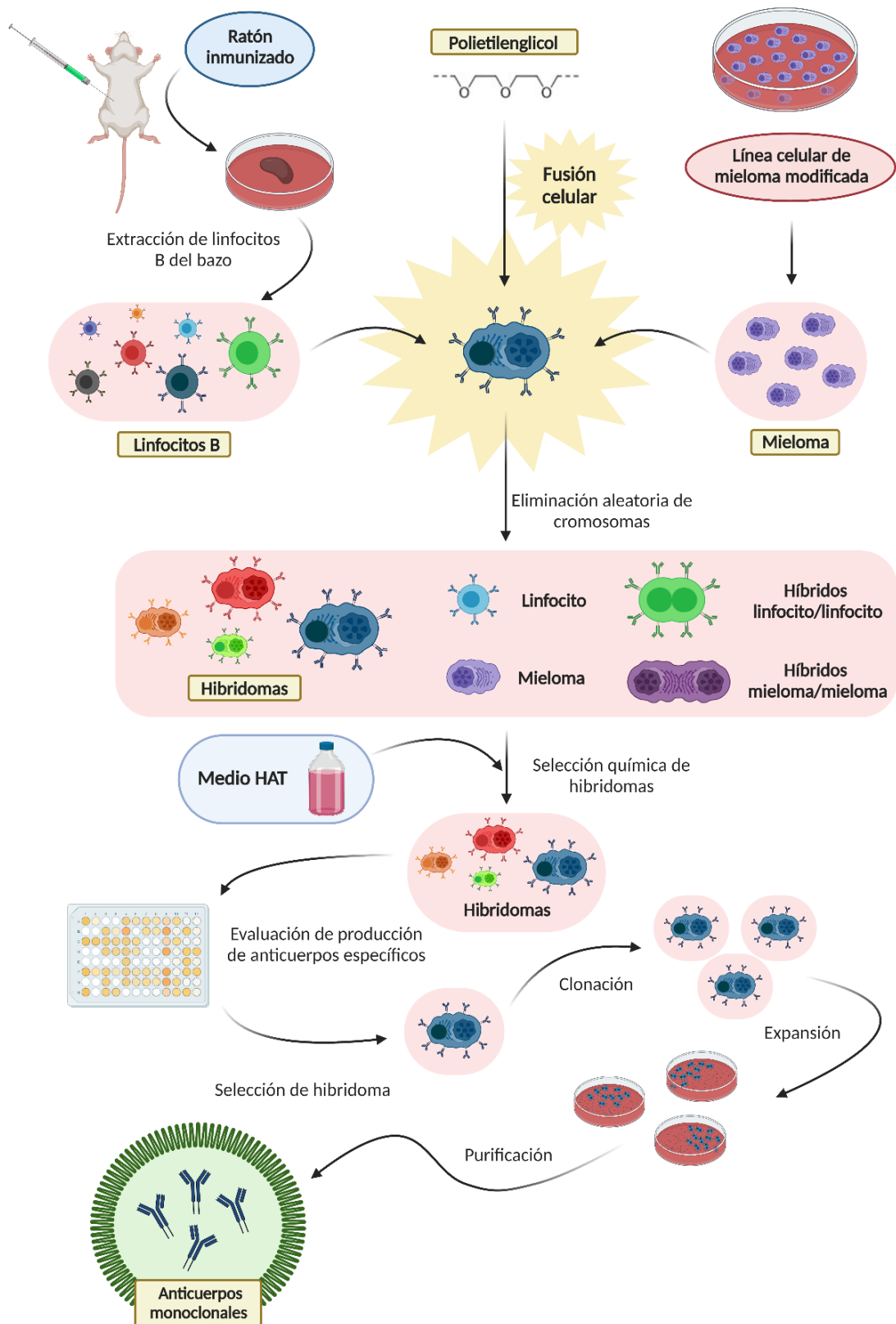
Dado que un linfocito *in vitro* posee una vida media muy corta, una forma de superar esta limitación es mediante su fusión con una célula de mieloma capaz de crecer indefinidamente en cultivo. Con el uso de polietilenglicol (PEG), un compuesto capaz de disolver de manera parcial las membranas celulares, y la reorganización posterior del material genético de las dos células parentales, se llega a obtener células híbridas linfocito-mieloma. Puesto que el proceso de fusión entre ambas poblaciones se produce al azar, se obtienen tanto hibridomas como células resultantes de la unión de dos mielomas o dos linfocitos, además de células no fusionadas. La presencia de linfocitos sin fusionar o sus correspondientes híbridos no interfieren en el proceso ya que perecen a los pocos días. En cuanto a la eliminación de los mielomas y sus respectivos híbridos, que sí suponen un problema, se realiza mediante selección química.

En las células animales, existen dos posibles rutas sintéticas para la obtención de los nucleótidos de purina requeridos para la síntesis de ADN, la ruta "natural" y la ruta "alternativa". La selección química de los hibridomas se consigue empleando líneas celulares de mieloma deficientes en uno de los genes que participan activamente en la síntesis de purinas vía la ruta alternativa y la adición de aminopterina al medio de cultivo, la cual bloquea la ruta natural. En presencia de aminopterina, las células de mieloma modificadas no son capaces de incorporar el pirofosfato de fosforribosilo (PRPP) en los nucleótidos de purina. Sin embargo, los hibridomas procedentes de linfocitos B pueden emplear la ruta alternativa para la producción de estos nucleótidos puesto que derivan de linfocitos B, en los cuales dicha ruta está plenamente operativa. En definitiva, sólo los híbridos procedentes de la fusión de un linfocito B y un mieloma modificado son capaces de prosperar en presencia de un medio post-fusión suplementado con aminopterina, medio al que también se añade hipoxantina y timidina para favorecer el crecimiento de los híbridos recién formados.

Con el fin de evaluar el potencial de producción de anticuerpos específicos frente al analito de interés, se lleva a cabo un análisis de los sobrenadantes de cultivo a los 10-12 días de la fusión. De modo general, el uso del ELISA diferencial, en el que cada sobrenadante se ensaya en presencia y ausencia de analito, permite el análisis de la capacidad de reconocimiento tanto hacia los conjugados proteína-hapteno como hacia el analito libre. Una vez identificados los hibridomas productores de anticuerpos específicos, se reevalúan mediante ELISA competitivo bidimensional con fines confirmatorios y comparativos.<sup>128</sup>

Tras seleccionar los hibridomas de mayor interés, es necesario realizar un proceso de aislamiento y estabilización de las líneas celulares seleccionadas que recibe el nombre de clonación celular y que se realiza mediante dilución límite. Este proceso se realiza tantas veces como sea necesario hasta conseguir una monoclonalidad total del hibridoma. Una vez logrado, el hibridoma se cultiva hasta obtener una cantidad suficiente de células para su congelación y conservación, y el sobrenadante se utiliza para obtener el anticuerpo monoclonal con el que desarrollar los ensayos inmunoquímicos.

# INTRODUCCIÓN



**Figura 1.15.** Representación esquemática del procedimiento experimental para la obtención de anticuerpos monoclonales (figura elaborada con biorender.com).

## 1.4 Desarrollo de inmunoensayos

Para el desarrollo de un inmunoensayo aplicable a la detección de un analito, es necesaria una caracterización previa exhaustiva de los inmunorreactivos disponibles. Una vez seleccionados los reactivos que formarán parte del ensayo final y optimizadas las condiciones experimentales, una validación analítica mediante la detección del analito en matrices reales y/o la comparación con un método de referencia, habitualmente de tipo cromatográfico, proporcionará información en cuanto a precisión y exactitud del método desarrollado.

### 1.4.1 Caracterización de anticuerpos

A la hora de evaluar la capacidad de reconocimiento de un anticuerpo hacia un analito se ha de tener en consideración principalmente dos propiedades: afinidad y especificidad. La afinidad de un anticuerpo corresponde a la suma de las fuerzas de atracción y repulsión que tienen lugar entre el sitio de unión del anticuerpo y el antígeno en estudio, es decir, la tendencia a formar el complejo anticuerpo-analito. Por su parte, la especificidad se basa en la capacidad de reconocimiento exclusivo del anticuerpo hacia el analito en presencia de otros tipos de antígenos, incluso antígenos estructuralmente semejantes. Mediante el uso de la tecnología de hibridomas, de modo general, muchos de los anticuerpos generados suelen tener una elevada afinidad. Sin embargo, la especificidad de un grupo de anticuerpos derivados de un mismo inmunógeno puede ser bastante dispar, pudiendo incluso ser beneficioso desde un punto de vista analítico que un anticuerpo sea capaz de reconocer a un grupo de compuestos estructuralmente emparentados.<sup>129</sup>

Para clasificar los anticuerpos en base a su afinidad y especificidad se puede hacer uso de diferentes metodologías inmunoquímicas, siendo una elección lógica la propia técnica a desarrollar. De entre la gran variedad de técnicas inmunoquímicas, las más empleadas para la detección de analitos de bajo peso molecular son el sistema ELISA y el ensayo de flujo lateral.

#### 1.4.1.1 ELISA

Existen diferentes variedades de ELISA que se recogen principalmente en dos tipos de formatos, formato competitivo y no competitivo. La detección y cuantificación de analitos de mayor tamaño, como proteínas y microorganismos, se puede realizar a través de la inmovilización de un anticuerpo, seguido por la adición del analito de interés y finalmente la adición de otro anticuerpo con un paratopo diferente al primero, o incluso el mismo anticuerpo si el antígeno presenta epitopos repetidos. Este formato no competitivo, también

## INTRODUCCIÓN

---

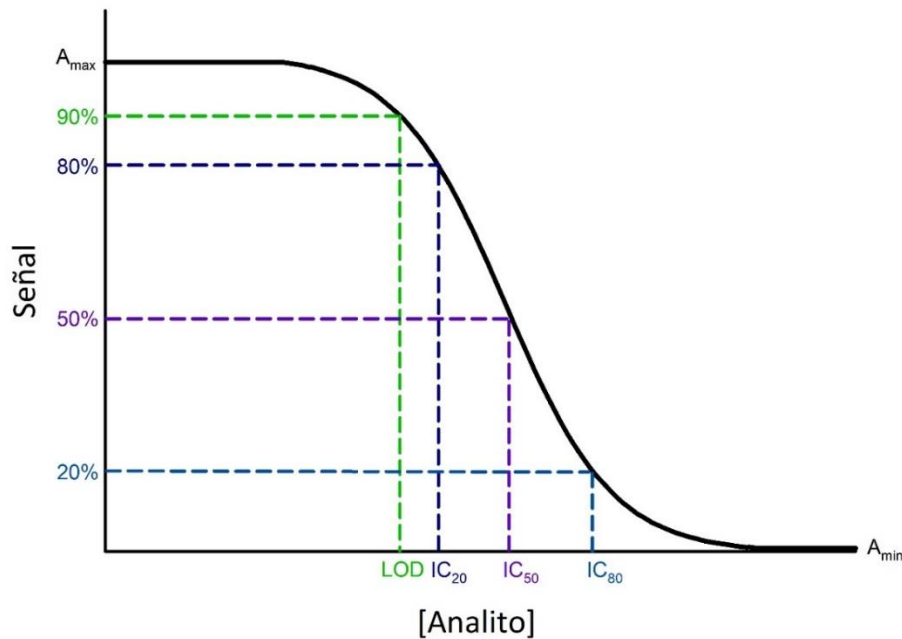
denominado de tipo *sandwich*, es posible siempre y cuando el tamaño del analito permita la unión simultánea de al menos dos anticuerpos. En el caso de moléculas de pequeño tamaño como es la toxina patulina, no es viable el uso de este tipo de formato dado que este tipo de analitos sólo constituye un único epítipo, por lo que es necesario recurrir al formato competitivo.

Fundamentalmente, el formato competitivo consiste en evaluar la interacción antígeno-anticuerpo en presencia de un conjugado competidor. De modo general, es necesaria la inmovilización de uno de los inmunorreactivos sobre un soporte sólido, mientras que el inmunorreactivo complementario, marcado enzimáticamente, se encuentra en disolución. El analito competirá con el hapteno unido al conjugado por los paratopos del anticuerpo, siendo la cantidad de conjugado unido proporcional a la señal observada. Para que la competición sea eficaz, la concentración de conjugado y de anticuerpo ha de ser limitante, de modo que variaciones en la concentración de analito ocasionen diferencias en la formación del complejo anticuerpo-conjugado. En ausencia de analito, la concentración de dicho complejo será máxima, y se generará por tanto la mayor señal posible, mientras que en presencia de un exceso de analito la concentración del complejo anticuerpo-conjugado será muy pequeña, por lo que apenas se generará señal. Por tanto, en un ensayo competitivo, la señal generada es inversamente proporcional a la concentración de analito.

El marcaje enzimático de los inmunorreactivos correspondientes permite la interpretación de los resultados mediante una señal de absorbancia, fluorescencia, electroquímica o luminiscencia. Entre las diferentes enzimas de marcaje, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*) destacan por su amplio uso en ELISA. En particular, la HRP cataliza la oxidación de sustratos como la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) o la *o*-fenilendiamina (OPD), entre otros, usando  $H_2O_2$  como co-sustrato, para dar lugar a un producto coloreado y cuantificable por absorbancia.

La representación de la señal generada frente a la concentración de analito en escala semilogarítmica proporciona una curva decreciente de tipo sigmoide, comúnmente denominada curva de inhibición (**Figura 1.16**). La sensibilidad de un inmunoensayo se suele determinar a partir del punto de inflexión de la curva, siendo más sensible cuanto menor sea la concentración en dicho punto. El valor del punto de inflexión, o tradicionalmente valor de  $IC_{50}$ , corresponde a la concentración de analito que proporciona una inhibición del 50% de la señal máxima del ensayo,  $A_{max}$ , siempre y cuando el valor de la asíntota inferior,  $A_{min}$ , tienda a cero. En otras palabras, la representación analítica de la curva de calibrado de un ELISA competitivo viene determinada por cuatro parámetros: una absorbancia máxima y mínima, una pendiente y un punto de inflexión.





**Figura 1.16.** Representación gráfica de una curva de inhibición sigmoide obtenida a partir de un ELISA competitivo.

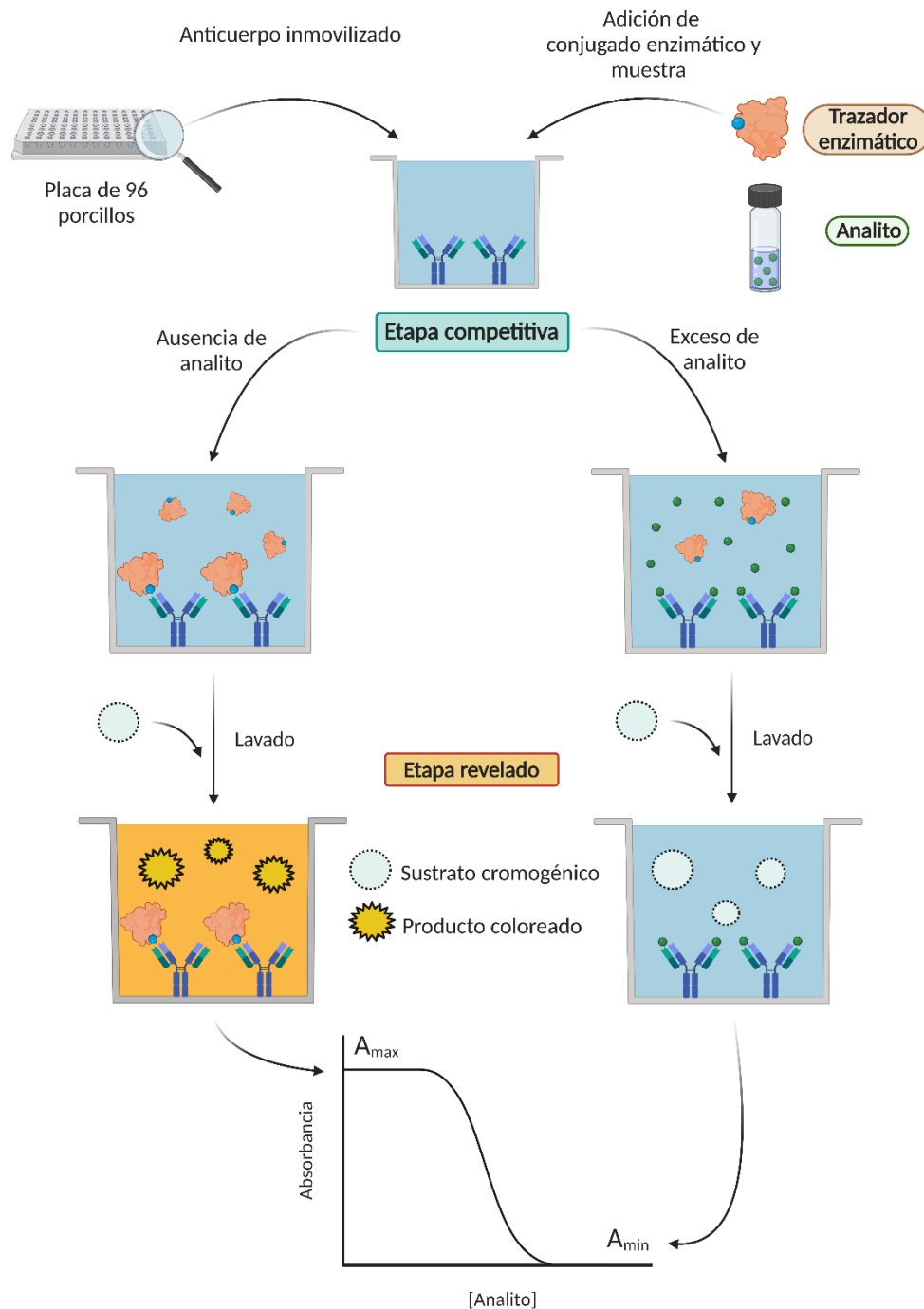
Además, a partir de la representación gráfica, es posible determinar el límite de detección (LOD) y el intervalo de cuantificación del método desarrollado. El LOD de un ensayo se define como la mínima concentración de analito detectable con fiabilidad, siendo habitual asimilarlo a la concentración que provoca una inhibición del 10% de la señal máxima. Por lo que respecta al rango de cuantificación, se suele definir entre las concentraciones que provocan una reducción del 20% y 80% de la  $A_{max}$ , rango donde los análisis son más precisos.

La inmovilización de un inmunorreactivo u otro sobre el soporte sólido, habitualmente una microplaca, da lugar a diferentes formatos de ensayo, teniendo generalmente todos ellos en común tres etapas: una etapa de inmovilización del inmunorreactivo sobre la microplaca, conocida como tapizado; una etapa competitiva entre el analito y el conjugado por unirse al anticuerpo; y, por último, una etapa de generación de la señal.

El primero de los formatos consiste en la inmovilización del anticuerpo sobre la superficie del soporte. Después de una etapa de lavado para eliminar el anticuerpo no adsorbido, se adiciona el analito y el conjugado enzima-hapteno, dando lugar a la etapa de competición. Una vez eliminado el exceso de reactivos mediante otra etapa de lavado, se procede con la generación de la señal a partir del propio conjugado enzimático. Al ser directamente uno de los participantes en la etapa competitiva el que se encuentra marcado, este tipo de ELISA se conoce como **formato directo** o de **anticuerpo inmovilizado**. El principal inconveniente de este formato es que la adsorción del anticuerpo sobre la placa no se produce de forma

# INTRODUCCIÓN

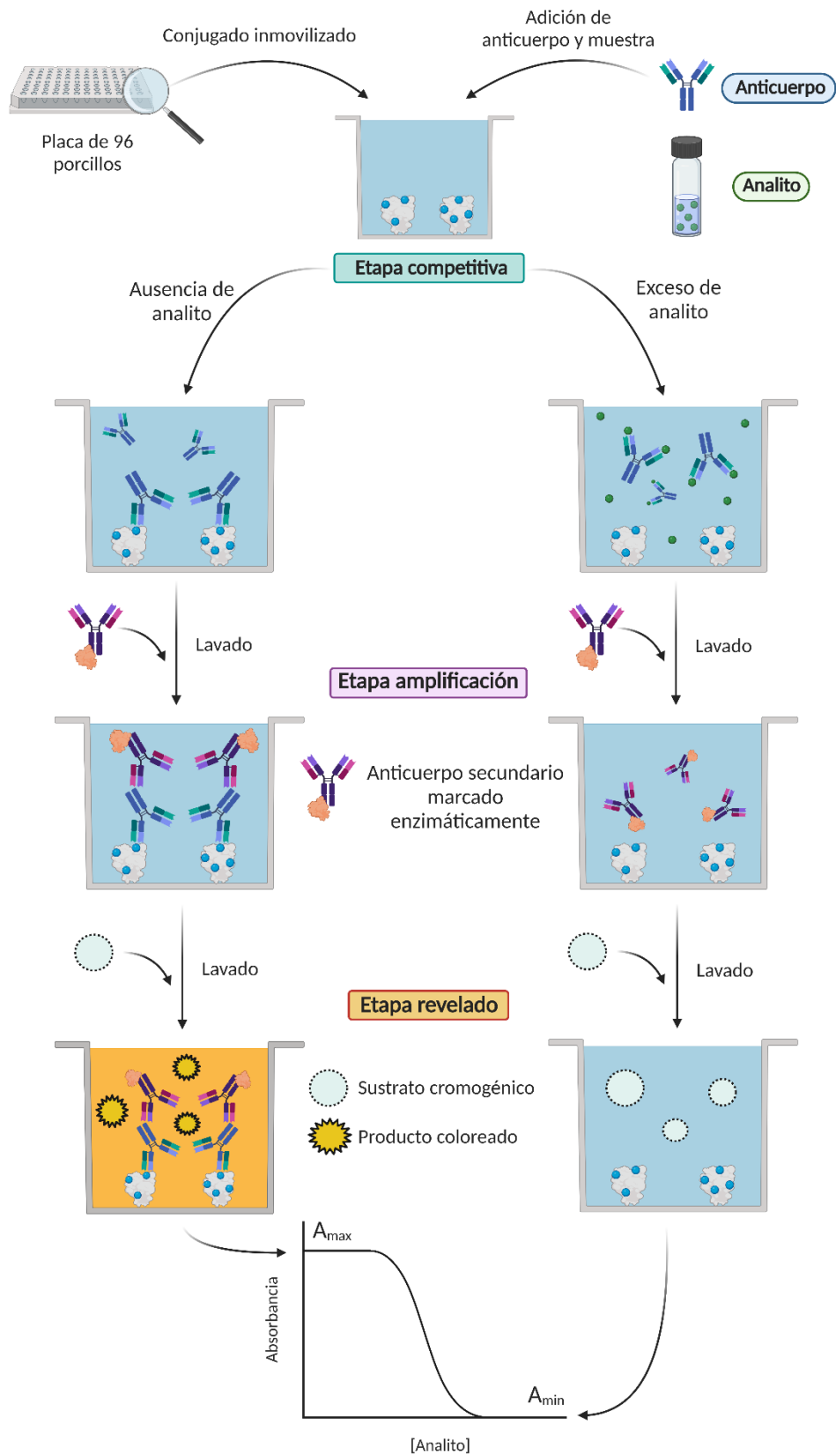
orientada, lo que puede ocasionar la pérdida de paratopos y la desnaturalización parcial o total del anticuerpo. El ensayo directo de captura es una variante del formato directo en la que la inmovilización del anticuerpo anti-analito se produce a través de la interacción con un anticuerpo secundario, que es el que se inmoviliza directamente sobre la microplaca, preservando así en mayor medida la actividad del anticuerpo primario. La representación esquemática de un ensayo competitivo en formato directo se puede observar en la **Figura 1.17**.



**Figura 1.17.** ELISA competitivo en formato de anticuerpo inmovilizado (directo) (figura elaborada con biorender.com).

Por otra parte, el formato de **conjugado inmovilizado** con detección indirecta, también conocido como **formato indirecto**, se diferencia del anterior en que el reactivo que genera la señal no participa en la etapa competitiva y que es el conjugado proteína-hapteno el inmunorreactivo adsorbido sobre el soporte. Esta etapa es seguida por la adición del analito y el anticuerpo, dando lugar a la etapa de competición, donde el anticuerpo puede quedar en disolución si se une al analito o retenido en la placa mediante la formación del complejo anticuerpo-conjugado. Dada la ausencia de un marcador enzimático en las etapas anteriores, la generación de señal se consigue mediante la adición de un anticuerpo secundario con actividad enzimática y con capacidad de reconocimiento del anticuerpo primario.<sup>130</sup> La representación esquemática de un ensayo competitivo en formato indirecto se puede observar en la **Figura 1.18**.

# INTRODUCCIÓN

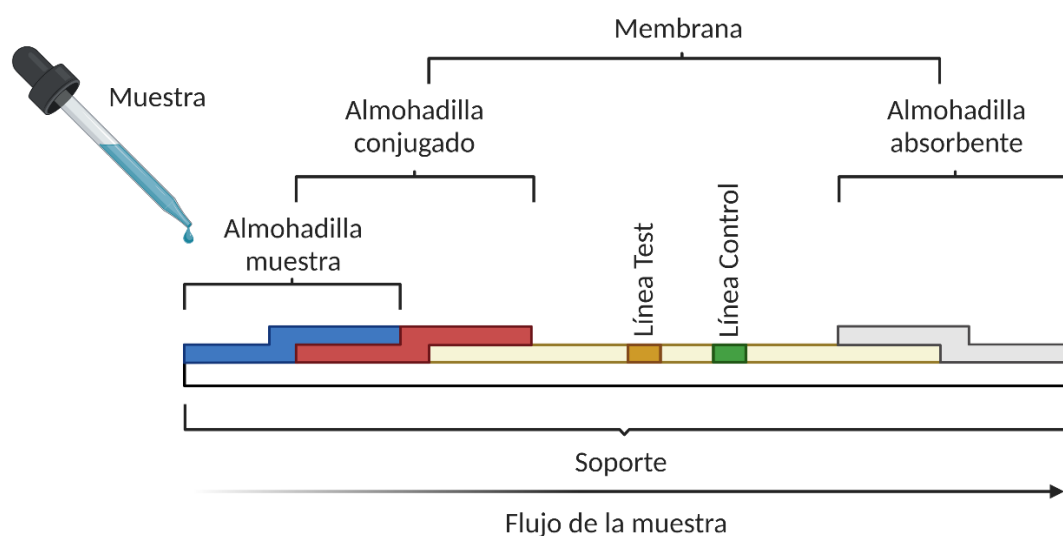


**Figura 1.18.** ELISA competitivo en formato de conjugado inmovilizado (indirecto) (figura elaborada con biorender.com).

## 1.4.1.2 Tiras inmunorreactivas

Los inmunoensayos de flujo lateral, también conocidos como tiras inmunorreactivas o tiras inmunocromatográficas, disfrutan de una gran popularidad en diferentes ámbitos, incluyendo la seguridad alimentaria.<sup>131</sup> Este formato de ensayo no requiere de etapas de lavado, lo que redonda en una mayor rapidez y simplicidad y facilita la realización de análisis *in situ*, de ahí su elevada aceptación en entornos industriales para la realización de cribados.<sup>132</sup>

De modo general, un dispositivo de flujo lateral está compuesto por cuatro componentes básicos: una almohadilla de muestra, una almohadilla de conjugado, una membrana y una almohadilla absorbente, ensamblados sobre un soporte plástico de forma que haya un flujo continuo mediante fuerzas capilares (**Figura 1.19**). Tradicionalmente, estas tiras inmunorreactivas fueron diseñadas para su uso en posición horizontal; no obstante, también es posible realizar los ensayos en posición vertical prescindiendo de la almohadilla de conjugado y añadiendo el anticuerpo marcado en un reservorio donde se introduce la tira.<sup>133,134</sup>

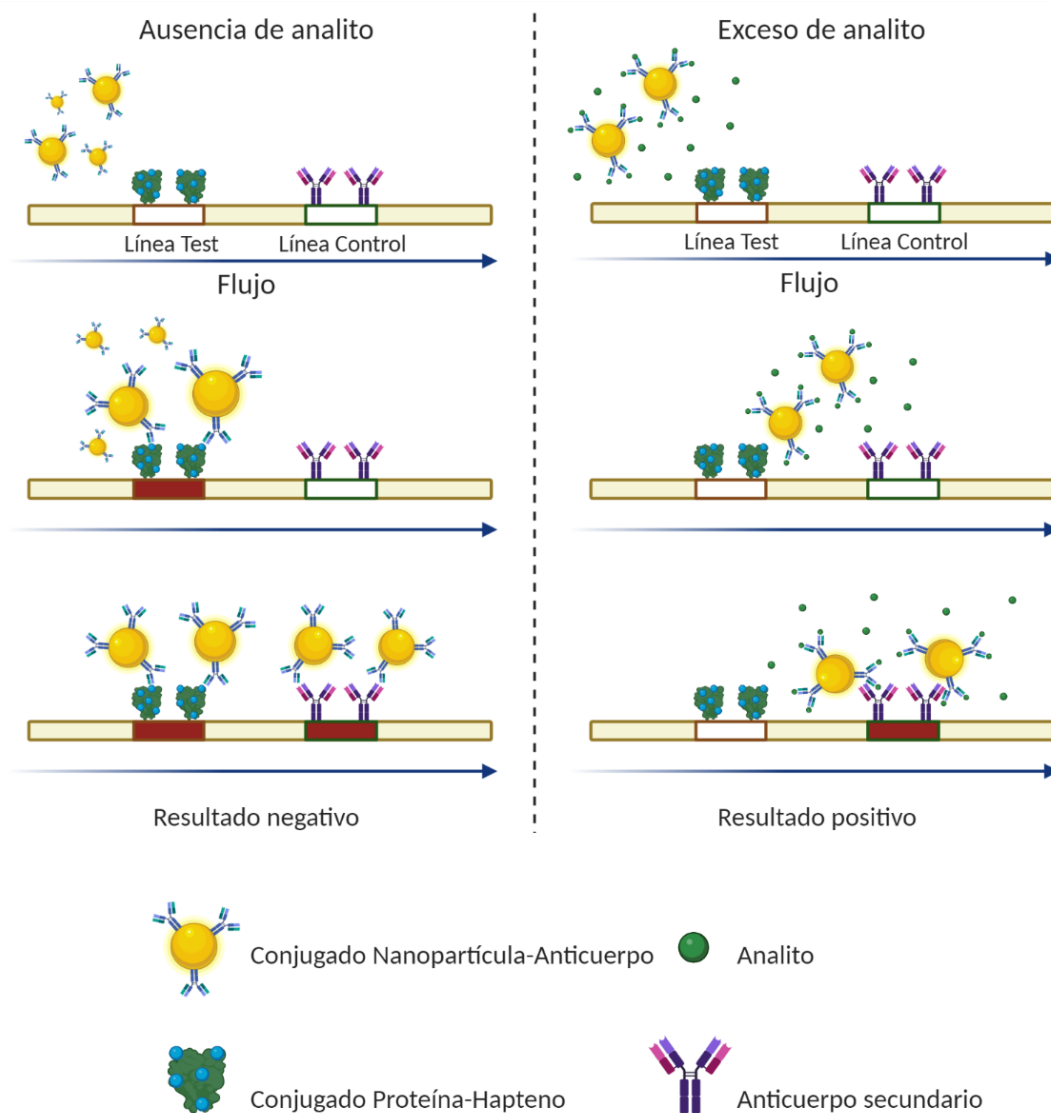


**Figura 1.19.** Vista lateral de una tira inmunorreactiva (figura elaborada con biorender.com).

Del mismo modo que en los sistemas ELISA, existe tanto formato competitivo como no competitivo, siendo el competitivo el que se utiliza para moléculas de pequeño tamaño. La disposición más habitual consiste en inmovilizar el conjugado proteína-hapteno sobre la membrana, formando la denominada línea test (LT). La muestra que contiene el analito y el anticuerpo previamente marcado con nanopartículas coloreadas migrarán a lo largo de la tira por capilaridad hasta la LT, donde se producirá la etapa competitiva (**Figura 1.20**). Si la muestra está muy contaminada, el anticuerpo se unirá al analito en disolución

# INTRODUCCIÓN

bloqueando sus sitios de unión, e impidiendo así la interacción con la LT, de forma que no aparecerá señal en esta zona. En caso contrario, la ausencia de analito en una muestra permitirá la unión de los anticuerpos al conjugado proteína-hapteno, dando lugar a una línea coloreada. La inmovilización en una zona superior de la tira de un anticuerpo secundario capaz de reconocer al anticuerpo primario proporciona una garantía del correcto funcionamiento del sistema, dando así lugar a la línea control (LC).



**Figura 1.20.** Tira inmunoquímica en formato competitivo para la detección de moléculas de bajo peso molecular (figura elaborada con biorender.com).

Existen diferentes tipos de nanopartículas para la generación de la señal en ensayos inmunocromatográficos, desde las más habituales en tests comerciales, como las de látex y oro coloidal, hasta las que su uso se limita fundamentalmente a la investigación, como las de plata, carbono o selenio y los quantum dots. Generalmente, las nanopartículas de oro son las más empleadas por su alta capacidad de interactuar con moléculas biológicas y por

sus excelentes propiedades ópticas.<sup>135</sup> La gran afinidad que presentan los grupos sulfhidrilo presentes en las biomoléculas hacia las nanopartículas de oro hace posible la formación de interacciones no covalentes con una estabilidad muy elevada mediante adsorción pasiva o fisisorción. El principal inconveniente de esta metodología es que la inmovilización del anticuerpo se produce de modo aleatorio, pudiendo quedar no disponible un porcentaje de los sitios de unión. Siguiendo la misma estrategia que en el ELISA competitivo directo, la inmovilización previa de un anticuerpo de captura puede proporcionar mejoras en cuanto a la sensibilidad del ensayo. Un método de acoplamiento alternativo, pero menos directo, es con el uso de nanopartículas modificadas con el fin de formar enlaces covalentes con residuos de aminoácidos, en otras palabras, la quimisorción de biomoléculas.<sup>136</sup>

Entre otros factores que se comentarán en el siguiente apartado, la naturaleza de la membrana juega un papel muy importante en la sensibilidad, ya que influye directamente en la velocidad del flujo y por tanto en el tiempo de ensayo. La nitrocelulosa es el material más empleado para la fabricación de membranas, repercutiendo el tamaño de sus poros directamente en el flujo capilar del ensayo. Al ser ensayos de carácter rápido, es necesario llegar a un compromiso entre el flujo y la sensibilidad, ya que un flujo elevado puede dificultar el equilibrio entre los anticuerpos y el conjugado proteína-hapteno, dando lugar a una señal insuficiente en la LT en ausencia de analito, mientras que un flujo bajo supone mayor tiempo de interacción entre ellos, pudiendo causar una pérdida de sensibilidad.

En base a las razones mencionadas, la presencia o ausencia de señal en la LT permite discriminar entre una muestra negativa y otra positiva. Ahora bien, la intensidad de la LC puede variar o no en función de si el ensayo es dependiente de la cantidad de conjugado nanopartícula-mAb sobrante o es independiente. En consecuencia, existen dos metodologías para la interpretación de los resultados obtenidos. La primera de ellas se basa en la lectura exclusivamente de la LT, siendo una técnica de interpretación rápida cuando la señal de la LC es constante. La segunda consiste en el uso de la relación entre las señales de LT y LC lo que permite un análisis más riguroso y reproducible, ya que tiene en cuenta posibles variaciones en la lectura entre diferentes tiras.

### 1.4.2 Optimización del inmunoensayo

La sensibilidad de un inmunoensayo competitivo viene determinada por la relación de las constantes de asociación del anticuerpo con el analito y con el conjugado proteína-hapteno, siendo el ensayo más sensible cuanto mayor es la afinidad del anticuerpo hacia el analito. Modificaciones de las condiciones del ensayo, como las concentraciones de los reactivos o parámetros fisicoquímicos, pueden afectar directamente a dicha afinidad, repercutiendo en

## INTRODUCCIÓN

---

la sensibilidad global. No obstante, las mejoras más significativas en cuanto a sensibilidad se obtienen con la aplicación de lo que se conoce como “heterología de hapteno”, una estrategia basada en el uso de conjugados competidores preparados con haptenos diferentes al empleado durante el proceso de inmunización. Así, se denomina **ensayo homólogo** al que emplea el mismo hapteno tanto para los conjugados inmunizantes como para los competidores, mientras que el **ensayo heterólogo** es aquel que utiliza diferentes haptenos para cada conjugado. Puesto que generalmente los anticuerpos presentan mayor afinidad hacia los conjugados homólogos, en un ensayo heterólogo la concentración del complejo anticuerpo-analito será mayor que en un ensayo homólogo en las mismas condiciones. El incremento relativo de la constante de asociación del complejo anticuerpo-analito en el ensayo heterólogo da como resultado una disminución del valor de  $IC_{50}$  y, por tanto, un aumento en la sensibilidad del ensayo.<sup>137</sup> De nuevo, predecir la estructura ideal de un hapteno competidor para que actúe como hapteno heterólogo no es evidente, por lo que una estrategia recomendable es el uso de diversos compuestos. Las aproximaciones habitualmente empleadas en la síntesis de estos haptenos implican cambios en la posición del brazo espaciador, cambios en la longitud o estructura de este o ligeras modificaciones en el esqueleto del analito.<sup>138-140</sup>

### 1.4.3 Validación analítica del ensayo desarrollado

Una vez desarrollado el inmunoensayo, la siguiente etapa consiste en estudiar su aplicabilidad en matrices en las que potencialmente se pueda encontrar el analito diana. A la hora de analizar muestras reales es común observar interferencias relacionadas con la naturaleza de las mismas, lo que se conoce como efecto matriz, siendo necesario el uso de etapas de pretratamiento para reducir la distorsión provocada. En el caso de muestras líquidas e inmunoensayos con una gran sensibilidad, una dilución directa de la muestra en tampón de ensayo suele ser suficiente para reducir dicho efecto y permitir una determinación fiable. Sin embargo, si el efecto matriz de una muestra líquida es significativo, o la muestra es sólida/semisólida, habitualmente es necesario un proceso de extracción además de una etapa de limpieza.

Una vez puesto a punto el tratamiento de la muestra, es necesario comprobar si los resultados obtenidos mediante el inmunoensayo son de tipo cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo. Dicha validación se puede llevar a cabo mediante el análisis de muestras reales certificadas y/o muestras fortificadas con concentraciones conocidas del analito, o a través del análisis de muestras de concentración desconocida y su comparación estadística con un método de referencia. Además de verificar la aplicabilidad del ensayo, la validación también permite determinar la exactitud y precisión del mismo.



## 2 OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como **objetivo principal** el desarrollo de métodos inmunoanalíticos para la detección de la micotoxina patulina. Para ello, se plantea preparar conjugados proteicos que permitan la generación de anticuerpos anti-patulina con elevada afinidad y especificidad que posibiliten el desarrollo de métodos de análisis de esta micotoxina en diferentes matrices alimentarias, en especial muestras de zumo de manzana. Con este propósito, se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Diseño y síntesis de análogos funcionalizados de patulina. Síntesis de derivados (haptenos) mediante la incorporación de un brazo espaciador en diferentes posiciones del esqueleto de la micotoxina que permitan una máxima exposición al sistema inmunitario y por tanto la generación de anticuerpos específicos.
2. Evaluación de la derivatización de patulina como estrategia alternativa de análisis. Evaluación de procedimientos de derivatización que conduzcan a un derivado químicamente estable.
3. Preparación de bioconjugados. Acoplamiento vía formación de un enlace covalente de los haptenos preparados, tanto de la propia patulina como de los potenciales derivados de la misma, a proteínas transportadoras, con o sin actividad enzimática, para uso inmunogénico o para su aplicación en el ensayo.
4. Producción de una familia de anticuerpos, tanto policlonales de conejo como monoclonales de ratón, frente a patulina y patulina derivatizada.

## OBJETIVOS

---

5. Caracterización de la afinidad y especificidad de los anticuerpos generados y su implementación en inmunoensayos tipo ELISA competitivo en diferentes formatos.
6. Desarrollo de tiras inmunocromatográficas empleando los anticuerpos monoclonales generados.
7. Optimización de los ensayos seleccionados y evaluación de la influencia de factores fisicoquímicos sobre los parámetros analíticos.
8. Aplicación a muestras reales. Evaluación de la influencia del efecto matriz sobre la sensibilidad y determinación de la exactitud y precisión de los ensayos.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha comentado en la introducción, el diseño y síntesis de haptenos es la piedra angular en el desarrollo de inmunoensayos de elevada sensibilidad para compuestos de bajo peso molecular. Es razonable que las primeras aproximaciones a explorar sean aquellas que impliquen un menor esfuerzo sintético, habitualmente utilizando alguno de los grupos funcionales presentes en la molécula original para la conjugación a las proteínas portadoras, o bien posiciones fácilmente abordables. Sin embargo, se ha demostrado que un adecuado diseño del hapteno que permita mantener las propiedades electrónicas y estructurales que caracterizan al analito, manteniendo intactas las agrupaciones funcionales más antigénicas, suele conducir a la producción de anticuerpos con superiores prestaciones y al posterior desarrollo de inmunoensayos más sensibles y específicos. El problema de esta estrategia es que requiere habitualmente de un mayor esfuerzo sintético, que en muchas ocasiones implica la síntesis total del hapteno.

En el caso de nuestro analito diana, la micotoxina patulina, los antecedentes bibliográficos en relación a la preparación de haptenos para la generación de anticuerpos son escasos y controvertidos. Como ya se ha mencionado, hasta la fecha se han descrito dos posibles aproximaciones para la producción de anticuerpos anti-patulina. La primera aproximación, abordada por Mehl y colaboradores,<sup>96</sup> sigue las pautas generales en cuanto a síntesis de haptenos, acoplando la micotoxina a una proteína a través del grupo funcional químicamente más accesible. Con intención de conocer el potencial antigénico de la

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

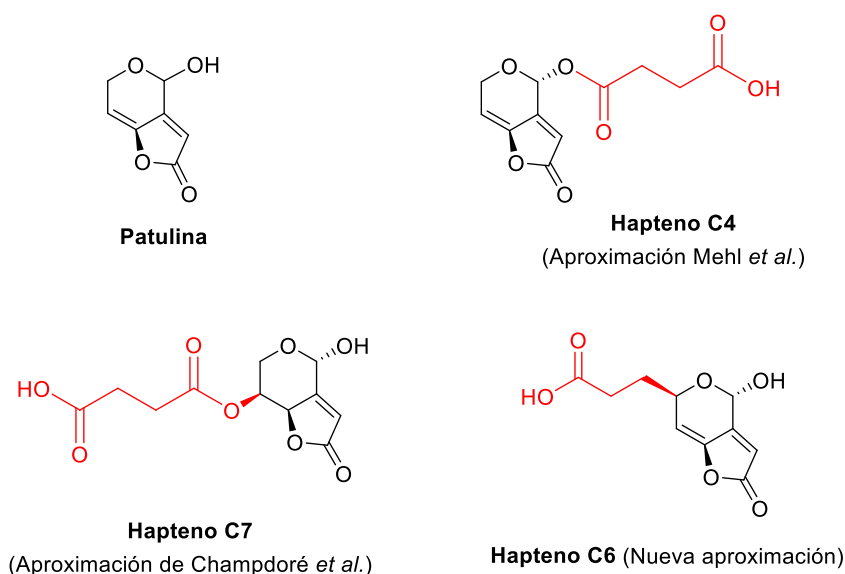
molécula, los autores introdujeron un brazo espaciador carboxilado *via* acilación del grupo hidroxilo hemicetálico (ver apartado 1.2.2), preparando así un hapteno con prácticamente el mismo esqueleto molecular de la micotoxina. Sin embargo, los bioconjugados preparados a partir de este hapteno no indujeron la generación de anticuerpos con suficiente afinidad para el desarrollo de un ensayo inmunoquímico. Este resultado puede atribuirse a la modificación funcional introducida, que para una molécula tan pequeña representa un cambio significativo de sus características fisicoquímicas, o a la reactividad intrínseca del sistema lactónico conjugado que no garantiza la supervivencia de la agrupación hapténica durante todo el tiempo que requiere el desarrollo de la respuesta inmunológica.

Por otro lado, la segunda aproximación, descrita por el grupo liderado por Sabato D'Auria,<sup>101</sup> consistió en la introducción del brazo espaciador por la posición C-7 del esqueleto de la toxina (ver apartado 1.2.2). Mediante este enfoque, que implica la supresión del doble enlace en posición C7-C7a, los autores perseguían aumentar la estabilidad de la molécula durante la respuesta inmune. No obstante, la eliminación de este doble enlace conlleva la piramidalización de ambas posiciones, un cambio estructuralmente muy relevante para una molécula cuasi-coplanar de tan pequeño tamaño. A pesar de ello, los autores describieron la producción de anticuerpos policlonales anti-patulina, aunque no fue probada la capacidad de reconocimiento hacia patulina libre en disolución mediante ELISA competitivo u otros métodos inmunoquímicos habituales en el control de micotoxinas.

Aunque otros autores han descrito la producción de anticuerpos policlonales anti-patulina mediante las estrategias anteriores, e incluso han llegado a estar disponibles comercialmente algunos anticuerpos anti-patulina, no existe ninguna evidencia clara de que estos anticuerpos sean realmente capaces de reconocer patulina con suficiente afinidad para dar lugar al desarrollo de inmunoensayos que permitan su determinación fiable a los niveles regulados. Las dificultades que presenta la generación de anticuerpos anti-patulina mediante estas estrategias convencionales, que juiciosamente buscan alterar lo menos posible el esqueleto de la micotoxina, se evidencian en que a fecha de hoy no existen ensayos inmunoquímicos comerciales para su detección, ni se ha reportado la producción de anticuerpos monoclonales, probablemente el tipo de anticuerpo más habitual en los tests de diagnóstico *in vitro*. En definitiva, a la vista de estos antecedentes, un primer objetivo que se planteó en esta Tesis fue profundizar en las posibilidades reales de generar anticuerpos anti-patulina empleando estrategias convencionales, incluidas las ya descritas por otros autores.

### 3.1 Estrategia convencional para la generación de anticuerpos frente a la micotoxina patulina

Con el objetivo de obtener anticuerpos de elevada afinidad hacia patulina mediante aproximaciones convencionales, se sintetizaron y acoplaron a proteínas tres derivados funcionalizados (**Figura 3.1**). Los primeros dos haptenos, haptenos **C4** y **C7**, son los mismos descritos previamente por otros autores y que se han mencionado en los párrafos precedentes, mientras que el tercero de ellos, hapteno **C6**, se ha preparado por primera vez en el contexto de esta Tesis. Los tres haptenos incorporan un brazo espaciador carboxilado por posiciones complementarias del esqueleto molecular de patulina, aunque solamente el nuevo hapteno **C6** mantiene inalteradas todas las agrupaciones funcionales de la misma.



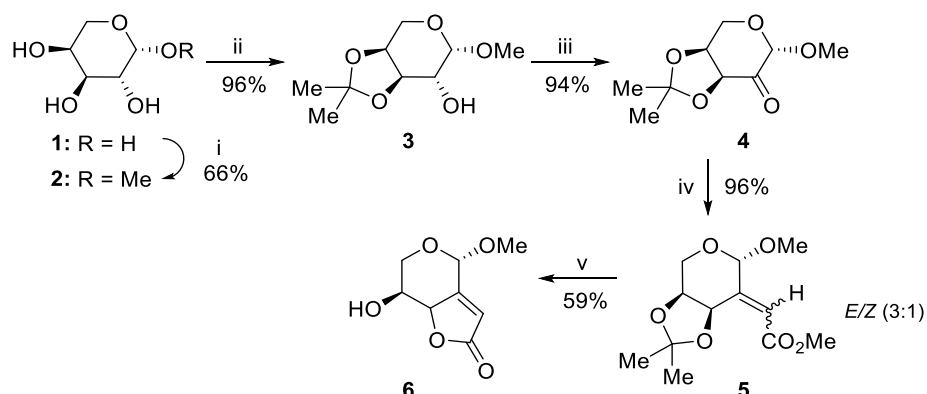
**Figura 3.1.** Estructura de patulina y de los haptenos sintetizados basados en estrategias convencionales.

#### 3.1.1 Síntesis de los haptenos **C4** y **C7**

La preparación del hapteno utilizado por Mehl es un proceso sintéticamente sencillo, puesto que la incorporación del brazo espaciador, un grupo 3-carboxipropanoilo, se efectúa directamente a partir de patulina mediante una reacción de *O*-acilación con anhídrido succínico del grupo hidroxilo en la posición C-4. Por contra, la síntesis del hapteno utilizado por de Champdoré, hapteno **C7**, requiere la incorporación del brazo espaciador por una posición no funcionalizada en la estructura original, lo que implica la introducción de un grupo hidroxilo en C-7 mediante síntesis total del esqueleto completo de patulina. Esta síntesis está basada en una adaptación de la síntesis de patulina realizada por Gill *et al.*, y el grupo hidroxilo introducido en C-7 se utiliza para la incorporación del brazo espaciador, también en este caso un grupo 3-carboxipropanoilo.<sup>23</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta tesis se planteó una única vía para la síntesis de ambos haptenos a través de un intermedio común, adaptando estrategias previamente empleadas por otros autores para la construcción del esqueleto de patulina.<sup>24</sup> La síntesis del intermedio común para la preparación de ambos haptenos, compuesto **6**, parte de *L*-arabinosa (**1**), disponible comercialmente (**Esquema 3.1**). En una primera etapa se lleva a cabo la derivatización de la agrupación hemiacetálica de la *L*-arabinosa al correspondiente  $\alpha$ -glicósido de metilo **2** por tratamiento con MeOH en presencia de HCl catalítico.<sup>141</sup> Tras la transformación de los grupos hidroxilo en posiciones C-4 y C-5 al correspondiente acetal **3** con dimetoxipropano en presencia de cantidades catalíticas de ácido *p*-toluenosulfónico, se realiza la oxidación del grupo hidroxilo que queda libre al correspondiente grupo carbonilo utilizando las condiciones de Swern.<sup>142,143</sup> La olefinación de Wittig de la cetona resultante **4** proporciona el éster metílico  $\alpha,\beta$ -insaturado **5** como una mezcla de isómeros geométricos del doble enlace, estereoisómeros *E* y *Z*, en una proporción 3:1. Estos estereoisómeros no son fácilmente separables cromatográficamente, por lo que se procedió a la hidrólisis de la agrupación dimetil 2,3-*O*-isopropilideno utilizando condiciones ácidas suaves. En estas condiciones, no solo se produce la hidrólisis de la agrupación cetálica de la mezcla de estereoisómeros, sino que también tiene lugar la ciclación intramolecular entre el grupo hidroxilo y el grupo metoxicarbonilo del isómero *Z*, formándose la correspondiente  $\gamma$ -butirolactona instaurada **6**, fácilmente separable por cromatografía en columna del diol-éster resultante de la hidrólisis del isómero *E*. Globalmente, la secuencia sintética que conduce al intermedio **6** consta de seis etapas a partir de la *L*-arabinosa, con un rendimiento del 45%.

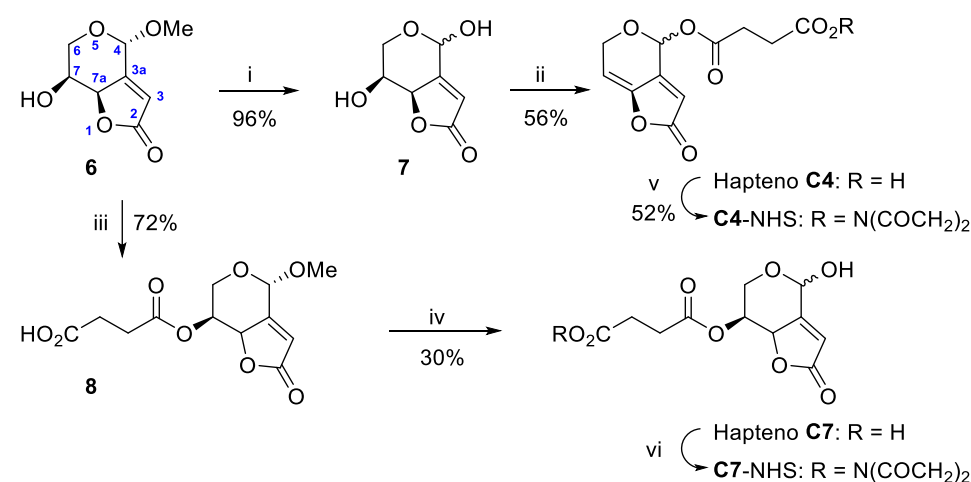


**Esquema 3.1.** Preparación del precursor de los haptenos **C4** y **C7** a partir de *L*-arabinosa. *Reactivos y condiciones:* i) AcCl, MeOH, 50 °C, 4 h; ii) *p*-TsOH, Me<sub>2</sub>C(OMe)<sub>2</sub>; acetona, t.a., 22 h; iii) (COCl)<sub>2</sub>, DMSO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 30 min, luego Et<sub>3</sub>N, -78 °C a t.a., 1 h; iv) Ph<sub>3</sub>P=CHCO<sub>2</sub>Me, benceno, 50 °C, 6 h; v) HCl 1.2 M, MeOH, reflujo, 2.5 h.

Partiendo del precursor **6**, la síntesis del hapteno **C4** se lleva a cabo en dos sencillos pasos, comenzando con la obtención del hemiacetal **7** mediante hidrólisis ácida del grupo acetálico

(Esquema 3.2). A continuación, la *O*-alcanoilación de ambos grupos hidroxilo con anhídrido succínico conduce al correspondiente derivado disuccinilado, el cual experimenta *in situ* la eliminación E<sub>2</sub> del grupo succinilo en C-7, una eliminación que se produce muy fácilmente dada la relación anticoplanar de este grupo con el hidrógeno axialmente dispuesto en la posición C-7a, para formar el hapteno **C4** con un rendimiento global del 54% desde el intermedio **6**.

La preparación del hapteno **C7** a partir del intermedio **6** requiere también de dos etapas. En este caso se procede en primer lugar a la succinilación del grupo hidroxilo en C-7 para dar el derivado **8**, seguido por la hidrólisis de la agrupación acetálica en C-4, proporcionando el hapteno **C7** con un rendimiento global del 22%. Este bajo rendimiento, muy inferior al obtenido para el hapteno **C4**, se debe a la facilidad con que se produce la eliminación del grupo succinilo en C-7 (ver apartado 3.1.3).



**Esquema 3.2.** Preparación de los haptenos **C4** y **C7** y los correspondientes ésteres activos, **C4-NHS** y **C7-NHS**, a partir del precursor **6**. *Reactivos y condiciones:* i) TFA/H<sub>2</sub>O (9:1), 50 °C, 16 h; ii) (CH<sub>2</sub>CO)<sub>2</sub>O, EtN<sub>3</sub>, DMAP, THF, t.a., 1 h; iii) (CH<sub>2</sub>CO)<sub>2</sub>O, DMAP, THF, t.a., 16 h; iv) TFA/H<sub>2</sub>O (9:1), 45 °C, 16 h; v) EDC·HCl, NHS, acetona, t.a., 24 h; vi) DCC, NHS, DMF, t.a., 24 h.

### 3.1.2 Diseño y síntesis del hapteno **C6**

El diseño del hapteno **C6** se basó en dos consideraciones. Por un lado, maximizar la similitud estructural y la distribución electrónica entre el hapteno y la micotoxina, manteniendo intactos todos los grupos funcionales de la misma. Por otro lado, reducir la reactividad intrínseca de la micotoxina hacia nucleófilos, que puede ser uno de los factores fundamentales que han dificultado en el pasado la producción de anticuerpos anti-patulina (ver apartado 1.1.3). Con estos objetivos, el hapteno **C6** incorpora una cadena hidrocarbonada carboxilada en la posición C-6 a través de un enlace C-C, cuya prácticamente nula polarización garantiza la mínima modificación de la distribución

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

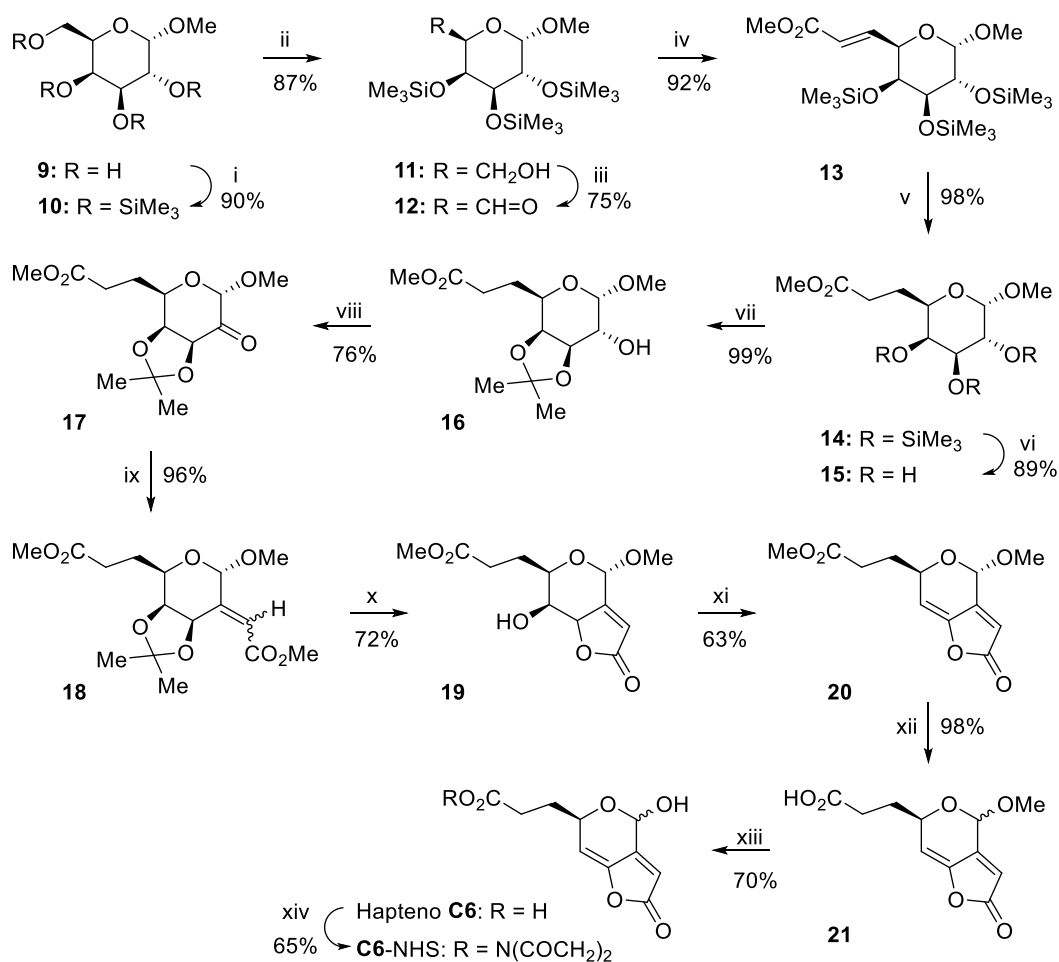
electrónica del esqueleto común con la patulina, y por otro lado implica un aumento notable del impedimento estérico en la vecindad de la posición insaturada adyacente C-7, y con ello, previsiblemente una menor susceptibilidad de esta posición a la adición nucleofílica.

Para la preparación de este hapteno se propuso una ruta sintética similar a la utilizada con los haptenos anteriores para la construcción del sistema bicíclico, si bien en este caso el brazo espaciador se incorporó previamente (**Esquema 3.3**). Partiendo del  $\alpha$ -D-galactopiranosido de metilo (**9**), disponible comercialmente, los grupos hidroxilo se protegieron como éteres de trimetilsililo (**10**), seguido por la desililación selectiva en condiciones ácidas suaves del grupo hidroxilo primario para obtener **11**.<sup>144</sup>

La oxidación posterior del grupo hidroxilo libre de **11** se llevó a cabo en condiciones de Ley-Griffith para dar lugar al aldehído **12**, posibilitando de este modo la elaboración del brazo espaciador mediante una reacción de olefinación de Wittig con el iluro estabilizado (carbometoximetilen)trifenilfosforano. La hidrogenación del doble enlace del alqueno trans resultante (**13**) en condiciones homogéneas empleando el catalizador de Wilkinson dio lugar al éster metílico saturado **14**. A partir del mismo se completó la construcción del sistema bicíclico característico de patulina empleando la estrategia previamente utilizada por Seijas *et al.* en la síntesis de patulina.<sup>24</sup> En primer lugar, se llevó a cabo la desililación del resto de las agrupaciones oxigenadas de **14** en condiciones ácidas suaves, utilizando una resina de intercambio iónico ácida en metanol, para obtener el triol **15**.

La protección selectiva de los grupos hidroxilo liberados en las posiciones C-4 y C-5 mediante la formación de un grupo isopropilideno cetal posibilitó la oxidación controlada del grupo hidroxilo libre en C-7, a través de la oxidación de Ley-Griffith, para obtener la correspondiente cetona **17**. Análogamente a lo realizado en la síntesis de los haptenos **C4** y **C7**, la olefinación de Wittig de la cetona obtenida empleando el mismo iluro estabilizado proporcionó la correspondiente mezcla de alquenos estereoisoméricos **18**, que después de la hidrólisis del grupo isopropilideno bajo condiciones ácidas condujo directamente a la  $\gamma$ -lactona insaturada **19**. La transformación del grupo hidroxilo dispuesto axialmente en la posición C-7 al correspondiente mesilato permitió la formación del doble enlace entre las posiciones C-7 y C-7a, vía una reacción de eliminación E2, completando así el esqueleto del hapteno. Por último, la hidrólisis del éster metílico de **20** en condiciones neutras, empleando la lipasa de *Candida antarctica* soportada sobre resina acrílica, seguido por una hidrólisis ácida del grupo acetálico del ácido **21**, dio lugar al hapteno **C6** como una mezcla 2:1 de epímeros en el carbono hemiacetálico.<sup>145</sup> En resumen, el hapteno **C6** se obtuvo a través de una secuencia de 13 etapas a partir del  $\alpha$ -D-galactopiranosido de metilo (**9**) con un rendimiento global del 9%.





**Esquema 3.3.** Preparación del hapteno **C6** y el correspondiente éster activo, **C6-NHS**. *Reactivos y condiciones:* i) HMDS, TMSOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 2 h; ii) NH<sub>4</sub>OAc, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), t.a., 25 h; iii) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 1.5 h; iv) Ph<sub>3</sub>P=CHCO<sub>2</sub>Me, benceno, t.a., 6 h; v) RhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>, 4 atm, THF, t.a., 24 h; vi) DOWEX® 50W X8, MeOH, t.a., 18 h; vii) *p*-TsOH, Me<sub>2</sub>C(OMe)<sub>2</sub>, acetona, t.a., 60 h; viii) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 2.5 h; ix) Ph<sub>3</sub>P=CHCO<sub>2</sub>Me, benceno, 50 °C, 6 h; x) MeOH, 1.2 M HCl, reflujo, 2.5 h; xi) MsCl, piridina, 0 °C a t.a., 8 h; xii) lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en resina acrílica, PB100/THF (4:1), t.a., 24 h; xiii) TFA/H<sub>2</sub>O (9:1), 50 °C, 4 h; xiv) EDC·HCl, NHS, MeCN, t.a., 3 h.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 3.1.3 Preparación de bioconjugados de los haptenos **C4**, **C7** y **C6**

Como se muestra en los esquemas anteriores, todos los haptenos fueron diseñados y preparados con un grupo carboxílico libre en el extremo terminal del brazo espaciador incorporado, posibilitando así la unión covalente del hapteno a las proteínas transportadoras vía la activación previa del mismo. El procedimiento empleado para la activación de todos los haptenos se basó en la formación del éster activo mediante el tratamiento con 1-etil-3-(3-dimetilamonipropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS), seguido de un procesado acuoso para eliminar la correspondiente urea generada. En la mayoría de los casos este procesado conduce al éster activo con una pureza elevada, pudiéndose utilizar en la etapa de conjugación sin purificación adicional. No obstante, los ésteres activos se pueden purificar cromatográficamente en un gran número de casos con rendimientos elevados. La purificación y aislamiento de los ésteres activos facilita su detallada caracterización estructural mediante las técnicas espectroscópicas habituales, además de prevenir reacciones secundarias no deseadas en la etapa de conjugación y posibilitar el uso de condiciones más ajustadas que permitan un mejor control de las relaciones molares hapteno/proteína obtenidas. En este caso, los ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo de los haptenos **C4** y **C6** se aislaron y posteriormente se purificaron por cromatografía sobre gel de sílice, obteniéndose los ésteres **C4-NHS** y **C6-NHS** con rendimientos del 52 y 65%, respectivamente (**Esquema 3.2 y 3.3**). Este moderado rendimiento se atribuyó al proceso cromatográfico, ya que el seguimiento de la reacción por CCF indicaba que la transformación de estos haptenos en los ésteres activos correspondientes se producía cuantitativamente, sin la formación de cantidades apreciables de otros productos. La estructura de ambos ésteres activos fue confirmada inequívocamente mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ .

Por el contrario, la reacción de activación del hapteno **C7** resultó ser mucho menos limpia, obteniéndose tras el procesado y purificación cromatográfica del crudo de reacción un bajo rendimiento del éster **C7-NHS**, debido en gran medida a la formación de cantidades apreciables (superiores al 30%) de patulina, formada como consecuencia de la pérdida del brazo espaciador del hapteno. Como se ha mencionado previamente, la facilidad con que se produce la eliminación E2 del brazo espaciador en C-7, un grupo alcanoiloxilo, se puede atribuir principalmente a la relación anti-coplanar que existe entre este grupo y el hidrógeno relativamente ácido en la posición alílica C-7a. En vista de la inestabilidad de este hapteno, se decidió realizar la preparación de los bioconjugados empleando el éster activo **C7-NHS** sin purificar. Hay que señalar que la facilidad con que se produce la eliminación del brazo espaciador es un motivo de preocupación cuando se trata de la activación y

conjugación de haptenos, dado que esta eliminación observada durante el procesado puede ocurrir posteriormente durante la conjugación y particularmente *in vivo* tras su inoculación en animales.

Una vez activados los haptenos, se procedió a la preparación de los conjugados proteicos, cada uno con una carga hapténica distinta en función de su aplicación posterior. Para la inmunización es preferible utilizar conjugados con una elevada relación molar que garantice una adecuada respuesta inmunitaria. En este sentido, la BSA es una proteína ampliamente utilizada por su elevada capacidad de conjugación, ya que dispone de un total de 59 residuos de lisina, 35 de los cuales son fácilmente accesibles en condiciones suaves de acoplamiento sin pérdida significativa de la solubilidad.<sup>117</sup> La reacción de conjugación de la proteína BSA con los haptenos **C4**, **C7** y **C6**, previamente activados, se llevó a cabo en tampón PB100 utilizando una relación molar inicial ( $RM_0$ ) hapteno-proteína de 30:1, un valor que en función de nuestra experiencia previa permite obtener bioconjugados inmunogénicos con una carga hapténica final adecuada.<sup>146</sup>

Por otro lado, los conjugados de ensayo requieren generalmente de cargas hapténicas inferiores a las empleadas en los conjugados inmunizantes para facilitar la competición y mejorar así la sensibilidad del ensayo. De manera análoga, el uso de proteínas diferentes a las empleadas en los procesos de inmunización es una práctica que permite discriminar entre anticuerpos específicos hacia el hapteno/analito o hacia la proteína portadora, favoreciendo por tanto la selección efectiva de hibridomas en las etapas posteriores. Los conjugados de tapizado necesarios para el formato de ELISA indirecto se prepararon empleando OVA, una proteína que contiene unos 20 residuos de lisina accesibles para el acoplamiento del hapteno.<sup>117</sup> En este caso, la  $RM_0$  elegida fue de 10:1, y la conjugación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que las empleadas para los conjugados de BSA.

Con respecto a los conjugados empleados en el formato directo, conocidos como trazadores enzimáticos, también es recomendable una baja carga hapténica por las razones expuestas anteriormente. La enzima utilizada fue HRP, la cual contiene 6 residuos de lisina, de los cuales 2-3 son accesibles.<sup>147</sup> Esta enzima cataliza la oxidación de ciertos sustratos en presencia de  $H_2O_2$ , dando lugar a productos fácilmente detectables, varios de ellos coloreados. En este caso, se decidió llevar a cabo la conjugación empleando una  $RM_0$  de 8:1.

Los conjugados se purificaron por cromatografía de exclusión molecular, y la densidad hapténica de cada uno de ellos se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, utilizando las proteínas sin modificar como referencia. La **Figura 3.2** muestra las relaciones molares finales (RM) obtenidas para los conjugados preparados con los haptenos **C4**, **C7** y **C6**. Como se puede observar, las RMs para los conjugados inmunogénicos de los

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

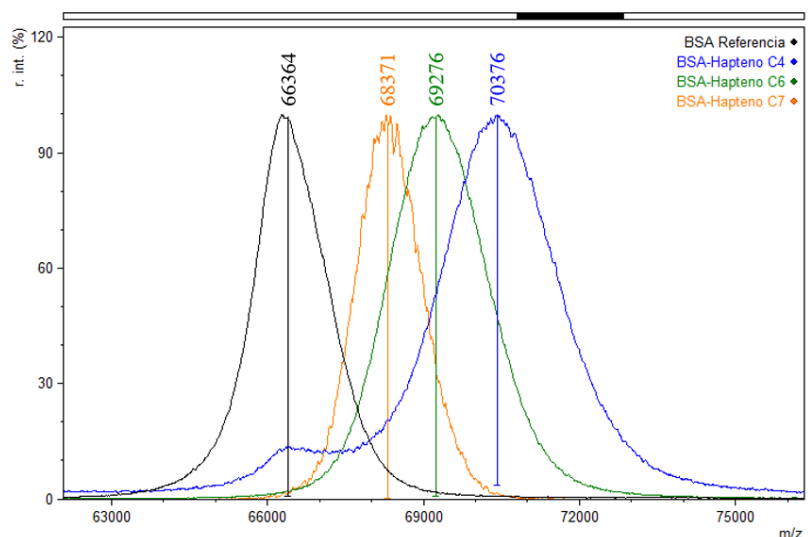
---

haptenos **C4** y **C6** fueron 17 y 14, respectivamente. En el caso del hapteno **C7** la RM fue sensiblemente más baja (7.9), lo que podría deberse a la facilidad antes mencionada con la que se produce la eliminación del brazo espaciador en este hapteno.

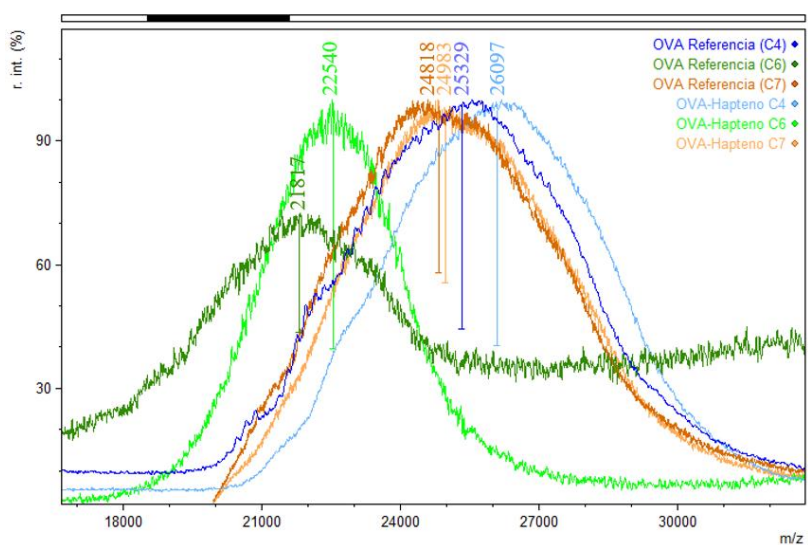
Los valores de RM obtenidos para los conjugados de ensayo también fueron superiores para los conjugados de los haptenos **C4** y **C6** que para el hapteno **C7**. En particular, se obtuvieron valores de RM entre 6 y 7 para los conjugados de OVA con los haptenos **C4** y **C6**, mientras que para el hapteno **C7** fue de solo 1.2. En el caso de los trazadores enzimáticos (HRP), se obtuvieron valores de RM cercanos a 1 para los conjugados con los dos primeros haptenos, mientras que para el conjugado con el hapteno **C7** el espectro de masas MALDI-TOF no permitió la cuantificación del grado de marcaje.

En cualquier caso, hay que señalar que la carga hapténica de los conjugados, tanto inmunogénicos como de ensayo, puede considerarse dentro de rango para la finalidad a la que van destinados. Aunque la carga hapténica del conjugado BSA-**C7** pueda parecer baja para un conjugado inmunogénico, lo cierto es que conjugados de moléculas de tamaño semejante al de este hapteno y con una carga hapténica análoga han dado lugar a una excelente respuesta inmune y han permitido la obtención de anticuerpos de elevada afinidad.<sup>148</sup>

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

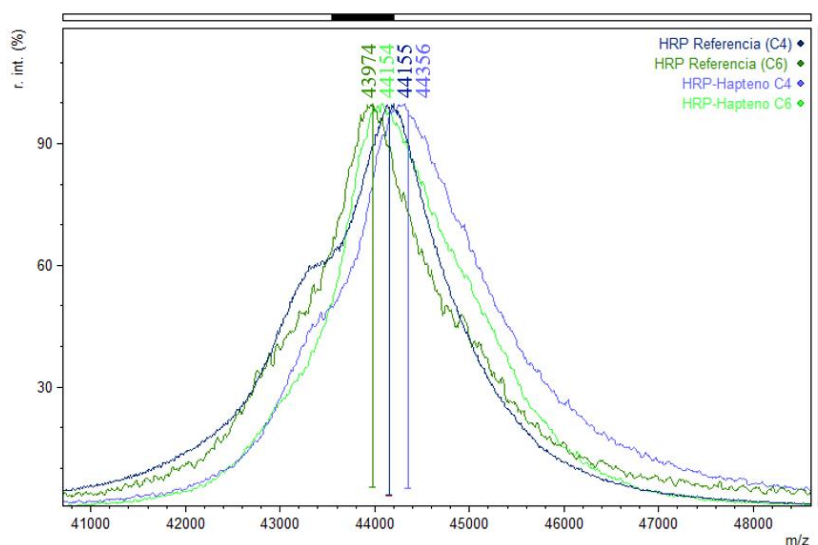


	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>BSA</b>	66364	–	–	–	–
<b>BSA-Hapteno C4</b>	70376	236	4012	17.0	30
<b>BSA-Hapteno C6</b>	69276	208	2912	14.0	24
<b>BSA-Hapteno C7</b>	68371	254	2007	7.9	30



	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>OVA</b>	25329	–	–	–	–
<b>OVA-Hapteno C4</b>	26097	236	768	6.4	10
<b>OVA</b>	21817	–	–	–	–
<b>OVA-Hapteno C6</b>	22540	208	723	7.0	10
<b>OVA</b>	24818	–	–	–	–
<b>OVA-Hapteno C7</b>	24983	254	165	1.2	10

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>HRP</b>	44155	–	–	–	–
<b>HRP-Hapteno C4</b>	44356	236	768	0.9	8
<b>HRP</b>	43974	–	–	–	–
<b>HRP-Hapteno C6</b>	44154	208	723	0.9	8

**Figura 3.2.** Espectros de masas MALDI-TOF: BSA (negro) [ion molecular monocargado,  $z = 1$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos **C4** (azul), **C6** (verde) y **C7** (naranja); OVA [ion molecular dicargado,  $z = 2$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos; HRP [ion molecular monocargado,  $z = 1$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos.

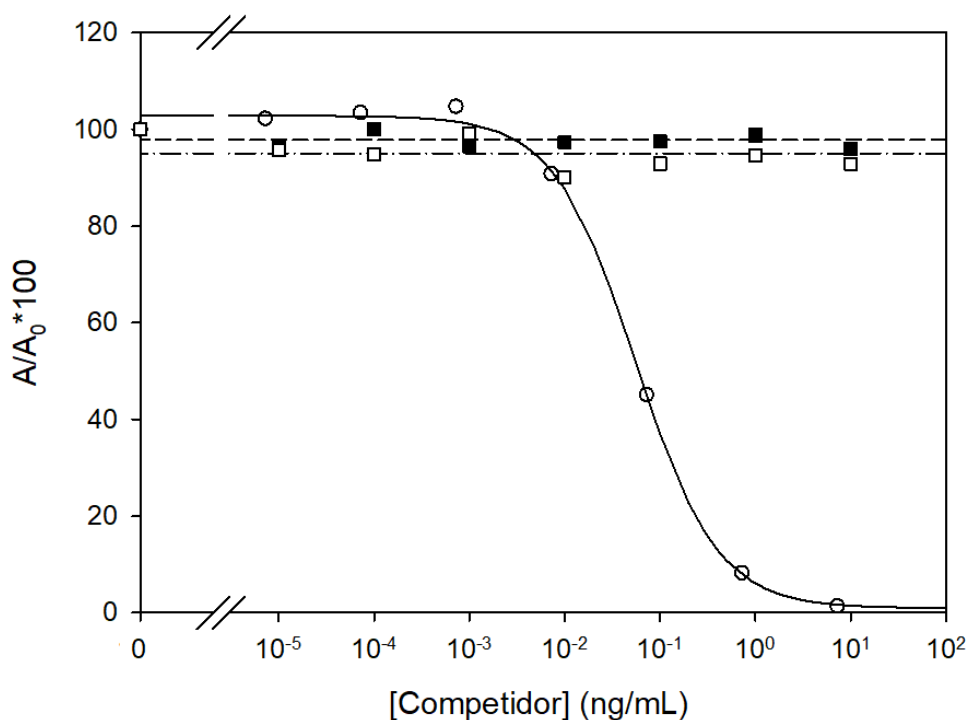
### 3.1.4 Generación de anticuerpos policlonales

Dadas las ventajas que ofrece la generación de anticuerpos policlonales en cuanto a rapidez, sencillez y coste, se decidió evaluar el potencial inmunogénico de los diferentes conjugados de BSA mediante la inmunización de conejos, un sistema que, además de su potencial tecnológico, permite determinar de forma fiable qué hapteno(s) presenta(n) el mayor potencial para la generación de anticuerpos específicos hacia el analito en estudio. Con este fin, dos conejos de raza New Zealand fueron inoculados subcutáneamente con cuatro dosis de 300  $\mu\text{g}$  de conjugado espaciadas 21 días. Con el propósito de valorar la evolución de la respuesta inmunitaria, se extrajeron muestras de sangre 10 días después de la tercera inmunización, y los antisueros obtenidos se analizaron por ELISA. Finalmente, 10 días después de la última inmunización los animales fueron exanguinados y los sueros se purificaron parcialmente por fraccionamiento salino.

La evaluación del potencial inmunogénico de los conjugados inmunizantes y el funcionamiento correcto de los conjugados de ensayo se llevó a cabo analizando los antisueros mediante ELISA no competitivo tanto en formato directo como en formato indirecto. Al realizar los ensayos en el formato directo se observó que la combinación de los antisueros con el trazador homólogo no dio lugar a la generación de señal. Ante la posibilidad de que los antisueros no soportaran de forma óptima la etapa de tapizado, se decidió repetir el experimento utilizando el formato directo asistido por anticuerpo de captura. Para ello se empleó un anticuerpo policlonal de cabra (GAR, *goat anti-rabbit*) como anticuerpo de tapizado. Desafortunadamente, los resultados en este formato fueron similares a los previamente obtenidos. Con el fin de descartar que la ausencia de señal se debiera a la pérdida de actividad enzimática de los trazadores durante el proceso de conjugación y/o su posterior conservación, se llevó a cabo un experimento para determinar la capacidad de cada uno ellos para catalizar la oxidación del sustrato OPD, comprobándose que todos ellos mostraron una actividad enzimática comparable a la de la enzima sin conjugar.

En el formato indirecto, los seis antisueros dieron lugar a títulos bajos en comparación con los habitualmente obtenidos con otros analitos. Aun así, se realizó una evaluación en términos de afinidad hacia la patulina libre en disolución mediante ELISA competitivo. Dichos ensayos se llevaron a cabo empleando una curva de 8 puntos de la micotoxina desde 10  $\mu\text{mol/L}$  con un factor 10 de dilución. No se observó inhibición de la señal para ninguno de los antisueros, es decir, ninguno de los anticuerpos fue capaz de reconocer al analito libre, ni siquiera a una concentración tan alta como 10  $\mu\text{M}$ . Decidimos entonces realizar curvas de inhibición en las que el hapteno y el conjugado OVA-hapteno se emplearon como competidores, con la idea de poder descartar una posible modificación estructural del hapteno durante las etapas de conjugación y/o inmunización. Como se puede observar en la gráfica de la **Figura 3.3** para un antisuero derivado del conjugado BSA-C6, se obtuvo una inhibición correcta de la señal empleando como competidor el propio conjugado de tapizado, mientras que el hapteno no mostró inhibición, al igual que ocurrió con patulina. La falta de reconocimiento del analito se puede deber a diferentes razones, siendo una de las más comunes un diseño inadecuado del hapteno. En cambio, la ausencia de reconocimiento también hacia el hapteno indicaría una conjugación inadecuada o la generación de una respuesta inmunitaria frente a un derivado del hapteno generado *in vivo*, con propiedades estructurales muy diferentes a la molécula parental.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 3.3.** Curvas de inhibición con el antisuero derivado del conjugado BSA-C6. *Condiciones del ensayo:* se recubrieron placas de ELISA con el conjugado OVA-C6 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se ensayó el anticuerpo a una dilución 1/3000. Los compuestos usados como competidores fueron OVA-C6 (○), patulina (■) y hapteno C6 (□).

Del mismo modo que patulina, los haptenos C6 y C7 poseen una posición hemiacetálica cíclica insaturada que existe en equilibrio dinámico con la forma abierta hidroxí-aldehídica. Dado el incremento de reactividad de la especie abierta, se evaluó el efecto de bloquear dicha posición mediante la inmunización con conjugados de los compuestos 8 y 21, además de un análogo del compuesto 21 con un brazo espaciador de 5 átomos de carbono. Pese a la mayor estabilidad estructural de estos compuestos con respecto a los haptenos C4, C6 y C7, tampoco en este caso los antisueros obtenidos fueron capaces de reconocer en disolución patulina o los propios compuestos, aunque sí sus conjugados correspondientes.

Como ya se ha comentado, una característica química muy destacada de la patulina es su elevado carácter electrofílico. La reactividad de patulina con nucleófilos, particularmente tioles y aminas, ha sido detalladamente estudiada por Fliege y Metzler, quienes demostraron que la primera reacción que tiene lugar es la adición del nucleófilo a la posición insaturada C-7. Además, estos autores también demostraron que la reacción no se detiene tras la adición de una molécula del nucleófilo, sino que el monoadducto inicialmente formado continúa reaccionando para dar lugar finalmente a un elevado número de productos.<sup>31</sup> Por lo tanto, existe la posibilidad de que, incluso con una conjugación adecuada del hapteno previamente activado y purificado a las proteínas transportadoras, se puedan

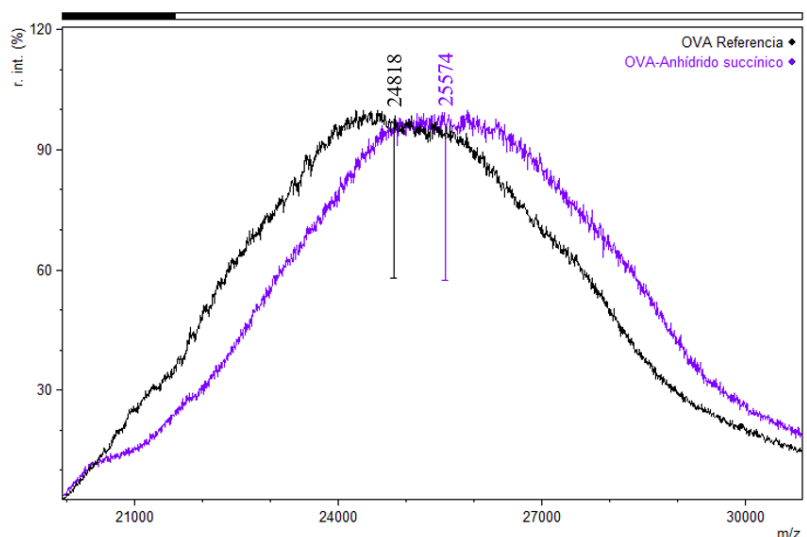


producir modificaciones estructurales del hapteno *in vivo* durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria. En este sentido, es bien conocido que las células poseen excelentes nucleófilos naturales que podrían propiciar este tipo de reacciones, como pueden ser los grupos tiol o amino libres de las proteínas o el ubicuo glutatión, un tripéptido con un grupo tiol libre y con importantes propiedades antioxidantes presente en la gran mayoría de las células eucariotas.

A pesar de que, como ya se ha dicho, no existen tests rápidos comerciales para la inmunodetección de patulina, varios autores han descrito el uso de un anticuerpo policlonal de conejo adquirido a la empresa sueca Agrisera (<https://www.agrisera.com>) para desarrollar estrategias inmunoanalíticas bastante complejas para la determinación de patulina (ver apartado 1.2.2). Alentados por esos estudios, este anticuerpo — amablemente suministrado por la empresa — se ensayó utilizando nuestra colección de bioconjugados. Un ELISA no competitivo en el formato indirecto nos permitió determinar que solamente los conjugados OVA-C4 y OVA-C7 eran reconocidos por este antisuero, aunque con títulos bajos. Una vez establecidas las condiciones de ensayo, se estudió la afinidad del anticuerpo hacia el analito mediante ELISA competitivo, no observándose inhibición de la señal, es decir, no hubo reconocimiento de patulina libre en disolución.

Ante este resultado, se decidió acoplar a OVA exclusivamente el brazo espaciador que caracteriza a ambos haptenos, el grupo succinilo. Este conjugado se preparó directamente por reacción de la proteína con anhídrido succínico (**Figura 3.4**). Al ensayar dicho pseudo-conjugado, que no contiene el esqueleto de patulina, como antígeno de tapizado, se observó que el antisuero comercial era capaz de reconocerlo, sugiriendo que dicho anticuerpo lo que estaba reconociendo en realidad era el brazo espaciador que forma parte de los haptenos C4 y C7. Merece la pena destacar que se obtuvo un resultado equivalente cuando nuestros anticuerpos policlonales generados a partir de los conjugados BSA-C4 y BSA-C7 se ensayaron frente a OVA succinilada, mientras que no se obtuvo respuesta con los antisueros derivados del conjugado BSA-C6. Este conjunto de datos apunta a que los haptenos C4 y C7, así como el hapteno utilizado para producir el antisuero comercializado por Agrisera, hubiesen perdido, al menos parcialmente, el sistema bicíclico de patulina durante el proceso de conjugación y/o inmunización, quedando exclusivamente unido a la proteína el brazo espaciador, el grupo succinilo, frente al cual se habrían generado los anticuerpos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>0</sub>
<b>OVA</b>	24818	–	–	–	–
<b>OVA-Anhídrido succínico</b>	25574	100	756	15.1	20

**Figura 3.4.** Espectros de masas MALDI-TOF: OVA (negro) [ion molecular dicargado,  $z = 2$ ] y del conjugado correspondiente con el anhídrido succínico (morado).

En general, los resultados que se han descrito en los párrafos precedentes apoyan firmemente la idea de que la generación de anticuerpos anti-patulina a través de enfoques convencionales destinados a preservar la integridad estructural de la micotoxina probablemente no sea factible. La alta reactividad de la micotoxina frente a nucleófilos, combinada con el pequeño tamaño de la molécula y la inestabilidad del hapteno, ya sea *in vitro* o *in vivo*, son factores que probablemente sustentan esta conclusión. De hecho, la toxicidad de la micotoxina se basa en su capacidad para modificar residuos de cisteína en proteínas/enzimas, inactivando o reduciendo así su actividad y alterando la función de sistemas celulares esenciales, directa o indirectamente. Tal conclusión no solo se aplica a los haptenos **C4** y **C7** con un brazo espaciador de succinilo, sino también al hapteno **C6**, un derivado que fue sintetizado a través de una vía sintética ciertamente elaborada y que no genera dudas sobre su estructura y estabilidad durante la purificación y conjugación, aunque probablemente sí ante la presencia de grupos tiol.

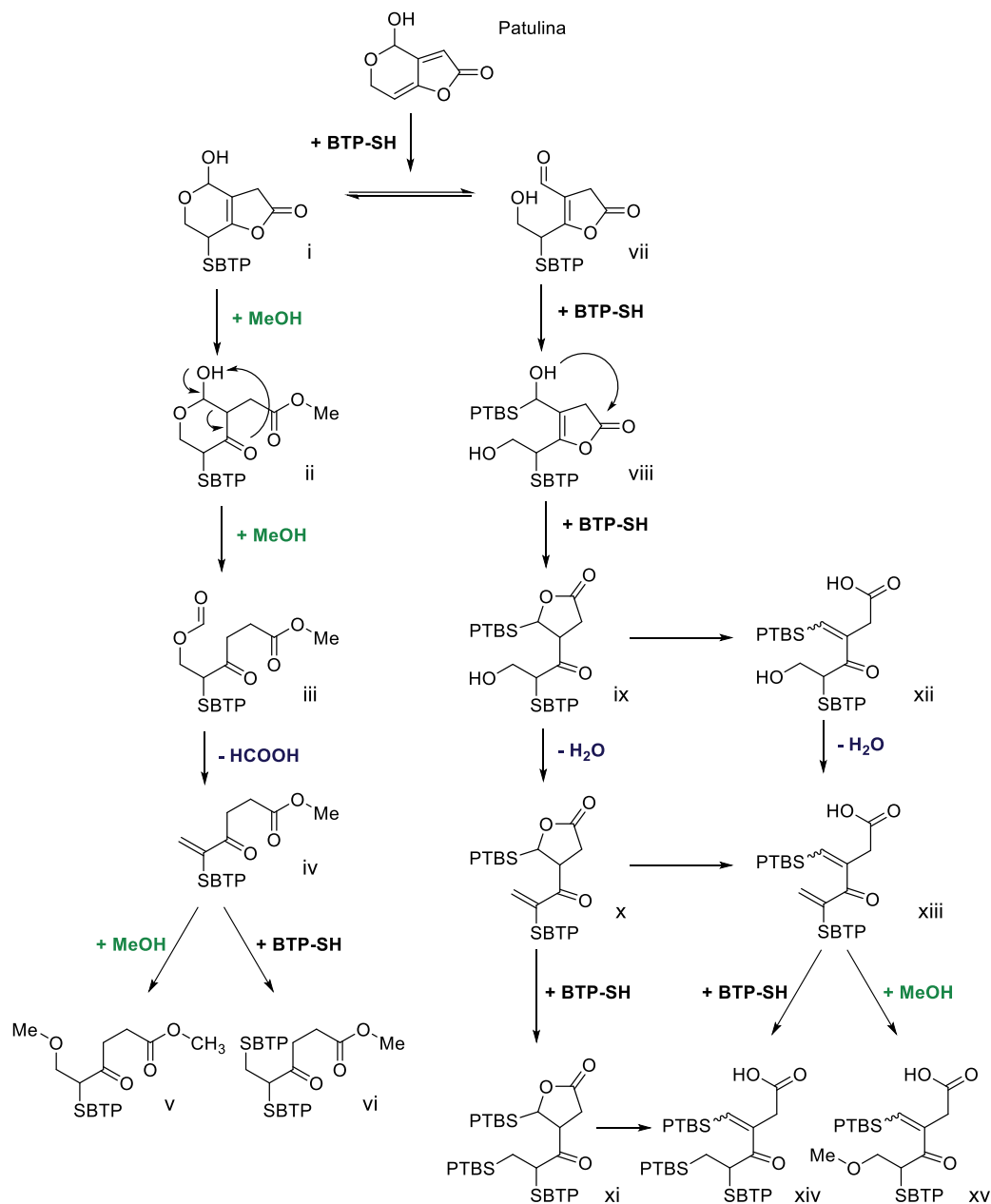
### 3.2 Aproximación alternativa basada en la derivatización de patulina con monotioles aromáticos

En este punto de la investigación, nos preguntamos si se podría aprovechar la reactividad electrofílica de la patulina para lograr el objetivo perseguido. En el año 2000, Fliege y Metzler fueron los primeros en sugerir que los métodos analíticos basados en anticuerpos para la detección de patulina podrían ser factibles mediante el análisis del aducto resultante de la reacción de la micotoxina con un compuesto que contuviera un grupo tiol.<sup>31</sup> Si fuera posible la generación de anticuerpos frente a un aducto de patulina con un nucleófilo, como por ejemplo un tiol, sería posible analizar muestras contaminadas con esta micotoxina por métodos inmunoquímicos convencionales tras una simple reacción de derivatización. En este sentido, la producción de anticuerpos y la determinación indirecta de diferentes contaminantes mediante derivatización previa es una estrategia que se ha llevado a cabo de manera exitosa para otros analitos con poco potencial inmunogénico, como por ejemplo el glifosato o la acrilamida.<sup>149,150</sup> Para que este enfoque sea de interés práctico y pueda implementarse en el análisis de muestras reales, se deberían cumplir ciertos requisitos. En concreto, (i) la reacción de la patulina y el nucleófilo debe tener lugar en un medio acuoso; (ii) la reacción debe proceder a través de una cinética de reacción rápida de modo que el producto se forme en minutos en lugar de horas o días; (iii) la reacción debe proceder de forma reproducible y con altos rendimientos, preferiblemente cuantitativamente; y (iv) la reacción debe conducir a un compuesto mayoritario, idealmente un único compuesto.

Dado que la reactividad de patulina con grupos sulfhidrilo ha sido ampliamente descrita en la bibliografía, se decidió diseñar una estrategia de derivatización utilizando compuestos tiolados como agentes derivatizantes. Cabe mencionar que diferentes autores han aplicado anteriormente una estrategia similar para el desarrollo de distintos tipos de sensores para la determinación indirecta de patulina o para su eliminación en matrices alimentarias.<sup>76,151,152</sup> Los estudios previos de Fliege y Metzler habían demostrado claramente que la reacción de patulina con tioles produce una gran cantidad de productos a través de vías de reacción complejas que comienzan con una adición de tipo Michael a la posición C-7 electrofílica de la agrupación lactónica  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada (**Figura 3.5**). En particular, la reacción de patulina con 4-bromotiofenol permitió identificar hasta dieciséis aductos diferentes,<sup>31</sup> lejos del objetivo deseable de obtener un único compuesto. Sin embargo, un examen cuidadoso de estos resultados mostró que seis de los dieciséis aductos resultantes, aductos ii-vi y xv, se formaban por la utilización de metanol como cosolvente, mientras que otros productos se formaban en condiciones en las que el tiol estaba presente en un elevado exceso y/o después de tiempos de reacción largos. Más importante aún, estos experimentos también mostraron que en ciertas condiciones se formaba un compuesto

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

predominante, a saber, el aducto formado por la incorporación de dos moléculas de tiol al esqueleto de la micotoxina en las posiciones C-7 y C-4, el aducto ditiolado xii.



**Figura 3.5.** Mecanismo de degradación de patulina en presencia de 4-bromotiofenol propuesto por Fliege y Metzler.

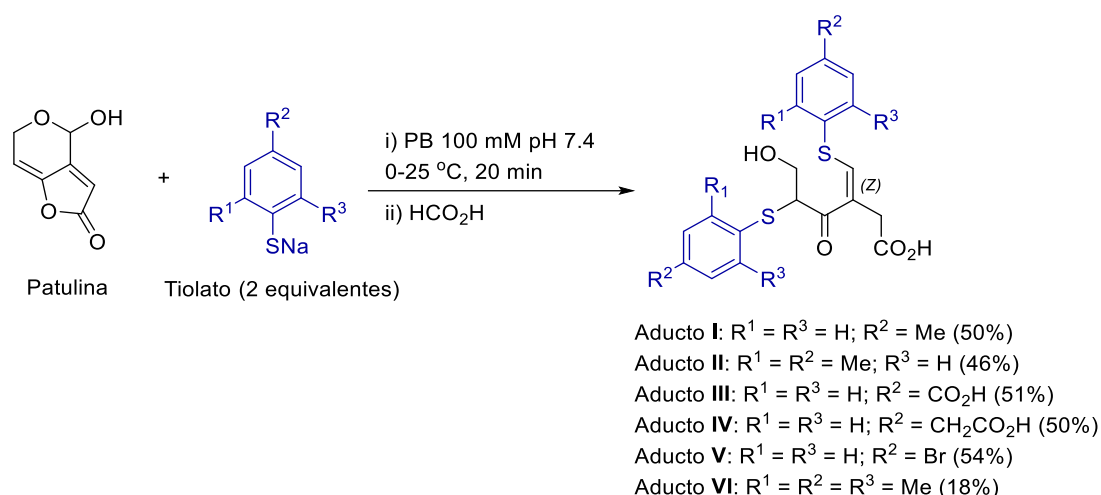
Otra condición clave para el éxito de la estrategia de derivatización planteada es que la estructura final del derivado sea lo suficientemente compleja como para provocar una respuesta inmune apropiada. Por tanto, los compuestos aromáticos que contienen grupos tiol parecen ser más adecuados como reactivos de derivatización que los tioles alifáticos. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se investigaron diferentes condiciones de reacción para mejorar la formación del aducto ditiolado en ausencia de metanol y utilizando

seis tioles aromáticos estructuralmente simples y disponibles comercialmente (ver el **Esquema 3.4** para la estructura de los tioles aromáticos utilizados).

Este estudio demostró que el aducto ditiolado era esencialmente el único producto formado (tal como se observó por cromatografía en capa fina y por el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto obtenido tras el procesado de la reacción, ver parte experimental) cuando la reacción se llevaba a cabo en tampón PB100, a una temperatura entre  $0\text{ }^\circ\text{C}$  y  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , y usando 2-3 equivalentes de la sal sódica del tiol, preparada independientemente por reacción del tiol con un equivalente de *tert*-butóxido sódico en metanol. Por tanto, en estas condiciones de reacción, la mayoría de los tioles ensayados condujeron a la formación rápida y con alto rendimiento del aducto correspondiente, visible por el desarrollo de un color amarillo intenso. Esto fue particularmente cierto para los aductos **I** y **V**, mientras que la formación del aducto **VI** se produjo de forma significativamente menos limpia y con menor rendimiento, muy probablemente debido al elevado impedimento estérico causado por la sustitución de las dos posiciones *orto* al grupo tiolato.

También se observó que el aducto ditiolado se formaba predominantemente incluso cuando se utilizaba un equivalente del tiolato, lo que indica que, una vez que un grupo tiolato reacciona con patulina, la incorporación del segundo grupo tiolato al aducto monotiolado formado inicialmente se ve favorecida sobre la adición a una molécula de patulina intacta. Además, el aducto ditiolado fue el producto principal incluso cuando se empleó un exceso de tiolato si se usaban tiempos de reacción relativamente cortos (por ejemplo, 40 equivalentes de sal del tiol y 1 hora de tiempo de reacción). Solo cuando el tiempo de reacción se prolongaba más allá de las 24 horas se empezó a observar la formación de otros productos, entre ellos fundamentalmente el producto de isomerización del doble enlace *Z* del aducto ditiolado a la geometría *E*, o incluso el aducto resultante de la adición de tres moléculas del tiolato si además de tiempos largos de reacción se utilizaba un gran exceso del mismo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



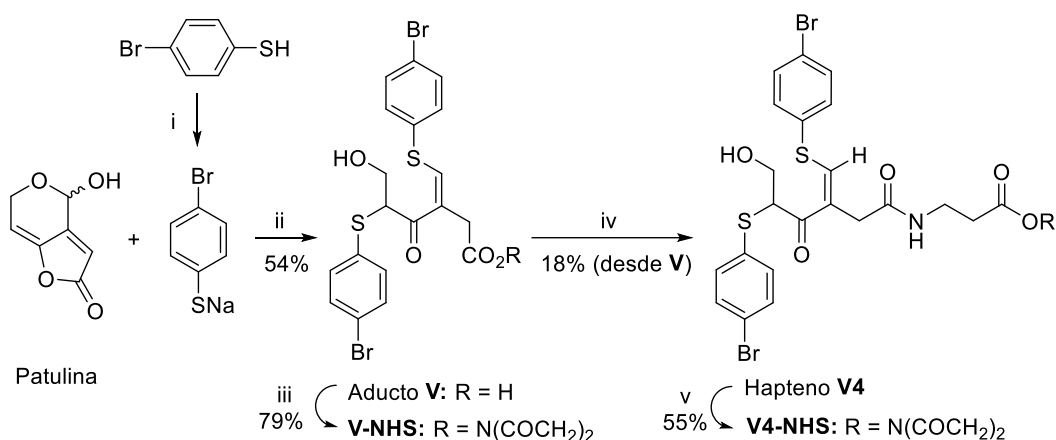
**Esquema 3.4.** Reacción de la patulina con los monotioles aromáticos estudiados y estructuras de los principales aductos que se forman. Los fragmentos coloreados corresponden a la estructura del tiol incorporada a la estructura del aducto. Los rendimientos (entre paréntesis) se calcularon después de la purificación cromatográfica del crudo de reacción para caracterizar los aductos por métodos espectroscópicos; sin embargo, sin procesado y purificación, la mayoría de las reacciones son prácticamente cuantitativas.

### 3.2.1 Preparación de haptenos y bioconjugados de los aductos ditiolados de patulina

Los resultados obtenidos en la reacción de patulina con tioles o sus sales fueron realmente alentadores, abriendo la posibilidad de lograr el objetivo de desarrollar pruebas rápidas de análisis basadas en la derivatización de patulina con un tiol o su sal. En este sentido, el aducto resultante de la reacción de patulina con 4-bromotiofenol (aducto **V**) se seleccionó para la generación de anticuerpos, ya que, además de ser uno de los aductos que más eficazmente se formaban, postulamos que tendría buenas propiedades inmunogénicas debido a la presencia en su estructura de los dos anillos de benceno bromados.

Debido a que la estructura de la patulina se abre al reaccionar con dos moléculas de tiol, el aducto resultante tiene un grupo carboxílico libre, un resultado favorable y aprovechable para el objetivo buscado, ya que dicho grupo funcional podía usarse para acoplar fácilmente el aducto a las proteínas transportadoras a través de su previa activación promovida por una carbodiimida. Sin embargo, pensamos que la conjugación directa del aducto **V** a través de este grupo carboxilo podría enmascarar los principales determinantes antigénicos de la molécula debido a la proximidad de su esqueleto molecular al núcleo proteico. En consecuencia, decidimos preparar también un análogo del aducto **V** con un brazo espaciador de tres átomos de carbono, hapteno **V4**, el cual se sintetizó vía amidación del grupo carboxilo de **V** con  $\beta$ -alanina (**Esquema 3.5**).

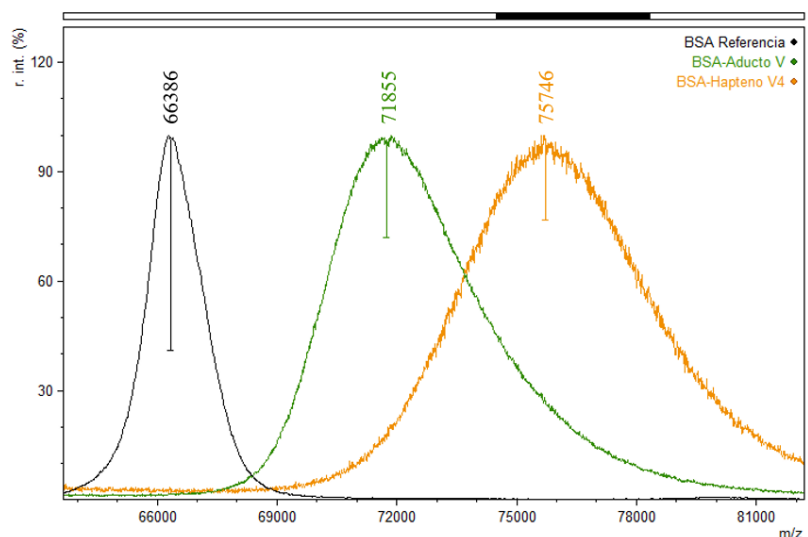
El grupo carboxílico en ambos derivados, el aducto **V** y el hapteno **V4**, se activó formando los correspondientes ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo, utilizando EDC y NHS, los cuales fueron caracterizados mediante RMN de  $^1\text{H}$ .



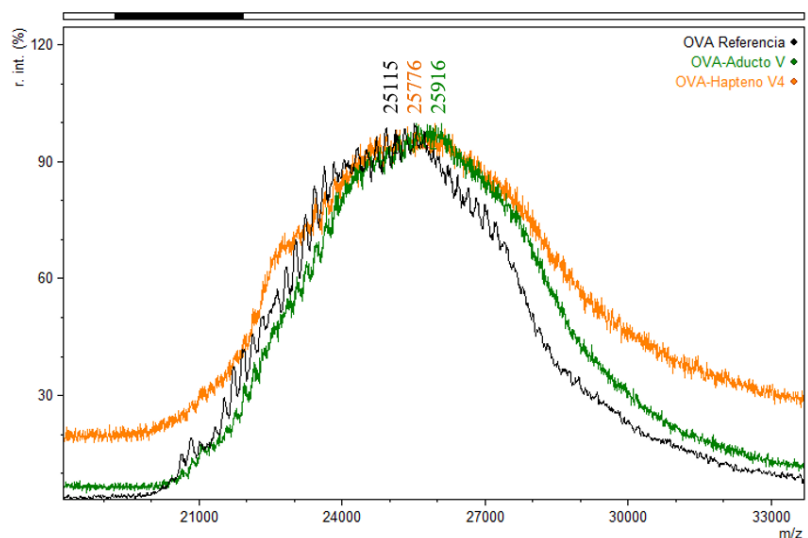
**Esquema 3.5.** Preparación del aducto **V** y el hapteno **V4**. *Reactivos y condiciones:* i)  $\text{Me}_3\text{CONa}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h; ii) PB100,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min; iii)  $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ , NHS,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h; iv)  $\beta$ -alanina,  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1),  $0\text{ }^\circ\text{C}$  a t.a., 2 h; v)  $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ , NHS,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h.

Los ésteres activos **V-NHS** y **V4-NHS** se acoplaron a proteínas siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el apartado 3.1.3 para la preparación de los conjugados de los haptenos convencionales. Con respecto a las relaciones molares hapteno-proteína, el conjugado inmunizante con BSA se preparó con exceso de hapteno, hasta 60 equivalentes por mol de proteína, mientras que para la preparación de los conjugados de ensayo con OVA se utilizaron 15 equivalentes. La cantidad de hapteno acoplado se determinó mediante análisis de MALDI-TOF-MS. Se determinaron densidades de hapteno adecuadas de 10.6 y 16.0 para los conjugados BSA-**V** y BSA-**V4**, respectivamente (**Figura 3.6**), mientras que se estimaron valores de alrededor de 2-3 para los conjugados de OVA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>BSA</b>	66386	–	–	–	–
<b>BSA-Aducto V</b>	71855	514	5469	10.6	60
<b>BSA-Hapteno V4</b>	75746	585	9360	16.0	40



	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>OVA</b>	25115	–	–	–	–
<b>OVA-Aducto V</b>	25916	514	801	3.1	15
<b>OVA-Hapteno V4</b>	25776	585	661	2.3	15

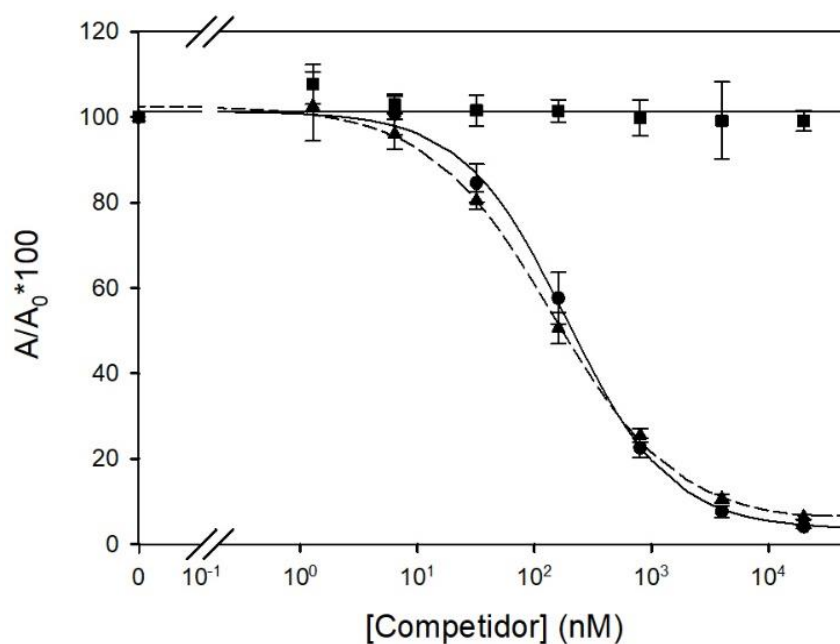
**Figura 3.6.** Espectros de masas MALDI-TOF: BSA (negro) [ion molecular monocargado,  $z = 1$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos V (verde) y V4 (naranja); OVA (negro) [ion molecular dicargado,  $z = 2$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos.



### 3.2.2 Generación y caracterización de anticuerpos policlonales

Tras la preparación de los bioconjugados se abordó la producción de anticuerpos. Para ello se inmunizaron conejos con los conjugados BSA-**V** y BSA-**V4** de forma análoga a como se ha descrito en el apartado 3.1.4, y los antisueros resultantes se analizaron en condiciones estándar para inmunoensayos competitivos. Cada anticuerpo policlonal fue capaz de reconocer a su correspondiente antígeno homólogo, es decir, el antisuero del conejo inmunizado con el conjugado BSA-**V** se unió al conjugado OVA-**V** inmovilizado, y el antisuero del conejo inmunizado con el conjugado BSA-**V4** reconoció el antígeno de tapizado OVA-**V4**. A continuación, se examinó la capacidad de estos antisueros para reconocer el aducto **V** en solución. Se prepararon curvas estándar del aducto **V**, comenzando con una disolución 100  $\mu\text{M}$  en PBS y diluyendo en serie con un factor de dilución de cinco, y se añadieron a placas tapizadas, seguido del anticuerpo policlonal en PBST. Remarcablemente, ambos antisueros fueron capaces de unirse al aducto **V**, como demuestra la inhibición de la señal de ensayo a medida que aumentaba la concentración del analito, mientras que eran incapaces de reconocer a patulina o al tiol derivatizante. El anticuerpo policlonal del hapteno **V4** exhibió una afinidad ligeramente mayor por el analito que el anticuerpo derivado de la inmunización con el aducto **V** ( $\text{IC}_{50} = 180 \text{ nM}$  frente a  $\text{IC}_{50} = 510 \text{ nM}$ ). Lo más probable es que este resultado se deba a la presencia del brazo espaciador en el hapteno **V4**, que favorece una mejor presentación de la molécula al medio circundante y, por tanto, una mejor interacción con el anticuerpo. Más importante aún, cuando se añadió el tiolato a 2 mg/ml en agua [2% (v/v)] a soluciones de patulina en tampón, y las mezclas se analizaron mediante ELISA competitivo después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, la curva de inhibición resultante superponía perfectamente con la curva obtenida con el aducto **V** purificado (**Figura 3.7**).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 3.7.** Curvas de inhibición con el antisuero derivado del conjugado BSA-V4. *Condiciones del ensayo:* se recubrieron placas de ELISA con el conjugado OVA-V4 (1 µg/ml) y se ensayó el anticuerpo a 1/3000. Los compuestos usados como competidores fueron patulina (■), aducto V (●) y patulina más la sal sódica de 4-bromotiofenol (▲).

Este resultado abría la puerta a desarrollar procedimientos inmunoanalíticos fáciles de usar para la detección de patulina después de una reacción de derivatización rápida y sencilla. El límite de detección del ensayo (35 nM), aunque ciertamente sobresaliente para un compuesto tan pequeño como la patulina, era aún mayor de lo deseable para el desarrollo de un inmunoensayo que permitiera la determinación confiable de patulina al nivel regulado más exigente (10 µg/kg). Sin embargo, sí significó una prueba de concepto alentadora de que la reactividad electrofílica de la patulina se podía aprovechar para generar anticuerpos adecuados para el inmunodiagnóstico de esta micotoxina en alimentos.

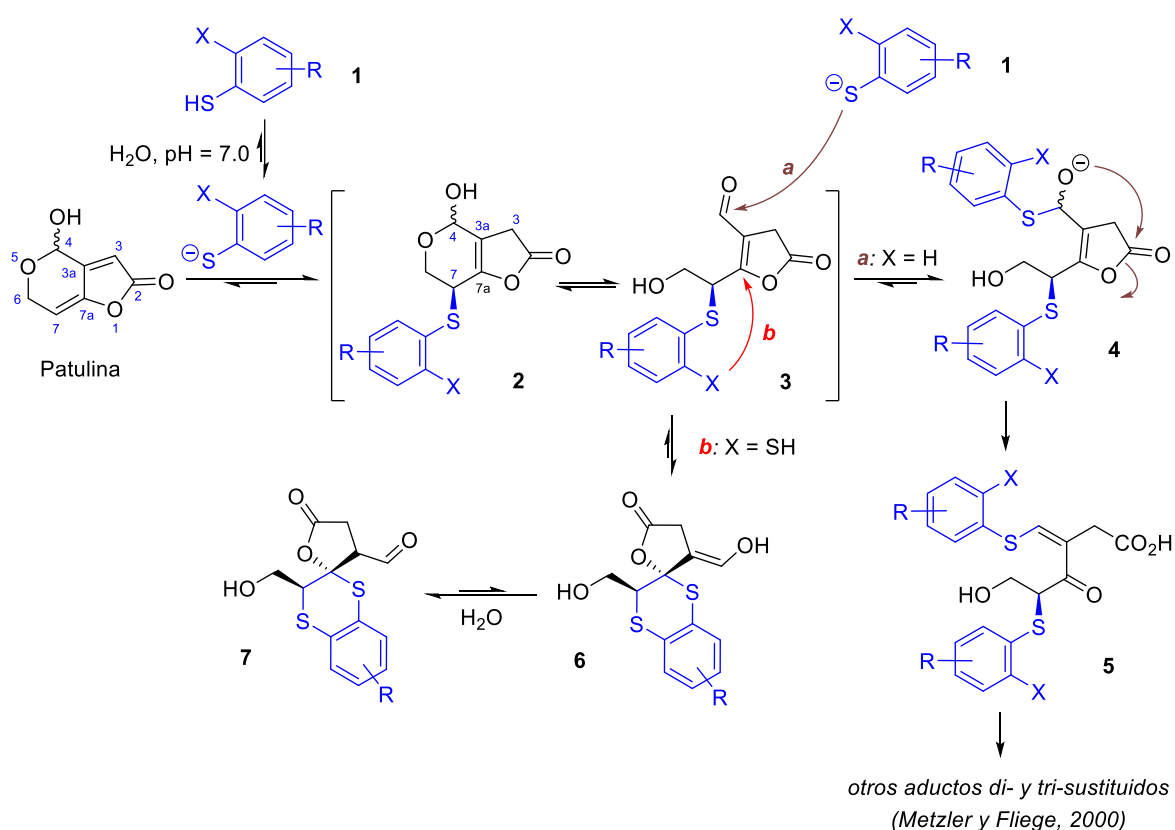
## 3.3 Reacción de patulina con aril-1,2-ditioles

En el apartado anterior se ha mostrado la potencial viabilidad de desarrollar un procedimiento inmunoanalítico para la determinación de patulina basado en la previa derivatización de la misma con un monotiol aromático. Tal como se ha mencionado, la patulina reacciona rápidamente con los tiolatos derivados de estos tioles (**1**, X = H) en medio acuoso vía una adición de Michael inicial a la posición electrofílica C-7 para formar un monoadducto hemiacetálico **2** (**Esquema 3.6**). Este intermedio hemiacetálico está en equilibrio con la forma abierta hidroxialdehídica **3** que rápidamente experimenta la adición nucleofílica 1,2 de una segunda molécula del anión tiolato al grupo carbonilo, generando el inestable intermedio **4** (ruta *a*), a partir del cual se producen una serie de transformaciones que conducen inicialmente de forma mayoritaria al aducto ditiolado **5**. En presencia de un exceso de tiolato y con tiempos largos de reacción, este aducto experimenta una serie de transposiciones, eliminaciones e incluso adición de nuevas moléculas de tiol que originan una mezcla compleja de derivados tiolados. Tal como se ha descrito en el apartado previo, los conjugados inmunogénicos preparados a partir de un aducto de este tipo (**5**, X = H, R = 4-Br) han posibilitado la generación de anticuerpos policlonales de afinidad moderada hacia el mismo, los cuales podrían eventualmente utilizarse para el desarrollo de un inmunoensayo para patulina que incluyese una etapa previa de derivatización con el correspondiente aril monotiol. No obstante, las características de los anticuerpos producidos a partir de estos aductos no fueron plenamente satisfactorias, en términos de afinidad, para el desarrollo de un inmunoensayo para patulina que permitiese su cuantificación a los niveles máximos establecidos por los organismos reguladores.

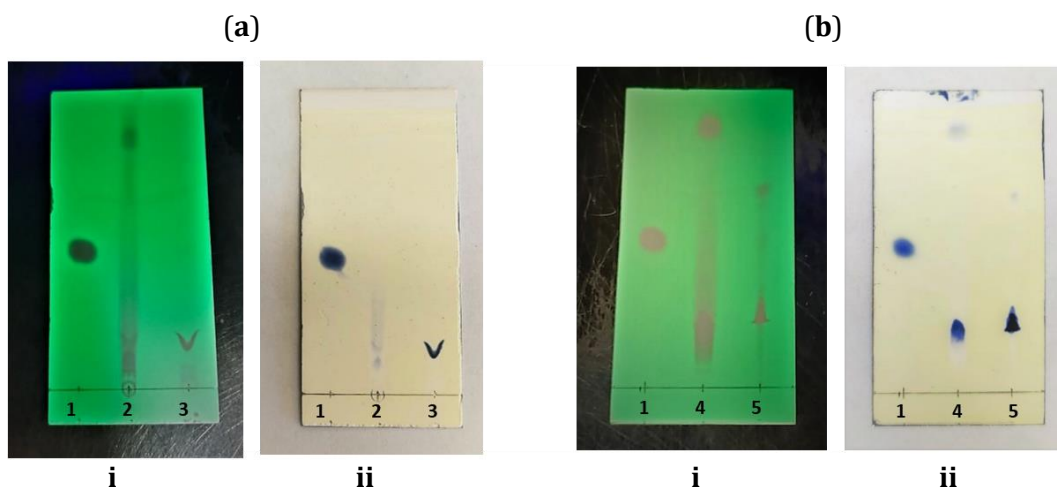
Ante estos antecedentes, pensamos que el curso mecanístico de la reacción de adición de un aril tiol a la patulina podría modificarse y potencialmente dirigirse hacia la formación de un aducto mayoritario más estable, usando un aril-1,2-ditiole (X = SH) en lugar de un aril monotiol. Especulamos con la posibilidad de que después de la adición del primer grupo tiolato a la posición electrofílica C-7 de la patulina, la presencia del segundo grupo tiol podría potencialmente modificar el curso de la reacción, dirigiéndola hacia una adición Michael intramolecular. Si este fuera el caso, se formaría posiblemente un compuesto como **7**, el cual podría ser suficientemente estable para ser aislado como el producto principal de la reacción de adición del aril-1,2-ditiole (**Esquema 3.6**, ruta *b*). Para evaluar esta hipótesis, comenzamos por hacer reaccionar patulina con benceno-1,2-ditiole (X = SH, R = H), disponible comercialmente. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en tampón fosfato 50 mM (pH = 7.4, PB50), utilizando un ligero exceso de ditiole y el doble de equivalentes de NaOH para facilitar así la solubilidad del ditiole en el medio acuoso. Bajo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

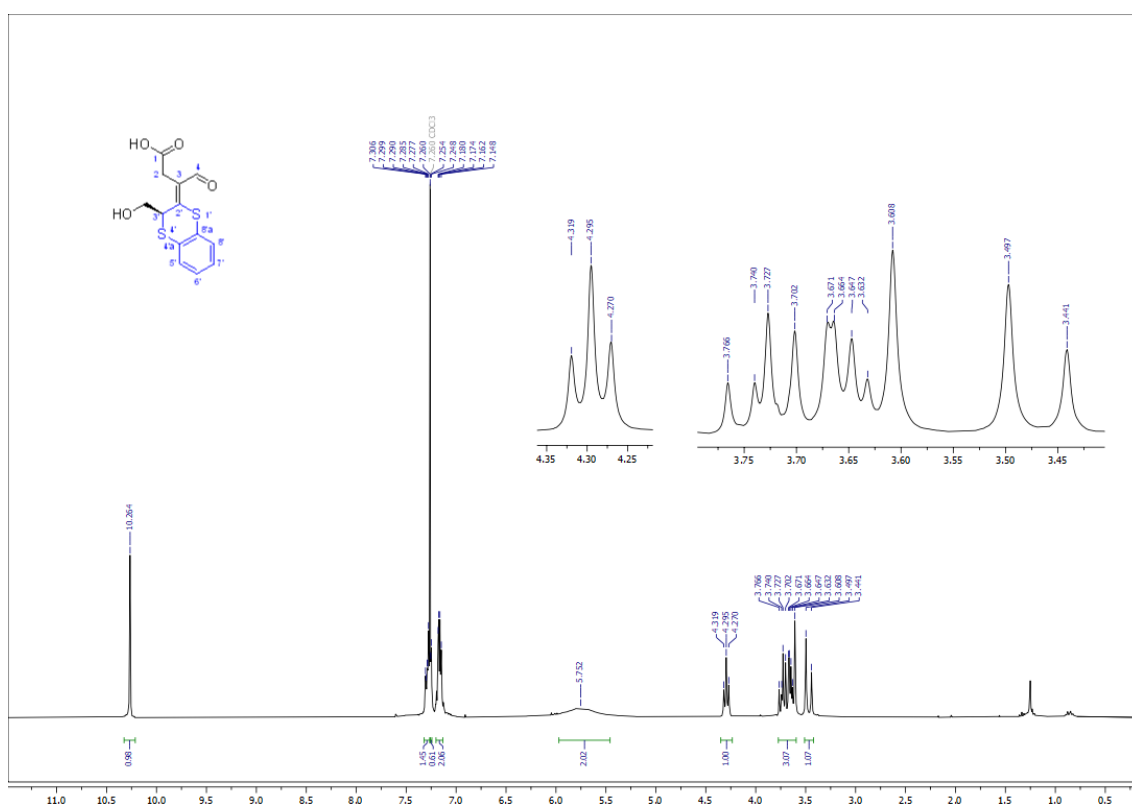
estas condiciones, se observó el desarrollo prácticamente instantáneo de un color amarillo intenso, análogo al observado en la reacción de patulina con los aril monotioles, indicativo de la rápida reacción del ditiol con patulina. La acidificación suave de la reacción después de unos pocos minutos proporcionó, tras el procesado de la misma, un crudo de reacción que mostró, tanto por CCF (**Figura 3.8**) como por RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 3.9**), la presencia de un producto de reacción muy mayoritario. Se obtuvo una reacción aún más limpia utilizando como reactivo una solución acuosa de la sal sódica del ditiol, preparada de forma independiente a partir de la reacción del ditiol con *tert*-butóxido sódico en MeOH.<sup>153</sup>



**Esquema 3.6.** Mecanismo propuesto para la adición de aril monotioles (**1**, X = H, ruta a) y aril-1,2-ditioles (**1**, X = SH, ruta b) a patulina. La adición del aril tiol genera un nuevo centro estereogénico en C-7, que puede tener la configuración R o S; para simplificar, solo se representan los estereoisómeros con la configuración S en esta posición.



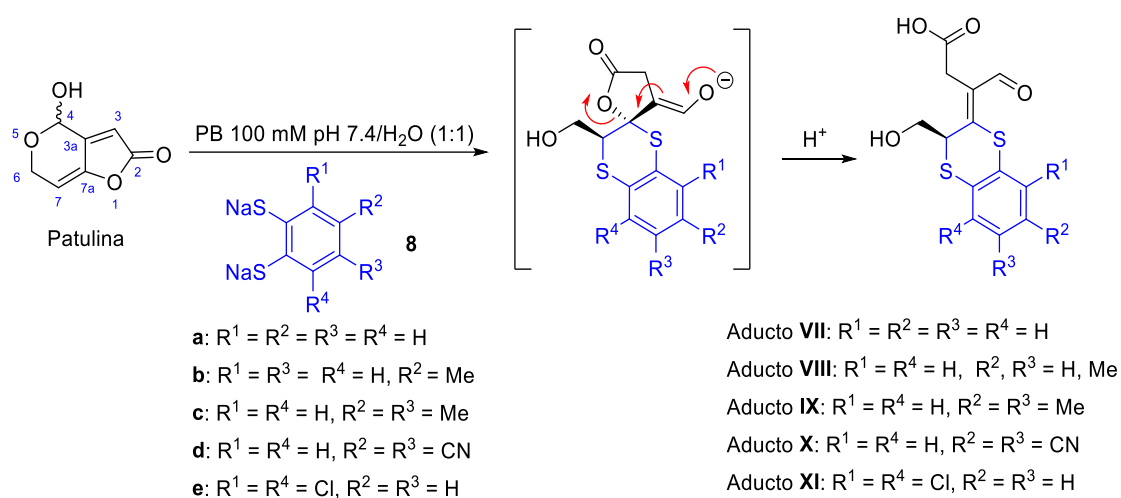
**Figura 3.8.** Cromatografía en capa fina (CCF) de la reacción entre patulina y benceno-1,2-bis(tiolato) de sodio (**8a**) en PB50 a temperatura ambiente. **(a):** Mezcla de reacción sin procesar: placas de CCF mostrando las manchas de (1) patulina, (2) benceno-1,2-bis(tiolato) de sodio y (3) mezcla de reacción de patulina y benceno-1,2-bis(tiolato) de sodio en PB 50 mM después de 10 min. **(b):** Crudo de reacción tras procesado: placas de CCF mostrando las manchas de (1) patulina, (4) benceno-1,2-bis(tiolato) de sodio y (5) extracto crudo de la reacción. *Eluyente:* 95:5 CHCl<sub>3</sub>-isopropanol con 0.5% de HCO<sub>2</sub>H. *Reactivo de revelado:* (i) luz UV; (ii) solución acuosa de molibdato de amonio y cerio y aplicación de calor.



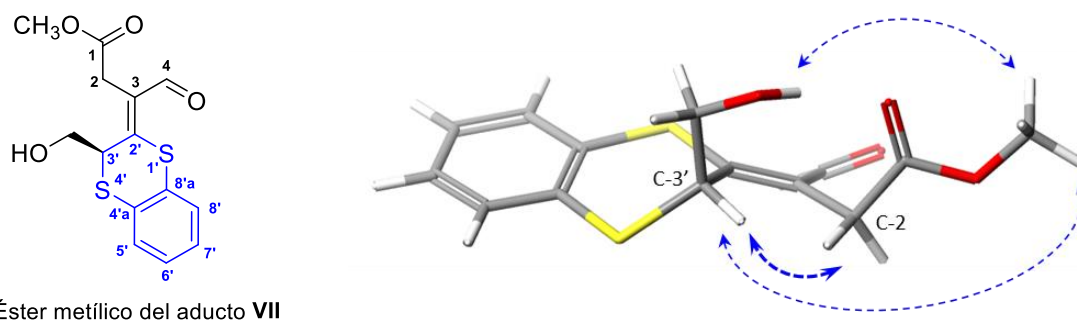
**Figura 3.9.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (en CDCl<sub>3</sub>) del crudo de la reacción entre patulina y benceno-1,2-bis(tiolato) de sodio en PB 50 mM (Aducto **VII**).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos espectroscópicos del aducto formado en la reacción de patulina con el benceno-1,2-ditiol nos permitieron asignar tentativamente al mismo la estructura **VII**, que no correspondía a la estructura que inicialmente habíamos planteado como más factible en términos mecanísticos (aducto **7**), sino a la resultante de la apertura de la agrupación  $\gamma$ -lactónica del mismo (**Esquema 3.7**). La confirmación definitiva de la estructura y estereoquímica de este aducto se obtuvo después de su transformación en el éster metílico correspondiente por esterificación con diazometano, seguida de purificación cromatográfica y un análisis espectroscópico detallado que incluyó técnicas de RMN 2D, experimentos COSY, HSQC, HMBC y NOESY (ver **Figura 3.10**, **Tabla 3.1**, parte experimental y apartado 7.1).



**Esquema 3.7.** Formación de los aductos de patulina con aril-1,2-ditioles (**8**).



**Figura 3.10.** Conformación de energía mínima global del éster metílico del aducto **VII**.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Los cálculos se realizaron utilizando Mecánica Molecular (MM3) tal como está implementado en el programa SCIGRESS (versión 3.0.0). Se realizó una búsqueda conformacional sistemática (todos los enlaces con libertad de giro se rotaron en pasos de 15 grados) y la geometría de los conformeros generados se refinó realizando un cálculo de la geometría optimizada en MOPAC utilizando parámetros de PM3 e incluyendo los efectos de solvatación del agua simulados por COSMO [MO-G-PM3\_H<sub>2</sub>O]. Las flechas punteadas indican las correlaciones NOESY más relevantes.

**Tabla 3.1.** Datos espectroscópicos (RMN) del éster metílico del aducto **VII** [CDCl<sub>3</sub>, 400 (<sup>1</sup>H)/101 (<sup>13</sup>C) MHz]

Asignación de posición		Desplazamiento químico (ppm) <sup>a</sup>		Multiplicidad de <sup>1</sup> H <sup>b</sup>	Conectividad <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C a 2 enlaces <sup>c</sup>	Conectividad <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C a 3 o más enlaces <sup>c</sup>	Efectos NOE observados <sup>d</sup>
		<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C				
C-1	CO <sub>2</sub>	-	171.2	<i>n/a</i>	-	-	-
C-2	CH <sub>2</sub>	3.62	32.0	Sistema AB, <i>J</i> = 16.3 Hz	C-1, C-3	C-2', C-4	H-3'
		3.49					
C-3	C	-	126.4	<i>n/a</i>	-	-	-
C-4	CHO	10.31	188.0	<i>s</i>	C-3		
C-2'	C	-	154.0	<i>n/a</i>	-	-	-
C-3'	CH	4.30	43.3	<i>t</i> , <i>J</i> = 7.4 Hz	C-2', CH <sub>2</sub> OH	C-4'a	H-2/H'-2, OCH <sub>3</sub>
C-4'a	C	-	126.8	<i>n/a</i>			
C-5'	CH	7.32-	127.3	Parte AA' (Sistema AA'BB')	C-6'	C-7'	
C-8'	CH	7.27	130.6		C-7'	C-6'	
C-6'*	CH	7.22-	127.18	Parte BB'		C-4'a	
C-7'*	CH	7.14	127.16				
C-8'a	C	-	129.5	<i>n/a</i>	-	-	-
CH-OH		3.78-	62.4	<i>m</i>			
		3.72					
CH'-OH		3.66		<i>ddd</i> , <i>J</i> = 12.8, 7.4, 4.4 Hz			
OCH <sub>3</sub>		3.71	52.7	<i>s</i>	C-1		H-3', OH
OH		2.35	-	<i>dd</i> , <i>J</i> = 7.9, 5.6 Hz	CH <sub>2</sub> OH		OCH <sub>3</sub>

[*n/a*: no aplicable; *s*: simplete; *s*; *dd*: doble doblete; *ddd*: doble doblete de dobletes, *t*: triplete; *m*: multiplete]<sup>a</sup> Desplazamiento químico asignado a partir de experimentos de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC y HMBC en CDCl<sub>3</sub> como disolvente. <sup>b</sup> Multiplicidad de <sup>1</sup>H y grado de sustitución de los carbonos obtenidos a partir de los experimentos de <sup>1</sup>H RMN y HSQC editado. <sup>c</sup> Conectividad entre las posiciones de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C deducidas a partir de experimentos de HMBC. <sup>d</sup> Efectos NOE observados en el experimento NOESY 2D. \* Asignación intercambiable.

La reacción de patulina con otros aril 1,2-ditioles también tuvo lugar de manera similar para proporcionar principalmente el aducto del ditiol correspondiente (**Esquema 3.7**). La reacción transcurrió muy eficazmente con los aril-1,2-ditioles que tienen sustituyentes electrón donantes en las posiciones *meta* o *para* en relación a los grupos sulfhidrilo (SH). Este es el caso de la reacción de patulina con la sal sódica del 4-metil-1,2-bencenoditiol (**8b**), que dio lugar a una mezcla 1:1 de aductos regioisoméricos **VIII**, o con la sal sódica del 4,5-dimetil-1,2-bencenoditiol (**8c**), que produjo el correspondiente aducto **IX**. La formación del aducto con el ditiol fue claramente menos efectiva con la sal sódica del 4,5-diciano-1,2-bencenoditiol (**8d**), resultado que se podría atribuir al menor carácter nucleofílico del correspondiente ditiolato debido al efecto electrón atrayente de los grupos ciano.<sup>154</sup> En cuanto a la reacción con la sal sódica del 3,6-diclorobenceno-1,2-ditiol (**8e**), esta tuvo lugar de forma muy eficiente, de modo análogo a la reacción con los aril ditioles **8a-8c**, a pesar del aparente impedimento estérico introducido por los átomos de cloro situados en la posición contigua a los centros nucleofílicos tiolados. Es interesante señalar que la reacción de patulina con alquil-1,2-ditioles, como el 1,2-etanoditiol, fue significativamente menos eficiente que la reacción con los aril-1,2-ditioles, aunque el aducto **XII** correspondiente seguía siendo el principal producto formado (consultar la parte experimental para más detalles).

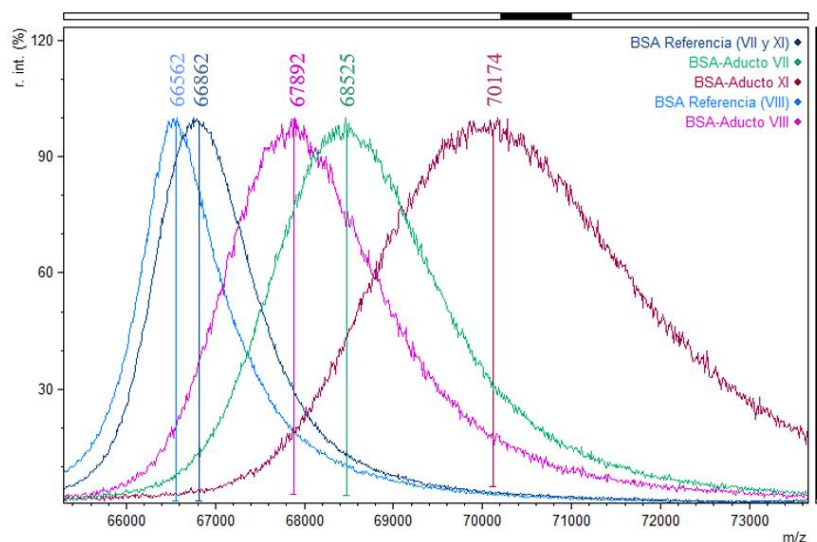
### 3.4 Generación de inmunorreactivos para patulina-aril-1,2-ditiol

#### 3.4.1 Preparación de bioconjugados de los aductos patulina–aril-1,2-ditiol

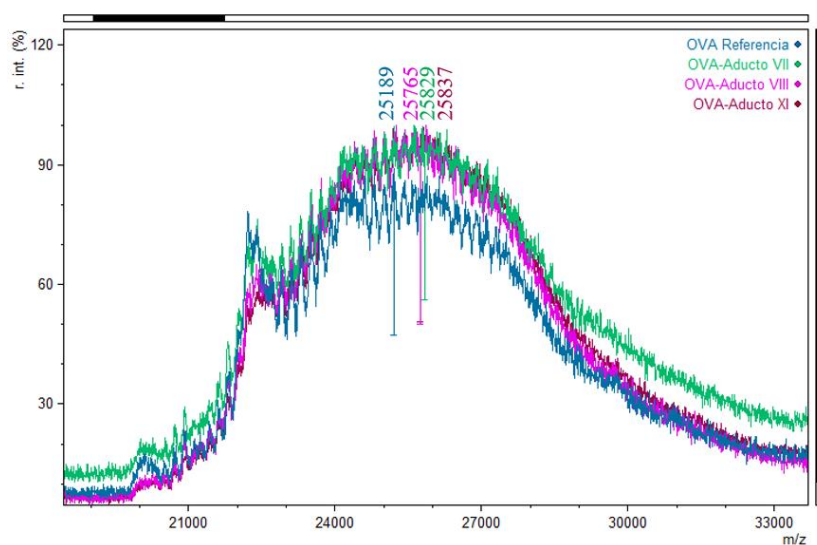
La eficacia y las condiciones experimentales en las que se produce la formación de los aductos de patulina-ditiol abrieron el camino para desarrollar un inmunoensayo rápido basado en la derivatización previa de la patulina con un compuesto aril-1,2-ditiolado. Una observación clave en relación con esta posibilidad es el hecho de que la reacción da lugar exclusivamente al aducto correspondiente incluso utilizando un gran exceso de ditiolato y tiempos largos de reacción, a diferencia de lo que ocurría con los aductos derivados de los aril monotioles. Asimismo, la mayor rigidez estructural y diversidad funcional de los nuevos aductos los hace potencialmente más inmunogénicos y por tanto más adecuados para inducir la producción de anticuerpos de elevada afinidad.

En vista de los resultados obtenidos, decidimos centrar nuestra atención en los monoaductos **VII**, **VIII** y **XI**, tanto por la eficiencia con la que se produce su formación como por la disponibilidad comercial de los correspondientes ditioles. Por otra parte, merece la pena señalar que como consecuencia de la apertura de la agrupación  $\gamma$ -lactónica del intermedio inicialmente generado, estos aductos poseen un grupo carboxílico que, en principio, puede utilizarse para realizar su acoplamiento directo a las proteínas portadoras a través de la química mediada por carbodiimida. No obstante, es posible que esta aproximación, sin duda la más simple e inmediata, no sea la más adecuada, dado que podría enmascarar el esqueleto completo del aducto al sistema inmunitario y además evitaría que el propio grupo carboxílico, un grupo inmunológicamente relevante, participe en la interacción con el anticuerpo. Conviene recordar que esta circunstancia ya se había observado en la diferente respuesta inmunitaria obtenida con el aducto **V** y el hapteno **V4**, en el cual el esqueleto del aducto ditiolado **V** se separa de la proteína mediante un pequeño brazo espaciador (ver apartado 3.2.2). En cualquier caso, y por no dejar de explorar todas las posibilidades que ofrecía la estructura de estas moléculas, se decidió preparar los correspondientes conjugados inmunogénicos (con BSA) y de ensayo (con OVA) con la idea de evaluar posteriormente la respuesta inmune de los mismos (ver más adelante). Las densidades de aducto obtenidas (relación molar, RM), determinadas por espectrometría de masas MALDI-TOF después de la purificación de los bioconjugados por cromatografía de exclusión molecular y diálisis, se recogen en la **Figura 3.11**.





	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>BSA</b>	66862	–	–	–	–
<b>BSA-Aducto VII</b>	68525	278	1663	6.0	30
<b>BSA-Aducto XI</b>	70174	346	3312	9.6	30
<b>BSA</b>	66562	–	–	–	–
<b>BSA-Aducto VIII</b>	67892	292	1330	4.6	30



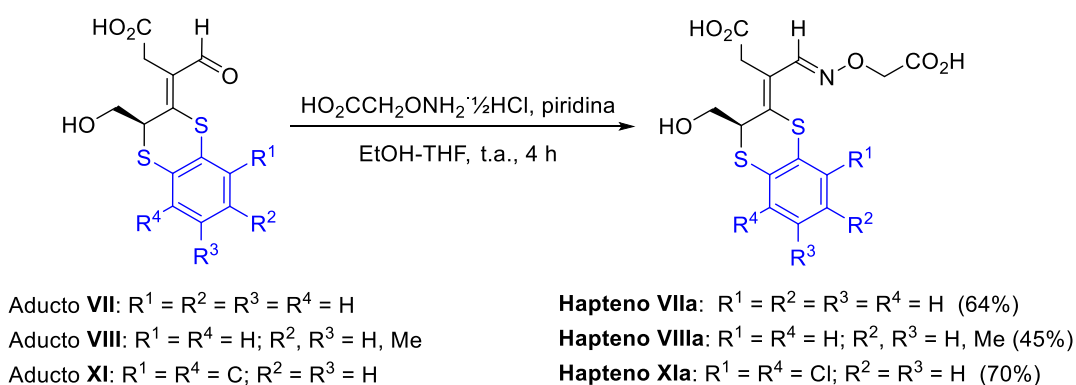
	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>OVA</b>	25189	–	–	–	–
<b>OVA-Aducto VII</b>	25829	278	640	4.6	10
<b>OVA-Aducto VIII</b>	25765	292	576	3.9	10
<b>OVA-Aducto XI</b>	25837	346	648	3.7	10

**Figura 3.11.** Espectros de masas MALDI-TOF: BSA (azul) [ion molecular monocargado,  $z = 1$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos **VII** (verde), **VIII** (rosa) y **XI** (borgoña); OVA [ion molecular dicargado,  $z = 2$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Paralelamente, y siguiendo una estrategia análoga a la utilizada en el caso del aducto **V**, se prepararon conjugados de los aductos **VII**, **VIII** y **XI** a través de la incorporación previa de un brazo espaciador carboxilado. Para ello, se aprovechó la presencia del grupo aldehído para introducir una pequeña cadena alifática vía la formación de un enlace oximino por reacción con el ácido aminooxiacético. La incorporación de este brazo espaciador no solo tiene la ventaja de permitir una mejor exposición del esqueleto completo de los aductos al sistema inmunitario al tiempo que deja libre el grupo carboxílico, sino que bloquea el grupo aldehído, un grupo funcional que podría sufrir modificaciones *in vivo* después de la inoculación ya que puede formar aductos tipo base de Schiff por reacción con los grupos  $\alpha$ -y  $\gamma$ -amino de las proteínas.<sup>155-157</sup>

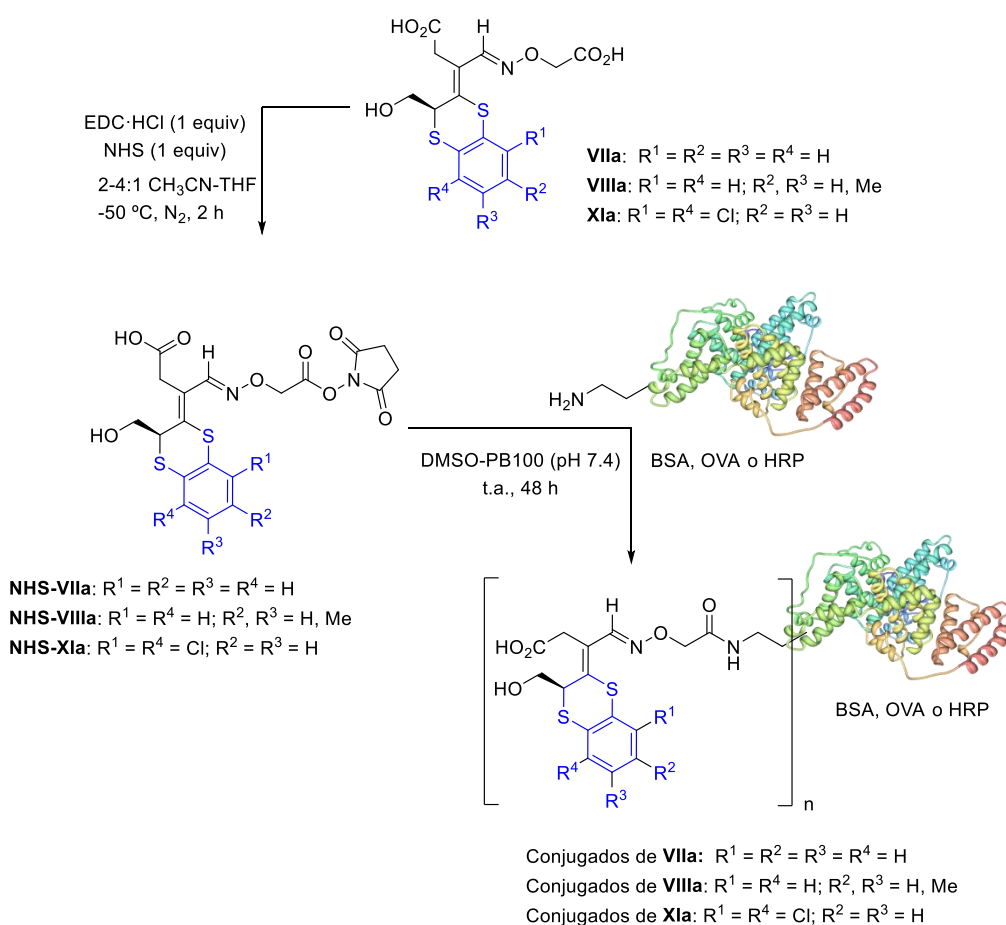
En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de los derivados oximínicos por reacción de los aductos **VII**, **VIII** y **XI** con el hemihidrocloruro del ácido aminooxiacético y piridina en una mezcla de EtOH y THF (**Esquema 3.8**). Tras el correspondiente procesado y purificación cromatográfica del crudo de reacción, se obtuvieron los haptenos **VIIa**, **VIIIa** y **XIa** con un rendimiento del 64%, 45% y 70%, respectivamente, los cuales fueron caracterizados por las técnicas espectroscópicas habituales (ver parte experimental).



**Esquema 3.8.** Preparación de los haptenos **VIIa**, **VIIIa** y **XIa**.

Una vez caracterizados, los haptenos **VIIa**, **VIIIa** y **XIa** se acoplaron a las proteínas portadoras mediante la formación previa de los correspondientes ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo. La activación del grupo carboxilo se realizó empleando un equivalente de EDC·HCl y NHS. Hay que destacar que, en contraste con las condiciones habitualmente empleadas para activaciones similares, el uso de temperaturas estándar para este tipo de reacción (0-25 °C) condujo a una mezcla compleja de productos difícil de caracterizar. Para llevar a cabo la reacción de manera eficaz, fue necesario utilizar temperaturas inferiores a -40 °C. En estas condiciones se produce la formación del éster activo del grupo carboxilo de la agrupación (carboximetoxi)imino, formándose los ésteres **VIIa-NHS**, **VIIIa-NHS** y **XIa-NHS** (**Esquema 3.9**), aunque, según se deduce del análisis del

espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se detecta también un porcentaje aproximadamente equivalente del éster activo del grupo carboxilo original del aducto (en la posición C-1) e incluso pequeñas cantidades del doble éster activo y del hapteno de partida sin reaccionar. Todos los intentos de activar selectivamente el grupo carboxilato del brazo espaciador o de separar cromatográficamente el éster activo deseado y mayoritario resultaron infructuosos, por lo que finalmente optamos por utilizar esta mezcla para la preparación de los bioconjugados, en el convencimiento de que, mediante las condiciones descritas previamente para el aducto **V**, la conjugación debería ocurrir preferentemente a través del grupo carboxílico del brazo espaciador propiciada por una catálisis intramolecular del nitrógeno oximiánico, lo que provocaría la hidrólisis lenta en medio acuoso del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo en C-1, regenerando el grupo carboxilo en esta posición.



**Esquema 3.9.** Activación de los haptenos **VIIa**, **VIIIa** y **XIa** mediante EDC/NHS y su acoplamiento a las proteínas correspondientes.<sup>b</sup>

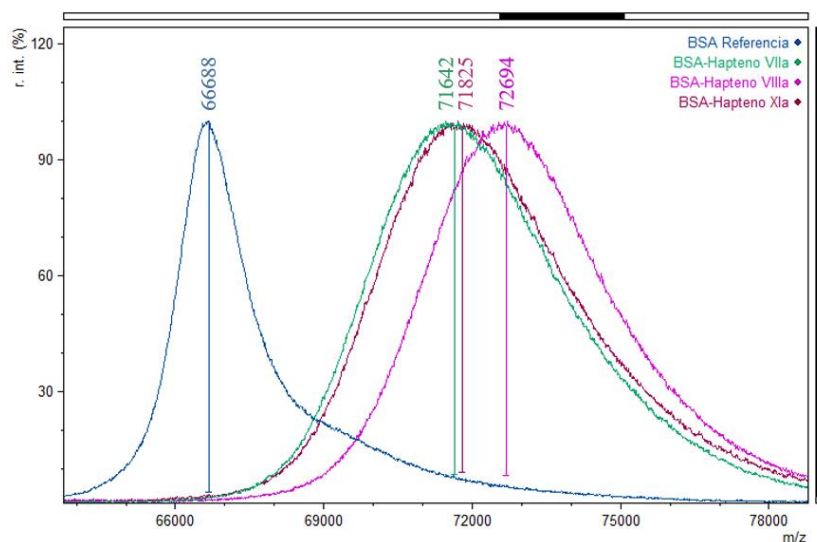
<sup>b</sup> Posteriormente, encontramos que se podían obtener bioconjugados con características espectroscópicas y rendimiento inmunoquímico similares utilizando el diéster de *N*-hidroxisuccinimidilo de ambos grupos carboxílicos, los diésteres *bis*-NHS-**VIIa**, *bis*-NHS-**VIIIa** y *bis*-NHS-**XIa**, preparados en condiciones análogas a las mencionadas anteriormente, pero utilizando tres equivalentes tanto de EDC·HCl como de NHS. La reacción de estos diésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo con las proteínas adecuadas (BSA, OVA o HRP) en las condiciones habituales de conjugación, pero prolongando la reacción de conjugación durante 48 horas, condujo también a los correspondientes conjugados con propiedades análogas a los obtenidos previamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

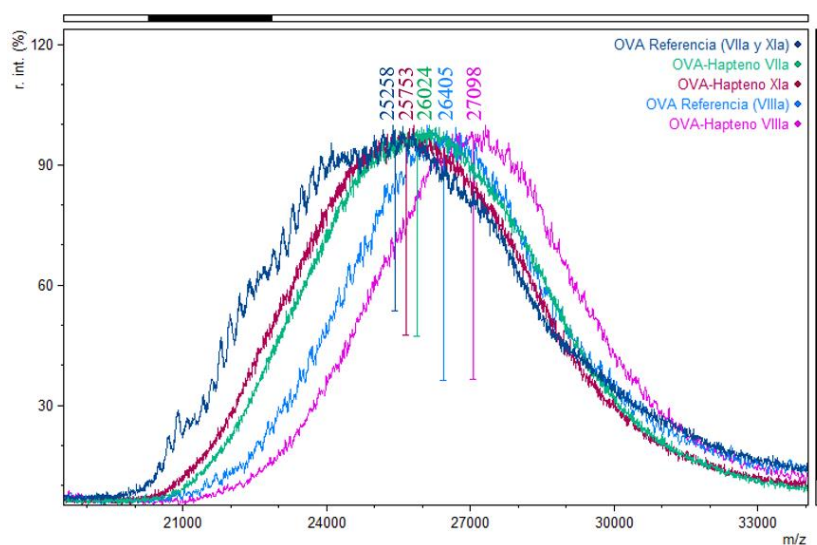
---

Tras el acoplamiento, los bioconjugados inmunizantes (con BSA) y de ensayo (con OVA y HRP) se purificaron por cromatografía de exclusión molecular y se caracterizaron mediante análisis MALDI-TOF-MS. Los valores de las relaciones molares proteína-hapteno obtenidos para los diferentes bioconjugados de cada hapteno se recogen en la **Figura 3.12**. Como se observa, tanto los conjugados inmunizantes como los conjugados de ensayo mostraron valores de carga hapténica adecuados para el uso al que se destina cada uno, destacando las relaciones molares obtenidas para los conjugados inmunogénicos, claramente más elevadas que las obtenidas para los conjugados análogos obtenidos por conjugación directa del aducto a la proteína, sin mediación del brazo espaciador (**Figura 3.11**).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

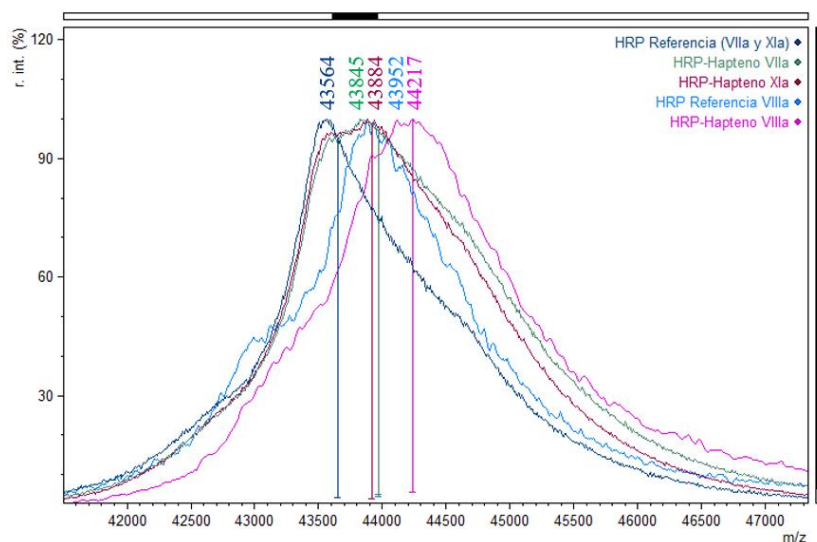


	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>BSA</b>	66688	–	–	–	–
<b>BSA-Hapteno VIIa</b>	71642	351	4954	14.1	60
<b>BSA-Hapteno VIIIa</b>	72694	365	6006	16.5	60
<b>BSA-Hapteno XIa</b>	71825	419	5137	12.3	60



	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>OVA</b>	25258	–	–	–	–
<b>OVA-Hapteno VIIa</b>	26024	351	766	4.4	35
<b>OVA-Hapteno XIa</b>	25753	419	495	2.4	35
<b>OVA</b>	26405	–	–	–	–
<b>OVA-Hapteno VIIIa</b>	27098	365	692	3.8	10

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



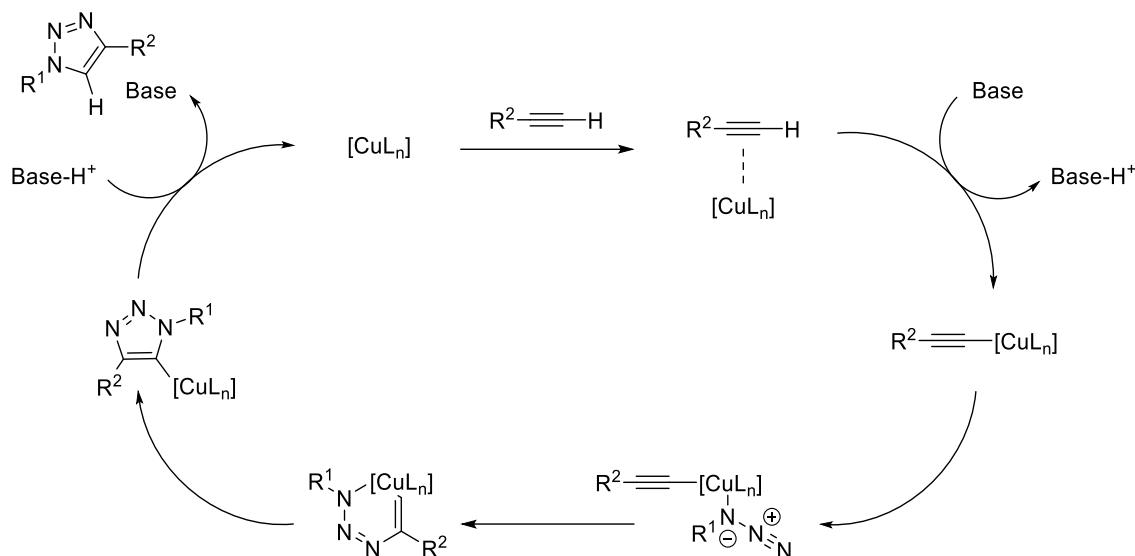
	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>HRP</b>	43564	–	–	–	–
<b>HRP-Hapteno VIIa</b>	43845	351	281	0.8	20
<b>HRP-Hapteno XIa</b>	43884	419	320	0.8	20
<b>HRP</b>	43952	–	–	–	–
<b>HRP-Hapteno VIIIa</b>	44217	365	265	0.7	8

**Figura 3.12.** Espectros de masas MALDI-TOF: BSA (azul) [ion molecular monocargado,  $z = 1$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos **VIIa** (verde), **VIIIa** (rosa) y **XIa** (borgoña); OVA [ion molecular dicargado,  $z = 2$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos; HRP [ion molecular monocargado,  $z = 1$ ] y de los conjugados correspondientes con los haptenos.

Llegados a este punto, decidimos insistir en obtener un hapteno de los aductos que permitiera la conjugación a proteínas a través de una posición definida y dejando libre el grupo carboxílico en C-1, propio del aducto. La estrategia ortogonal elegida consistió en la utilización de *click chemistry* para el acoplamiento, en concreto introducir un brazo espaciador con un grupo azida terminal que pudiera ser empleado para la conjugación a proteínas previamente modificadas con grupos alquino.

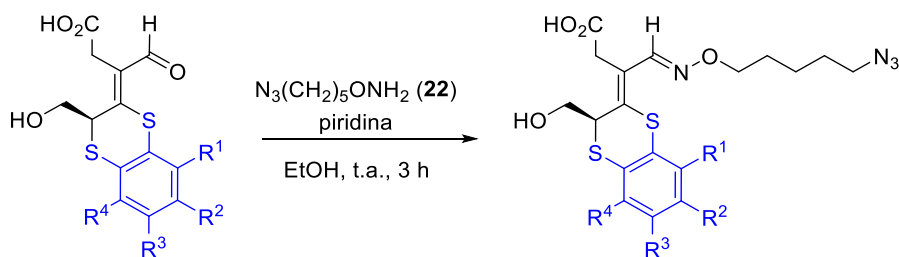
La utilización del grupo azida para la conjugación se basa en una modificación de la conocida reacción de Huisgen, una reacción de cicloadición [3+2] entre el grupo azida y el grupo alquino.<sup>158–160</sup> La reacción se lleva a cabo en presencia de Cu(I) como catalizador (*Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction*, reacción CuAAC), generado habitualmente *in situ* a partir de CuSO<sub>4</sub> y un agente reductor, formándose de forma regioselectiva el isómero

1,4 del anillo de triazol (**Esquema 3.10**).<sup>161</sup> Es frecuente también la utilización de ligandos de carácter básico que favorecen la estabilidad del ion de Cu(I).<sup>162</sup>



**Esquema 3.10.** Mecanismo de cicloadición [3+2] dipolar azida-alquino catalizado por Cu (I) (CuAAC).

La preparación de los haptenos **VIIb**, **VIIIb** y **XIb**, que incorporan un grupo ((5-azidopentil)oxi)imino como brazo espaciador, se llevó a cabo a partir de los aductos de patulina siguiendo un procedimiento similar al utilizado en la preparación de los haptenos equivalentes con un brazo (carboximetoxi)imino, empleando en este caso como nucleófilo *O*-(5-azidopentil)hidroxilamina (**22**), preparada previamente en tres etapas a partir de 1,5-dibromopentano tal como se describe en la parte experimental (**Esquema 3.11**).



Aducto **VII**:  $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$   
 Aducto **VIII**:  $R^1 = R^4 = H$ ;  $R^2, R^3 = H, Me$   
 Aducto **XI**:  $R^1 = R^4 = Cl$ ;  $R^2 = R^3 = H$

Hapteno **VIIb**:  $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$  (60%)  
 Hapteno **VIIIb**:  $R^1 = R^4 = H$ ;  $R^2, R^3 = H, Me$  (50%)  
 Hapteno **XIb**:  $R^1 = R^4 = Cl$ ;  $R^2 = R^3 = H$  (54%)

**Esquema 3.11.** Preparación de haptenos con brazo espaciador azidado.

Para preparar los bioconjugados de los haptenos azidados, primero se llevó a cabo la modificación de las proteínas BSA, OVA y HRP con grupos propargilo por reacción con el alquino-éster de succinimidilo **23** (**Esquema 3.12**). Con el fin de obtener una carga de restos de alquino relativamente alta en la proteína inmunogénica para una reacción

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

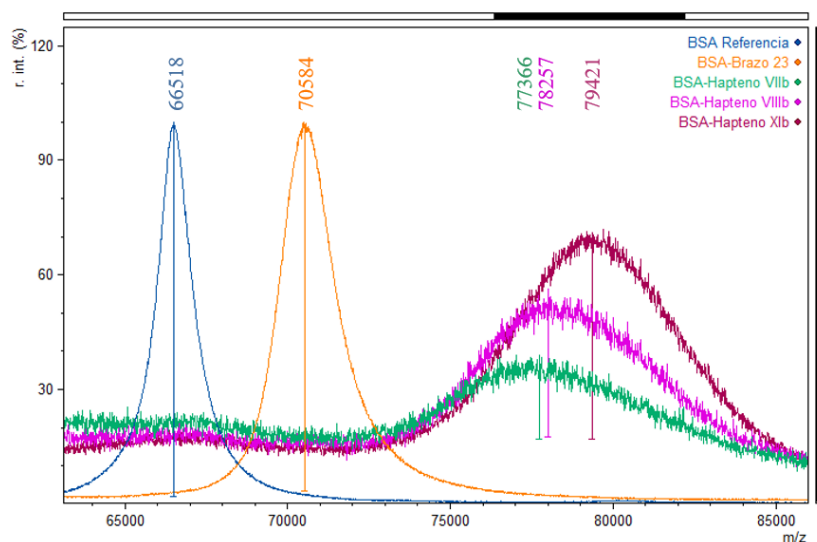
eficiente de cicloadición 1,3-dipolar con los haptenos azidados, se utilizó una relación molar inicial de **23** respecto de BSA relativamente elevada ( $RM_o = 40$ ). La BSA modificada con restos de propargilo se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular, y el número medio de grupos propargilo introducidos, determinado mediante MALDI-TOF-MS, fue aproximadamente 27 (**Figura 3.13**). Con respecto a OVA y HRP, para las cuales se requerían cargas de alquino más bajas, se usaron relaciones molares iniciales de alquino **23** a proteína de 12 y 10, respectivamente. En estas condiciones, se incorporaron como media 3.6 y 0.4 residuos de alquino por molécula de OVA y HRP, respectivamente.

La conjugación de los haptenos **VIIb**, **VIIIb** y **XIb** a las proteínas modificadas se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno empleando 4 equivalentes del hapteno por residuo de alquino en tampón PB100, en presencia del complejo catalítico Cu(I)-*tris*(3-hidroxi-propil-triazolilmetil)amina (THPTA) y ascorbato sódico como agente reductor. Transcurridas 22 horas a temperatura ambiente, los bioconjugados fueron concentrados y purificados mediante cromatografía de exclusión molecular. Las cargas hapténicas promedio determinadas para los conjugados de cada hapteno con las proteínas BSA, OVA y HRP también se recopilan en la **Figura 3.13**.

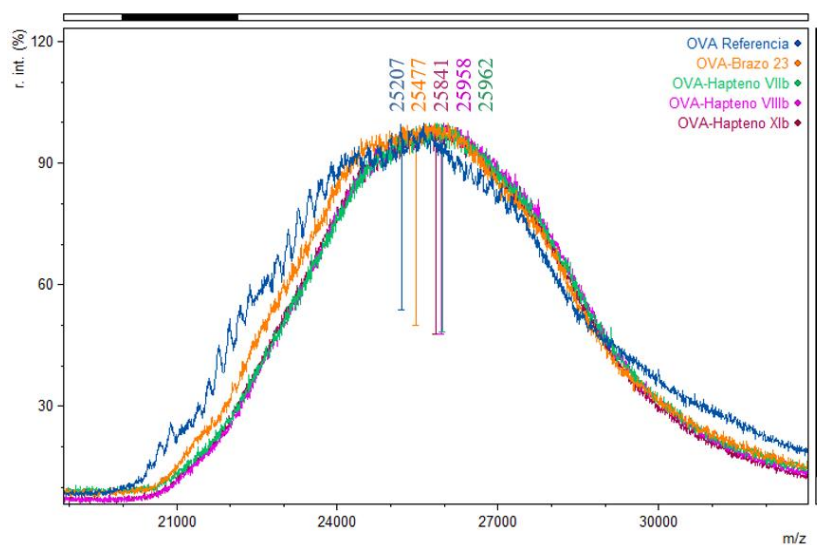
De modo general, la cantidad de hapteno acoplado fue coherente con el número de posibles sitios de anclaje, remarcando de nuevo la eficacia de esta estrategia poco convencional para la preparación de bioconjugados para moléculas de pequeño tamaño.<sup>163</sup>



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

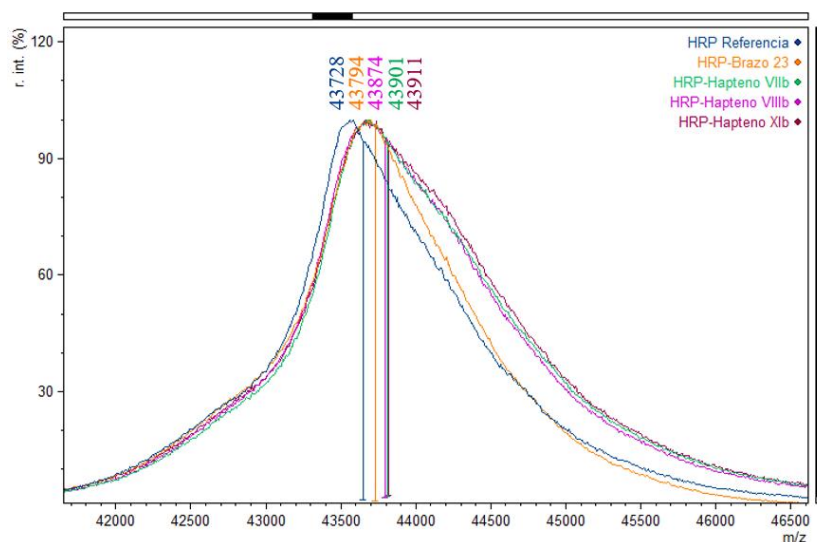


	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>BSA</b>	66518	–	–	–	–
<b>BSA-Brazo 23</b>	70584	152	4066	26.7	40
<b>BSA-Hapteno VIIb</b>	77366	422	6782	16.0	50
<b>BSA-Hapteno VIIIb</b>	78257	436	7673	17.6	50
<b>BSA-Hapteno XIb</b>	79421	490	8837	18.0	50



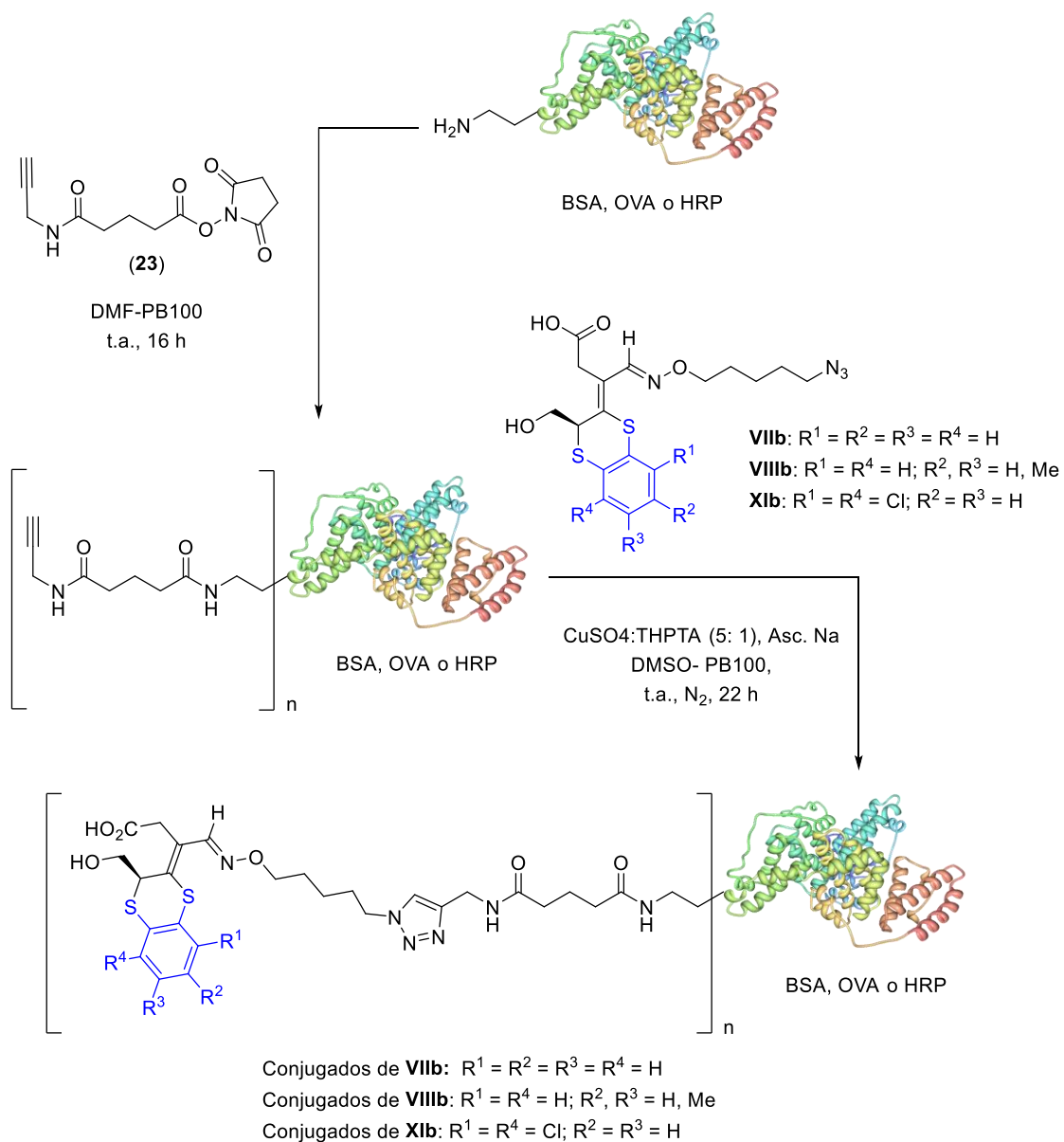
	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>OVA</b>	25207	–	–	–	–
<b>OVA-Brazo 23</b>	25477	152	270	3.6	12
<b>OVA-Hapteno VIIb</b>	25962	422	485	2.3	15
<b>OVA-Hapteno VIIIb</b>	25958	436	478	2.2	15
<b>OVA-Hapteno XIb</b>	25841	490	364	1.5	15

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



	$m/z$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	RM	RM <sub>o</sub>
<b>HRP</b>	43728	–	–	–	–
<b>HRP-Brazo 23</b>	43794	152	66	0.4	10
<b>HRP-Hapteno VIIb</b>	43901	422	107	0.3	4
<b>HRP-Hapteno VIIIb</b>	43874	436	80	0.2	4
<b>HRP-Hapteno XIb</b>	43911	490	117	0.2	4

**Figura 3.13.** Espectros de masas MALDI-TOF: BSA (azul) [ion molecular monocargado,  $z = 1$ ] y de los conjugados correspondientes con el brazo **23** (naranja) y los haptenos **VIIb** (verde), **VIIIb** (rosa) y **XIb** (borgoña); OVA [ion molecular dicargado,  $z = 2$ ] y de los conjugados correspondientes con el brazo y los haptenos; HRP [ion molecular monocargado,  $z = 1$ ] y de los conjugados correspondientes con el brazo y los haptenos.



Esquema 3.12. Preparación de los conjugados de los haptenos **VIIb**, **VIIIb** y **XIb** vía reacción CuAAC.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 3.4.2 Producción y caracterización de anticuerpos policlonales

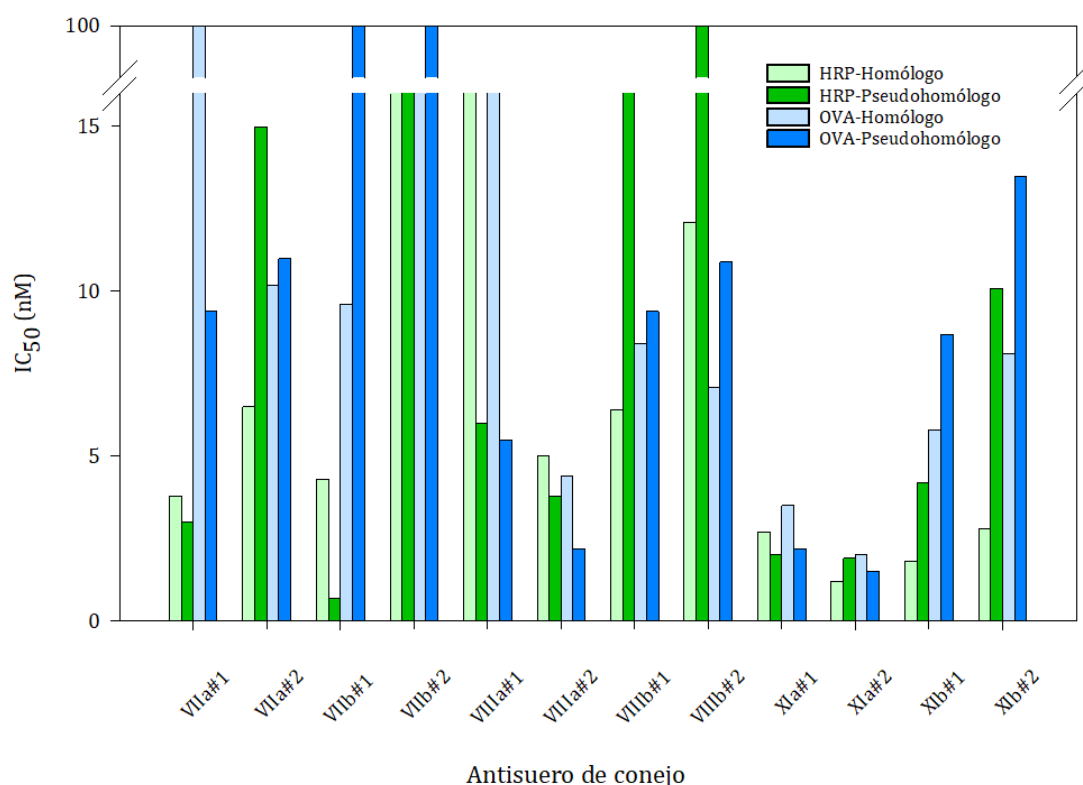
La evaluación de la respuesta inmune en conejos se llevó a cabo con los conjugados de los haptenos **VIIa**, **VIIIa**, **XIa**, **VIIb**, **VIIIb** y **XIb**. Se inocularon dos animales con cada uno de los conjugados de BSA utilizando 300 µg por dosis. Empleando el mismo protocolo de inmunización descrito anteriormente y una vez completada la pauta de inmunización, los anticuerpos policlonales fueron aislados, purificados por fraccionamiento salino y caracterizados por ELISA.

En primer lugar, se determinó la capacidad de cada antisuero para reconocer a los diferentes conjugados de ensayo, tanto homólogos como heterólogos. En el caso del formato directo asistido por un anticuerpo de captura (GAR), todos los anticuerpos fueron capaces de reconocer a su trazador enzimático homólogo y pseudohomólogo (aquellos conjugados preparados mediante el método de acoplamiento alternativo), si bien en el caso de los derivados de **VIIa** el reconocimiento fue algo menor.<sup>c</sup> En cuanto al reconocimiento de trazadores heterólogos, solo la combinación entre los antisueros derivados de **VIIIa** y el trazador HRP-**VIIa** fue capaz de proporcionar una señal suficiente. Por lo que respecta al formato indirecto, todas las combinaciones, tanto homólogas como heterólogas, mostraron títulos elevados.

Tras determinar las posibles combinaciones de los inmunorreactivos, se procedió con la evaluación de la afinidad de los anticuerpos hacia el analito libre en disolución. Puesto que cada pareja de antisueros se generó frente a un aducto diferente, el estudio se llevó a cabo empleando como analito los aductos correspondientes, previamente sintetizados y purificados mediante cromatografía en columna. Para ello, se emplearon curvas estándar de 8 puntos preparadas en PBS. De nuevo, los ensayos directos se llevaron a cabo en el formato asistido por anticuerpo de captura (GAR, 1 µg/mL). Tras el acondicionamiento de los pocillos con el anticuerpo de captura, los antisueros producidos fueron inmovilizados a diferentes diluciones, y en la etapa competitiva cada uno de los trazadores enzimáticos se empleó a distintas concentraciones. La afinidad de los anticuerpos se estimó mediante el valor de IC<sub>50</sub>, calculado a partir de las respectivas curvas de inhibición (**Figura 3.14**).

---

<sup>c</sup> En el caso de los conjugados preparados mediante el acoplamiento directo de los aductos **VII**, **VIII** y **XI**, ninguno de los anticuerpos mostró señal suficiente.



**Figura 3.14.** Representación gráfica de la afinidad estimada de cada antisuero frente a su aducto correspondiente empleando ELISA directo (verde) o ELISA indirecto (azul).

En general, los valores de  $IC_{50}$  obtenidos hacia el competidor correspondiente estuvieron mayoritariamente por debajo de 10 nM, siendo los antisueros derivados del hapteno **XIa** los que mostraron una mayor afinidad, con valores de  $IC_{50}$  inferiores a 3 nM.

Con respecto al formato indirecto, diferentes concentraciones de los conjugados OVA-hapteno inmovilizados en la placa multipocillo se ensayaron frente a varias diluciones de los antisueros en presencia de curvas estándar del aducto correspondiente. Nuevamente, el funcionamiento de los inmunorreactivos en este formato se estimó a partir de los parámetros de las curvas de inhibición. Cuando los diferentes antisueros se ensayaron frente a los conjugados homólogos, se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  similares a los obtenidos en el formato directo, entre 2 y 100 nM. Sin embargo, cuando los antisueros se ensayaron empleando conjugados heterólogos, se produjo un incremento importante en la afinidad aparente de los mismos, siendo especialmente destacables las combinaciones de los antisueros **XIa#1** y **#2** con los conjugados OVA-**VIIa** y OVA-**VIIb**, con las que se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  por debajo de 1 nM (ver apartado 7.2).

En definitiva, todos los antisueros obtenidos, y muy especialmente los derivados del hapteno **XIa**, mostraron una afinidad hacia los competidores correspondientes mucho

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

mayor que la obtenida con los antisueros generados mediante la inmunización con los haptenos **V** y **V4**. En vista de estos resultados, se puede afirmar que la estabilidad química y rigidez estructural de los aductos obtenidos mediante la derivatización de patulina con aril-1,2-ditioles permite la producción de anticuerpos de elevada afinidad cuando derivados funcionalizados de dichos aductos se emplean como haptenos inmunizantes.

### 3.4.3 Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales

Como se ha comentado en el apartado 1.3.3.3, la producción de anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de hibridomas ofrece una serie de ventajas, tales como una mayor reproducibilidad y una capacidad de producción ilimitada, características que los hacen especialmente útiles para el desarrollo de métodos inmunoanalíticos de elevadas prestaciones.

A raíz de los resultados obtenidos con el estudio de la respuesta inmunitaria en conejos, se decidió proceder a la obtención de hibridomas a partir de ratones inmunizados con los conjugados de los haptenos **VIIa**, **VIIIa** y **XIa**. Adicionalmente, dada la elevada respuesta observada en la caracterización de los antisueros de conejo derivados del hapteno **XIa**, se decidió evaluar la eficiencia de las diferentes estrategias de acoplamiento inmunizando en paralelo con los conjugados BSA-**XI**, en el que el aducto se acopla directamente a la proteína, y BSA-**XIb**, en el que el acoplamiento tiene lugar mediante *click chemistry*.

La inmunización en ratones se llevó a cabo inyectando periódicamente 100 µg de los conjugados de BSA-hapteno (ver parte experimental). Una vez completada la pauta de inmunización, se sacrificaron los animales y se extrajeron los linfocitos B del bazo para llevar a cabo la fusión celular (ver apartado 1.3.3.3). Un cribado inicial mediante ELISA competitivo permitió la identificación de aquellos hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer al conjugado homólogo y de mostrar inhibición de señal en presencia del aducto libre, mientras que una segunda evaluación más detallada mediante ELISA bidimensional competitivo permitió ordenar los hibridomas en base a la afinidad de los anticuerpos producidos, y utilizar esta información para la selección de las líneas celulares con las que continuar el proceso.

Los resultados recopilados en la **Tabla 3.2** muestran el número de hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer al conjugado de ensayo OVA-hapteno y, en la columna correspondiente, cuáles mostraron una inhibición significativa de la señal en presencia del analito libre en disolución, considerados como competitivos. En primer lugar, es preciso destacar la diferencia significativa entre el porcentaje de pocillos positivos y competitivos identificados en ausencia o presencia del brazo espaciador. Así, el acoplamiento directo del

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aducto proporcionó un bajo número de hibridomas de elevada afinidad, lo que se refleja en el hecho de que sólo se estabilizó un hibridoma procedente del conjugado BSA-**XI**.

**Tabla 3.2.** Resultados de las fusiones celulares a partir de ratones inmunizados con los conjugados BSA-hapteno seleccionados.

Inmunógeno	Fusión <sup>a</sup>	Número de pocillos			Hibridomas estabilizados <sup>d</sup>
		Cultivados	Positivos <sup>b</sup>	Competitivos <sup>c</sup>	
BSA- <b>XI</b>	1	1536	8	0	0
	2	1824	14	3	1
	3	1728	38	0	0
BSA- <b>VIIa</b>	1	1920	60	15	11
	2	1248	23	5	0
	3	1344	53	6	0
BSA- <b>VIIIa</b>	1	2016	24	11	2
	2	1440	11	5	1
	3	768	23	3	0
BSA- <b>XIa</b>	1	1248	16	11	7
	2	1440	46	12	7
	3	1344	47	17	13
BSA- <b>XIb</b>	1	1344	23	7	4
	2	1440	71	10	5

<sup>a</sup> La fusión celular se realizó con la mezcla de los linfocitos obtenidos de dos ratones inmunizados idénticamente. <sup>b</sup> Número de pocillos que proporcionaron una señal superior a 0.5 en ausencia de analito. <sup>c</sup> Número de pocillos en los que la presencia del analito a 100 nM indujo una reducción de la señal igual o superior al 80%. <sup>d</sup> Número de hibridomas finalmente generados.

Por el contrario, los tres haptenos que incorporan el brazo espaciador carboxilado proporcionaron una familia importante de hibridomas productores de anticuerpos con elevada afinidad hacia los respectivos aductos, si bien el conjugado BSA-**XIa** destaca claramente sobre los demás, ya que dio lugar de forma consistente a un importante número de hibridomas interesantes en las tres fusiones que se llevaron a cabo. Al igual que el hapteno **XIa**, la inmunización con el conjugado basado en el hapteno con brazo azidado, BSA-**XIb**, también dio lugar a un número importante de hibridomas con buenas prestaciones, estabilizándose finalmente un total de 9 líneas celulares a partir de este conjugado. Tras clonar y estabilizar los hibridomas de interés (ver parte experimental), se realizó una producción a pequeña escala de cada uno de los anticuerpos monoclonales. Una vez purificados por afinidad, se realizó una evaluación preliminar para confirmar las propiedades de unión de cada uno de ellos mediante ELISA indirecto homólogo. Los resultados de este experimento nos permitieron seleccionar, para su posterior

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

caracterización en detalle mediante los dos formatos de ensayo y empleando heterología, un grupo más reducido de anticuerpos: 1 a partir del hapteno **XI**, 3 a partir del hapteno **VIIa**, 2 a partir del hapteno **VIIIa**, 7 a partir del hapteno **XIa** y 4 a partir del hapteno **XIb**.

De manera similar a la evaluación de la respuesta inmunitaria en conejos, el uso de ELISA en ausencia de analito permitió evaluar el correcto funcionamiento de los inmunorreactivos y, a su vez, determinar posibles combinaciones heterólogas. En el caso del formato directo, se llevaron a cabo los ensayos asistidos por un anticuerpo de captura (GAM, *goat anti-mouse*). Como se muestra en la **Figura 3.15**, casi todos los anticuerpos fueron capaces de reconocer a su trazador homólogo o pseudohomólogo, con algunas excepciones entre los anticuerpos generados frente a **VIIa** y **VIIIa**. En cuanto al reconocimiento de trazadores heterólogos, el número de posibles combinaciones fue meramente testimonial, con únicamente dos combinaciones válidas.<sup>d</sup>

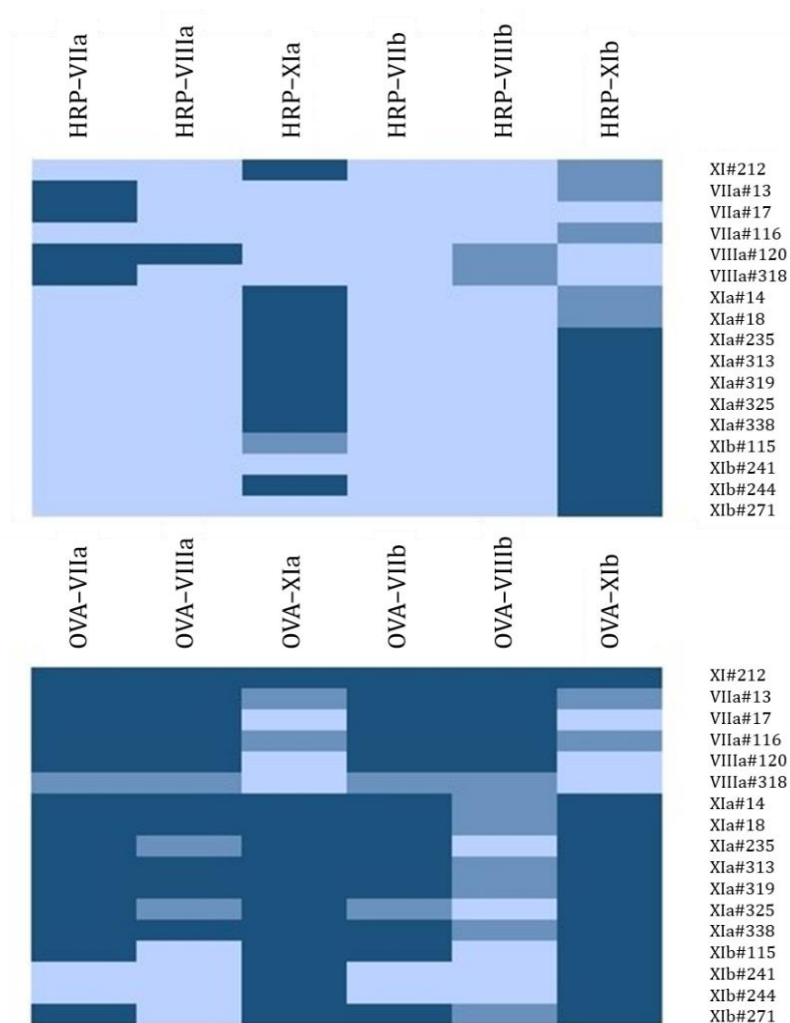
Por lo que respecta al formato indirecto, como cabía esperar todos los anticuerpos reconocieron al conjugado homólogo dado que fue el que se empleó para la selección de los hibridomas. Como también se observa en la figura, el reconocimiento de conjugados heterólogos fue considerablemente más amplio al obtenido en los ensayos directos. De modo general, gran parte de los anticuerpos producidos mostraron reconocimiento hacia el conjugado OVA-**VIIa**, con la excepción de los mAbs (*monoclonal antibody*) **XIb**#241 y **XIb**#244. El elevado número de anticuerpos capaces de reconocer a este conjugado de ensayo se podría atribuir a la ausencia de sustituyentes en el anillo aromático.

Por el contrario, gran parte de los anticuerpos de tipo **XIa** y **XIb** no fueron capaces de reconocer al conjugado OVA-**VIIIa**, observándose una tendencia similar para los anticuerpos de tipo **VIIa** y **VIIIa** hacia el conjugado de **XIa**. También cabe destacar el comportamiento del anticuerpo **XI**#212, ya que presenta una elevada capacidad para reconocer a los seis conjugados de ensayo, quizás debido a la ausencia de brazo espaciador en el hapteno inmunizante.

---

<sup>d</sup> De nuevo, los anticuerpos generados no interaccionaron con los conjugados preparados mediante el acoplamiento directo de los aductos **VII**, **VIII** y **XI**.





**Figura 3.15.** Representación visual de la capacidad de unión para cada pareja de inmunorreactivos en ELISA, correspondiendo el azul claro a nulo o poco reconocimiento y el aumento en la intensidad del color a mayor reconocimiento. Concentración de mAb = 1  $\mu\text{g/mL}$ ; Concentración de conjugado de ensayo: OVA-Hapteno = 1  $\mu\text{g/mL}$ , HRP-Hapteno = 0.3  $\mu\text{g/mL}$ . Figura elaborada con el programa de libre acceso *MultiExperiment Viewer* (MeV).

Para el estudio de la afinidad de los anticuerpos monoclonales, las diferentes combinaciones válidas de inmunorreactivos se ensayaron frente a una curva estándar de ocho puntos del correspondiente aducto en PBS (incluyendo un blanco). Con respecto al formato directo, los ensayos se realizaron empleando dos concentraciones de anticuerpo, 100 y 1000  $\text{ng/mL}$ , mientras que el trazador enzimático se utilizó a cuatro concentraciones, 10, 30, 100 y 300  $\text{ng/mL}$ . Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la **Tabla 3.3**. Cabe destacar que la afinidad de todos los anticuerpos hacia los aductos correspondientes fue muy elevada, con valores de  $\text{IC}_{50}$  mayoritariamente por debajo de 2 nM. Es más, varios de los anticuerpos derivados de los haptenos **VIIa**, **XIa** y **XIb** mostraron valores de  $\text{IC}_{50}$  claramente por debajo de 1 nM, erigiéndose en reactivos extraordinariamente valiosos para el desarrollo de métodos de inmunodetección de patulina de elevada sensibilidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 3.3.** Caracterización de los anticuerpos seleccionados mediante ELISA competitivo en formato directo asistido por anticuerpo de captura.<sup>a</sup>

Anticuerpo	[mAb] <sup>b</sup>	Trazador	[C] <sup>b</sup>	Parámetros		
				A <sub>max</sub>	Pendiente	IC <sub>50</sub> <sup>c</sup>
<b>XI#212</b>	1000	<b>XIa</b>	300	1.3	1.1	1.6
<b>VIIa#13</b>	1000	<b>VIIa</b>	100	1.6	1.1	0.8
<b>VIIa#17</b>	100	<b>VIIa</b>	300	0.9	1.2	0.7
<b>VIIIa#120</b>	100	<b>VIIIa</b>	100	1.2	1.1	4.4
<b>VIIIa#318</b>	1000	<b>VIIIa</b>	100	1.0	1.2	2.6
<b>XIa#14</b>	1000	<b>XIa</b>	100	0.7	1.4	0.8
<b>XIa#18</b>	1000	<b>XIa</b>	300	1.3	1.1	1.0
<b>XIa#235</b>	300	<b>XIa</b>	100	0.9	1.3	0.7
<b>XIa#313</b>	100	<b>XIa</b>	100	1.1	0.9	0.5
<b>XIa#325</b>	1000	<b>XIa</b>	100	1.3	1.4	0.8
<b>XIa#338</b>	100	<b>XIa</b>	100	0.9	1.0	0.5
<b>XIb#115</b>	100	<b>XIb</b>	300	0.9	1.0	1.2
<b>XIb#241</b>	100	<b>XIb</b>	300	1.0	0.8	1.4
<b>XIb#244</b>	100	<b>XIb</b>	300	1.2	1.0	0.6
<b>XIb#271</b>	100	<b>XIb</b>	300	1.4	1.2	0.8

<sup>a</sup> Los valores obtenidos corresponden a la media de 3 determinaciones independientes. El valor de la asíntota inferior fue menor de 0.1. Para cada pareja de inmunorreactivos solo se muestran los datos de la combinación óptima. <sup>b</sup> Concentración de anticuerpo y trazador enzimático expresado en ng/mL. <sup>c</sup> Valores expresados en nM.

Por otra parte, los ensayos en el formato indirecto se llevaron a cabo empleando concentraciones de 100 y 1000 ng/mL del conjugado OVA-hapteno para el recubrimiento de los pocillos, mientras que en la etapa de competición se ensayó la curva estándar frente a 4 concentraciones de anticuerpo (10, 30, 100 y 300 ng/mL). Los resultados que derivan de este experimento se recogen en la **Tabla 3.4**.

De modo semejante al formato directo, los valores de IC<sub>50</sub> de los anticuerpos generados a partir del hapteno **VIIIa** fueron en general superiores a los obtenidos con los anticuerpos derivados de los demás haptenos. Por otro lado, los resultados obtenidos para el hapteno **VIIa** fueron ligeramente peores a los observados en el formato directo. En cambio, los anticuerpos **XIa** y **XIb** mostraron sensibilidades similares a las obtenidas en el otro formato. Es más, el uso de conjugados heterólogos permitió ampliar el número de posibles combinaciones e incluso incrementar levemente la sensibilidad en algunos casos, obteniéndose valores de IC<sub>50</sub> de 0.2–0.4 nM con varias combinaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En definitiva, los resultados en el formato indirecto confirman los obtenidos con el formato directo, y demuestran la muy elevada afinidad hacia el aducto de patulina de varios de los anticuerpos monoclonales generados, destacando quizás entre todos ellos los que derivan del hapteno **XIa**.

**Tabla 3.4.** Caracterización de los anticuerpos seleccionados mediante ELISA competitivo en formato indirecto.<sup>a</sup>

mAb	OVA-VIIa			OVA-VIIIa			OVA-XIa		
	[mAb] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	[mAb] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	[mAb] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>c</sup>
<b>XI#212</b>	100	100	3.2	100	1000	2.3	30	100	6.6
<b>VIIa#13</b>	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>6.7</b>	100	1000	6.0	100	1000	2.5
<b>VIIa#17</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>3.5</b>	100	1000	1.1	-	-	-
<b>VIIa#116</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>6.5</b>	30	1000	8.5	100	1000	2.3
<b>VIIIa#120</b>	100	100	12.2	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>4.7</b>	-	-	-
<b>VIIIa#318</b>	300	1000	4.1	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>2.2</b>	-	-	-
<b>XIa#14</b>	30	100	0.4	100	1000	0.5	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>0.5</b>
<b>XIa#18</b>	30	100	0.4	100	1000	0.5	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>0.6</b>
<b>XIa#235</b>	100	100	0.5	100	1000	0.4	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>1.0</b>
<b>XIa#313</b>	100	100	0.6	100	1000	0.5	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>1.2</b>
<b>XIa#319</b>	100	100	0.5	100	1000	0.4	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>0.7</b>
<b>XIa#325</b>	100	1000	0.7	100	1000	0.2	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>0.7</b>
<b>XIb#115</b>	300	1000	1.8	-	-	-	300	100	2.4
<b>XIb#241</b>	-	-	-	-	-	-	30	100	2.3
<b>XIb#244</b>	-	-	-	-	-	-	100	100	0.7
<b>XIb#271</b>	30	1000	0.4	-	-	-	30	100	0.5
mAb	OVA-VIIb			OVA-VIIIb			OVA-XIb		
	[mAb] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	[mAb] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	[mAb] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>c</sup>
<b>XIa#14</b>	30	1000	0.3	-	-	-	30	1000	0.8
<b>XIa#18</b>	30	1000	0.4	-	-	-	30	100	0.7
<b>XIa#235</b>	30	1000	0.2	-	-	-	100	1000	1.1
<b>XIa#313</b>	30	1000	0.4	300	1000	1.3	30	1000	0.7
<b>XIa#319</b>	30	1000	0.2	-	-	-	100	100	0.5
<b>XIa#325</b>	100	1000	0.3	-	-	-	100	1000	0.7
<b>XIb#115</b>	100	1000	1.1	-	-	-	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>2.2</b>
<b>XIb#241</b>	-	-	-	-	-	-	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>1.9</b>
<b>XIb#244</b>	-	-	-	-	-	-	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>2.0</b>
<b>XIb#271</b>	100	100	0.6	300	1000	1.6	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>0.3</b>

<sup>a</sup> Valores obtenidos corresponden a la media de 3 determinaciones independientes. Valores obtenidos para la asíntota inferior fueron de modo general por debajo de 0.1. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. <sup>b</sup> Concentración de anticuerpo y conjugado de tapizado expresado en ng/mL. <sup>c</sup> Valores expresados en nM. <sup>d</sup> No se obtuvo señal.

### 3.4.1 Optimización y desarrollo del ELISA

Tras la caracterización de todos los anticuerpos generados, se seleccionaron las mejores combinaciones anticuerpo-conjugado para su posterior optimización. Aunque varias combinaciones presentaban una sensibilidad similar, se decidió escoger exclusivamente aquellas que utilizaban anticuerpos generados frente a **XIa** con el fin de simplificar el desarrollo de los ensayos mediante el uso de un único agente derivatizante y centrarnos en un número limitado de monoclonales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Como paso previo, se decidió llevar a cabo un estudio para determinar la especificidad de los anticuerpos, es decir, si alguno de ellos era capaz de reconocer a otras micotoxinas. Hay que señalar que esto era poco probable, dado que el aducto de patulina posee una estructura única muy diferente de la de otras micotoxinas, y que además estas no reaccionan con el agente derivatizante. No obstante, se realizaron curvas patrón de patulina, ochratoxina A, alternariol y zearalenona, y todas ellas se analizaron tras la adición a cada uno de los puntos de un 1% de 3,6-diclorobenceno-1,2-ditiolato potásico con los anticuerpos de tipo **XIa**. Los resultados fueron los esperados, y ninguna de las micotoxinas fue capaz de inhibir la señal hasta una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , el máximo ensayado.

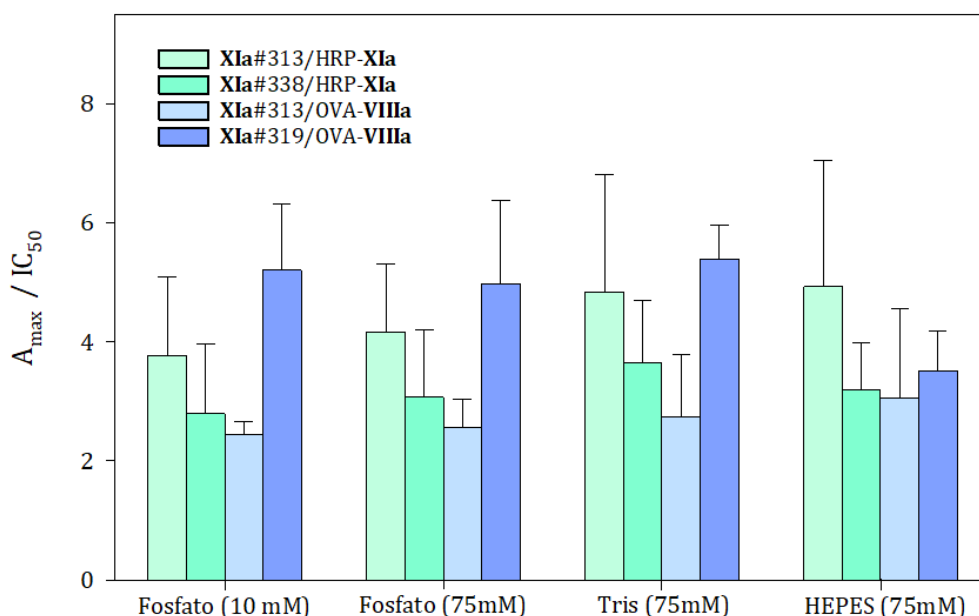
Confirmada la especificidad de los anticuerpos de tipo **XIa**, decidimos escoger para estudios posteriores dos combinaciones en el formato directo y otros dos en el formato indirecto. La selección se realizó de acuerdo a una serie de criterios, tales como el consumo de inmunorreactivos, la capacidad de producción de los hibridomas correspondientes y los parámetros de la curva de inhibición obtenida. En base a ello, se decidió continuar en el formato de ELISA competitivo directo con los anticuerpos **XIa**#313 y **XIa**#338 en combinación con el trazador homólogo HRP- **XIa**, mientras que para el formato de ELISA competitivo indirecto se seleccionaron los anticuerpos **XIa**#313 y **XIa**#319 junto con el conjugado heterólogo OVA-**VIIIa**. Todas estas combinaciones habían mostrado una elevada sensibilidad, con valores de  $\text{IC}_{50}$  iguales o inferiores a 0.5 nM.

### 3.4.1.1 Condiciones de ensayo

Todos los estudios anteriores habían sido realizados empleando PBS como tampón de ensayo (pH 7.4 y fuerza iónica,  $I = 166 \text{ mM}$ ). No obstante, es bien sabido que modificaciones en las características fisicoquímicas del medio pueden provocar cambios en la interacción entre el anticuerpo y el conjugado competidor o el propio analito, afectando por tanto a la sensibilidad global del ensayo. En consecuencia, se planteó evaluar el impacto de dichos parámetros sobre las características de los inmunoensayos seleccionados.

El primer factor que se estudió fue el propio tampón de ensayo. El PBS, por su baja concentración en fosfato (10 mM), posee una limitada capacidad tamponante, cuando lo deseable a la hora de aplicar el inmunoensayo al análisis de muestras reales es que el tampón permita una correcta neutralización del pH de la muestra. En consecuencia, se evaluó el efecto sobre la relación  $A_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$  de tres tampones de ensayo con una concentración 75 mM y pH 7.4. Los tampones seleccionados fueron fosfato, Tris y HEPES, además de PBS como control. Con el fin de evaluar exclusivamente la influencia de la especie tamponante, la fuerza iónica de cada tampón fue ajustada mediante la adición de NaCl hasta 166 mM, la misma que tiene el PBS. Como se puede observar en la **Figura 3.16**, la relación

$A_{max}/IC_{50}$  fue ligeramente superior con el tampón Tris 75 mM, pH 7.4, para todas las combinaciones, por lo que en adelante se decidió emplear este tampón para la etapa competitiva en lugar de PBS.



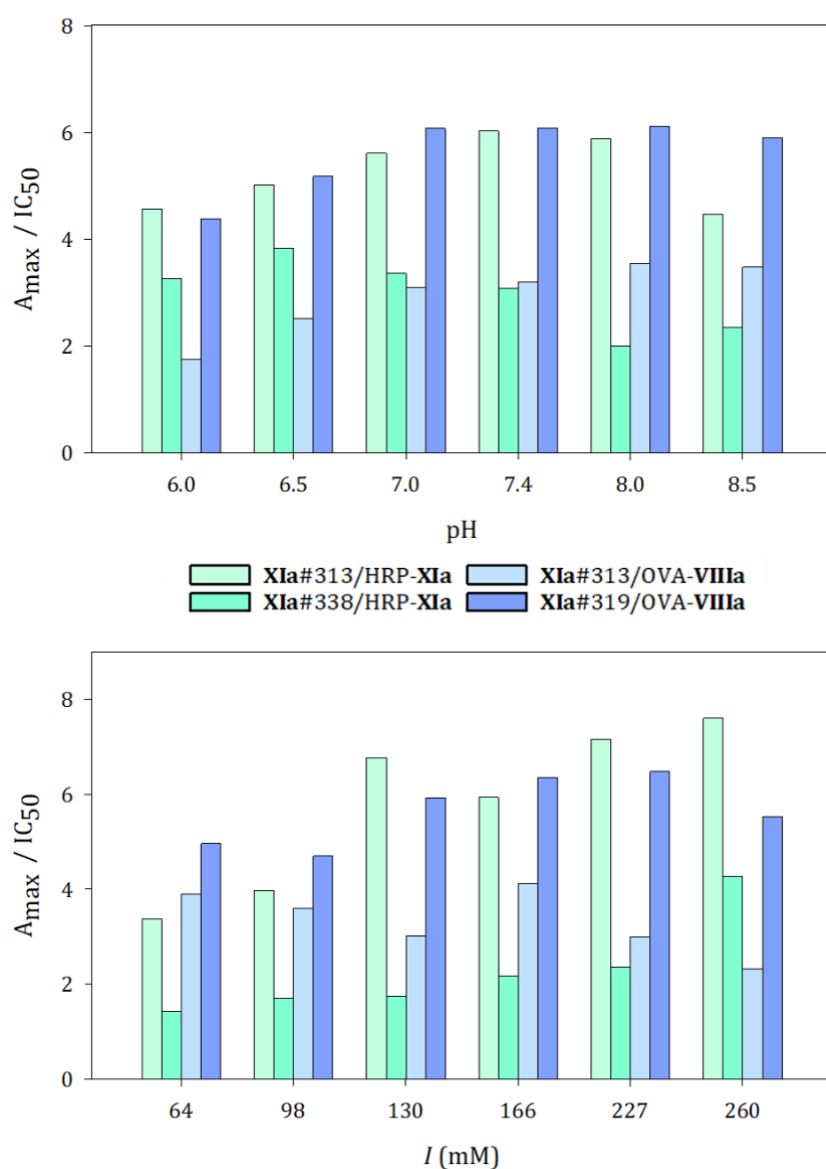
**Figura 3.16.** Influencia del tampón de ensayo sobre la relación  $A_{max}/IC_{50}$  de los cuatro inmunoensayos seleccionados ( $n=3$ ).

El efecto del pH en la etapa competitiva fue evaluado de manera similar, empleando tampones con un rango de pH comprendido entre 6.0 y 8.5, pero manteniendo constante la concentración de Tris (75 mM) y la fuerza iónica (166 mM) (**Figura 3.17**).

Teniendo en cuenta las condiciones de referencia (pH 7.4), no se observó ninguna mejora importante en la relación  $A_{max}/IC_{50}$  en el intervalo de pH evaluado, por lo que decidimos seguir empleando un tampón con pH neutro.

Por último, la evaluación de la influencia de la fuerza iónica se llevó a cabo manteniendo constante la concentración de Tris y el pH, pero variando la concentración de NaCl, de forma que se cubriera un intervalo de fuerza iónica comprendido entre 64 y 260 mM, incluyendo la del tampón de referencia ( $I = 166$  mM). En ningún caso se observó una disminución importante del valor de  $IC_{50}$  con respecto al de referencia, por lo que los incrementos observados en la relación  $A_{max}/IC_{50}$ , fundamentalmente en los ensayos directos, fueron debidos principalmente a un ligero aumento en la señal máxima.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 3.17.** Influencia del pH (gráfica superior) y fuerza iónica (gráfica inferior) sobre la relación  $A_{max} / IC_{50}$  de los inmunoensayos seleccionados. Los valores están referidos al comportamiento en PBS.

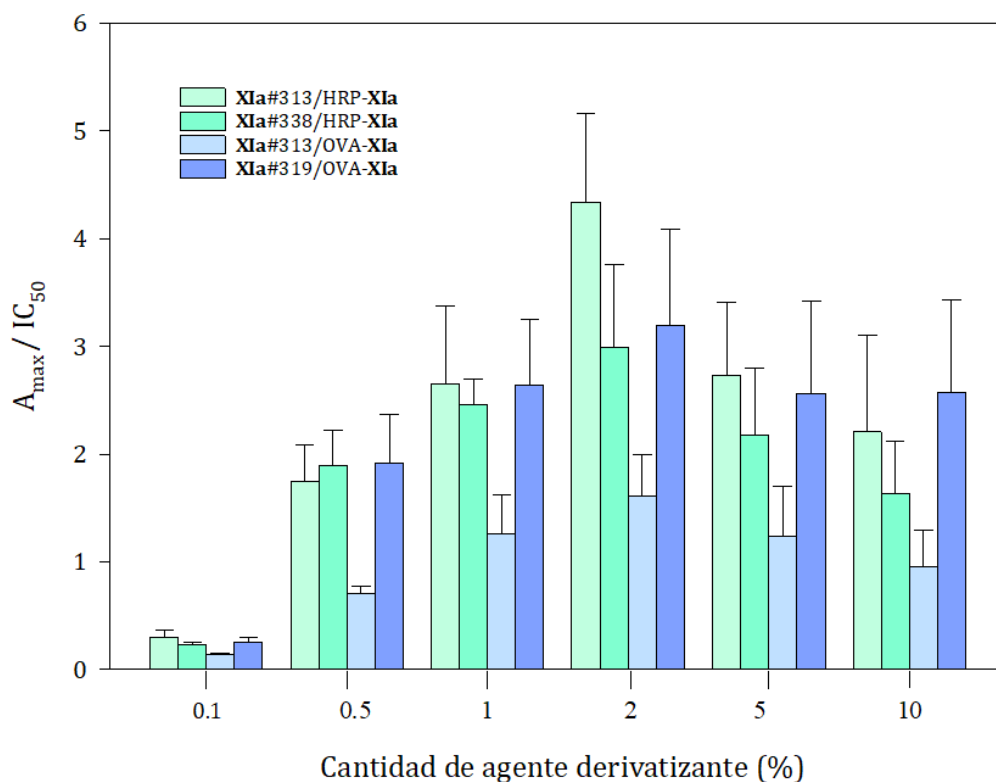
En resumen, la sustitución del tampón fosfato por tampón Tris permitió una ligera mejora de la relación  $A_{max}/IC_{50}$ , mientras que sólo uno de los cuatro ensayos seleccionados mostró un ligero incremento de dicha relación a un pH moderadamente ácido. Una tendencia similar se observó con la evaluación de la fuerza iónica, donde valores superiores a 166 mM resultaron en una mejor relación para los ensayos directos, mientras que en el formato indirecto la influencia fue mínima e incluso desfavorable. Dadas las pequeñas variaciones observadas y la ausencia de un resultado común, se decidió continuar trabajando como tampón de ensayo con Tris 75 mM, pH = 7.4.

### 3.4.1.2 Condiciones para la derivatización

Desde el momento en que nos planteamos desarrollar un sistema para la inmunodetección de patulina basado en la reacción de la micotoxina con aril-ditioles, consideramos que la fiabilidad analítica del sistema sería mayor si tanto las muestras como los patrones se trataban de manera equivalente, minimizando así la posible influencia de las condiciones ambientales en la eficiencia de la reacción de derivatización. En otras palabras, se optó por un sistema en el que se harían reaccionar con el derivatizante tanto las muestras como los patrones. Dicho esto, la eficiencia de la etapa necesaria de derivatización es crucial para el correcto desempeño del método ya que de ella depende directamente la sensibilidad del ensayo desarrollado. Es por ello por lo que, llegados a este punto, decidimos estudiar cuáles eran las condiciones más adecuadas para la conversión de patulina en el aducto **XI**. Sabíamos por pruebas preliminares que la reacción de formación del aducto tenía lugar de forma prácticamente cuantitativa a tiempos cortos, y que la adición a las muestras/patrones de un 1% (v/v) de una disolución 1 mg/mL en agua del derivatizante parecía un protocolo cuanto menos adecuado.

A partir de esta información, el primer experimento de optimización que llevamos a cabo consistió precisamente en determinar la cantidad óptima de la sal de 3,6-diclorobenceno-1,2-ditioil. Como se puede ver en la **Figura 3.18** para los cuatro inmunoensayos propuestos, si bien un 1% del derivatizante proporcionó valores adecuados de la relación  $A_{\max}/IC_{50}$ , el máximo de dicho parámetro se alcanzó con una proporción del 2%, por lo que en adelante esta fue la cantidad seleccionada para añadir a las muestras y a los patrones. El hecho observado de que la relación  $A_{\max}/IC_{50}$  disminuya para concentraciones superiores del derivatizante se debe a un descenso en la señal máxima, lo que refleja una interferencia en la interacción entre el anticuerpo y el conjugado competidor.

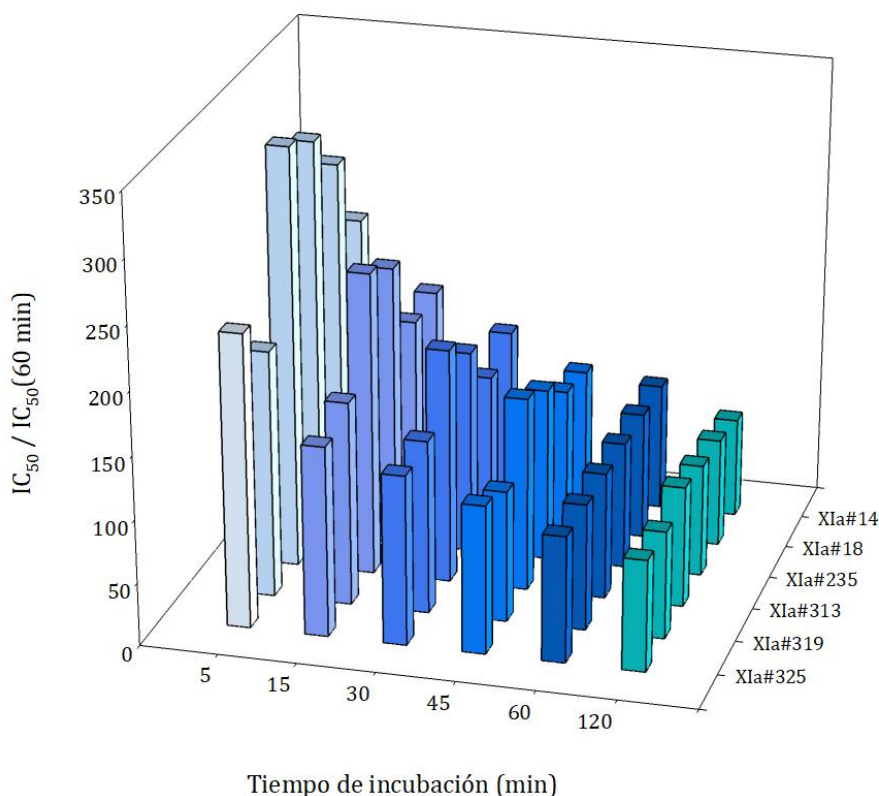
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 3.18.** Influencia de la cantidad de agente derivatizante sobre los valores de  $A_{max}$  y  $IC_{50}$  de los cuatro inmunoensayos ( $n = 3$ ).

La segunda de las condiciones que se estudió fue el tiempo de incubación de la reacción de derivatización, estudio que se llevó a cabo empleando el formato indirecto. Además de los anticuerpos **XIa#313** y **XIa#319** previamente seleccionados, se decidió incluir 4 anticuerpos adicionales con fines confirmatorios. Como se puede observar en la **Figura 3.19**, para todos los anticuerpos el valor de la  $IC_{50}$  disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación, señal inequívoca del progreso de la misma. Como cabía esperar, los valores registrados tienden a una asíntota que se aproxima a su límite a partir de los 60 minutos, si bien los valores a 120 minutos fueron ligeramente inferiores. Estos resultados, unidos al interés por no alargar en exceso el tiempo total de los inmunoensayos para no menoscabar su viabilidad práctica, nos llevó a seguir utilizando 60 minutos como el tiempo óptimo de la reacción de derivatización. No obstante, cabe destacar que, dado que patrones y muestras son sometidos al mismo proceso, un tiempo de incubación de 30 minutos sería perfectamente factible, ya que proporciona una muy buena sensibilidad. Es más, los anticuerpos muestran curvas de inhibición bien definidas incluso a tiempos tan cortos como 5 minutos, lo que constituye una clara indicación de que se produce una muy significativa formación del aducto casi de forma instantánea.

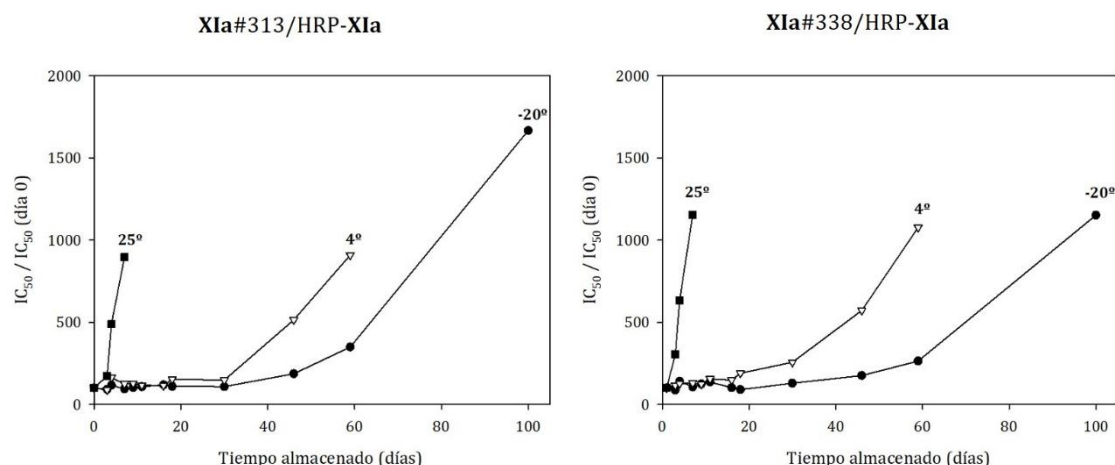




**Figura 3.19.** Influencia del tiempo de incubación en la reacción de derivatización mediante ELISA competitivo indirecto. Los valores de  $IC_{50}$  están referidos al comportamiento a los 60 minutos (%) y son la media de 3 ensayos independientes.

Por último, la vida útil del reactivo también es un parámetro fundamental, siendo su estabilidad con el tiempo un factor importante para una correcta reproducibilidad del ensayo. En este sentido, conviene recordar que la oxidación de compuestos tiolados al correspondiente disulfuro con oxígeno atmosférico está muy documentada en la bibliografía, y que la cinética de este tipo de reacciones es más rápida cuando los tioles se encuentran en forma aniónica, como ocurre en nuestro caso.<sup>164</sup> El estudio de la estabilidad del agente derivatizante, evaluada a partir de los valores de  $IC_{50}$  obtenidos con los dos inmunoensayos competitivos directos seleccionados, se realizó empleando una disolución de la sal a 2 mg/mL en agua, la cual se almacenó a tres temperaturas,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 3.20.** Representación gráfica de la estabilidad del reactivo derivatizante con el tiempo. Los valores de  $IC_{50}$  están referidos al comportamiento en el día 0 (%).

Tal y como era de esperar (**Figura 3.20**), la oxidación del reactivo fue muy evidente cuando se almacenó a temperatura ambiente, como pone de manifiesto el aumento significativo del valor de  $IC_{50}$  registrado a tiempos cortos. De hecho, la vida útil del ditiol es de tan solo un día a 25 °C, mientras que cuando se almacena a 4 °C los valores de  $IC_{50}$  son aceptables durante dos semanas y hasta un mes a -20 °C. Si bien la adición de un agente anti-oxidante podría favorecer la estabilidad del reactivo, optamos por no introducir reactivos adicionales que menoscabaran la simplicidad del ensayo. Por tanto, a la vista de estos resultados, decidimos adoptar como protocolo de trabajo el uso de alícuotas de trabajo almacenadas a -20 °C durante un máximo de dos semanas desde su disolución en agua para garantizar una mayor fiabilidad analítica.

### 3.4.1.3 Condiciones finales de los ensayos desarrollados

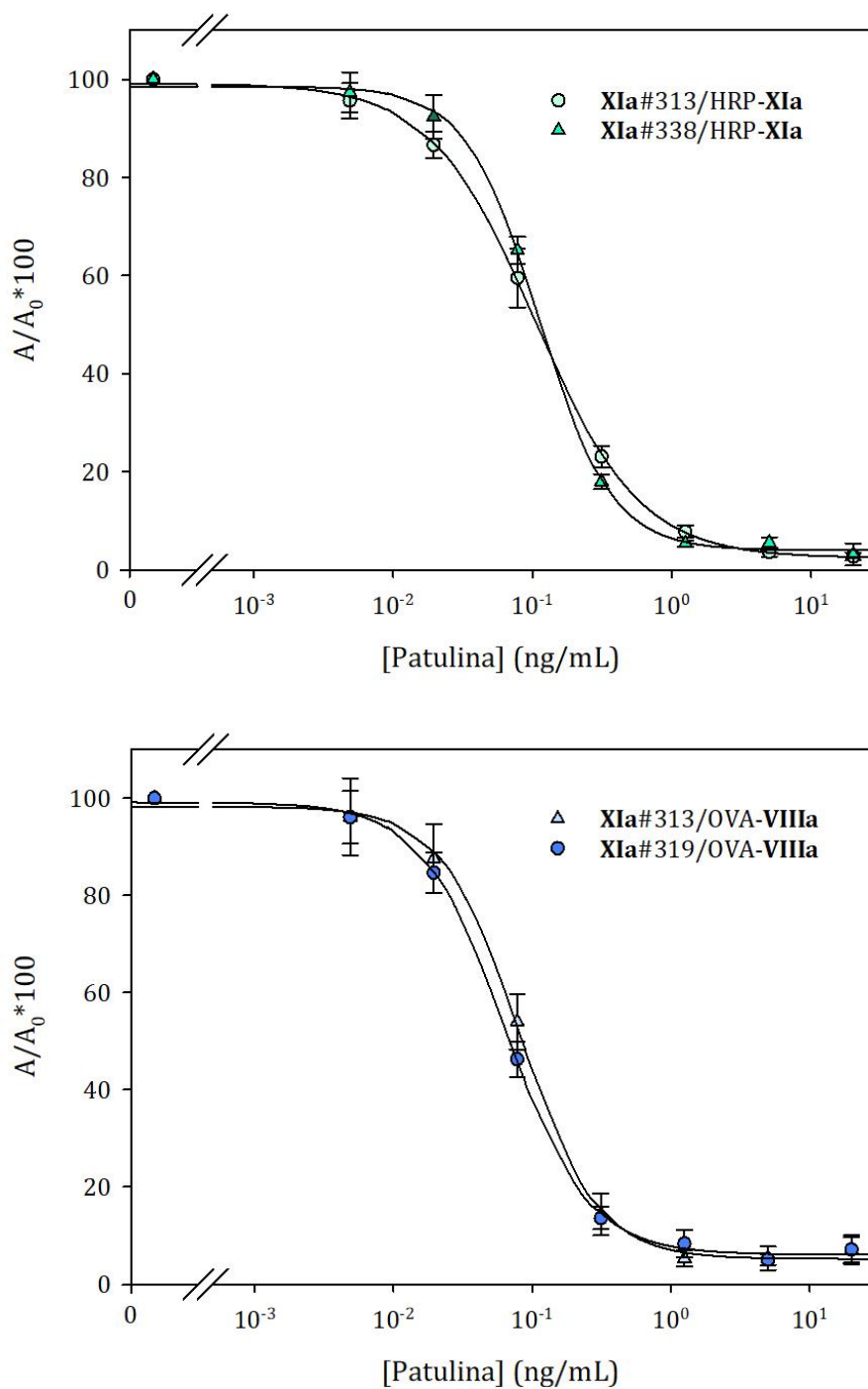
Tras concluir los estudios anteriores, se dio por completado el desarrollo del ELISA. Las principales características de cada inmunoensayo se encuentran recopiladas en la **Tabla 3.5**. Los ensayos indirectos fueron ligeramente más sensibles que los ensayos directos. Por el contrario, los ensayos directos son más rápidos que los indirectos, ya que, aunque el número de etapas es el mismo para ambos formatos, en los ensayos directos dos de las etapas se pueden realizar de manera simultánea. Merece la pena señalar que el límite de detección (LOD) inferior fue en todos los casos menor de 0.03 ng/mL, sin duda un valor realmente destacable. Tras valorar toda la información, y considerando que la mayor parte de los kits comerciales emplean el formato de anticuerpo inmovilizado, se decidió continuar exclusivamente con el formato directo para estudios posteriores.

**Tabla 3.5.** Características de los inmunoensayos ELISA optimizados (**Figura 3.21**).<sup>a</sup>

Formato	Directo		Indirecto	
	XIa#313	XIa#338	XIa#313	XIa#319
<b>Anticuerpo</b>	(100 ng/mL)	(300 ng/mL)	(100 ng/mL)	(100 ng/mL)
<b>Conjugado</b>	HRP-XIa (100 ng/mL)	HRP-XIa (100 ng/mL)	OVA-VIIIa (1000 ng/mL)	OVA-VIIIa (1000 ng/mL)
<b>A<sub>max</sub></b>	1.83 ± 0.19	1.53 ± 0.18	1.44 ± 0.24	1.66 ± 0.21
<b>IC<sub>50</sub> (ng/mL)</b>	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01
<b>Pendiente (ng/mL)</b>	-1.19 ± 0.12	-1.63 ± 0.19	-1.70 ± 0.20	-1.44 ± 0.19
<b>LOD (ng/mL)</b>	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
<b>R.T. (ng/mL)<sup>b</sup></b>	0.03 - 0.44	0.05 - 0.29	0.04 - 0.21	0.03 - 0.27
<b>Substrato</b>	TMB	TMB	TMB	TMB
<b>Tiempo de ensayo</b>	130 min	130 min	190 min	190 min
Derivatización <sup>c</sup>	60 min	60 min	60 min	60 min
Tapizado mAb <sup>c</sup>	60 min	60 min	-	-
Competición	60 min	60 min	60 min	60 min
Amplificación	-	-	60 min	60 min
Revelado	10 min	10 min	10 min	10 min

<sup>a</sup> Los valores provienen de 10 determinaciones independientes. <sup>b</sup> Rango de trabajo estimado como el intervalo IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>. <sup>c</sup> Etapas llevadas a cabo de manera simultánea.

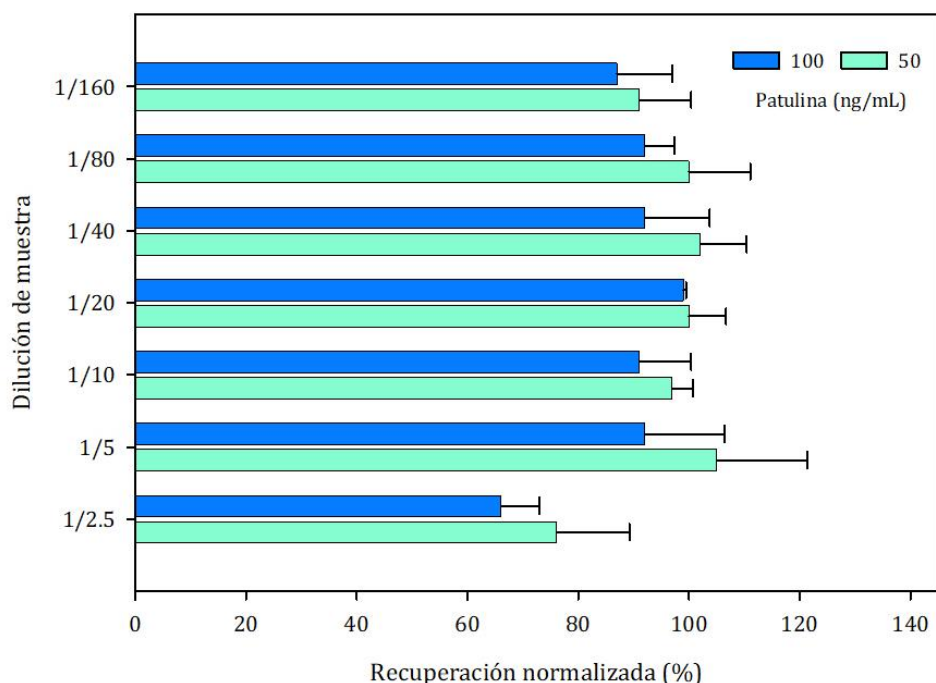
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 3.21.** Curvas de inhibición en las condiciones optimizadas de los dos ELISA en formato de anticuerpo inmovilizado (gráfica superior) y conjugado inmovilizado (gráfica inferior). Los valores representados corresponden a la media de 10 experimentos independientes.

### 3.4.1.4 Aplicación a muestras

Como se ha demostrado anteriormente, la eficacia de la derivatización del analito es fundamental para el tipo de ensayo desarrollado, por lo que, previo al análisis de muestras reales, se decidió que era clave comenzar comprobando la dilución mínima necesaria de zumo de manzana, matriz más relevante en el caso de patulina, para que la reacción de derivatización pudiese considerarse cuantitativa. Con ese fin, se prepararon una serie de diluciones de zumo de manzana en tampón de ensayo y se fortificaron con patulina a 50 y 100 ng/mL. A continuación, se añadió un 2% (v/v) del agente derivatizante y, tras 1 hora de incubación, todas las muestras fueron diluidas de nuevo 500 veces en tampón y analizadas mediante los ensayos directos. Esta elevada dilución de las muestras antes de su análisis se realizó para poder adscribir el efecto observado exclusivamente a la reacción de derivatización, y no a la posible influencia de la matriz sobre la reacción competitiva. Los resultados que derivan de este experimento para el caso de la combinación **XIa#313/HRP-XIa**, recogidos en la **Figura 3.22**, demostraron que las recuperaciones fueron cuantitativas a partir de una dilución 1/5 del zumo. Similares resultados se obtuvieron para la combinación **XIa#338/HRP-XIa**.



**Figura 3.22.** Evaluación con el inmunoensayo **XIa#313/HRP-XIa** de la influencia del zumo de manzana a diferentes diluciones sobre la reacción de derivatización. Los valores se normalizaron con respecto a los obtenidos en ausencia de matriz (tampón) (n = 3).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

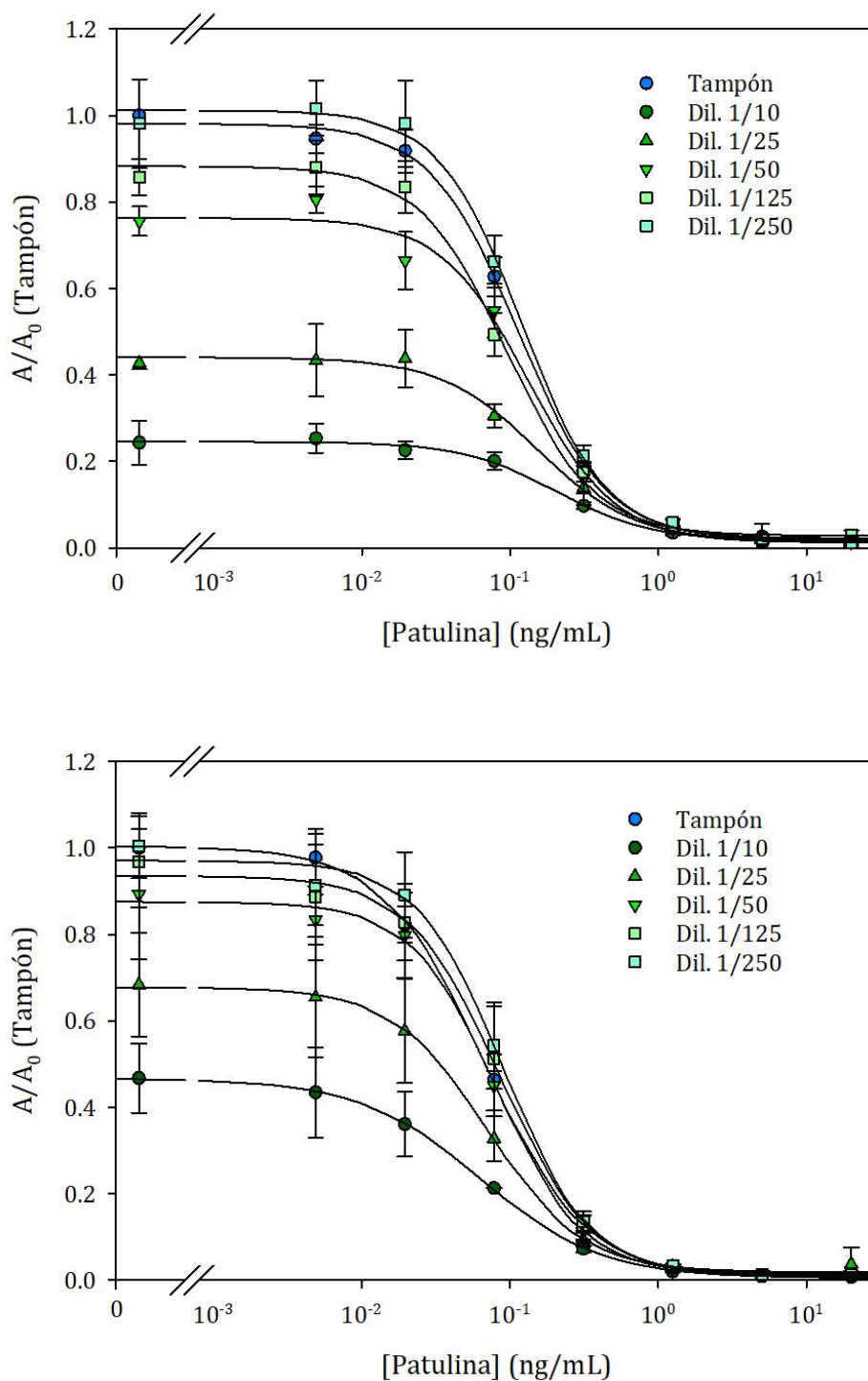
Para el estudio del efecto matriz sobre los ensayos directos, se analizaron curvas completas preparadas en diferentes proporciones de zumo de manzana. Pruebas preliminares habían indicado que la influencia de la presencia de zumo sobre los ensayos era importante, mayor que sobre la reacción de derivatización. En consecuencia, se preparó una serie de curvas estándar en presencia de diluciones crecientes de matriz empezando en 1/10, y se comparó con una curva control en tampón.<sup>e</sup>

Como se puede ver en la **Figura 3.23**, para el ensayo basado en el anticuerpo **XIa#313**, la presencia de matriz a una dilución 1/10 y 1/25 tuvo un efecto importante sobre la señal máxima del ensayo, influencia que disminuye a medida que se reduce la proporción de zumo de manzana, de forma que las curvas de inhibición realizadas en presencia de una proporción de matriz 1/125 o superior se aproximan a la curva obtenida en tampón. Una tendencia similar se observó con el ensayo basado en el anticuerpo **XIa#338**, si bien en este caso la influencia puede considerarse aceptable a partir de una dilución 1/50.

En definitiva, para que la exactitud del método empleando una curva de calibrado en tampón no se vea comprometida, el estudio indicaría que las muestras de zumo de manzana habría que diluirlas al menos 50 veces. Una posibilidad alternativa para poder emplear diluciones menores consistiría en realizar la curva de calibrado en presencia de una determinada dilución de zumo, por ejemplo 1/25, y emplear el mismo factor de dilución para las muestras, una aproximación utilizada a menudo en las técnicas instrumentales cromatográficas conocida como *matrix-matched calibration*. Sin embargo, dado que los inmunoensayos son suficientemente sensibles como para determinar patulina a niveles regulatoriamente relevantes incluso aplicando una dilución elevada de la muestra, se optó por no emplear este procedimiento para mantener así la simplicidad del método.

---

<sup>e</sup> Para este estudio se preparó manualmente un zumo de manzana a partir de manzanas sanas, sin infección aparente por hongos mediante inspección visual.



**Figura 3.23.** Efecto del zumo de manzana sobre la curva de inhibición del ensayo XIa#313/HRP-XIa (gráfica superior) y XIa#338/HRP-XIa (gráfica inferior).

Una vez establecidas las condiciones óptimas de los ensayos, estos fueron aplicados al análisis de muestras fortificadas con cantidades conocidas de patulina. Para ello, un zumo preparado manualmente a partir de manzanas libres de lesiones visibles fue suplementado a niveles de fortificación centrados en los límites regulados en la Unión Europea, es decir,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10, 25 y 50 ng/mL, y, adicionalmente, un nivel algo más exigente de 5 ng/mL. Con el fin de adecuar los diferentes niveles de fortificación al rango de trabajo de los ensayos, se aplicaron tres factores de dilución, una inferior (1/50) que permitiría la cuantificación de los niveles más bajos, y dos diluciones mayores (1/150 y 1/300) para cubrir las concentraciones más altas. La concordancia de la concentración de patulina obtenida con respecto al valor de fortificación se evaluó mediante el cálculo de los valores de recuperación (R). Tal y como se muestra en la **Tabla 3.6**, los valores de recuperación estuvieron comprendidos entre el 89 y 111%, con valores de coeficiente de variación inferiores al 15%.

**Tabla 3.6.** Recuperaciones de patulina obtenidas mediante ELISA en el formato directo.<sup>a</sup>

[Patulina] <sup>b</sup>	<b>XIa#313</b> <sup>c</sup>	<b>XIa#338</b> <sup>c</sup>
5	-	89 ± 9 (1/50)
10	-	89 ± 4 (1/50)
25	111 ± 7 (1/150)	111 ± 14 (1/150)
50	106 ± 10 (1/150)	89 ± 4 (1/150)

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes. <sup>b</sup> Concentración de fortificación expresado en ng/mL. <sup>c</sup> Valores de recuperación (%) ± desviación estándar (factor de dilución).

A vista de estos resultados, se puede afirmar que ambos ensayos permiten la correcta cuantificación de patulina en una muestra de zumo de manzana a los límites establecidos de 25 y 50 ng/mL. Por su parte, como ya se ha comentado anteriormente, el efecto matriz observado para el ensayo **XIa#313/HRP-XIa** fue más importante que para el ensayo **XIa#338/HRP-XIa**, siendo necesaria una dilución mayor de la muestra para su análisis. A raíz de ello, no fue posible llevar a cabo la cuantificación de los niveles más pequeños de patulina mediante este ensayo, mientras que el ensayo desarrollado con el mAb **XIa#338** dio lugar a valores de recuperación muy satisfactorios, permitiendo una correcta determinación de patulina al nivel más bajo regulado (10 ng/mL) e incluso por debajo de dicho nivel, 5 ng/mL, considerado como el límite de cuantificación (LOQ) para este ensayo.

El siguiente paso en el proceso de validación consistió en analizar materiales de referencia adquiridos a empresas especializadas y cuyo contenido en patulina había sido previamente certificado mediante técnicas cromatográficas. Se analizaron 3 zumos de manzana comercializados por FAPAS y un cuarto distribuido por *LGC standards*, con un rango de concentración comprendido entre 10 y 40 ng/mL. Este experimento se llevó a cabo con el ensayo directo basado en el anticuerpo **XIa#338** por ser el que mejores resultados había proporcionado en los estudios de recuperación.



**Tabla 3.7.** Análisis de material de referencia mediante el ELISA desarrollado **XIa#338/HRP-XIa.**<sup>a</sup>

Muestra	Valor asignado	Rango satisfactorio	[Patulina] <sup>b</sup>
T1668QC <sup>c</sup>	9.3	5.2-13.4	8.4 ± 0.7
T1672QC <sup>c</sup>	39.6	22-57	52.9 ± 7.5
TYG060RM <sup>c</sup>	20.1 ± 1.4	- <sup>e</sup>	22.1 ± 4.4
QBS BV280 520 <sup>d</sup>	29.3 ± 8.1	13.2-45.4	36.9 ± 5.8

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de cinco determinaciones independientes. Valores expresados en ng/mL. <sup>b</sup> Valor obtenido ± desviación estándar. <sup>c</sup> Zumo distribuido por FAPAS. <sup>d</sup> Zumo distribuido por *LGC Standards*. <sup>e</sup> Dato no proporcionado.

Como se puede observar en la **Tabla 3.7**, la concordancia entre las concentraciones certificadas y las obtenidas con el ELISA fue muy satisfactoria, y en todos los casos los valores obtenidos estuvieron dentro del rango aceptable. De modo general, la cantidad de patulina determinada para las muestras con mayor contaminación se situó en el límite superior del rango satisfactorio. Cabe recordar que la detección de patulina en zumos mediante técnicas cromatográficas requiere del uso de varias etapas de pretratamiento con el fin de alcanzar la sensibilidad requerida, lo que puede resultar en pérdidas del analito, provocando una subestimación del contenido presente. Por otra parte, los rangos satisfactorios proporcionados son bastante amplios, particularmente en la muestra suministrada por *LGC standards*, lo que da una idea de la dificultad analítica de determinar patulina con exactitud a los niveles establecidos en la legislación europea. En definitiva, nuestros resultados demuestran la validez del ensayo desarrollado para la cuantificación de patulina a niveles relevantes, con una precisión y exactitud equivalentes a los obtenidos mediante técnicas instrumentales.

Por último, se decidió llevar a cabo un estudio del grado de incidencia de patulina en un grupo amplio de productos locales, para lo que se analizaron un total de 32 muestras de zumo de manzana mediante el ELISA seleccionado. seis muestras presentaron cantidades detectables de patulina, con valores por encima del LOD, de las cuales tres contenían niveles cuantificables, por encima del LOQ (**Tabla 3.8**).

La muestra **Z1** presentó una cantidad de patulina cercana al LOQ y por debajo del límite máximo establecido para productos destinados a la población infantil (10 ng/mL). La muestra **Z3** contuvo una mayor concentración de patulina, superando el límite más bajo establecido, aunque a un nivel considerado como apto para el consumo por la población adulta. Mención especial merece la muestra **Z2**, con una concentración de patulina claramente por encima del límite más alto establecido en la legislación (50 ng/mL). A raíz de este llamativo resultado, decidimos adquirir y analizar un segundo zumo del mismo lote

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y, en paralelo, un tercer zumo de la misma marca, pero de diferente lote. Como se puede observar en la tabla, la muestra **Z4**, del mismo lote que la muestra **Z2**, permitió confirmar la contaminación observada, siendo la cantidad cuantificada similar para ambas muestras, mientras que la muestra **Z5**, del mismo fabricante, pero perteneciente a otro lote, presentó una concentración de patulina inferior.

**Tabla 3.8.** Análisis de zumos comerciales mediante el ELISA desarrollado **XIa#338/HRP-XIa**.<sup>a</sup>

Muestra	Origen	[Patulina] <sup>b</sup>
Z1	Hacendado	8 ± 1
Z2	Consum (lote 301.R)	67 ± 8
Z3	Carrefour	18 ± 3
Z4	Consum (lote 301.R)	61 ± 11
Z5	Consum (lote 276.V)	28 ± 4

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de cinco determinaciones independientes. Valores expresados en ng/mL. <sup>b</sup> Valor obtenido ± desviación estándar.

Llegados a este punto, decidimos confirmar la concentración de patulina en la muestra **Z2** mediante métodos analíticos alternativos. En primer lugar, analizamos la muestra mediante el método oficial de la AOAC, que incluye extracción con acetato de etilo y determinación mediante HPLC-UV. El resultado obtenido teniendo en cuenta la recuperación del método fue de 69 ng/mL, en clara sintonía con el valor obtenido mediante ELISA. Posteriormente, la muestra **Z2** fue analizada por dos laboratorios independientes, cada uno de ellos con su propio protocolo de análisis, pero ambos basados en HPLC-MS. Uno de ellos proporcionó un resultado corregido de 58 ng/mL, mientras que el valor obtenido por el segundo fue de 40 ng/mL. En definitiva, los resultados obtenidos por métodos instrumentales confirmaron la presencia de patulina en la muestra **Z2** a niveles elevados, muy probablemente por encima del límite máximo establecido. Más allá de que la muestra en cuestión incumpliera o no la legislación, nuestro estudio con zumos comerciales de manzana confirma que la presencia de patulina es un hecho relativamente frecuente, y que ocasionalmente dichos niveles son superiores a los regulados, un resultado que está en línea con los programas de vigilancia que se llevan a cabo a nivel oficial en todo el mundo y que han obligado en los últimos años a retirar varios productos del mercado (ver **Tabla 1.5**). Asimismo, nuestros estudios de validación refuerzan la idea de que el ELISA desarrollado en esta tesis doctoral puede contribuir significativamente a reforzar los controles sobre la presencia de patulina en alimentos y a reducir por tanto la exposición de los consumidores a esta micotoxina insuficientemente vigilada.

### 3.4.2 Desarrollo de tiras inmunorreactivas

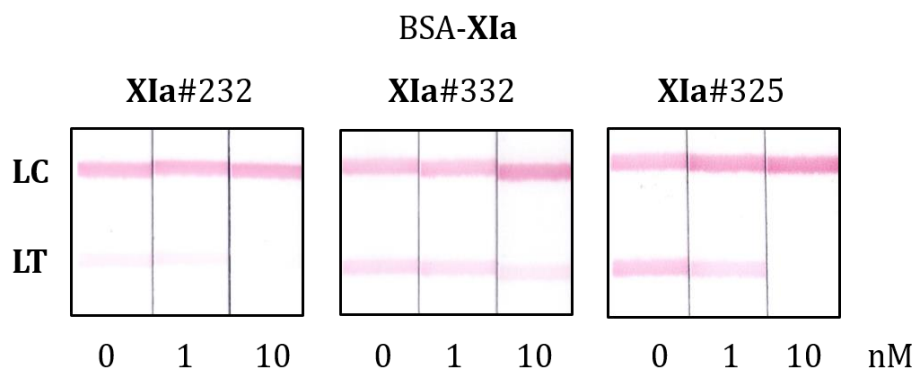
En comparación con la técnica ELISA, las tiras inmunorreactivas constituyen sistemas más sencillos que además permiten reducir significativamente los tiempos de ensayo, por lo que resultan de gran utilidad en procesos de cribado cualitativos. Por estos motivos, se planteó el desarrollo de tiras inmunorreactivas capaces de detectar patulina en muestras de zumo. Para ello, se procedió de un modo similar al desarrollo del ELISA, empezando primero con la caracterización de los inmunorreactivos, seguido por la optimización de las condiciones y finalmente la aplicación a muestras.

El desarrollo de tiras inmunorreactivas requiere de la inmovilización previa de los anticuerpos seleccionados sobre nanopartículas con el propósito de proporcionar una señal, habitualmente una banda coloreada, tras su retención sobre la membrana. En este caso, se emplearon nanopartículas de oro con un tamaño de 40 nm modificadas con un anticuerpo de captura (GAM). Por otra parte, se seleccionó como soporte una membrana de nitrocelulosa por su elevado potencial de fijación de proteínas y con un tamaño de poro de 15  $\mu\text{m}$ , permitiendo así tiempos de ensayo cortos. Por último, decidimos trabajar en formato *dipstick*, lo que supone que el sistema no incluye la almohadilla de conjugado donde habitualmente se encuentran absorbidas las nanopartículas marcadas con anticuerpo. De esta forma, la tira es introducida directamente en una solución que contiene la muestra y las nanopartículas marcadas tras un tiempo de incubación.<sup>165</sup> Una vez completado el ensayo, generalmente tras 10 minutos desde la introducción de la tira, la cuantificación de la señal de las bandas se realizó mediante un escáner convencional y el programa ImageJ.<sup>166</sup> En los casos que procedía, la representación de la señal registrada frente a la concentración de aducto en escala logarítmica permitió obtener los parámetros analíticos de las curvas de inhibición, de forma similar al ELISA.

En primer lugar, evaluamos el comportamiento en el sistema de todos los inmunorreactivos para seleccionar las mejores combinaciones anticuerpo-conjugado competidor. Con ese fin, un grupo de 11 anticuerpos generados frente al hapteno **XIa**, seleccionados previamente en base a su afinidad hacia el aducto **XI** en ELISA, fueron evaluados frente a los conjugados de BSA-**VIIa**, BSA-**VIIIa** y BSA-**XIa**. El uso de diferentes concentraciones del aducto **XI** (1 y 10 nM), además de un blanco, permitió valorar de forma visual y semicuantitativa la señal máxima de la LT y su inhibición en presencia del analito. Para este estudio, la cantidad de conjugado BSA-hapteno se fijó en 200 ng por tira y se empleó 1  $\mu\text{g}$  de anticuerpo por mililitro de nanopartículas (OD = 1). Por último, el ensayo se llevó a cabo mezclando 25  $\mu\text{L}$  del conjugado nanopartícula-mAb con 75  $\mu\text{L}$  de la disolución del analito en tampón Tris75-T.

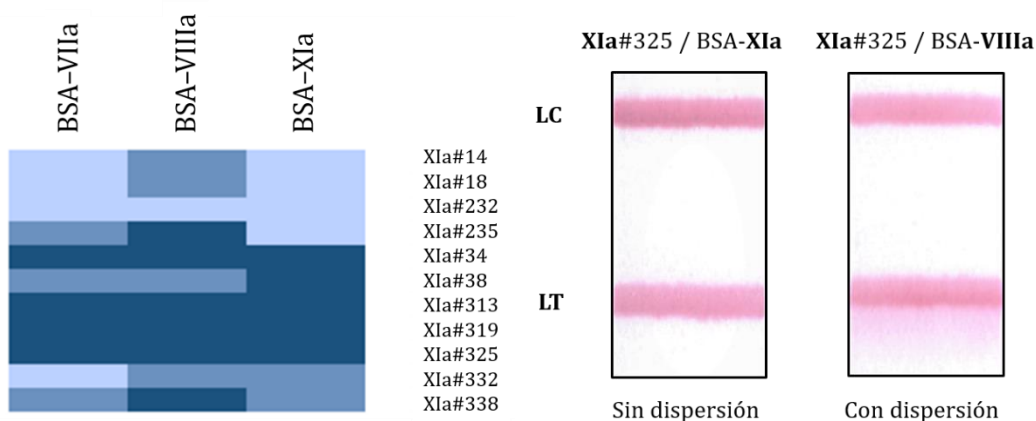
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El funcionamiento de todos los anticuerpos en el sistema inmunocromatográfico se pudo clasificar en 3 categorías, ejemplificadas en la **Figura 3.24**. La primera de ellas se caracterizó por el bajo o nulo reconocimiento del anticuerpo hacia el conjugado de la LT, como sucede en el caso del anticuerpo **XIa#232**, dando lugar a una señal insuficiente para el desarrollo del sistema. Por otro lado, algunos anticuerpos mostraron reconocimiento hacia el conjugado de ensayo, proporcionando así una señal coloreada en la LT, pero los niveles de inhibición de la señal fueron insuficientes para la detección a niveles bajos del analito, caso del anticuerpo **XIa#332**. Por último, la combinación más interesante se observó con los anticuerpos con un comportamiento similar al del anticuerpo **XIa#325**, el cual mostró una inhibición total de la LT en presencia de 10 nM del aducto **XI**, e incluso una ligera reducción de la señal en presencia de 1 nM del aducto.



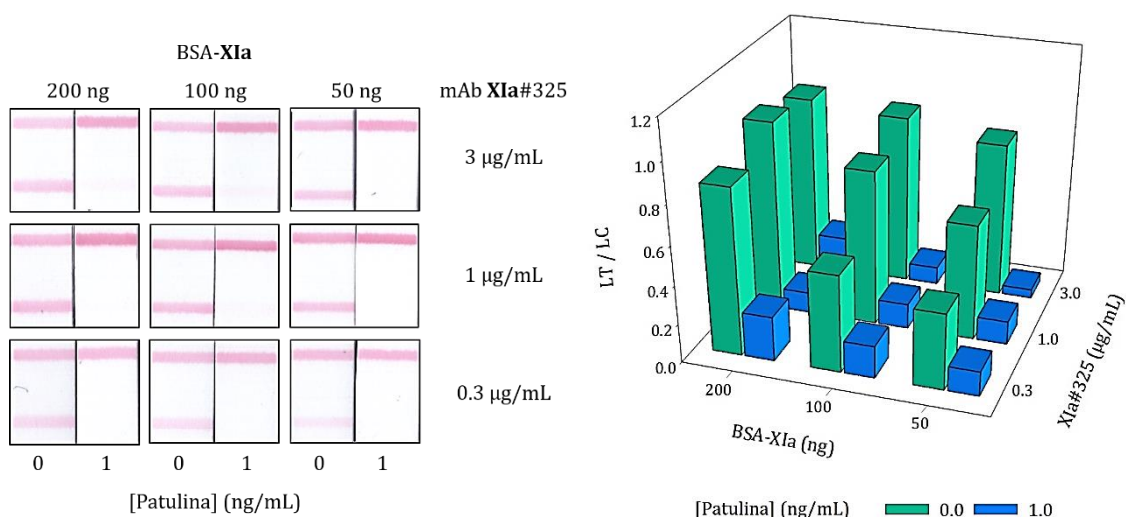
**Figura 3.24.** Ejemplo de los patrones de señales obtenidos durante la caracterización de los inmunorreactivos para el desarrollo de tiras.

Con respecto a los conjugados de ensayo (**Figura 3.25**), el uso de BSA-**VIIa** y BSA-**XIa** proporcionó buenos resultados, con la excepción de los anticuerpos **XIa#14**, **XIa#18** y **XIa#232**. Ambos conjugados exhibieron características similares en cuanto a la generación de señal tanto en la LC como en la LT y, además, mostraron buena capacidad de inhibición de la LT en presencia de analito. Por su parte, a pesar de presentar también buenas propiedades en cuanto a señal y afinidad, el uso del conjugado BSA-**VIIIa** resultó en una ligera dispersión de las nanopartículas retenidas en la LT, dificultando así el correcto registro de la señal. Tras la evaluación de los resultados, y en base a la señal máxima obtenida en ambas bandas (LT y LC) y a la capacidad de inhibición de la LT en presencia de analito, se decidió continuar trabajando con el anticuerpo **XIa#325** en combinación con el conjugado BSA-**XIa**.



**Figura 3.25.** Representación visual de la capacidad de unión para cada pareja de inmunorreactivos en tiras inmunorreactivas (izquierda), correspondiendo el azul claro a nulo o poco reconocimiento y el aumento en la intensidad del color a mayor reconocimiento, y ejemplo de la dispersión observada para el conjugado **VIIIa** durante la preselección de inmunorreactivos (derecha). Figura elaborada con el programa de libre acceso *MultiExperiment Viewer* (MeV).

El siguiente paso en el desarrollo de las tiras inmunorreactivas consistió en la optimización de la señal máxima y de la sensibilidad del ensayo. Con este propósito, se prepararon nanopartículas con diferentes cantidades de anticuerpo y se ensayaron frente a diferentes concentraciones del conjugado de ensayo inmovilizado en la membrana. Las concentraciones de anticuerpo estudiadas fueron 0.3, 1 y 3  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el conjugado se evaluó a 50, 100 y 200 ng de proteína por tira (**Figura 3.26**).



**Figura 3.26.** Optimización de la concentración de anticuerpo y conjugado de ensayo basada en la relación **LT/LC** para la tira inmunorreactiva **XIa#325/BSA-XIa**.

La inmovilización de 50 ng de conjugado proporcionó una señal insuficiente en la LT, mientras que el uso de concentraciones superiores dio lugar a una LT bien definida, sin diferencias claras entre 100 y 200 ng de conjugado. En cuanto a la cantidad de anticuerpo,

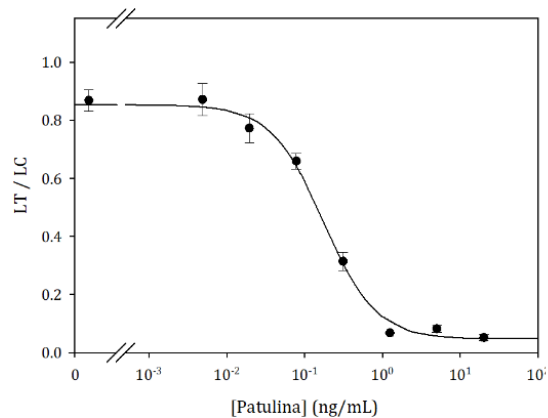
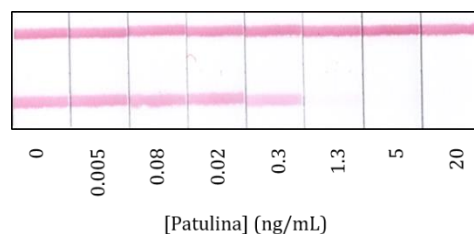
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

se observó que una concentración de 1 µg/mL era suficiente para la generación de una señal adecuada sin comprometer la interpretación visual de los resultados, como sí ocurrió con una concentración de 3 µg/mL.

Hasta este punto, los ensayos se habían realizado empleando tan solo dos concentraciones de analito, por lo que decidimos analizar curvas completas de calibrado que permitiesen determinar los parámetros analíticos del ensayo seleccionado a partir de la curva de inhibición. Como se muestra en la **Tabla 3.9**, el ensayo mostró una adecuada uniformidad e intensidad de ambas bandas, facilitando así la determinación visual del analito. Por lo que respecta a la sensibilidad, el valor de IC<sub>50</sub> fue excelente, y tan solo ligeramente peor que el obtenido con el ELISA, un dato sin duda muy llamativo para un ensayo tan sencillo y rápido como es un test inmunocromatográfico.

**Tabla 3.9.** Características de los ensayos inmunocromatográficos seleccionados.<sup>a</sup>

LC	GAM (1 mg/mL)
LT	BSA-XIa (1 mg/mL)
mAb	XIa#325 (1 µg/mL)
NP-mAb	25 µL
Muestra	75 µL
Tiempo	15 min
Curva Test/Control:	
(LT/LC) <sub>max</sub>	0.95 ± 0.18
Pendiente	-1.65 ± 0.51
IC <sub>50</sub> (ng/mL)	0.17 ± 0.07
(LT/LC) <sub>min</sub>	0.04 ± 0.03
LOD (ng/mL)	0.04 ± 0.01
R.T. (ng/mL) <sup>b</sup>	0.07 - 0.53



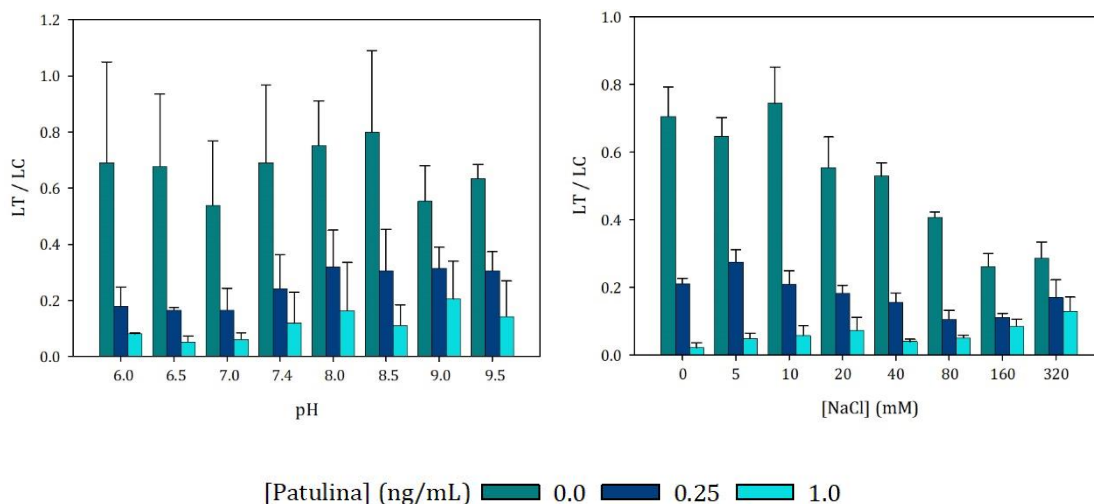
<sup>a</sup> Los valores son la media de tres determinaciones independientes. <sup>b</sup> Rango de trabajo calculado como el intervalo IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>.

### 3.4.2.1 Condiciones de ensayo.

Una vez realizada la selección del ensayo y las concentraciones de reactivos, se procedió con la optimización de las propiedades fisicoquímicas del medio. De forma similar al ELISA, se decidió evaluar la influencia del pH y la fuerza iónica del tampón con el objetivo de optimizar sus valores y, con ello, estudiar si era posible incrementar la sensibilidad global del ensayo.

La variación de los parámetros del ensayo en presencia de un rango de diferentes pH y fuerzas iónicas se llevó a cabo empleando como referencia el tampón Tris75-T. Los valores

de pH estuvieron comprendidos entre 6 y 10.4, mientras que la fuerza iónica se estimó en función de la concentración de NaCl adicionada, cubriendo un intervalo entre 0 a 320 mM (**Figura 3.27**). Los ensayos se llevaron a cabo adicionando 75  $\mu$ L de una disolución estándar del analito preparada en los diferentes tampones con 25  $\mu$ L de la disolución de nanopartículas con el anticuerpo acoplado en tampón de referencia.



**Figura 3.27.** Estudio de la influencia del pH (izquierda) y de la concentración de NaCl (derecha) sobre la señal LT/LC de la tira inmunorreactiva **XIa#325/BSA-XIa** (n=3).

En vista de los resultados, se puede concluir que la tira inmunorreactiva mostró cierta tolerancia a los cambios de pH, aunque los valores máximos de la relación LT/LC se observaron en un intervalo relativamente estrecho, comprendido entre 7.4 y 8.5. Adicionalmente, cabe destacar que el incremento de la intensidad de las bandas se produjo tanto en ausencia de analito como en su presencia. El uso de una única tira inmunorreactiva para determinaciones semicuantitativas es la práctica habitual, siendo de crucial importancia la posibilidad de discriminar entre una muestra positiva y otra negativa. En consecuencia, la interpretación visual de los resultados, en concreto la inhibición total de la LT en presencia de analito, es una característica clave, por lo que finalmente se optó por continuar trabajando a un valor de pH 7.4. Por su lado, el incremento de la concentración de NaCl mostró un claro impacto negativo sobre los parámetros analíticos. La presencia de NaCl, sobre todo a partir de 10 mM, condujo a una disminución de la relación LT/LC tanto en presencia como en ausencia de analito. En consecuencia, se optó por seguir utilizando como tampón de ensayo Tris75, sin NaCl.

### 3.4.2.2 Validación de tiras inmunorreactivas.

Para llevar a cabo la validación de un nuevo método analítico, es imprescindible el cumplimiento de una serie de directrices establecidas por las comisiones reguladoras,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

recogidas actualmente en el reglamento No 2002/657/EC.<sup>167</sup> No obstante, a raíz del incremento en metodologías de cribado para el análisis de micotoxinas a nivel industrial, la Comisión Europea incorporó un conjunto de criterios de obligado cumplimiento para la validación de este tipo de técnicas, reunidos en el reglamento No 519/2014/EC.<sup>168</sup> Consecuentemente, se decidió realizar el proceso de validación en base a las pautas establecidas para los métodos semicuantitativos de cribado. Como cualquier procedimiento de validación, el propósito principal es valorar la aplicabilidad real del método desarrollado en un proceso de cribado. Para ello, fue necesario valorar una serie de parámetros característicos del rendimiento del ensayo, detallados a continuación.

El umbral de corte (*cut-off*) se define como el valor, en este caso de la relación LT/LC, por debajo del cual una muestra es considerada como sospechosa de contener patulina a una concentración superior a la establecida, conocida como concentración de cribado (STC, *Screening Target Concentration*). Puesto que estos ensayos juegan un papel importante en la seguridad alimentaria, una práctica habitual es establecer una concentración de cribado igual o inferior a los límites máximos regulados.<sup>169</sup> Por otra parte, la normativa establece una tasa tolerable de falsos negativos para el análisis de micotoxinas del 5%, por lo que, si el valor de la relación LT/LC del ensayo es superior al umbral de corte, es decir, por debajo del STC, la muestra será negativa con un 95% de probabilidad.

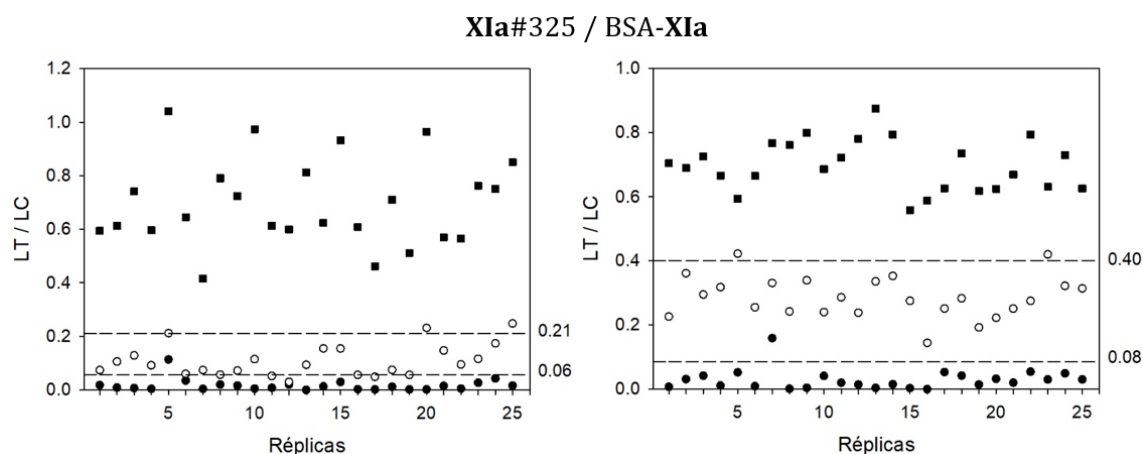
Tal y como exige el reglamento, para fijar el umbral de corte ha de llevarse a cabo un mínimo de veinte mediciones de cada matriz fortificada a la STC junto a un número equivalente de muestras sin fortificar. Para esta validación, se decidió establecer el valor de STC en 25 ng/mL, que es la mitad del límite máximo establecido para esta toxina en zumos. De modo adicional, se incluyó en el estudio muestras fortificadas a  $1/5 \times \text{STC}$  (5 ng/mL), un valor bastante más exigente y que se corresponde con la mitad del valor máximo regulado para productos destinados a la población infantil. La evaluación se realizó analizando un total de cinco muestras de zumo de manzana preparados manualmente a partir de diferentes variedades de manzana, carentes de daños por podrido, durante cinco días consecutivos. Finalmente, el umbral de corte se calculó como la diferencia entre la media de la señal de las muestras fortificadas, representada por  $R_{\text{STC}}$  o  $R_{1/5 \times \text{STC}}$ , y el valor de  $t$  de una distribución  $t$ -Student de una cola para un porcentaje de falsos negativos del 5% con 24 grados de libertad ( $t = 1.7109$ ), multiplicado por la desviación estándar del nivel fortificado,  $SD_{\text{STC}}$  o  $SD_{1/5 \times \text{STC}}$  (**Ecuación 1**).

$$\text{Umbral} = R_{\text{STC}} - t_{0.05} \times SD_{\text{STC}} \text{ (Ecuación 1)}$$

El análisis se llevó a cabo utilizando el procedimiento establecido previamente, aplicando diluciones de los zumos de 1/10 y 1/50 en tampón. Los resultados de este estudio se



presentan en la **Figura 3.28**, y muestran que existe una clara diferencia entre el valor medio de LT/LC de las muestras libres de contaminación y las muestras fortificadas con patulina a la STC (0.7 vs 0.02-0.03), tanto cuando se emplea una dilución 1/10 como cuando se emplea una dilución 1/50. Por su parte, se obtuvo una menor variabilidad de la señal con una dilución superior de la muestra, aunque la sensibilidad visual se vio ligeramente comprometida, mientras que una dilución inferior dio lugar a una inhibición casi total de la señal a una concentración de patulina de  $1/5 \times \text{STC}$ . Por último, se observó una separación visible entre el cociente LT/LC obtenido a las dos concentraciones ensayadas para cada dilución de la muestra.



**Figura 3.28.** Valores de LT/LC y umbrales de corte (----) para la matriz (zumo de manzana) sin fortificar (■) y fortificada a 5 (○) y 25 ng/mL (●) con patulina. Izquierda: dilución 1/10 del zumo en tampón de ensayo. Derecha: dilución 1/50 del zumo en tampón de ensayo.

Otro parámetro que se debe determinar es la tasa de falsos sospechosos, que representa la probabilidad de clasificar equivocadamente como sospechosa de contaminación por encima de la STC a una muestra con una concentración real inferior a la STC. Para llevar a cabo su determinación, es preciso el cálculo previo del valor de la  $t$  de una distribución  $t$ -Student de una cola a partir de la diferencia entre el valor LT/LC medio de las muestras sin fortificar,  $media_{\text{blanco}}$ , y el valor del umbral de corte partido por la desviación estándar del blanco,  $SD_{\text{blanco}}$  (**Ecuación 2**). Cabe recordar que el valor de STC se asigna según la finalidad del estudio, 25 ng/mL en nuestro caso, posibilitando así la determinación de la tasa de falsos sospechosos a diferentes niveles de contaminación. La tasa de falsos sospechosos se calculó a partir de dicho valor de  $t$  utilizando la función DIST-T del programa Microsoft Excel para una distribución  $t$ -Student de una cola.

$$t = (media_{\text{blanco}} - \text{umbral}) / SD_{\text{blanco}} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Como se puede ver en los resultados recopilados en la **Tabla 3.10**, la tira inmunorreactiva desarrollada mostró una inhibición total en muestras con patulina a la STC establecida (25

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ng/mL). En consecuencia, asumiendo una tasa de falsos negativos del 5%, los valores del umbral de corte fueron inferiores a 0.1 para la STC en muestras diluidas 1/10 y 1/50. A su vez, las tasas de falsos sospechosos a dicha STC, comparado con el blanco, fueron igual de satisfactorios, obteniendo valores cercanos a cero.

**Tabla 3.10.** Resultados de la validación de la tira inmunorreactiva en base al Reglamento de la Comisión Europea 519/2014.<sup>168</sup>

	Dilución 1/10		Dilución 1/50	
	1/5×STC <sup>a</sup>	STC	1/5×STC	STC
LT/LC ± sd	0.11 ± 0.06	0.02 ± 0.02	0.29 ± 0.07	0.03 ± 0.03
Umbral (5% falsos negativos)	<b>0.21</b>	<b>0.06</b>	<b>0.40</b>	<b>0.09</b>
Falso sospechosos (%) del cero	0.32	0.03	0.05	<10 <sup>-3</sup>
Falso sospechosos (%) de 1/5×STC	-	19.39	-	0.25

<sup>a</sup> Concentración de STC fijada en 25 ng/mL.

Por su parte, los umbrales de corte determinados para 1/5×STC fueron de 0.21 para las muestras diluidas 1/10 y de 0.40 para las diluidas 1/50. De nuevo, las tasas de falsos sospechosos de muestras sin patulina fueron altamente aceptables, siendo la tasa más elevada de 0.32%. Esto significa que, en muestras diluidas 1/10, tan solo 3.2 muestras de cada mil analizadas con una contaminación inferior a 5 ng/mL serán clasificadas como potencialmente contaminadas. Esta probabilidad es incluso más baja (0.05%) si los análisis se llevan a cabo con muestras diluidas 1/50.

Por último, la inhibición casi completa de la LT frente a ambas concentraciones a una dilución 1/10 de la matriz, dio lugar a valores elevados, hasta el 20%, de la tasa de muestras clasificadas como sospechosas de contener más de 25 ng/mL de patulina si la concentración real está entre 5 y 25 ng/mL. No obstante, dicha tasa se redujo considerablemente, hasta 100 veces menor, al emplear una dilución de 1/50, siendo la probabilidad de considerar erróneamente como una contaminación superior a los 25 ng/mL a una muestra que contiene una concentración entre 5 y 25 ng/mL de 0.25%.

En resumen, se ha demostrado la validez de la tira inmunorreactiva descrita en este trabajo para la detección de patulina en zumo de manzana según los criterios establecidos para el desarrollo de sistemas semicuantitativos de cribado. Por último, es digno de mencionar que este sistema no sólo es la primera tira inmunorreactiva desarrollada para la determinación de patulina, sino que ofrece ventajas en cuanto a sensibilidad, simplicidad y rapidez en comparación con otros métodos de análisis para esta toxina.

Para verificar estos resultados, se decidió analizar el material de referencia y el zumo localmente adquirido con una cantidad importante de patulina mediante el procedimiento

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

optimizado. Como control negativo, se analizó en paralelo cada zumo en ausencia de derivatizante.

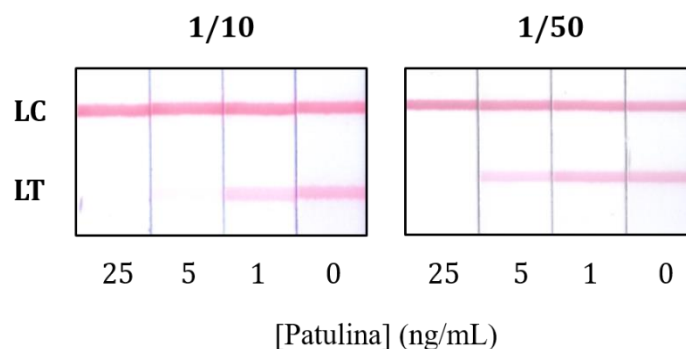
**Tabla 3.11.** Análisis de material de referencia mediante la tira desarrollada **XIa#325/BSA-XIa**.<sup>a</sup>

Muestra	Dilución 1/10			Dilución 1/50		
	LT/LC	STC	1/5 STC	LT/LC	STC	1/5 STC
T1668QC <sup>b</sup>	0.08	-	+	0.33	-	+
T1672QC <sup>b</sup>	0.02	+	+	0.04	+	+
TYG060RM <sup>b</sup>	0.04	+	+	0.16	-	+
QBS BV280 520 <sup>c</sup>	0.03	+	+	0.03	+	+
Z2 <sup>d</sup>	0.04	+	+	0.05	+	+

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes. <sup>b</sup> Zumo distribuido por FAPAS. <sup>c</sup> Zumo distribuido por *LGC Standards*. <sup>d</sup> Zumo comercial.

Tal y como se observa en la **Tabla 3.11**, cuando se ensayaron las muestras diluidas 1/10, sólo la muestra T1668QC ([patulina] = 9.3 ng/mL) presentó una relación LT/LC superior al umbral de la STC (0.06), y por tanto la muestra se clasificó como negativa (<25 ng/mL). En el caso de las muestras con una dilución 1/50 se observó que la muestra TYG060RM ([patulina] = 20.1 ng/mL) también superó dicho valor (0.09). Dado que todas las muestras mostraron valores por debajo del umbral<sub>1/5\*STC</sub>, se puede confirmar que las muestras T1668QC y TYG060RM contienen una concentración de patulina comprendida entre 5 y 25 ng/mL, mientras que las muestras restantes superan la STC. De nuevo, la concordancia entre estos resultados y los discutidos en el apartado anterior, ponen de manifiesto la validez de la tira inmunorreactiva desarrollada para el análisis de patulina en muestras de zumo de manzana a niveles por debajo del límite exigido por los organismos reguladores.

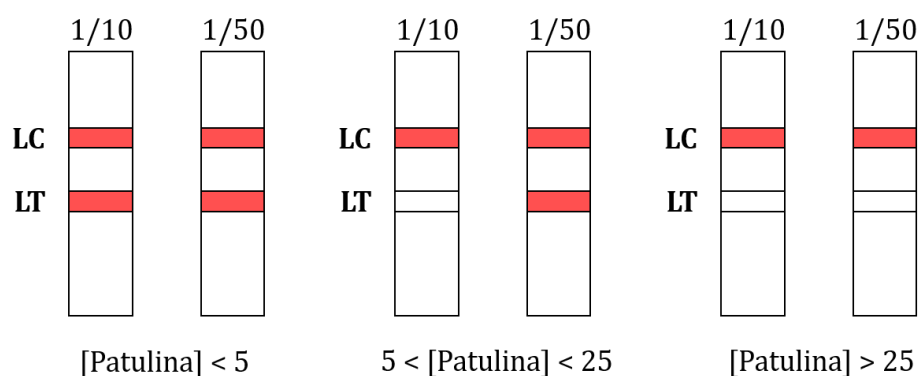
Una estrategia alternativa para realizar los análisis es mediante detección visual. Para ello se determinó el límite de detección visual (vLOD) como la mínima concentración de analito que inhibe completamente la señal de la LT. Como se puede ver en la **Figura 3.29**, el vLOD de la tira inmunorreactiva para el análisis de patulina es de 5 ng/mL si la muestra se diluye 1/10 y de 25 ng/mL si se diluye 1/50.



**Figura 3.29.** vLOD en zumo de manzana de la tira inmunorreactiva desarrollada.

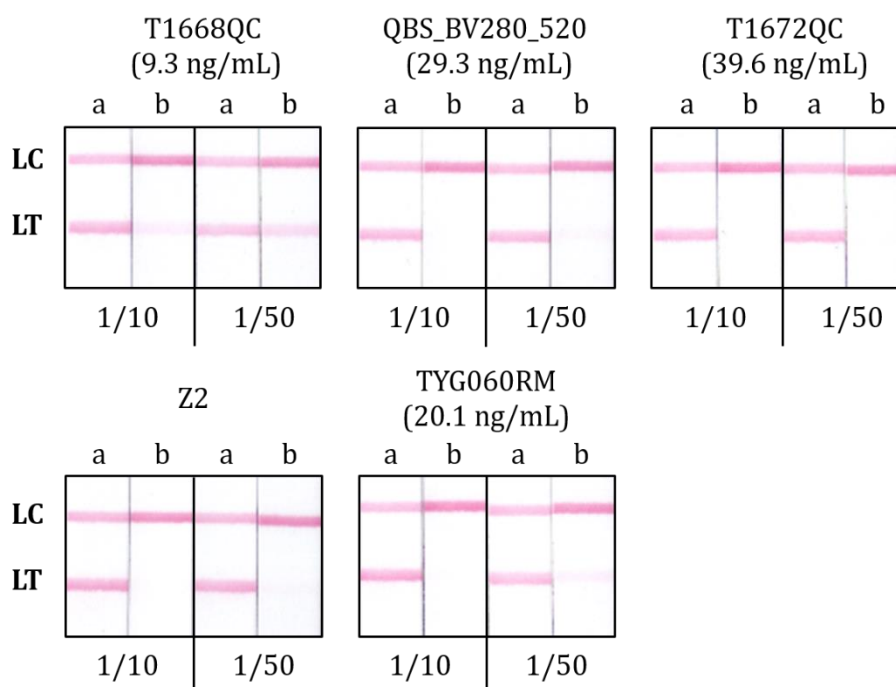
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De este modo, el análisis de una muestra con 2 tiras inmunorreactivas permitiría determinar de manera semicuantitativa el grado de contaminación, según se ejemplifica en la **Figura 3.30**.



**Figura 3.30.** Representación de las 3 combinaciones posibles de la LT y LC para la determinación semicuantitativa de una muestra. El valor de la concentración de patulina está expresado en ng/mL.

Esta estrategia se aplicó para el análisis visual del material de referencia y de la muestra de zumo comercial contaminado con y sin derivatización de patulina. Tal y como era de esperar, las muestras no derivatizadas presentaron una banda coloreada tanto en la LC como en la LT, mientras que las muestras derivatizadas mostraron inhibición en la LT, en mayor o menor medida según su nivel de contaminación (**Figura 3.31**).



**Figura 3.31.** Resultados del análisis de material de referencia mediante la tira inmunorreactiva **XIa#325/BSA-XIa**. a) Muestras analizadas en ausencia de agente derivatizante. b) Muestras analizadas en presencia de agente derivatizante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En el caso del material de referencia con menor cantidad de patulina (T1668QC, [patulina] = 9.3 ng/mL) se observa que a una dilución 1/10 existe una inhibición prácticamente total de la LT, indicando que dicha muestra contiene más de 5 ng/mL de patulina. En cambio, si analizamos el resultado obtenido a una dilución 1/50 para la misma muestra, observamos que la inhibición de la señal en la LT es parcial, indicando que el contenido de patulina es inferior a 25 ng/mL. Por otro lado, las muestras con cantidades de patulina por encima de 25 ng/mL (QBS\_BV280\_520, T1672QC y Z2) mostraron inhibición total en la LT a ambas diluciones, mientras que el zumo con un contenido cercano a 25 ng/mL dio lugar a una LT tenue cuando se diluyó a 1/50. De nuevo, los resultados que se desprenden de este estudio claramente demuestran que el ensayo desarrollado permite la determinación del contenido de patulina en zumo de manzana a los niveles regulados, e incluso por debajo de los mismos.

### 3.5 Aplicación del método de derivatización al desarrollo de técnicas cromatográficas instrumentales

Al comienzo de esta tesis doctoral, se planteó como objetivo principal el desarrollo de métodos inmunoanalíticos para la detección de patulina en muestras alimentarias. Tal como se ha demostrado en los apartados anteriores, se ha llevado a cabo de manera exitosa el reto propuesto vía una estrategia de derivatización no descrita previamente, permitiendo así la cuantificación de muestras contaminadas a niveles inferiores a los máximos establecidos por los organismos reguladores. Las ventajas en cuanto a rapidez, simplicidad y portabilidad que aportan los sistemas de inmunodetección han corroborado su uso como métodos alternativos o complementarios a los convencionales cromatográficos. No obstante, la utilización de técnicas cromatográficas para la determinación de contaminantes en alimentos, como plaguicidas y micotoxinas, sigue presentando una elevada popularidad en el ámbito de la seguridad alimentaria.

A pesar de los avances recientes en las técnicas instrumentales, el uso de HPLC junto con la detección UV perdura como método oficial de la AOAC *International* para el análisis de patulina en alimentos, por lo que es ampliamente utilizado por los laboratorios de control en todo el mundo.<sup>86,89,170,171</sup> Sin embargo, está muy documentado que la presencia de compuestos fenólicos como el 5-hidroximetilfurfural produce una pérdida de sensibilidad y especificidad cuando el análisis es realizado mediante esta sencilla técnica.<sup>90,172,173</sup> Este hecho ha llevado al desarrollo de metodologías alternativas para el control de patulina, la mayoría de los cuales se basan en técnicas de separación por cromatografía líquida acopladas con detectores de espectrometría de masas que brindan una mayor sensibilidad y tiempos de análisis más cortos.<sup>85,174-177</sup> Entre ellos, el uso de espectrómetros de alta resolución, como los basados en tiempo de vuelo (ToF, *time-of-flight*) u Orbitrap, además de ofrecer ventajas en cuanto a mayor resolución y detectabilidad, proporciona una información espectral más completa de todos los componentes ionizables en la fuente de ionización, sin comprometer la sensibilidad del método ni el tiempo análisis. Esta característica hace que estos detectores sean de gran interés en los métodos de análisis multi-residuo, en los que la patulina es frecuentemente excluida por su baja eficiencia de ionización. No obstante, estos métodos requieren laboriosas etapas de extracción con disolventes orgánicos indeseables y costosos procedimientos de limpieza con el fin de alcanzar los niveles exigidos por los organismos reguladores.

Puesto que la transformación de patulina con compuestos aril 1,2-ditiole a un único derivado estable se logró de manera eficiente y sin necesidad de aislar previamente el analito, se planteó explorar la viabilidad de esta reacción de derivatización para desarrollar un método

de análisis vía determinación por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-QTOF-MS). Con ese objetivo, se seleccionó el aducto **VII** para llevar a cabo la evaluación del método en base a la formación de un solo producto de reacción, la disponibilidad comercial del agente derivatizante y la ausencia de átomos isotópicos abundantes.

### 3.5.1 Caracterización del aducto **VII** por espectrometría de masas de alta resolución

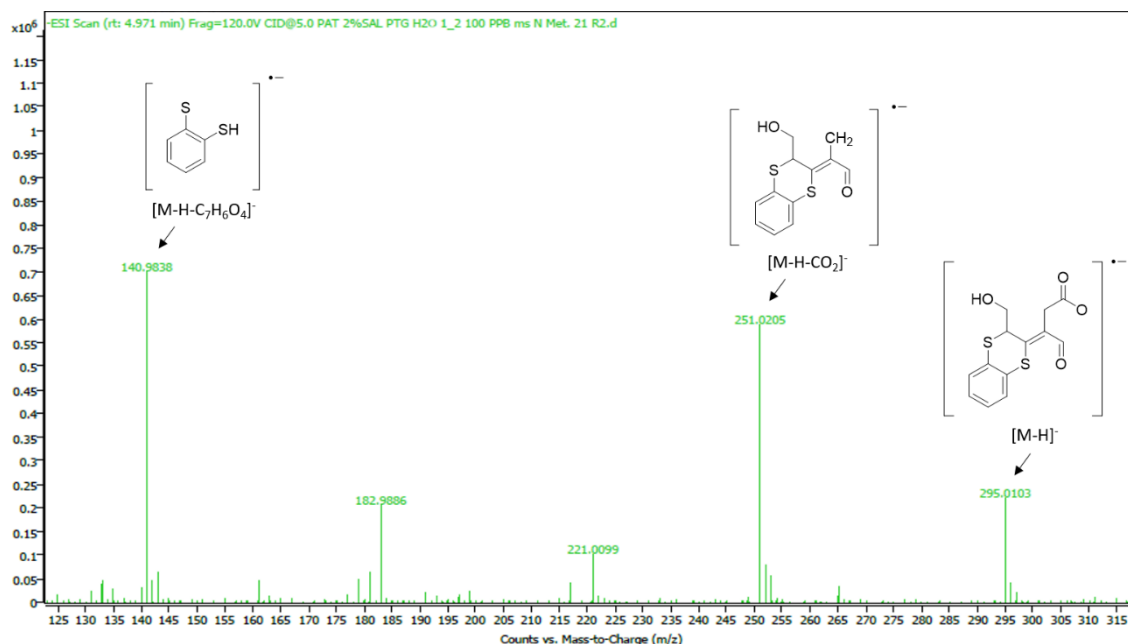
En primer lugar, se examinó la intensidad y estabilidad del pico de masas del aducto mediante la obtención de espectros de barrido completo (*Full-scan*), así como su perfil de fragmentación mediante espectrometría en tándem (MS/MS), tanto en modo positivo como negativo. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando ionización por electropulverización (ESI). En el modo de barrido completo, se empleó una energía de colisión de 5 eV, mientras que en MS/MS se aplicaron energías de colisión de 10, 20 y 30 eV para evaluar las condiciones óptimas para generar los iones del producto. Los datos para ambos modos de ionización se recogen en la **Tabla 3.12**. Cabe mencionar que en las condiciones cromatográficas establecidas (ver apartado 5.1.6), el aducto **VII** eluyó a los 4.97 minutos, mientras que el reactivo de derivatización eluyó a los 6.31 minutos.

El análisis del espectro de barrido completo obtenido en modo de ionización positiva mostró un pico de baja intensidad para el ion molecular  $[M+H]^+$  a  $m/z$  297, mientras que el pico más abundante correspondió a  $[M+H-H_2O]^+$  a  $m/z$  279. La fragmentación por análisis MS/MS proporcionó cuatro iones de producto abundantes. Cuando se aplicó una energía de colisión de 10 eV, además del pico de pérdida de agua todavía abundante de  $m/z$  279, se observaron tres picos de igual intensidad con  $m/z$  261, 233 y 153, correspondientes a  $[M+H-H_4O_2]^+$ ,  $[M+H-CH_4O_3]^+$  y  $[M+H-C_6H_8O_4]^+$ , respectivamente. Cuando la energía de colisión se elevó a 20 eV, los picos correspondientes a  $m/z$  279 y 261 disminuyeron, mientras que los dos picos restantes mantuvieron la intensidad. Adicionalmente, se observó un quinto pico abundante con  $m/z$  205 correspondiente a  $[M+H-C_2H_4O_4]^+$ . Por último, cuando la energía de colisión se estableció en 30 eV, se observó un único pico abundante con  $m/z$  153.

Por otro lado, el espectro de barrido completo en modo de ionización negativa mostró un pico con  $m/z$  295 correspondiente al ion molecular  $[M-H]^-$  (**Figura 3.32**). Cuando se llevó a cabo el análisis MS/MS, se observó una fragmentación satisfactoria de iones precursores a una energía de colisión relativamente baja de 5 eV, lo que produjo dos iones producto abundantes con  $m/z$  251 y 141, correspondientes a  $[M-H-CO_2]^-$  y  $[M-H-C_7H_6O_4]^-$ , respectivamente. Cuando se aplicaron energías de colisión más altas, los picos con  $m/z$  251

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y 141 fueron más abundantes hasta 20 eV, y solo el pico con  $m/z$  141 permaneció con una energía de colisión de 30 eV.



**Figura 3.32.** Espectro de masas de barrido completo para el aducto **VII** (0.1 µg/mL) en modo negativo con un tiempo de retención de 4.97 min y una energía de colisión de 5 eV. Se muestran las estructuras químicas de los productos identificados más abundantes obtenidos en modo de ionización negativa a diferentes energías de colisión.

**Tabla 3.12.** Parámetros de espectrometría de masas optimizados para el aducto de patulina en modo ESI.

Modo de ionización	Ion precursor ( $m/z$ )	Tiempo de retención (min)	Ion producto ( $m/z$ )	Energía de colisión (eV) <sup>a</sup>
Positivo	297.0255 [M+H] <sup>+</sup>	4.97	279.0145 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	0
			261.0043 [M+H-H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	10
			233.0095 [M+H-CH <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	10
			205.0146 [M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	20
			152.9832 [M+H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	30
Negativo	295.0103 [M-H] <sup>-</sup>	4.97	251.0205 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	0
			140.9838 [M-H-C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	10

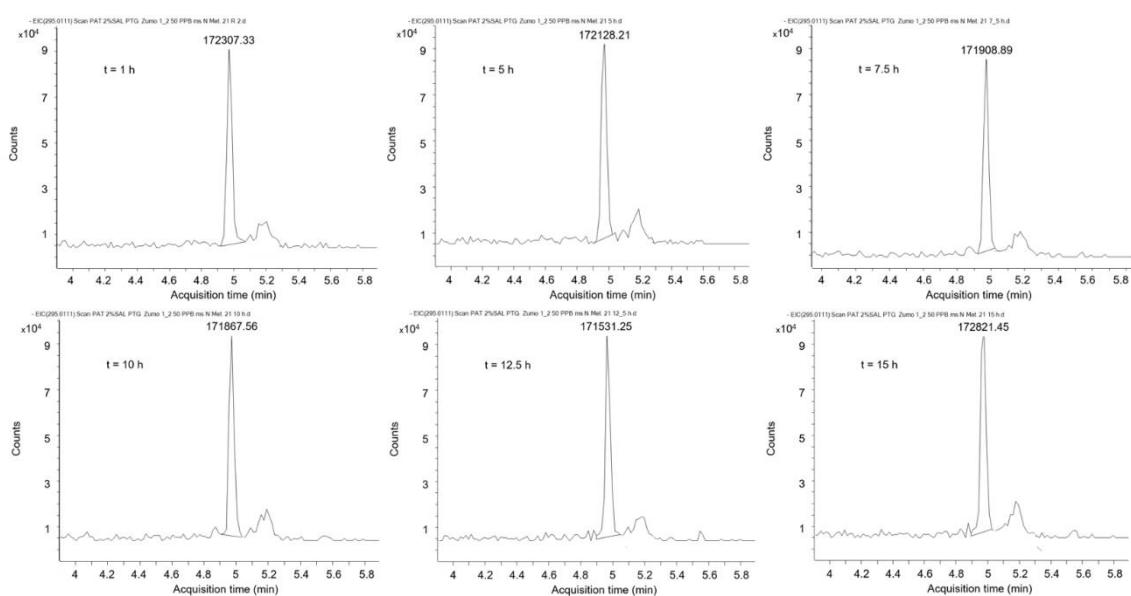
<sup>a</sup> Energía de colisión en la que el pico correspondiente es más abundante.

En general, la intensidad máxima del ion molecular [M-H]<sup>-</sup> en modo negativo con una energía de colisión de 5 eV fue mucho más alta que el pico correspondiente en el modo de ionización positiva [M+H]<sup>+</sup>; por lo tanto, se eligió el pico con  $m/z$  295 en modo negativo para fines de cuantificación, mientras que los iones de producto con  $m/z$  251 y 141 se seleccionaron para la confirmación.



## 3.5.2 Desarrollo y validación del método LC-QTOF-MS

Durante el desarrollo de los métodos inmunoquímicos se encontró que la formación del aducto era más eficiente a pH neutro, por lo que se decidió establecer un procedimiento similar al empleado anteriormente, optando por la dilución directa de las muestras con un volumen de tampón PB200 y la posterior derivatización con un 2% (v/v) del tiolato durante 60 minutos. De esta manera, la sensibilidad del método no se vio seriamente comprometida. Por otra parte, dado que la compatibilidad con los sistemas automatizados es de suma importancia en el análisis instrumental moderno, la estabilidad temporal del aducto en presencia de matriz alimentaria es un requisito esencial para cualquier método basado en la derivatización del analito. Para evaluar la estabilidad del aducto, se fortificó una muestra de zumo de manzana diluida en tampón de ensayo con 50 ng/mL de patulina y se trató con benceno-1,2-bis (tiolato) de sodio como se describió anteriormente. Después de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas y se analizaron a intervalos de 2.5 h. Se encontró que el área de pico del aducto se mantuvo constante durante toda la duración del estudio (15 h), con una señal media de  $17.21 \times 10^4$  y un coeficiente de variación de 0.29% (**Figura 3.33**). Esta excelente reproducibilidad del área del pico evidenció claramente que la concentración del aducto no disminuye ni aumenta una vez que se completa la reacción (1 h). Este resultado permite la derivatización simultánea de todas las muestras en un lote y el uso del muestreador automático para una operación sin supervisión, allanando el camino para el uso del método propuesto en el análisis de rutina.



**Figura 3.33** Estudio de la estabilidad de los aductos. Una muestra de zumo de manzana fortificada con 50 ng/mL de patulina y analizada periódicamente (1 a 15 h) a partir de la adición del reactivo de derivatización.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las causas más comunes de pérdida de sensibilidad en los métodos analíticos basados en cromatografía líquida acoplada con detectores de espectrometría de masas es la presencia de componentes desconocidos en la muestra que eluyen conjuntamente con el analito objetivo y comprometen la eficiencia de la ionización, lo que da como resultado la supresión o incremento de la señal.<sup>178</sup> Este fenómeno afecta el rendimiento del método incluso cuando se utilizan elaborados procedimientos de pretratamiento, por lo que debe evaluarse cuidadosamente en los primeros pasos del proceso de validación.<sup>179</sup> Con este propósito, los efectos de la matriz (EM) se evaluaron cuantitativamente mediante la relación de pendientes ( $EM = A/B \times 100$ ).<sup>180,181</sup> Las pendientes de las curvas estándar de siete puntos preparados en muestras de zumo de fruta o compota de manzana diluidas 1:1 con tampón de ensayo (A), se compararon con la pendiente de una curva estándar preparada en paralelo en ausencia de matriz (B), de modo que las proporciones de pendiente porcentual del 100% corresponden a la ausencia de EM, mientras que los valores superiores o inferiores al 100% indican un EM que conduce a un incremento o supresión de la señal, respectivamente.

Tras analizar las muestras, se encontraron relaciones de pendiente inferiores al 100% para las tres matrices alimentarias, lo que indica que la supresión de la señal posiblemente conduce a una subestimación en la cuantificación del analito. De modo general, se encontraron desviaciones de alrededor del 20% en los dos zumos de fruta, mientras que se observó una desviación de casi el 30% en la compota de manzana (**Tabla 3.13**). Aunque las desviaciones observadas en los zumos de manzana y pera se consideran comúnmente aceptables y se podrían usar curvas de calibración externa para estas matrices, se decidió emplear las curvas de calibración en presencia de matriz para todas las muestras con el fin de mantener procedimientos comparables y lograr una cuantificación más precisa de patulina.

**Tabla 3.13.** Parámetros de linealidad y sensibilidad del método propuesto en las diferentes matrices estudiadas .

Matriz	Rango lineal (µg/L)	Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	Relación de pendiente (%)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Tampón	0.25 – 100	$y = 5835x + 6526$	0.9997	-	0.5	2.0
Zumo de manzana	1.0 – 100	$y = 4701x - 1452$	0.9961	81.0	1.0	5.0
Zumo de pera	1.0 – 100	$y = 4605x + 1169$	0.9962	79.3	1.0	5.0
Compota de manzana	5.0 – 250	$y = 4156x + 1153$	0.9960	71.6	2.0	5.0

La linealidad del método se calculó inyectando por triplicado soluciones estándar (0.25 - 100 ng/mL) tanto en tampón como en presencia de la matriz. El método analítico propuesto exhibió una excelente linealidad ( $R^2 \geq 0.996$ ) dentro de los rangos que aparecen en la **Tabla 3.13**; además, el incremento del límite superior del calibrado a 250 ng/mL aún dio un ajuste satisfactorio ( $R^2 \geq 0.985$ ). Cuando las disoluciones patrón se prepararon exclusivamente en tampón de ensayo, la mejor relación lineal se obtuvo a partir de una concentración de patulina de tan solo 0.25 ng/mL, mientras que, para las curvas estándar preparadas con matriz, la concentración más baja por encima de la cual se obtuvieron coeficientes de correlación lineal superiores a 0.996 fue de 1.0 ng/mL.

Por otro lado, la sensibilidad del método se definió por los valores de LOD y LOQ, establecidos en la concentración de patulina ensayada más baja que proporcionó señales 3 y 10 veces más altas que las de fondo, respectivamente.<sup>167</sup> En ausencia de matriz alimentaria, los valores instrumentales de LOD y LOQ obtenidos fueron de 0.5 y 2.0 ng/mL, respectivamente. En presencia de matriz, los valores de LOD y LOQ aumentaron levemente, aunque todavía estaban por debajo del límite legal más exigente para patulina en alimentos en la UE (10 µg/kg en alimentos destinados al consumo de lactantes y niños pequeños).<sup>5</sup> Es importante señalar que estos valores de sensibilidad se lograron mediante una simple dilución 1:1 de la muestra en tampón de ensayo, en marcado contraste con los procedimientos que requieren etapas de extracción, concentración y purificación complejas.

La exactitud y precisión del método se determinaron fortificando muestras blanco con patulina a tres niveles diferentes (10, 50 y 100 ng/mL) y calculando los valores de recuperación con las desviaciones estándar relativas correspondientes ( $n = 6$ ) (**Tabla 3.14**). Dos de los tres niveles fortificados correspondieron a los valores más bajos y más altos regulados en Europa (10 y 50 ng/mL), mientras que la tercera concentración se seleccionó para imitar muestras claramente no conformes (100 ng/mL). En el análisis de zumos de manzana y pera se obtuvieron excelentes recuperaciones (94%–98%) para los tres niveles probados, mientras que la precisión estuvo dentro del 1%–12%. Se encontraron resultados similares en el análisis de la compota de manzana, aunque se obtuvo una baja recuperación (66%) para esta matriz al nivel más alto de fortificación (100 ng/mL). Este resultado indica que esta concentración de patulina es probablemente demasiado alta para ser extraída de manera eficiente con la proporción de tampón que se utilizó, por lo que serán necesarios estudios posteriores para abordar esta cuestión. En general, este estudio muestra que el método propuesto es capaz de cuantificar la micotoxina a concentraciones relevantes en aquellas matrices de alimentos donde la patulina se encuentra comúnmente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 3.14.** Estudio de recuperación con muestras alimentarias fortificadas con patulina (n = 6).

Muestra	Recuperación ± SD (%)		
	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L
Zumo de manzana	98 ± 2	94 ± 1	95 ± 5
Zumo de pera	98 ± 10	98 ± 5	95 ± 12
Compota de manzana	100 ± 2	95 ± 1	66 ± 5

Finalmente, el método propuesto se aplicó al análisis de los materiales de referencia y control de calidad empleados previamente en la validación de los inmunoensayos. Cabe recordar que los valores de patulina asignados a estos materiales se obtuvieron de laboratorios acreditados que participaron en ejercicios de comparación entre laboratorios o del consenso de los laboratorios que participaron en las pruebas de aptitud. Como se muestra en la **Tabla 3.15**, los resultados analíticos fueron altamente consistentes con los valores esperados y estuvieron dentro de los rangos satisfactorios reportados por el proveedor, lo que permite confirmar que este método es muy prometedor para el análisis rutinario de patulina en productos alimentarios.

**Tabla 3.15.** Determinación de patulina por el método propuesto en materiales de referencia y control de calidad (n = 3).<sup>a</sup>

Muestra	Valor asignado	Rango satisfactorio	Valor obtenido ± SD
T1668QC <sup>b</sup>	9.3	5.2 – 13.4	12.8 ± 1.6
TYG060RM <sup>b</sup>	20.1 ± 1.4 <sup>d</sup>	- <sup>e</sup>	16.6 ± 1.9
T1672QC <sup>b</sup>	39.6	22 – 57	26.1 ± 2.7
QBS_BV280_520 <sup>c</sup>	29.3 ± 8.1 <sup>d</sup>	13.2 – 45.4	27.1 ± 1.3

<sup>a</sup> Los valores están expresados en ng/mL y corresponden a la media de tres determinaciones independientes. <sup>b</sup> Zumo distribuido por FAPAS. <sup>c</sup> Zumo distribuido por *LGC Standards*. <sup>d</sup> Valor asignado ± Exp.SD (ng/mL). <sup>e</sup> Rango satisfactorio no indicado.

Si bien la necesidad de una derivatización previa del analito podría concebirse inicialmente como un inconveniente para un método LC-QTOF-MS, el procedimiento en su conjunto tiene varias ventajas claves, tales como (i) permite superar los problemas analíticos bien documentados que surgen de la pobre ionización de la patulina en condiciones de ionización a presión atmosférica; (ii) demuestra una elevada selectividad, pues el aducto formado proviene exclusivamente de la reacción entre el derivatizante y la patulina; (iii) no requiere solventes orgánicos nocivos, solo agua; (iv) se puede implementar en sistemas cromatográficos automatizados, ya que el aducto formado es estable durante horas a temperatura ambiente; y (v) las muestras se determinan después de una simple dilución en tampón fosfato, sin pasos previos de extracción o limpieza.

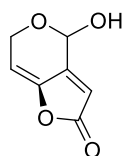
## 4 CONCLUSIONES

Al comienzo de esta tesis doctoral se propuso como *objetivo principal* el desarrollo de métodos inmunoanalíticos para la detección de la micotoxina patulina en matrices alimentarias. El cumplimiento de este objetivo requería necesariamente de la generación de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia patulina, un reto de especial relevancia dado que hasta la fecha no existían evidencias claras de haberse conseguido.

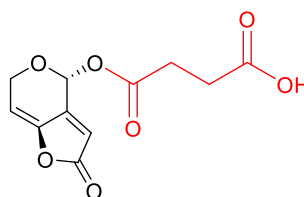
Tal y como evidencian los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, este objetivo se ha alcanzado con éxito, lo que ha posibilitado el desarrollo de ensayos, tanto ELISA como tiras inmunorreactivas, que permiten la determinación de patulina en muestras de zumo de manzana con elevada precisión y exactitud. A continuación, se relacionan las conclusiones y logros particulares de este trabajo:

- ❖ Siguiendo estrategias previamente descritas, se han preparado los haptenos **C4** y **C7** con el fin de evaluar su capacidad para inducir la generación de anticuerpos anti-patulina. Además, se ha preparado un tercer hapteno (**C6**), sintetizado por primera vez en esta tesis doctoral, que introduce mínimas modificaciones estructurales en la molécula de patulina.

## CONCLUSIONES

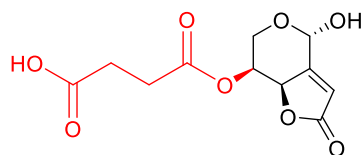


**Patulina**



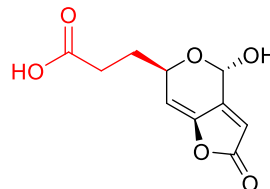
**Hapteno C4**

(Aproximación Mehl *et al.*)



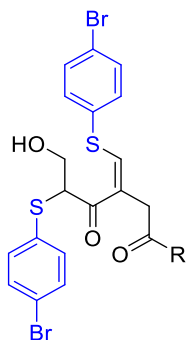
**Hapteno C7**

(Aproximación de Champdoré *et al.*)



**Hapteno C6** (Nueva aproximación)

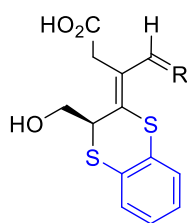
- ❖ Tras la inmunización de conejos con los conjugados de los haptenos sintetizados, se ha comprobado que los antiseros obtenidos mediante esta estrategia no son capaces de reconocer patulina en ELISA competitivo. Estudios complementarios han permitido determinar que, muy probablemente, la modificación estructural del inmunógeno, debido a la reactividad de patulina frente a ataques nucleofílicos, es la razón por la cual la producción de anticuerpos de elevada afinidad hacia el esqueleto intacto de la micotoxina no es posible.
- ❖ Ante el fracaso de las estrategias convencionales, se ha evaluado la viabilidad de desarrollar un procedimiento inmunoanalítico para la detección de patulina que implica una reacción previa de derivatización. En un primer estudio, se han preparado diversos aductos de patulina con aril monotoles y se ha comprobado la capacidad del conjugado derivado del aducto **V** (conjugado BSA-**V4**) para generar anticuerpos con una afinidad en el rango nanomolar (LOD = 35 nM). Este resultado demostraba la viabilidad de esta estrategia para el desarrollo de métodos basados en anticuerpos para la inmunodetección de esta esquiva micotoxina.



Aducto **V**: R = OH

Hapteno **V4**: R = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H

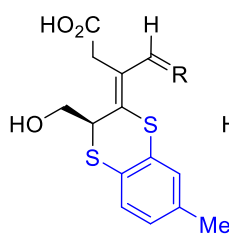
- ❖ En un segundo estudio, se ha desarrollado un novedoso método de derivatización de patulina, en condiciones muy favorables para su implementación como método de derivatización previo al inmunoensayo, basado en la reacción de la micotoxina con aril-1,2-ditioles y que conduce a la formación de aductos más estables con un mayor potencial inmunogénico.
- ❖ A partir de algunos de estos aductos ditiolados (aductos **VII**, **VIII** y **XI**), se han preparado los correspondientes haptenos que incorporan un brazo oximínico carboxilado (haptenos **VIIa**, **VIIIa** y **XIa**) o azidado (haptenos **VIIb**, **VIIIb** y **XIb**). Estos derivados funcionalizados se conjugaron covalentemente a proteínas utilizando un acoplamiento mediado por carbodiimida (haptenos carboxilados) o una reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por Cu(I) (CuAAC; haptenos azidados).



Aducto **VII**: R = O

Hapteno **VIIa**: R = NOCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H

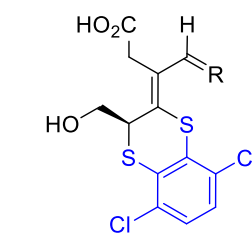
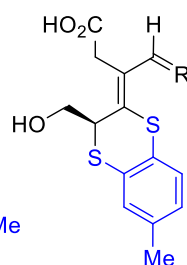
Hapteno **VIIb**: R = NO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>N<sub>3</sub>



Aducto **VIII**: R = O

Hapteno **VIIIa**: R = NOCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H

Hapteno **VIIIb**: R = NO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>N<sub>3</sub>



Aducto **XI**: R = O

Hapteno **XIa**: R = NOCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H

Hapteno **XIb**: R = NO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

- ❖ Se ha obtenido una familia de anticuerpos policlonales de conejo y monoclonales de ratón mediante la inmunización con conjugados de los haptenos **XI**, **VIIa**, **VIIIa**, **XIa** y **XIb**.
- ❖ La caracterización de los anticuerpos monoclonales en términos de afinidad y selectividad hacia los correspondientes aductos, así como hacia la patulina derivatizada *in situ*, ha permitido seleccionar varias combinaciones de inmunorreactivos con prestaciones analíticas adecuadas para el desarrollo de ELISAs y de tiras inmunorreactivas.
- ❖ El ELISA desarrollado en el formato de anticuerpo inmovilizado, basado en el mAb **XIa**#338 en combinación con su trazador homólogo, se ha aplicado a muestras de zumo de manzana, obteniéndose excelentes resultados en términos de precisión y exactitud.
- ❖ La combinación del mAb **XIa**#325 y el conjugado BSA-**XIa** ha permitido el desarrollo de una tira inmunorreactiva que se ha validado siguiendo las directrices

## CONCLUSIONES

---

del Reglamento 519/2014 de la UE, demostrando así su validez como método rápido de cribado, incluso a concentraciones de 5 ng/mL.

- ❖ Finalmente, la aplicación de ambas técnicas a muestras de referencia, así como a muestras adquiridas de tiendas locales, ha demostrado la aplicabilidad de ambos ensayos para la determinación de patulina a los niveles establecidos por la legislación europea.

Una vez finalizado el desarrollo de inmunoensayos, y con el objetivo de contribuir a ampliar las metodologías disponibles para la determinación de patulina, se ha evaluado la aplicabilidad de la estrategia de derivatización para el desarrollo de un método basado en LC-QTOF-MS.

- ❖ Se ha caracterizado el aducto **VII** mediante espectrometría de masas, y se han determinado las prestaciones analíticas del método mediante la utilización de patrones, alcanzándose un LOD instrumental de 0.5 ng/mL.
- ❖ El análisis de muestras fortificadas de zumo de manzana y pera, así como de compota de manzana, ha permitido establecer la precisión y exactitud del método en muestras de interés alimentario.
- ❖ Por último, la determinación de la concentración de patulina en materiales de referencia y control de calidad ha demostrado su aplicabilidad en condiciones reales.



## 5 EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 5.1 Reagents, instruments and techniques

#### 5.1.1 Hapten preparation

Benzene and tetrahydrofuran (THF) were distilled over sodium and benzophenone under nitrogen atmosphere just before use.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and MeCN were distilled from  $\text{CaH}_2$  in the same way.<sup>182</sup> Anhydrous *N,N*-dimethylformamide (DMF), MeOH, and acetone were purchased from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Patulin was purchased from Fermentek (Jerusalem, Israel). The remaining solvents and commercial reagents were used without prior purification. The operations with air and/or moisture-sensitive reagents were carried out under an inert atmosphere of dry nitrogen, using syringes or cannulas, oven-dried (140 °C) glass material, and freshly distilled and dried solvents. Reactions were monitored by thin-layer chromatography on precoated silica plates (0.25 mm layer thickness, Silica Gel 60 F<sub>254</sub>) using UV light as the visualizing agent and ethanolic phosphomolybdic acid or aqueous ceric ammonium molybdate solutions and heat as developing agents. The synthesized compounds were purified by flash column chromatography using silica gel 60 (particle size 0.043–0.063 mm). Melting points (Mp) were determined on a Büchi M-560 apparatus and are uncorrected. Optical rotations were recorded on a Perkin Elmer Mod. 343 polarimeter at a temperature of 20 °C, using a 1 dm cell and the solvent specified in each case; concentrations of the solutions are expressed in g/100 mL. IR spectra were recorded using a Nicolet Avatar 320 FT-IR spectrophotometer equipped with ATR (IR band intensities: w = weak, m = medium, s = strong). <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 25 °C, in the solvent indicated, at 300/75 MHz (Bruker Avance DPX300 spectrometer) or 500/125 MHz (Bruker

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

---

Avance DRX500). The chemical shifts are expressed in ppm ( $\delta$  scale) relative to the residual solvent as the internal reference in all cases [7.27/77.00 ppm, 2.05/29.84 ppm, 3.31/49.00 ppm and 4.79 ppm for the  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  spectra in  $\text{CDCl}_3$ , acetone- $d_6$ , methanol- $d_4$  and  $\text{D}_2\text{O}$ , respectively]. Carbon substitution degrees were established by DEPT pulse sequences. Complete assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of selected compound was made based on a combination of COSY, HSQC and NOESY experiments. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electrospray ionization (ESI) mode in a premier Q-TOF mass spectrometer equipped with an electrospray source (Waters, Manchester, UK). The obtained data are expressed as mass/charge ratio ( $m/z$ ).

### 5.1.2 Buffers and solutions

Aqueous solutions and buffers preparation was carried out employing ultrapure MilliQ® water generated in a Merck-Millipore system (Billerica, MA, USA). All purchased salts and reagents were used without purification.

**Coating buffer:** 50 mM  $\text{Na}_2\text{HCO}_3/\text{NaH}_2\text{CO}_3$  buffer, pH 9.6.

**Washing solution:** 150 mM NaCl and 0.05% (v/v) Tween-20.

**Substrate buffer:** 25 mM citric acid and 62 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 5.4.

**Substrate solution:** 2 mg/mL OPD and 0.012% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in substrate buffer.

**Stop solution:**  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M.

**SAS:** saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**PBS:** 11 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4.

**PBS-T:** PBS with 0.05% (v/v) Tween-20.

**PB20:** 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4.

**PB50:** 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4.

**PB100:** 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4.

**PB200:** 200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4.

**PB75:** 75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4.

**PB75-T:** 75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer with 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4.

**PBS-BSA-thimerosal:** 1% (m/v) BSA and 0.01% (m/v) thimerosal in PBS.

**Tris75:** 75 mM Tris-HCl buffer and 100 mM NaCl, pH 7.4.

**Tris75-T:** 75 mM Tris-HCl buffer with 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4.

### 5.1.3 Conjugate preparation

Bovine serum albumin (BSA, fraction V, cat. no. 10735094001) was purchased from Roche Applied Science (Mannheim, Germany). Ovalbumin (OVA, V grade, cat. no. A2512), was provided by Sigma/Aldrich (Madrid, Spain) and horseradish peroxidase (HRP, cat. no. 31490, activity: 307 U/mg) was from ThermoFisher Scientific (Madrid, Spain). Conjugate purification was carried out by size-exclusion chromatography employing an ÄKTA purifier system with UV detection and using 5-mL Sephadex G-25 HiTrap Desalting columns purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Three columns were employed to purify BSA and OVA conjugates, and two columns to purify HRP conjugates, using PB buffer as eluent in all cases. Dialysis was carried out in 300  $\mu$ L Slide-a-Lyzer dialysis cassettes with 30 kDa membranes from Fisher Scientific. Analysis of hapten bioconjugates was performed by mass spectrometry in a 5800 MALDI TOF-TOF from ABSciex (Framingham, MA, USA) in positive linear mode (1500 shots for each position) in a mass range of 10000-120000  $m/z$ . Matrix for MALDI-TOF analysis consisted of a solution containing sinapinic acid (5 mg/mL) and 2,2,2-trifluoroacetic acid (0,1% v/v) in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (7:3 (v/v)) from (Bruker, Billerica, MA, USA).

### 5.1.4 Antibody production and cell culture

Animals were supplied by Granja San Bernardo (Navarra). Female New Zealand rabbits [CrI:KBL(NWZ)] and female BALB/c mice (BALB/cAnNCrI) were kept and cared for by the Animal Production section from the Central Support Service for Experimental Research (SCSIE) (University of Valencia) for the entire immunization process. Animal manipulation was performed in compliance with the European Directive 2010/63/EU and the Spanish laws and guidelines (RD1201/2005 and 32/2007) concerning the protection of animals used for scientific purposes.<sup>183-185</sup> Sterile plastic material was used throughout the whole immunization and cell culture process.

Mouse plasmocytoma cell line P3-X63-Ag 8.653 from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, United Kingdom) was purchased from Sigma. Cell cultures were stored in a ThermoElectron incubator (Waltham, MA, USA) at 37 °C under 90% humidity and 5% CO<sub>2</sub> conditions. Cell counting was carried out employing a Neubauer hemocytometer. Sterile meshes (EASYstrainer™, 70  $\mu$ m) for culture medium filtration were obtained from Greiner Bio-One (Kremsmunster, Austria) and Nunc® Cryotubes for cell lines conservation in liquid N<sub>2</sub> were provided by Sigma-Aldrich.

Complete and incomplete Freund adjuvants, Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, high glucose content, cat. no. D6546), fetal bovine serum (FBS, cat. no. F7524), *L*-alanine-*L*-

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

---

glutamine solution (*L*-Ala-*L*-Gln, 200 mM), non-essential amino acids (NEAA, 100×), Hybri-Max erythrocytes lysis buffer and polyethylene glycol (PEG 1500, cat. no. P7181) were obtained from Sigma-Aldrich. Gentamicin (50 mg/mL, cat. no. G1397), HT supplement (hypoxanthine 5 mM, thymidine 0.8 mM, cat. no. 41065-012) and HAT supplement (HT supplemented with aminopterin 20 μM, cat. no. 21060-017) were purchased from Gibco BRL (Paisley, United Kingdom). Hybridoma fusion and cloning supplement (HFCS, 50×, Roche, cat. no. 11363735001) and DMSO Hybri-Max (cat. no. D2650) were provided by Sigma. All media and supplements were acquired in sterile conditions. The following culture media were prepared from the commercial media and supplements:

**Incomplete medium:** DMEM with 2 mM *L*-Ala-*L*-Gln, 25 μg/mL NEAA and 25 μg/mL gentamicin.

**Complete medium:** Incomplete medium with 10% FBS (v/v).

**Post-fusion medium:** Incomplete medium with 15% FBS (v/v).

**HT-HFCS medium:** Incomplete medium with 20% FBS (v/v), 100 μM hypoxanthine, 16 μM thymidine and 1% HFCS (v/v).

**HAT medium:** HT-HFCS medium with 0.4 μM aminopterin.

**Cryopreservation medium:** FBS with 10% DMSO (v/v).

Purification of monoclonal antibodies from late stationary phase hybridoma cell cultures was carried out by affinity chromatography using a 5-mL HiTrap Protein G HP column and a 5-mL Sephadex G-25 HiTrap Desalting column, both purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden), and stored at 4 °C as ammonium sulphate precipitates. Centrifugation-filtration of the purified monoclonal antibodies was performed in Amicon Ultra-4 tubes from Merck-Millipore (Billerica, MA, USA) with 30 kDa cellulose membranes.

Heavy chains mouse monoclonal antibody isotyping was accomplished by employing Calbiochem Hybridoma Subisotyping Kit from Merck-Millipore (cat. no. 386445). Rabbit anti-mouse immunoglobulins from Rockland Immunochemicals Inc (Limerick, PA, USA) were used for light chains isotyping.

### 5.1.5 Immunoassays

*o*-Phenylenediamine, Tween-20 and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) were purchased from Sigma-Aldrich. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine was provided by ZEULAB S.L. (Zaragoza). Goat anti-rabbit immunoglobulins and goat anti-mouse immunoglobulins were obtained from Rockland Inc. (Limerick, PA, USA, cat. no. 611-1102) and Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA, cat. no. 115-005-008), respectively. Peroxidase-labeled rabbit anti-

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

---

mouse immunoglobulins antibody conjugate was obtained from Dako (Glostrup, Denmark, cat. no. P026002-2) and peroxidase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulins antibody conjugate from Bio-Rad Laboratories (Madrid, cat. no. 170-6515). Costar flat-bottom high-binding 96-well polystyrene ELISA plates were purchased from Corning (Corning, NY, USA, cat. no. 3590). ELISA absorbance was determined employing a PowerWave HT from BioTek Instruments (Winooski, VT, USA). Microplate wells were washed with an ELx405 microplate washer also from BioTek Instruments. Nitrocellulose membranes (pore size: 15  $\mu\text{m}$ ) were obtained from MDI Membrane Technologies (Ambala, India, cat. no. 70CNPH-N-SS40) and backing cards were purchased from Kenosha (Amstelveen, The Netherlands). Cellulose sample pad (cat. no. CFSP173000) and absorbent pad were acquired from Merck-Millipore (Billerica, MA, USA) and Ahlstrom-Munksjö (Manchester, UK), respectively. 40-nm GAM-modified gold nanoparticles (OD = 10) were obtained from BBI solutions (Crumlin, UK, cat. no. BA.GAM40). A ZX1010 system from Biodot (West Sussex, UK) was employed for dispensing the immunoreagents onto the nitrocellulose membrane, immunostrips were manually assembled and cut using a CM5000 guillotine from Biodot. Immunostrips were scanned using an EPSON V39 scanner and RGB signal was processed using ImageJ (version 1.52a) free software.

### 5.1.6 High resolution mass spectrometry (QTOF-MS)

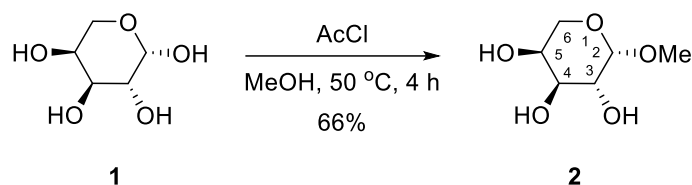
Acetonitrile UHPLC Hipergradient (purity 99.9%) was supplied by PanReac AppliChem (Castellar del Vallés, Spain). HPLC-grade water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Ltd, Bedford, MA). Reference and quality control materials contaminated with patulin were provided by FAPAS (York, UK) and LGC Standards (Barcelona, Spain). LC-QTOF-MS analysis was carried out using an Agilent Technologies 1290 Infinity II Series LC coupled with a 6546 LC/Q TOF with Jet Stream source from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), equipped with an electrospray ionization Dual Jet Stream ion source (Dual AJS ESI). Chromatographic separation was achieved on a Gemini<sup>®</sup> NX-C18 (3  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  2 mm ID) and a guard column C18 (4  $\times$  2 mm, ID; 3  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in Milli Q water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) with a 25 min gradient. The mobile phase gradient (10–95% B) steps were applied as follows: 0–2 min, 10% B; 2–5 min, 70% B; 5–7 min, 80% B; 7–8 min, 90% B; 8–12 min, 90% B; 12–16 min, 95% B; 16–18 min, 50% B; 18–22 min, 10% B. The injection volume was 10  $\mu\text{L}$ . The mass spectrometry analysis was carried out with the following QTOF-MS conditions: drying gas flow ( $\text{N}_2$ ), 10 L/min; nebulizer pressure, 40 psi; gas drying temperature, 300  $^\circ\text{C}$ ; capillary voltage, 3500 V; fragmentor voltage, 120 V; skimmer voltage, 70 V; and octopole RF peak, 750 V. The Agilent Dual Jet Stream electrospray ionization (Dual

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

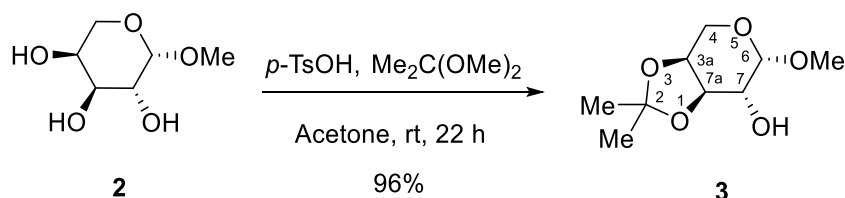
AJS ESI) interface was used in the positive and negative ionization modes, and ions were acquired in the range of 100–1700  $m/z$  for MS scans at a scan rate of five spectra/s for MS. Internal mass correction was enabled by using two reference masses in positive mode at 121.050873 and 922.009798 and two in negative mode at 112.985587 and 1033.988109  $m/z$ . Instrument control and data acquisition were performed using MassHunter Workstation software B.10.1. All of the MS data of the validation standards were integrated by MassHunter Qualitative Analysis B.10.0 and MassHunter Quantitative Analysis B.10.0 (Agilent Technologies).

### 5.2 Hapten and adduct synthesis

#### 5.2.1 Synthesis of haptens **C4** and **C7**



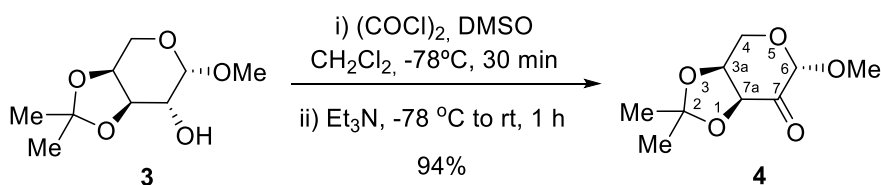
**Preparation of (2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-2-methoxytetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (**2**).** Acetyl chloride (2 mL, 28 mmol, 2.1 equiv) was added dropwise to 70 mL of dry methanol in an ice bath and stirred for 30 minutes. Once room temperature was reached, L-(+)-arabinose (**1**) (9.0 g, 60 mmol) was added and the mixture was stirred at 50 °C for 4 hours. The mixture was then cooled to 0 °C for 1 hour allowing product **2** to crystallize. The obtained crystals were filtered and washed with cold methanol to afford **2** (6.49 g, 66%) as white crystals. Mp 165–168 °C (MeOH) [Lit.<sup>186</sup> 166–168 °C];  $[\alpha]_D^{25} = +235^\circ$  (c 1.1, MeOH); IR  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3355s, 2491m, 1652w, 1456w, 1198w, 1142w, 1064w, 998w;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.84 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H, H-2), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.88 (dd,  $J = 15.0, 3.0$  Hz, 1H, H-6), 3.85 (m, 2H, H-3 and H-5), 3.66 (dd,  $J = 15.0, 3.0$  Hz, 1H, H'-6), 3.42 (s, 3H, MeO);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  100.3 (C-2), 69.3 (C-4), 69.2 (C-3), 68.5 (C-5), 62.9 (C-6), 55.6 (MeO); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NaO}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  187.0582, found 187.0582.



**Preparation of (3*aS*,6*S*,7*R*,7*aR*)-6-methoxy-2,2-dimethyltetrahydro-3*aH*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyran-7-ol (**3**).** Compound **2** (2.0 g, 12.12 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (5.2 mg, 0.028 mmol, 0.002 equiv) were dissolved in dry acetone (32 mL). 2,2-

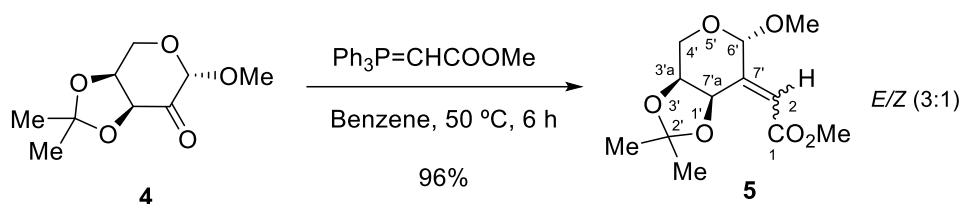
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

Dimethoxypropane (1.56 mL, 12.74 mmol, 1.05 equiv) was added and the mixture was stirred for 22 hours at room temperature. The mixture was then concentrated under reduced pressure, dissolved in EtOAc, washed with a 5% aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, concentrated in vacuo, and finally purified by silica gel flash chromatography, using CHCl<sub>3</sub> as eluent, to afford **3** (2.39 g, 96%) as a clear oil. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +213° (c 1.1, CHCl<sub>3</sub>) {Lit.<sup>142</sup> [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +218.8°}; IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3383m, 2941m, 1732w, 1447w, 1359w, 1192w, 1137w, 1061m, 995w, 941w, 882w, 837w, 773w, 702w; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.71 (dd,  $J$  = 3.6, 0.6 Hz, 1H, H-6), 4.21 (dt,  $J$  = 5.8, 1.9 Hz, 1H, H-3a), 4.17 (dd,  $J$  = 6.8, 5.8 Hz, 1H, H-7a), 3.92 (m, 2H, H-4), 3.76 (ddd,  $J$  = 7.3, 6.8, 3.6 Hz, 1H, H-7), 3.43 (s, 3H, MeO), 2.35 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, OH), 1.54 and 1.37 (each s, each 3H, Me<sub>2</sub>C); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  109.4 (C-2), 98.9 (C-6), 76.2 (C-3a), 76.1 (C-7a), 70.3 (C-7), 59.4 (C-4), 55.8 (MeO), 28.1 and 26.1 (Me<sub>2</sub>C); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 277.0895, found 277.0890.

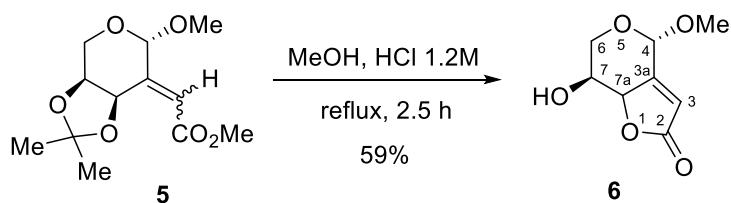


**Preparation of (3a*S*,6*S*,7a*S*)-6-methoxy-2,2-dimethyldihydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyran-7(4*H*)-one (4).** DMSO (0.98 mL, 13.85 mmol, 2.8 equiv) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.4 mL) was added dropwise over 5 min to a solution of (COCl)<sub>2</sub> (0.59 mL, 6.92 mmol, 1.4 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11.5 mL) and the mixture was stirred for 15 minutes at -78 °C. Compound **3** (1.00 g, 4.95 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11.5 mL) was then added dropwise and the reaction mixture was stirred for 30 min, followed by the addition of Et<sub>3</sub>N (4.12 mL, 29.67 mmol, 6 equiv). The mixture was then stirred for a further 10 min at -78 °C, and then allowed to warm to room temperature and stirred for 1 hour. The mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, concentrated in vacuo, and purified by silica gel flash chromatography, using CHCl<sub>3</sub>-MeOH (95:5) as eluent, to afford ketone **4** (0.94 g, 94%) as a yellowish solid. Mp 93-94°C (CHCl<sub>3</sub>) [Lit.<sup>187</sup> 88-91°C]; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +166° (c 0.4, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 2986m, 2936m, 1751s, 1662w, 1455w, 1382w, 1224w, 1159w, 1119w, 1074s, 1029m, 969w, 891w, 868w, 847w, 784w, 766w; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.69 (s, 1H, H-6), 4.67 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, H-7a), 4.52 (ddd,  $J$  = 5.6, 2.1, 0.9 Hz, 1H, H-3a), 4.22 (dd,  $J$  = 13.4, 2.1 Hz, 1H, H-4), 4.06 (dd,  $J$  = 13.4, 0.9 Hz, 1H, H'-4), 3.48 (s, 3H, MeO), 1.45 and 1.38 (each s, each 3H, Me<sub>2</sub>C); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  198.9 (C-7), 110.6 (C-2), 101.3 (C-6), 78.1 (C-7a), 75.8 (C-3a), 58.8 (C-4), 52.1 (MeO), 27.6 and 26.5 (Me<sub>2</sub>C); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 203.0875, found 203.0914.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES



**Preparation of methyl 2-((3a*S*,6*S*,7a*R*)-6-methoxy-2,2-dimethyl-3aH-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyran-7(4*H*,6*H*,7a*H*)-ylidene)acetate (5).** Ketone **4** (727.0 mg, 3.60 mmol) and methyl 2-(triphenylphosphoranylidene)acetate (1.36 g, 4.07 mmol, 1.1 equiv) were suspended in dry benzene (12 mL) under nitrogen. The mixture was heated at 50 °C and stirred for 6 hours. The resulting mixture was concentrated in vacuo and purified by silica gel flash chromatography, using hexane/EtOAc (8:2) as eluent, to afford unsaturated methyl ester **5** (880 mg, 96%) as a yellowish oil, a 3:1 mixture of *E/Z* stereoisomers. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2985w, 2935w, 2828w, 1721s, 1669w, 1435w, 1380w, 1320w, 1244w, 1152w, 1128w, 1066w, 1038w, 1013w, 986w, 961w, 936w, 908w, 875w, 850w;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (only signals of the predominant *E*-isomer are given)  $\delta$  6.35 (dd,  $J = 1.8, 0.7$  Hz, 1H, H-2), 6.02 (dt,  $J = 7.5, 0.5$  Hz, 1H, H-7'a), 5.23 (dd,  $J = 1.9, 0.4$  Hz, 1H, H-6'), 4.32 (dt,  $J = 7.5, 1.7$  Hz, 1H, H-3'a), 3.75 (s, 3H,  $\text{MeO}_2\text{C-1}$ ), 3.64 (d,  $J = 1.7$  Hz, 2H, H-4'), 3.47 (s, 3H, MeO), 1.53 and 1.40 (each d,  $J = 0.7$  Hz, 3H each,  $\text{Me}_2\text{C}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (only signals of the predominant *E*-isomer are given)  $\delta$  166.0 (C-1), 148.2 (C-7'), 123.7 (C-2), 110.6 (C-2'), 97.8 (C-6'), 75.2 (C-3'a), 68.6 (C-7'a), 63.1 (C-4'), 55.6 (MeO), 51.9 ( $\text{MeO}_2\text{C-1}$ ), 26.5 and 25.4 ( $\text{Me}_2\text{C}$ ); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NaO}_6$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  281.0996, found 281.1007.

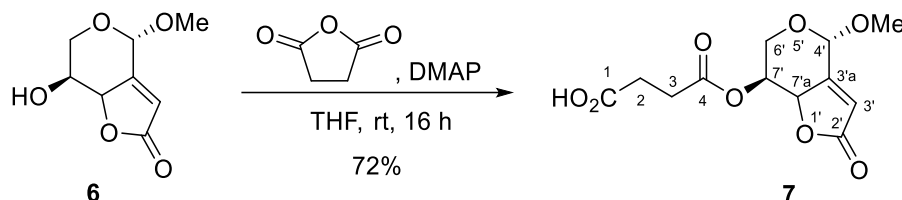


**Preparation of (4*S*,7*S*,7a*R*)-7-hydroxy-4-methoxy-4,6,7,7a-tetrahydro-2*H*-furo[3,2-*c*]pyran-2-one (6).** The mixture of  $\alpha,\beta$ -unsaturated esters **5** (313 mg, 1.21 mmol) and 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (25.1 mg, 0.11 mmol, 0.1 equiv) were dissolved in anhydrous methanol (13 mL) under nitrogen. Aqueous 1.2 M HCl solution (300  $\mu\text{L}$ , 0.36 mmol, 0.3 equiv) was then added and the mixture was stirred at reflux for 2.5 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature and then extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , concentrated in vacuo, and purified by silica gel flash chromatography, using hexane-EtOAc (1:1) as eluent, to afford hydroxy  $\gamma$ -lactone **6** (132.2 mg, 59%) as a white solid. Mp 126-127°C ( $\text{CHCl}_3$ ) [Lit.<sup>187</sup> 134-136°C];  $[\alpha]_{\text{D}} = +236^\circ$  (c 0.9,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3446s, 3106m, 2936s, 1784m, 1747s, 1436w, 1346w, 1312w, 1230w,

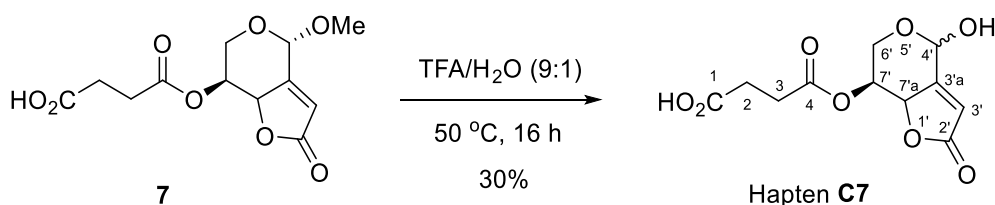


## EXPERIMENTAL PROCEDURES

1193m, 1142m, 1094m, 1051m, 1023m, 971w, 891m, 841w, 801w;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.99 (dd,  $J = 1.9, 0.8$  Hz, 1H, H-3), 5.48 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1H, H-4), 5.13 (ddd,  $J = 4.1, 1.9, 0.6$  Hz, 1H, H-7a), 4.36 (t,  $J = 4.2$  Hz, 1H, H-7), 3.99 (d,  $J = 12.7$  Hz, 1H, H-6), 3.84 (dd,  $J = 12.7, 2.3$  Hz, 1H, H'-6), 3.48 (s, 3H, MeO);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.4 (C-2), 159.9 (C-3a), 115.5 (C-3), 95.6 (C-4), 78.3 (C-7a), 69.7 (C-7), 61.3 (C-6), 55.5 (MeO); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  187.0601, found 187.0594.



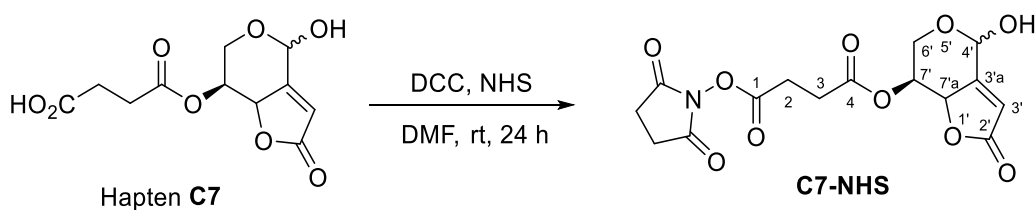
**Preparation of 4-(((4*S*,7*S*,7*aR*)-4-methoxy-2-oxo-4,6,7,7*a*-tetrahydro-2*H*-furo[3,2-*c*]pyran-7-yl)oxy)-4-oxobutanoic acid (**7**).** Alcohol **6** (10 mg, 0.054 mmol) was dissolved in dry THF (0.3 mL) under nitrogen. Succinic anhydride (53.8 mg, 0.537 mmol, 10 equiv) and 4-dimethylaminopyridine (0.7 mg, 6  $\mu\text{mol}$ , 0.1 equiv) were dissolved in dry THF (0.6 mL) and added dropwise. The mixture was stirred 20 hours at room temperature before being diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (2 mL) and extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic layers were then washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated in vacuo. The residue obtained was purified by chromatography, using  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (95:5) as eluent, to obtain acid **7** (11 mg, 72%) as an amorphous white solid. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2937w, 1788m, 1743s, 1413m, 1382w, 1348m, 1195m, 1164m, 1054m, 1100m, 975m, 862w, 800w;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.02 (dd,  $J = 2.0, 0.8$  Hz, 1H, H-3'), 5.51 (s, 1H, H-4'), 5.49 (ddd,  $J = 4.0, 1.8, 1.0$  Hz, 1H, H-7'), 5.20 (dd,  $J = 4.3, 1.9$  Hz, 1H, H-7'a), 4.01 (dt,  $J = 13.1, 0.8$  Hz, 1H, H-6'), 3.87 (dd,  $J = 13.3, 2.2$  Hz, 1H, H'-6'), 3.49 (s, 3H, MeO), 2.74-2.53 (m, 4H, H-2 and H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176.8 (C-1), 171.8 (C-4), 171.1 (C-2'), 159.2 (C-3'a), 115.3 (C-3'), 95.5 (C-4'), 75.5 (C-7'a), 70.5 (C-7'), 59.3 (C-6'), 55.6 (MeO), 29.0 and 28.8 (H-2 and H-3); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_8$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  287.0761, found 287.0766.



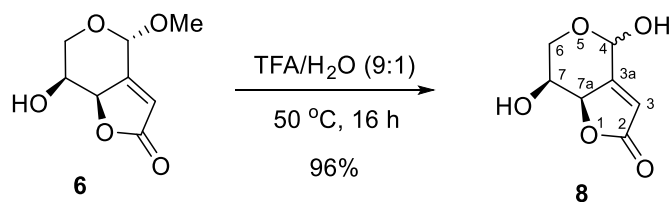
**Preparation of 4-(((4*S*,7*S*,7*aR*)-4-hydroxy-2-oxo-2,6,7,7*a*-tetrahydro-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-7-yl)oxy)-4-oxobutanoic acid (Hapten **C7**).** Compound **7** (8.4 mg, 0.029 mmol) was dissolved in a 9:1 mixture of trifluoroacetic acid- $\text{H}_2\text{O}$  (0.6 mL) and stirred at 45-50  $^\circ\text{C}$

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

overnight. The mixture was then concentrated in vacuo and purified by silica gel flash chromatography, using  $\text{CHCl}_3$ -isopropyl alcohol (95:5) as eluent, to afford hapten **C7** (2.4 mg, 30%) as a clear film. As observed by  $^1\text{H}$  NMR, the product was an approximately 7:3 mixture of the two hemiacetal epimers at C-4', in equilibrium with a small percentage of the open hydroxy-aldehyde form. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3404w, 1735s, 1416w, 1161m, 1054m, 1010m;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone  $d_6$ ) [only signal of the major epimer are given]  $\delta$  6.07 (dd,  $J = 2.0, 0.8$  Hz, 1H, H-3'), 6.06 (s, 1H, H-4'), 5.53 (ddd,  $J = 4.4, 2.2, 0.9$  Hz, 1H, H-7'), 5.44 (ddd,  $J = 4.5, 1.9, 0.5$  Hz, 1H, H-7'a), 4.33 (ddd,  $J = 13.3, 1.0, 0.6$  Hz, 1H, H-6'), 3.78 (dd,  $J = 13.3, 2.3$  Hz, 1H, H'-6'), 2.58-2.55 (m, 4H, H-2 and H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) [only signal of the major epimer are given]  $\delta$  173.7 (C-1), 173.2 (C-4), 171.9 (C-2'), 162.8 (C-3'a), 114.1 (C-3'), 89.6 (C-4'), 76.1 (C-7'), 71.7 (C-7'a), 59.6 (C-6'), 29.0 (2C, C-2 and C-3); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  273.0605, found 273.0604.



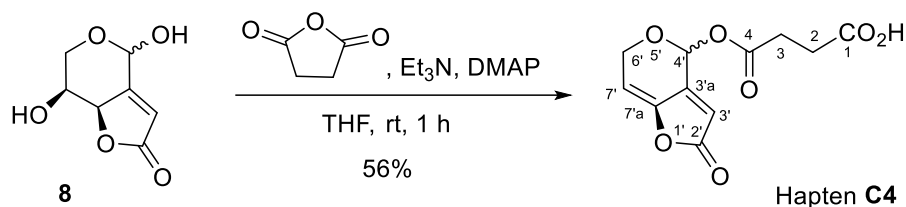
**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ((4*S*,7*S*,7*aR*)-4-hydroxy-2-oxo-2,6,7,7*a*-tetrahydro-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-7-yl) succinate (**C7-NHS**).** A solution of hapten **C7** (2.4 mg, 9  $\mu\text{mol}$ ), NHS (1.0 mg, 9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 equiv) and dicyclohexylcarbodiimide (DCC; 2.2 mg, 9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 equiv) in anhydrous DMF was stirred for 24 hours at room temperature under nitrogen. Upon completion, the reaction mixture was centrifuged to separate the **C7-NHS** ester formed from dicyclohexylurea. The collected supernatant was then directly used for the preparation of hapten-protein conjugates.



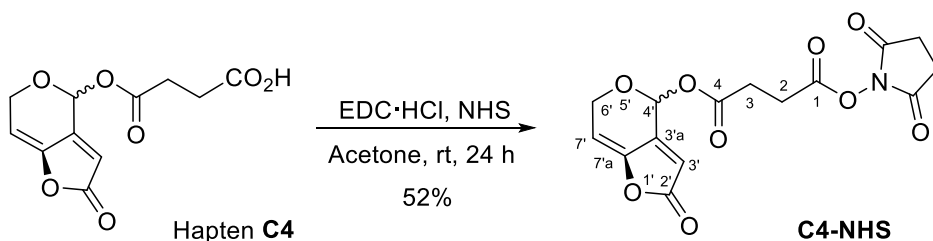
**Preparation of (4*S*,7*S*,7*aR*)-7-hydroxy-4-methoxy-4,6,7,7*a*-tetrahydro-2*H*-furo[3,2-*c*]pyran-2-one (**8**).** Compound **6** (9.4 mg, 0.051 mmol) was dissolved in a mixture 9:1 of trifluoroacetic acid- $\text{H}_2\text{O}$  and stirred overnight at 50  $^\circ\text{C}$ . The mixture was then concentrated in vacuo and purified by silica gel flash chromatography, using  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (95:5) as eluent, to afford **8** (8.6 mg, 96%) as a white solid.<sup>23</sup> IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3356s, 1737s, 1672s, 1452w, 1201s, 1141s, 1016m, 847w, 804m, 728 m;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  5.95 (dd,  $J =$

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

1.9, 0.8 Hz, 1H, H-3), 5.94 (m, 1H, H-4), 5.24 (ddd,  $J = 4.1, 1.9, 0.6$  Hz, 1H, H-7a), 4.34 (ddt,  $J = 4.0, 2.4, 0.9$  Hz, 1H, H-7), 4.23 (ddd,  $J = 12.6, 1.1, 0.6$  Hz, 1H, H-6), 3.69 (dd,  $J = 12.5, 2.4$  Hz, 1H, H'-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.6 (C-2), 163.1 (C-3a), 114.2 (C-3), 89.8 (C-4), 79.0 (C-7a), 70.7 (C-7), 62.4 (C-6); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  173.0444, found 173.0436.



**Preparation of (R)-4-oxo-4-((2-oxo-4,6-dihydro-2H-furo[3,2-c]pyran-4-yl)oxy)butanoic acid (Hapten C4).** Compound **8** (28 mg, 0.162 mmol), succinic anhydride (35.6 mg, 0.356 mmol, 2.2 equiv) and DMAP (2.0 mg, 0.016 mmol, 0.1 equiv) were dissolved in anhydrous THF (0.45 mL) under nitrogen.  $\text{Et}_3\text{N}$  (100  $\mu\text{L}$ , 0.712 mmol, 4.4 equiv) was then added dropwise and stirred for 1 hour at room temperature. The mixture was diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  and acidified with 10% aqueous HCl to a pH of 4-5. The aqueous layer was then extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated in vacuo to give hapten **C4** (24.7 mg, 56%) as an amorphous white solid. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2967w, 2926w, 1862w, 1782s, 1754s, 1421m, 1240m, 1212m, 1230w, 1162m, 1113m, 1063m, 1048s, 921m, 910s, 812w;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  7.04 (s, 1 H, H-3'), 6.19 (dq,  $J = 1.2, 0.6$  Hz, 1H, H-4'), 6.14 (dt,  $J = 4.5, 2.4$  Hz, 1H, H-7'), 4.73 (ddd,  $J = 17.6, 2.4, 1.2$  Hz, 1H, H-6'), 4.52 (dd,  $J = 17.6, 4.5$  Hz, 1H, H'-6'), 2.70-2.60 (m, 4H, H-2 and H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  173.5 (C-1), 173.2 (C-2'), 171.4 (C-4), 168.9 (C-3'a), 148.0 (C-7'a), 112.7 (C-3'), 108.3 (C-7'), 87.9 (C-4'), 61.2 (C-6'), 29.7 (C-3), 28.9 (C-2); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_7$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  272.0765, found 272.0770.

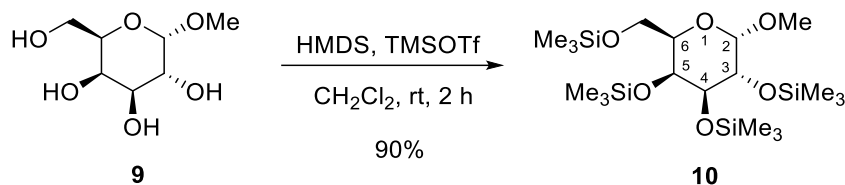


**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (2-oxo-2,6-dihydro-4H-furo[3,2-c]pyran-4-yl) succinate (C4-NHS).** A solution of hapten **C4** (13.3 mg, 0.05 mmol), NHS (13.4 mg, 0.116 mmol, 2.3 equiv) and *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl; 25.0 mg, 0.130 mmol, 2.6 equiv) in anhydrous acetone was stirred for 24 hours under nitrogen atmosphere. Upon completion, the reaction mixture was diluted with  $\text{CHCl}_3$ ,

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

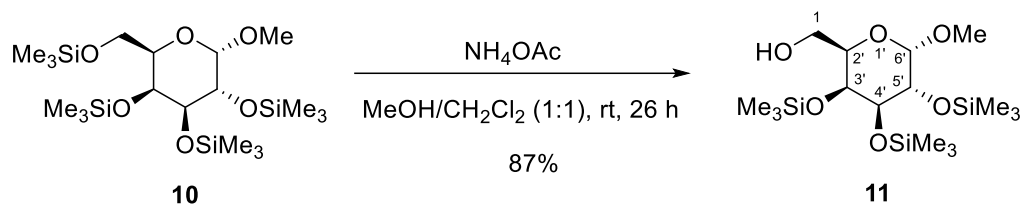
washed with water and brine, and dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . After solvent evaporation, the residue was chromatographed through a small column of silica gel, employing  $\text{CHCl}_3$  as eluent, to obtain the *N*-hydroxysuccinimidyl ester **C4-NHS** (8.4 mg, 52%) as a clear oil.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.02 (d,  $J = 0.5$  Hz, 1H, H-4'), 6.06 (dt,  $J = 1.3, 0.7$  Hz, 1H, H-3'), 5.95 (dt,  $J = 4.5, 2.2$  Hz, 1H, H-7'), 4.72 (ddd,  $J = 17.5, 2.5, 1.3$  Hz, 1H, H-6'), 4.51 (dd,  $J = 17.5, 4.6$  Hz, 1H, H'-6'), 2.98 (m, 2H, H-2), 2.84 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.81 (m, 2H, H-3).

### 5.2.2 Synthesis of hapten **C6**

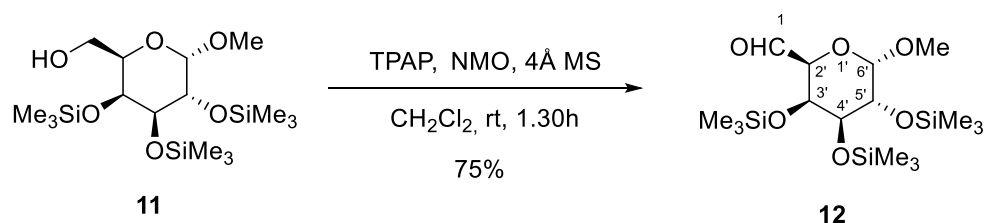


**Preparation of (((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-methoxy-6-(((trimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl)tris(oxy))tris(trimethylsilane) (**10**).** Methyl  $\alpha$ -D-galactopyranoside (**9**) (1.487 g, 7.66 mmol) was dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) under nitrogen. The mixture was then cooled to 0  $^\circ\text{C}$  and hexamethyldisilazane (3.88 mL, 18.5 mmol, 2.4 equiv) and trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (150  $\mu\text{L}$ , 183.7 mg, 0.837 mmol, 0.11 equiv) was added portion wise over 10 min. Upon complete addition, the mixture was warmed to room temperature and stirred for 2h, then diluted with hexane and washed with  $\text{H}_2\text{O}$ . The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated under reduced pressure to give **10** (3.314 g, 90%) as a clear oil. The product was *pure enough by*  $^1\text{H}$  NMR to be used directly in the next step without further purification.  $[\alpha]_{\text{D}} = +73^\circ$  (c 2.2,  $\text{CHCl}_3$ ) {Lit.<sup>188</sup>  $[\alpha]_{\text{D}} = +81.5^\circ$ }; IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2956w, 2897w, 1249m, 1102m, 1042w, 1002w, 967w, 923w, 873m, 832s, 747m, 685w;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.63 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H, H-2), 3.92 (dd,  $J = 9.3, 3.6$  Hz, 1H, H-3), 3.90 (m, 1H, H-5), 3.81 (dd,  $J = 9.6, 2.7$  Hz, 1H, H-4), 3.72 (m, 1H, H-6), 3.64 (dd,  $J = 9.6, 6.9$  Hz, 1H, H-1'), 3.59 (dd,  $J = 9.6, 6.3$  Hz, 1H, H'-1'), 3.37 (s, 3H, MeO), 0.15, 0.14, 0.13 and 0.12 (each s, 9H each, 4xTMS);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  100.9 (C-2), 72.4 (C-5), 71.1 (2C, C-4 and C-6), 69.9 (C-3), 61.5 (C-1'), 55.4 (MeO), 0.8, 0.7, 0.5 and  $-0.4$  (4xTMS); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{46}\text{NaO}_6\text{Si}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  505.2264, found 505.2255.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES



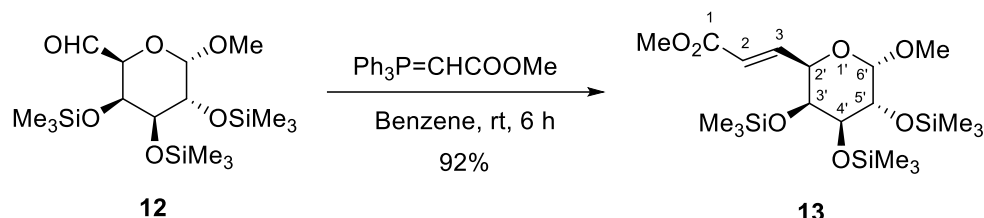
**Preparation of ((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-methoxy-3,4,5-*tris*((trimethylsilyl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)methanol (**11**).** Compound **10** (2.67 g, 5.53 mmol) and ammonium acetate (1.70 g, 22.06 mmol, 4 equiv) were dissolved in a 1:1 mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (92 mL) and stirred at room temperature for 25 hours.<sup>189</sup> The mixture was then concentrated under reduced pressure, dissolved in hexane/ether (1:1), washed with  $\text{H}_2\text{O}$  and brine, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated in vacuo to give alcohol **11** (1.97 g, 87%) as a thick clear oil with sufficient purity to be used in the next step without further purification.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +140^\circ$  (c 0.2,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2956w, 2899w, 1249m, 1143m, 1102m, 1038w, 971w, 924w, 872m, 838s, 750m, 687w;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.66 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-6'), 3.91 (dd,  $J = 9.4, 3.5$  Hz, 1H, H-5'), 3.80 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' and H-1), 3.61 (m, 1H, H'-1), 3.37 (s, 3H, MeO), 2.12 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, OH), 0.14, 0.13 and 0.13 (each s, 9H each, 3xTMS);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  100.9 (C-6'), 77.4 (C-3'), 73.8 (C-2'), 70.9 (C-4'), 69.7 (C-5'), 63.3 (C-1), 55.5 (MeO), 0.8, 0.7 and 0.45 (3xTMS); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{38}\text{NaO}_6\text{Si}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  433.1868, found 433.1867.



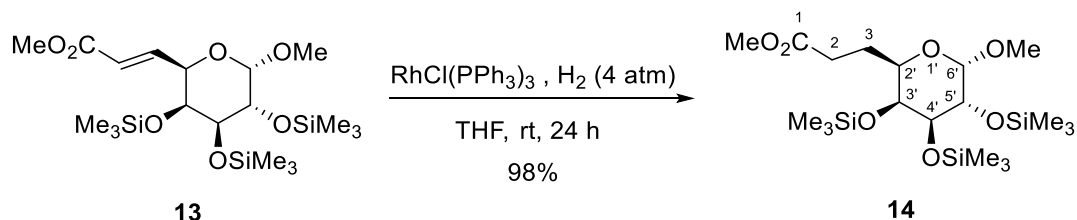
**Preparation of (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-methoxy-3,4,5-*tris*((trimethylsilyl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-2-carbaldehyde (**12**).** A mixture of **11** (2.273 g, 5.33 mmol), *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (NMO) (811 mg, 6.93 mmol), tetrabutylammonium perruthenate (TPAP) (187 mg, 0.53 mmol) and molecular sieves (4.404 g) in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (70 mL) was stirred at room temperature for 1.30h under nitrogen. After this time, isopropanol (3 mL) was added and the mixture was stirred for an additional 30 minutes. The residue left after evaporation of the solvents was chromatographed on silica gel, using a mixture of hexane-EtOAc-Et<sub>3</sub>N (69:30:1) as eluent, to yield aldehyde **12** (1.697 g, 75%) as a yellowish oil.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +60^\circ$  (c 0.2,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3412w, 2954w, 2923w, 2852w, 1781s, 1735s, 1671w, 1438w, 1345w, 1264w, 1170m, 1027m, 867w;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.60 (s, 1H, H-1), 4.79 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-6'), 4.25 (dd,  $J = 2.8, 1.7$  Hz, 1H, H-3'),

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.08 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, H-2'), 3.99 (dd,  $J = 9.4, 3.4$  Hz, 1H, H-5'), 3.83 (dd,  $J = 9.4, 2.8$  Hz, 1H, H-4'), 3.43 (s, 3H, MeO), 0.16, 0.15 and 0.10 (each s, 9H each, 3xTMS);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201.3 (C-1), 100.6 (C-6'), 75.9 (C-2'), 75.1 (C-4'), 69.7 (C-5'), 68.9 (C-3'), 55.5 (MeO), 0.6 (2xTMS), 0.4 (TMS); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{NaO}_6\text{Si}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  431.1712, found 431.1764.



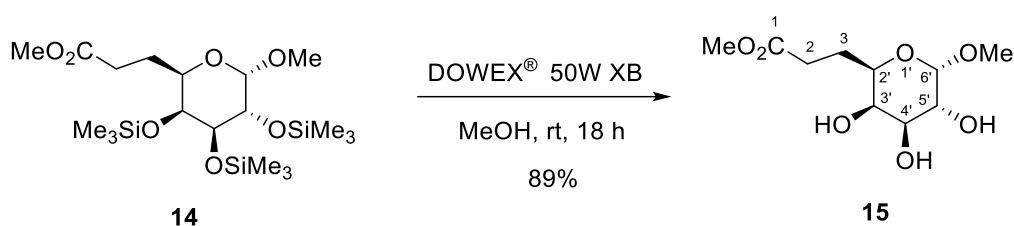
**Preparation of (*E*)-methyl 3-((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-methoxy-3,4,5-*tris*((trimethylsilyl)oxy) tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)acrylate (13).** Aldehyde 12 (1.92 g, 4.70 mmol) and methyl 2-(triphenylphosphoranylidene)acetate (1.93 g, 5.77 mmol, 1.23 equiv) were suspended in dry benzene under nitrogen. The mixture was stirred for 6 hours at room temperature, the solvent was eliminated at reduced pressure, and the residue obtained was purified by silica gel flash chromatography, using a mixture of hexane-EtOAc-Et<sub>3</sub>N (79:20:1) as eluent, to afford 13 (1.96 g, 92%) as a yellowish oil, an approximately 4:1 mixture of *E/Z* isomers. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2970w, 1737s, 1721s, 1439w, 1365m, 1250w, 1229m, 1145w, 1102w, 1044w, 899w, 841m;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (only signals of the predominant *E*-isomer are given)  $\delta$  6.84 (dd,  $J = 15.7, 4.3$  Hz, 1H, H-3), 6.84 (dd,  $J = 15.7, 1.9$  Hz, 1H, H-2), 4.70 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-6'), 4.39 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H, H-2'), 3.95 (m, 1H, H-5'), 3.86 (m, 2H, H-3' and H-4'), 3.75 (s, 3H,  $\text{MeO}_2\text{C}$ ), 3.37 (s, 3H, MeO), 0.16, 0.15 and 0.09 (each s, 9H each, 3xTMS);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (only signals of the predominant *E*-isomer are given)  $\delta$  166.8 (C-1), 145.3 (C-3), 121.7 (C-2), 101.0 (C-6'), 74.9 (C-4'), 70.8 (C-5'), 70.3 (C-2'), 69.4 (C-3'), 55.7 (MeO), 51.7 ( $\text{MeO}_2\text{C}$ ), 0.7, 0.7 and 0.4 (3xTMS); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{NaO}_7\text{Si}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  487.1974, found 487.1969.



**3.5. Preparation of methyl 3-((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-methoxy-3,4,5-*tris*((trimethylsilyl)oxy) tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)propanoate (14).** Compound 13 (1.10 g, 2.37 mmol) and Wilkinson's catalyst (120 mg, 0.12 mmol, 0.05 equiv) were

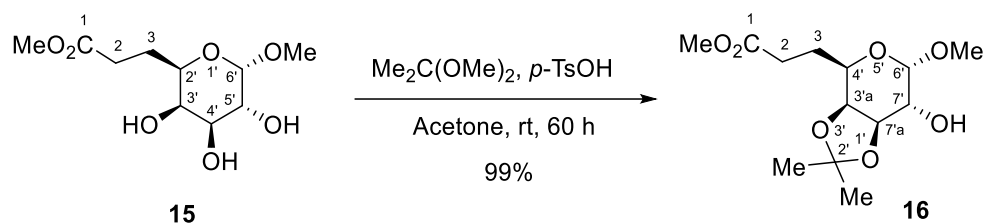
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

dissolved in dry THF under nitrogen. The reactor was flushed with hydrogen several times, pressurized with hydrogen gas at 4 bar, and stirred at room temperature for 24 hours. The mixture was then diluted in diethyl ether, washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The resulting mixture was purified by silica gel flash chromatography, using a mixture of hexane-EtOAc-Et<sub>3</sub>N (79:20:1) as eluent, to afford **14** (1.081 g, 98%) as an oil.  $[\alpha]_D = +91^\circ$  (c 1.9, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3056w, 2955w, 1737s, 1715s, 1359w, 1249m, 1143w, 1098m, 1042m, 896m, 876w; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.60 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H, H-6'), 3.90 (dd,  $J = 9.6, 3.6$  Hz, 1H, H-5'), 3.79 (dd,  $J = 9.6, 2.8$  Hz, 1H, H-4'), 3.68 (m, 2H, H-2' and H-3'), 3.67 (s, 3H, MeO<sub>2</sub>C), 3.32 (s, 3H, MeO), 2.44 (m, 2H, H-2), 1.98 (m, 1H, H-3), 1.68 (m, 1H, H'-3), 0.14, 0.13 and 0.12 (each s, 9H each, 3xTMS); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.1 (C-1), 100.8 (C-6'), 75.2 (C-2'), 71.1 (C-4'), 69.6 (C-5'), 69.4 (C-3'), 55.3 (MeO), 51.7 (MeO<sub>2</sub>C), 30.3 (C-2), 26.6 (C-3), 0.9, 0.7 and 0.5 (3xTMS); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>NaO<sub>7</sub>Si<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 489.2131, found 489.2126.

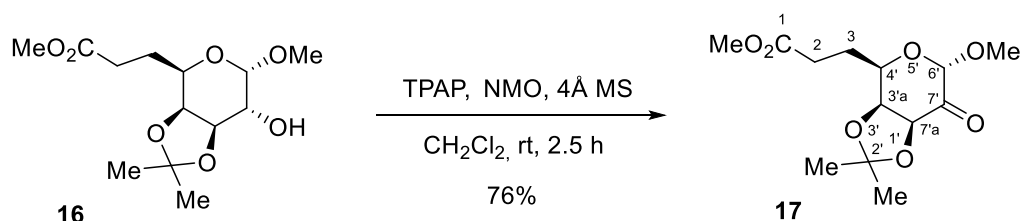


**Preparation of methyl 3-((2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanoate (15).** Compound **14** (1.031 g, 2.22 mmol) was dissolved in dry methanol (60 mL) under nitrogen. DOWEX<sup>®</sup> 50W XB resin (360 mg) was then added, and the mixture was stirred for 18 hours at room temperature. The resulting mixture was filtered through Celite and concentrated in vacuo to give triol **15** as a whitish solid (0.496 g, 89%) with sufficient purity to be used in the next step without further purification. Mp 131-133°C (MeOH);  $[\alpha]_D = +139^\circ$  (c 1.9, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3539m, 3450s, 3312s, 3156m, 2956w, 2930w, 1746s, 1725s, 1628w, 1440w, 1370w, 1269w, 1195w, 1039m, 1041m, 974w, 782m; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.78 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H, H-6'), 3.83 (m, 1H, H-5'), 3.79-3.72 (m, 3H, H-2', H-3' and H-4'), 3.69 (s, 3H, MeO<sub>2</sub>C), 3.40 (s, 3H, MeO), 2.51 (m, 2H, H-2), 2.10 (m, 1H, H-3), 1.92 (m, 1H, H'-3); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.4 (C-1), 99.8 (C-6'), 71.2 (C-2'), 70.1 (C-5'), 69.1 (C-4'), 69.0 (C-3'), 55.3 (MeO), 51.8 (MeO<sub>2</sub>C), 30.4 (C-2), 25.8 (C-3); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 273.0945, found 273.0946.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES



**Preparation of methyl 3-((3aS,4R,6S,7R,7aR)-7-hydroxy-6-methoxy-2,2-dimethyltetrahydro-3aH-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-4-yl)propanoate (16).** A mixture of compound **15** (460 mg, 1.84 mmol) and  $p$ -toluenesulfonic acid (20 mg, 0.12 mmol) was dissolved in dry acetone (9 mL) under a nitrogen atmosphere. Then, 2,2-dimethoxypropane (274  $\mu\text{L}$ , 0.233 mg, 2.23 mmol), 1.2 equiv) was added via syringe and the mixture stirred for 60 hours at rt. The reaction mixture was then quenched with a 5% aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$  (2 mL) and diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated under reduced pressure to give **16** (0.531 g, 99%) as a yellowish oil with sufficient purity to be used in the next step without further purification.  $[\alpha]_D^{25} = +115^\circ$  (c 0.7,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3467s, 2986m, 2936m, 1735s, 1438w, 1370m, 1217w, 1195w, 1160m, 1063m, 1029m, 990w, 872m, 797m;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.71 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-6'), 4.19 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H, H-7'a), 4.09 (dd,  $J = 6.0, 2.3$  Hz, 1H, H-3'a), 3.95 (ddd,  $J = 9.4, 4.3, 2.2$  Hz, 1H, H-4'), 3.78 (td,  $J = 6.6, 3.9$  Hz, 1H, H-7'), 3.68 (s, 3H,  $\text{MeO}_2\text{C}$ ), 3.41 (s, 3H, MeO), 2.51 (m, 2H, H-2), 2.27 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H, OH), 2.07 (m, 2H, H-3), 1.50 and 1.34 (each s, 3H each,  $\text{Me}_2\text{C}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.9 (C-1), 109.5 (C-2'), 98.7 (C-6'), 76.4 (C-4'), 74.9 (C-3'), 69.7 (C-5'), 69.5 (C-7'), 55.4 (MeO), 51.7 ( $\text{MeO}_2\text{C}$ ), 30.4 (C-2), 27.9 and 26.1 ( $\text{Me}_2\text{C}$ ), 26.1 (C-3); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{NaO}_7$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  313.1258, found 313.1266.

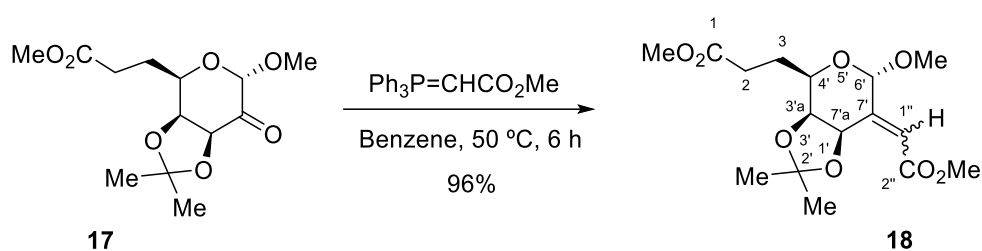


**Preparation of methyl 3-((3aS,4R,6S,7aS)-6-methoxy-2,2-dimethyl-7-oxotetrahydro-3aH-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-4-yl)propanoate (17).** A mixture of **16** (552 mg, 1.90 mmol), NMO (285 mg, 1.22 mmol), (TPAP (74 mg, 0.21 mmol) and recently activated molecular sieves (400 mg) in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (27 mL) was stirred at room temperature for 2.5 h under nitrogen. Isopropanol (2 mL) was then added and the mixture was stirred for an additional 30 minutes. The reaction mixture was concentrated at reduced pressure and the obtained residue was chromatographed on silica gel, using a 7:3 mixture of hexane-



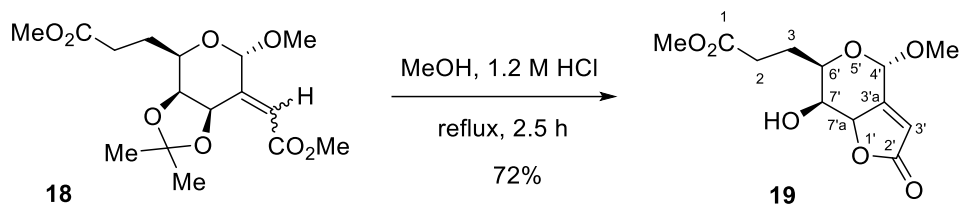
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

EtOAc as eluent, to yield ketone **17** (419 mg, 76%) as a yellowish oil.  $[\alpha]_D^{25} = +83^\circ$  (c 0.7, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3001w, 2970w, 2942w, 1738s, 1440s, 1228m, 1217m, 1109w, 1078w, 870m, 785m; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.68 (s, 1H, H-6'), 4.62 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H, H-7'a), 4.40 (dd,  $J = 5.6, 1.9$  Hz, 1H, H-3'a), 4.30 (ddd,  $J = 9.5, 4.1, 1.9$  Hz, 1H, H-4'), 3.70 (s, 3H, MeO<sub>2</sub>C), 3.44 (s, 3H, MeO), 2.54 (m, 2H, H-2), 2.08 (m, 2H, H-3), 1.44 and 1.37 (each s, 3H each, Me<sub>2</sub>C); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  199.4 (C-7'), 173.7 (C-1), 110.9 (C-2'), 100.6 (C-6'), 79.5 (C-3'a), 75.7 (C-7'a), 66.4 (C-4'), 55.6 (MeO), 51.8 (MeO<sub>2</sub>C), 30.3 (C-2), 27.3 and 26.3 (Me<sub>2</sub>C), 26.0 (C-3); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 311.1101, found 311.1144.

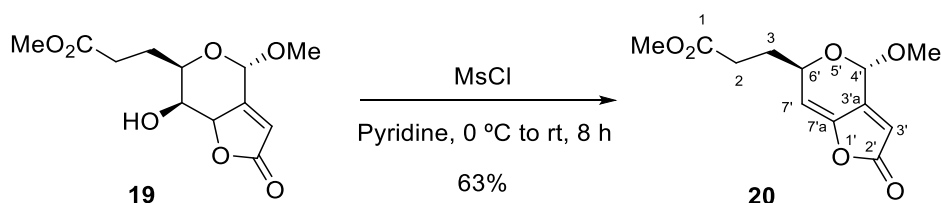


**Preparation of methyl 3-((3a*S*,4*R*,6*S*,7a*R*)-6-methoxy-7-(2-methoxy-2-oxoethylidene)-2,2-dimethyltetrahydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyran-4-yl)propanoate (**18**).** Ketone **17** (400 mg, 1.39 mmol) and methyl 2-(triphenylphosphoranylidene)acetate (585 mg, 1.75 mmol, 1.25 equiv) were suspended in dry benzene (23 mL) under nitrogen. The mixture was stirred for 6 hours at 50 °C, cooled down to rt, and the *solvent* removed under vacuum. The obtained residue was purified by silica gel flash chromatography, using hexane-EtOAc mixtures from 9:1 to 1:1 as eluent, to afford unsaturated methyl ester **18** (459 mg, 96%) as a clear oil, a 4:1 mixture of *E/Z* stereoisomers. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3003w, 2969w, 2951w, 1737s, 1726s, 1435m, 1365s, 1227m, 1216s, 1154w, 1090w, 1044w, 1009w; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (only signals of the major *E*-isomer are given)  $\delta$  6.35 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-1''), 6.05 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-7'a), 5.24 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-6'), 4.20 (dd,  $J = 7.6, 1.6$  Hz, 1H, H-3'a), 3.74 (s, 3H, MeO<sub>2</sub>C-2''), 3.67 (s, 3H, MeO<sub>2</sub>C-1), 3.51 (m, 1H, H-4'), 3.46 (s, 3H, MeO), 2.49 (m, 2H, H-2), 2.01 (m, 1H, H-3), 1.86 (m, 1H, H'-3), 1.50 and 1.39 (each s, 3 H each, Me<sub>2</sub>C); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (only signals of the major *E*-isomer are given)  $\delta$  173.7 (C-1), 165.9 (C-2''), 148.9 (C-7'), 123.8 (C-1''), 110.9 (C-2'), 98.0 (C-6'), 77.5 (C-3'a), 70.4 (C-4'), 69.4 (C-7'a), 55.6 (MeO), 52.0 (MeO<sub>2</sub>C-2''), 51.9 (MeO<sub>2</sub>C-1), 30.6 (C-2), 25.6 (C-3), 26.3 and 25.6 (Me<sub>2</sub>C); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 367.1363, found 367.1388.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES



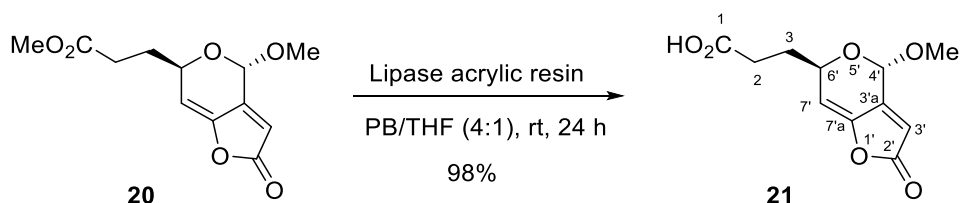
**Preparation of methyl 3-((4*S*,6*R*,7*S*,7*a**R*)-7-hydroxy-4-methoxy-2-oxo-4,6,7,7*a*-tetrahydro-2*H*-furo[3,2-*c*]pyran-6-yl)propanoate (**19**).** Compound **18** (0.48 g, 1.39 mmol) and 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (30.6 mg, 0.139 mmol, 0.1 equiv) were dissolved in dry MeOH (6 mL) under nitrogen. 334  $\mu$ L of 1.2 M aqueous HCl (0.67 mmol, 0.5 equiv) was then added and the mixture was stirred at reflux for 2.5 hours. The mixture was then cooled to room temperature, diluted in H<sub>2</sub>O, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. *The residue obtained* was purified by silica gel flash chromatography, using hexane-EtOAc mixtures from 8:2 to 6:4 as eluent, to afford **19** (0.27 g, 72%) as white crystals. Mp 88-89°C (MeOH);  $[\alpha]_D^{25} = +191^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3459s, 2927m, 2850w, 1783w, 1732s, 1436w, 1346w, 1192w, 1144m, 1014m, 970w, 872m, 811w; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.00 (dd, *J* = 1.9, 0.7 Hz, 1H, H-3'), 5.47 (s, 1H, H-4'), 5.13 (dd, *J* = 3.9, 1.9 Hz, 1H, H-7'a), 4.21 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H, H-7'), 4.04 (dd, *J* = 9.7, 4.2 Hz, 1H, H-6'), 3.70 (s, 3H, MeO<sub>2</sub>C-1), 3.47 (s, 3H, MeO), 2.53 (m, 2H, H-2), 2.14 (m, 1H, H-3), 2.00 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, HO), 1.93 (m, 1H, H'-3); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.7 and 172.5 (C-1 and C-2'), 159.4 (C-3'a), 115.7 (C-3'), 95.3 (C-4'), 79.2 (C-7'a), 71.5 (C-7'), 68.2 (C-6'), 55.3 (MeO), 51.9 (MeO<sub>2</sub>C-1), 30.2 (C-2), 26.0 (C-3); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 273.0969, found 273.0970.



**Preparation of methyl 3-((4*S*,6*R*)-4-methoxy-2-oxo-4,6-dihydro-2*H*-furo[3,2-*c*]pyran-6-yl)propanoate (**20**).** Mesyl chloride (262  $\mu$ L, 3.37 mmol, 3.5 equiv) was dropwise added to a solution of alcohol **19** (260 mg, 0.964 mmol) in anhydrous pyridine (5 mL) at 0 °C under nitrogen. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 8 hours, then diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed successively with water, 1 M aqueous solution of KHSO<sub>4</sub>, and brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue obtained was purified by silica gel flash chromatography, using hexane-EtOAc mixtures from 7:3 to 6:4 as eluent, to afford the  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated lactone **20** (152 mg,

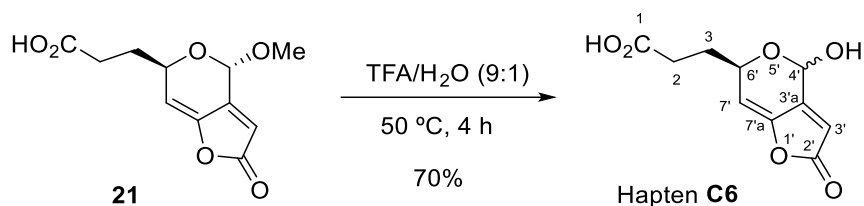
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

63%) as a white solid. Mp 76-77°C (Et<sub>2</sub>O); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +109° (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 2953w, 2928w, 1782s, 1733s, 1672w, 1438w, 1355m, 1260w, 1169s, 1072w, 1032w, 973w, 864w; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.97 (ddd,  $J$  = 1.9, 1.2, 0.5 Hz, 1H, H-3'), 5.78 (t,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, H-7'), 5.62 (s, 1H, H-4'), 4.64 (ddt,  $J$  = 7.8, 3.8, 1.6 Hz, 1H, H-6'), 3.69 (s, 3H, MeO<sub>2</sub>C-1), 3.52 (s, 3H, MeO), 2.52 (dd,  $J$  = 10.8, 4.7 Hz, 2H, H-2), 2.06 (m, 2H, H-3); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.5 (C-1), 168.7 (C-2'), 148.5 (C-3'a), 147.1 (C-7'a), 111.8 (C-3'), 110.4 (C-7'), 94.2 (C-4'), 66.8 (C-6'), 56.2 (MeO), 51.9 (MeO<sub>2</sub>C-1), 30.1 (C-2), 29.5 (C-3); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na+CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup> 309.0945, found 309.0963.

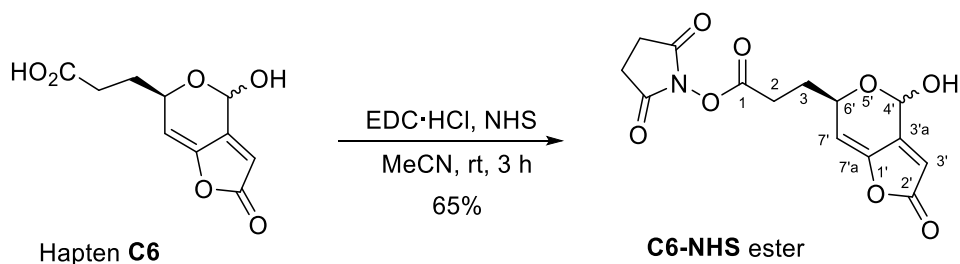


**Preparation of methyl 3-((4S,6R)-4-methoxy-2-oxo-4,6-dihydro-2H-furo[3,2-c]pyran-6-yl)propanoate (21).** Methyl ester **20** (150 mg, 0.590 mmol) was dissolved in 20 mL of a 4:1 mixture of PB100 and THF. Then, 300 mg of lipase acrylic resin from *Candida antarctica* was added and the mixture was smoothly stirred for 24 hours at room temperature. After filtering the enzyme, the filtrate was diluted with water, acidified to pH  $\approx$  4 with 1 M HCl, and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel flash chromatography, using CHCl<sub>3</sub>-MeOH (98:2) as eluent, to afford acid **21** (139 mg, 98%) as an amorphous white solid. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +108° (c 0.6, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3109w, 3095w, 2836w, 1785s, 1703s, 1673m, 1623w, 1406m, 1349w, 1259m, 1907m, 1069s, 1027s, 961s, 859s, 839s, 806m; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.99 (m, 1H, H-3'), 5.78 (t,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, H-7'), 5.63 (s, 1H, H-4'), 4.67 (ddt,  $J$  = 8.3, 3.7, 1.7 Hz, 1H, H-6'), 3.53 (s, 3H, MeO), 2.58 (dd,  $J$  = 10.8, 4.5 Hz, 2H, H-2), 2.09 (m, 2H, H-3); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  178.9 (C-1), 168.8 (C-2'), 148.4 (C-3'a), 147.2 (C-7'a), 111.9 (C-3'), 110.2 (C-7'), 94.3 (C-4'), 66.8 (C-6'), 56.2 (MeO), 29.9 (C-2), 29.5 (C-3); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 263.0526, found 263.0518.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES



**Preparation of 3-((4*S*,6*R*)-4-hydroxy-2-oxo-4,6-dihydro-2*H*-furo[3,2-*c*]pyran-6-yl)propanoic acid (Hapten **C6**).** Compound **21** (20 mg, 0.083 mmol) was dissolved in 1 mL of a 9:1 mixture of trifluoroacetic acid and H<sub>2</sub>O and stirred at 50 °C for 4 hours. The mixture was then diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue obtained was purified by silica gel flash chromatography, using CHCl<sub>3</sub>-MeOH (95:5) containing a 0.1% of HCO<sub>2</sub>H as eluent, to afford hapten **C6** (13.2 mg, 70%) as a film. From the <sup>1</sup>H NMR data, this product was determined to be an approximately 2:1 mixture of epimers at hemiacetalic carbon C-4', in equilibrium with a small percentage of the open hydroxy-aldehyde form. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3117w, 2926w, 2854w, 1779s, 1747s, 1707s, 1673m, 1624w, 1408m, 1171m, 861m; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) [signals of major  $\alpha$ -OH epimer/signals of minor  $\beta$ -OH-epimer]  $\delta$  6.30/6.67 (br d, *J* = 5.5/7.0 Hz, 1H, OH), 6.17/5.91 (br d, *J* = 3.8/5.2 Hz, 1H, H-4'), 6.11/6.06 (ddd, *J* = 1.8, 1.1, 0.5/2.0, 1.4, 1.0 Hz, 1H, H-3'), 6.02/6.02 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-7'), 4.83/4.61 (m, 1H, H-6'), 2.51/2.47 (t, *J* = 7.5/7.3 Hz, 2H, H-2), 2.13-1.86 (m overlapped with solvent signal, 2H, H-3); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) [signals of major  $\alpha$ -OH epimer/signals of minor  $\beta$ -OH-epimer]  $\delta$  174.8/174.8 (C-1), 169.5/169.4 (C-2'), 152.1/155.1 (C-3'a), 147.8/149.1 (C-7'a), 111.7/112.1 (C-7'), 111.1/110.5 (C-3'), 88.4/91.5 (C-4'), 67.3/72.5 (C-6'), 30.8/31.5 (C-2), 29.8/29.8 (C-3); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 249.0370, found 249.0365.



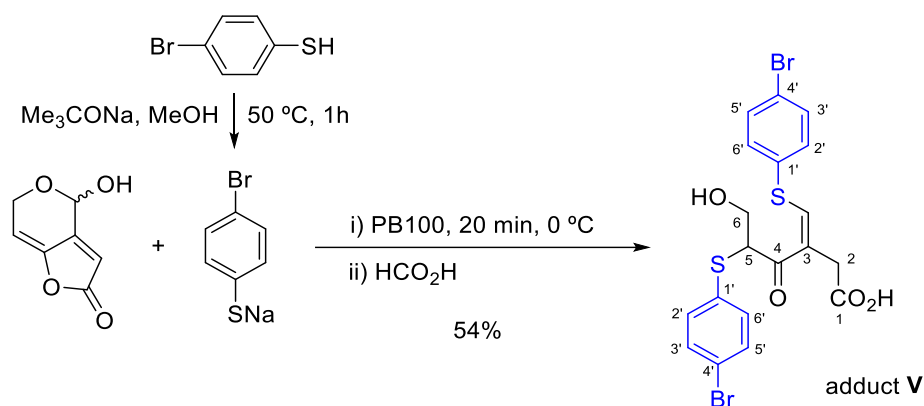
**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-((6*R*)-4-hydroxy-2-oxo-2,6-dihydro-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-6-yl)propanoate (C6-NHS).** A solution of hapten **C6** (14.4 mg, 0.062 mmol), NHS (7.5 mg, 0.065 mmol, 1.05 equiv) and EDC·HCl (12.4 mg, 0.065 mmol, 1.05 equiv) in anhydrous CH<sub>3</sub>CN was stirred for 3 hours under nitrogen atmosphere. Upon completion, the reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with water and brine, and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>. Evaporation of the solvent under reduced pressure, followed

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

by filtration through a short pad of silica gel, using  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (95:5) as eluent, afforded the corresponding *N*-hydroxysuccinimidyl ester, **C6-NHS** (12.9 mg, 65%), as a light brownish solid, also a mixture of epimers at C-4'.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) [signals of major  $\alpha$ -OH epimer/signals of minor  $\beta$ -OH-epimer] 6.12/5.83 (br s/t,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-4'), 6.07/6.02 (dt,  $J = 2.2, 1.2/1.8, 0.8$  Hz, 1H, H-3'), 5.79/5.76 (t,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-7'), 4.85/4.65 (dddd,  $J = 9.9, 3.7, 2.1, 1.1/7.0, 4.7, 2.3, 1.0$  Hz, 1H, H-6'), 2.86 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.65–2.85 (m, 2H, H-2), 2.34–2.05 (m, 2H, H-3).

### 5.2.3 Synthesis of adducts I-VI

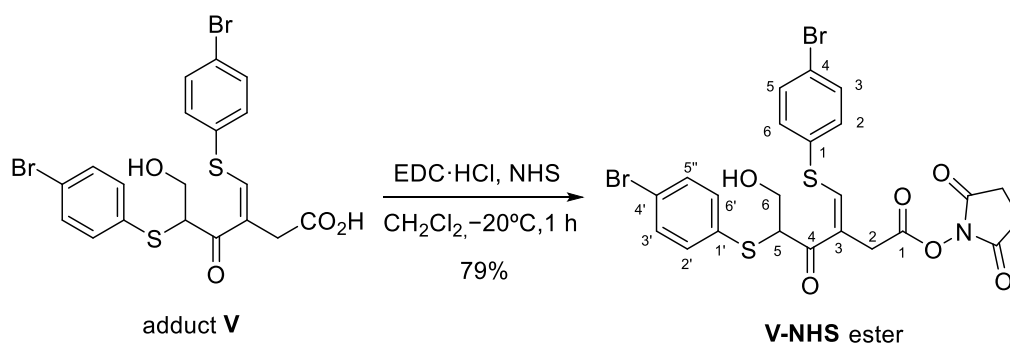
#### 5.2.3.1 Preparation of adduct V



**Preparation of (Z)-5-((4-bromophenyl)thio)-3-(((4-bromophenyl)thio)methylene)-6-hydroxy-4-oxohexanoic acid (Adduct V).** A solution of 4-bromobenzenethiol (150 mg, 0.79 mmol) and sodium *tert*-butoxide (83.5 mg, 0.87 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous MeOH was stirred at  $50\text{ }^\circ\text{C}$  for 1 hour under nitrogen atmosphere. The solvent was eliminated under reduced pressure to afford sodium 4-bromobenzenethiolate as a white powder. A solution of patulin (10.3 mg, 0.067 mmol) in 8 mL of PB100, was cooled in an ice-water bath and a solution of the above sodium thiolate (44.1 mg, 0.194 mmol, 2.9 equiv) in Mili-Q  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) was added dropwise. The reaction mixture turned an intense yellow color almost immediately, which indicates how quickly the reaction is taking place. After 10-20 minutes stirring at the same temperature, the reaction mixture was acidified with formic acid to pH 3-4 and extracted with EtOAc ( $3 \times 20$  mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , concentrated in vacuo, and finally purified by silica gel flash chromatography, using  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (95:5) with 0.1% of  $\text{HCO}_2\text{H}$  as eluent, to afford adduct **V** as a yellow oil (19.2 mg, 54%). The spectroscopic data of adduct **V** were in complete agreement with those described previously by Metzler.<sup>31</sup> IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3339m, 1705m, 1472m, 1230w, 1112w, 1019s, 814m;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  7.62 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3 Ph and H-5 Ph), 7.50 (m, 4H, H-2' Ph, H-6' Ph, H-2 Ph and H-6 Ph), 7.49 (s,

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

$^1\text{H}$ ,  $H-C=C3$ ), 7.43 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3' Ph and H-5' Ph), 4.30 (br t,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-5), 4.00 (dd,  $J = 11.3, 7.5$  Hz, 1H, H-6), 3.78 (dd,  $J = 11.3, 6.4$  Hz, 1H, H'-6), 3.77 (d,  $J = 17.0$  Hz, 1H, H-2), 3.71 (d,  $J = 17.4$  Hz, 1H, H'-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  194.4 (C-4), 172.7 (C-1), 148.8 (HC=C3), 138.0 (C-3), 136.9 (2C, C-3' Ph and C-5' Ph), 133.3 (2C, C-3 Ph and C-5 Ph), 133.0 (2C, C-2' Ph and C-6' Ph), 132.8 (2C, C-2 Ph and C-6 Ph), 132.0 (C-1' Ph), 127.0 (C-1 Ph), 123.3 (C-4' Ph), 122.5 (C-4 Ph), 62.3 (C-6), 54.2 (C-5), 38.2 (C-2); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Br}_2\text{O}_4\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  530.8930 (51.4%), 532.8909 (100%) and 534.8889 (48.6%), found 530.8910, 532.8889 and 534.8867.



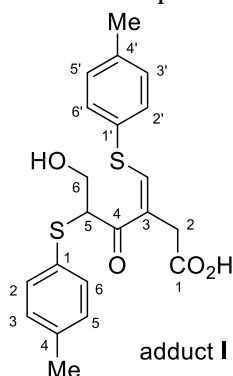
**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (Z)-5-((4-bromophenyl)thio)-3-(((4-bromophenyl) thio)methylene)-6-hydroxy-4-oxohexanoate (V-NHS).** Adduct **V** (10.5 mg, 0.020 mmol), NHS (2.8 mg, 0.024 mmol, 1.2 equiv) and EDC·HCl (5.0 mg, 0.026 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in of anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.5 mL) and stirred for 1 hour at  $-20^\circ\text{C}$  under nitrogen.<sup>f</sup> Upon completion, the reaction mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and washed successively with water and brine, and then dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . Evaporation of the solvent under reduced pressure afforded compound **V-NHS** (11.5 mg, 79%) as a brownish oil.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.54 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3 Ph and H-5 Ph), 7.43 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-3' Ph and H-5' Ph), 7.41 (s, 1H, H-C=C3), 7.37 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2 Ph and H-6 Ph), 7.26 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2' Ph and H-6' Ph), 4.13 (dd,  $J = 7.8, 5.1$  Hz, 1H, H-5), 4.06 (dd,  $J = 17.7, 0.9$  Hz, 1H, H-2), 4.05 (dd,  $J = 11.2, 7.8$  Hz, 1H, H-6), 3.87 (dd,  $J = 11.2, 5.1$  Hz, 1H, H'-6), 3.76 (d,  $J = 17.7$  Hz, 1H, H'-2), 2.85 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ).

### 5.2.3.2 Preparation of adducts **I-IV** and **VI**

The procedure followed for the reaction of patulin with the other aromatic thiols was similar to that described above for the preparation of adduct **V**. The most relevant data for each case are given below.

<sup>f</sup> If the formation of the active ester is carried out at higher temperatures, the OH at C-6 is eliminated, resulting in the formation of a terminal double bond between C-5 and C-6. For example, the active ester of the mentioned elimination product is formed mostly at rt.

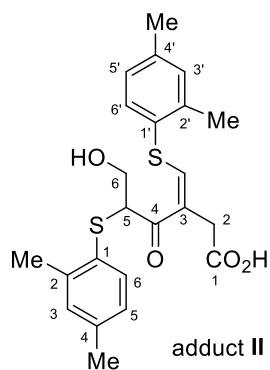
**Preparation of (Z)-6-Hydroxy-4-oxo-5-(p-tolylthio)-3-((p-tolylthio)methylene)hexanoic acid (Adduct I).** This adduct (13 mg, 50%), a yellow oil, was obtained from a



solution of patulin (10 mg, 0.065 mmol) in PB100 (12.8 mL) and a solution of sodium 4-methylbenzenethiolate (20.1 mg, 0.138 mmol, 2.1 eq.) in Mili-Q H<sub>2</sub>O (6.4 mL) at room temperature. The EtOAc extract of the reaction mixture was purified by silica gel flash chromatography using CHCl<sub>3</sub>-MeOH (from 98:2 to 95:5) as eluent. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3021m, 1713m, 1493m, 1216s; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.38 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, H-2' Ph and H-6' Ph), 7.27 (s, 1H, =C-H), 7.25 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, H-2 Ph and H-6 Ph), 7.19 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, H-3' Ph and H-5' Ph), 7.09 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, H-3 Ph and H-5 Ph), 4.10 (dd,  $J$  = 8.2, 4.7 Hz, 1H, H-5), 4.04 (dd,  $J$  =

10.9, 8.2 Hz, 1H, H-6), 3.88 (d,  $J$  = 17.6 Hz, 1H, H-2), 3.84 (dd,  $J$  = 10.9, 4.6 Hz, 1H, H'-6), 3.40 (d,  $J$  = 17.3 Hz, 1H, H'-2), 2.37 and 2.31 (each s, 3H each, 2xMe Ph); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  194.0 (C-4), 175.1 (C-1), 152.9 (HC=C3), 139.7 (C-4' Ph), 138.8 (C-4 Ph), 135.5 (2C, C-3 Ph and C-5 Ph), 133.8 (C-1' Ph), 131.2 (2C, C-3' Ph and C-5' Ph), 130.3 (2C, C-2' Ph and C-6' Ph), 130.1 (2C, C-2 Ph and C-6 Ph), 125.7 (C-1 Ph), 123.9 (C-3), 61.5 (C-6), 52.4 (C-5), 38.1 (C-2), 21.4 and 21.3 (2xMePh); HRMS calcd for C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 403.1032, found 403.1018.

**Preparation of (Z)-5-((2,4-Dimethylphenyl)thio)-3-(((2,4-dimethylphenyl)thio)methylene)-6-hydroxy-4-oxohexanoic acid (Adduct II).** This adduct (5.8 mg, 46%), a yellow oil, was obtained from a solution of patulin (4.5 mg, 0.029 mmol) in PB100 (5.4 mL)

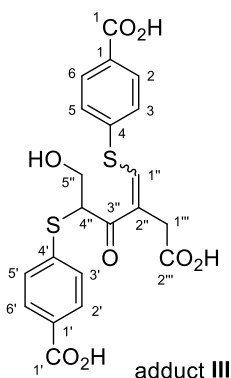


and a solution of sodium 2,4-dimethylbenzenethiolate (10.3 mg, 0.064 mmol, 2.2 equiv) in Mili-Q H<sub>2</sub>O (5.4 mL) at room temperature. The EtOAc extract of the reaction mixture was purified by silica gel flash chromatography using CHCl<sub>3</sub>-MeOH 95:5 as eluent. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3354m, 3009m, 2920m, 2855m, 1701m, 1647m, 1559m, 1217m, 1051m, 954m, 812m, 751s; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.34 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-6' Ph), 7.24 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-6 Ph), 7.08-6.95 (m, 3H, H-3 Ph, H-3' Ph and H-C=C3), 7.01 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5 Ph), 6.91 (d,

$J$  = 7.8 Hz, 1H, H-5' Ph), 4.16 (dd,  $J$  = 8.4, 4.8 Hz, 1H, H-5), 4.03 (dd,  $J$  = 11.3, 8.4 Hz, 1H, H-6), 3.84 (dd,  $J$  = 11.3, 4.8 Hz, 1H, H'-6), 3.69 (d,  $J$  = 17.3 Hz, 1H, H-2), 3.29 (d,  $J$  = 17.3 Hz, 1H, H'-2), 2.39, 2.35, 2.32 and 2.26 (each s, 12H, 4xMePh); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  194.4 (C-4), 174.3 (C-1), 152.6 (HC=C3), 142.2 (C-2' Ph), 139.2 (C-2 Ph), 137.6 (C-4' Ph), 136.2 (C-4 Ph), 131.4 (2C, C-3 Ph and C-3' Ph), 131.2 (C-6' Ph), 129.9 (C-1' Ph), 127.7 (2C, C-5 Ph and C-6 Ph), 127.3 (C-5' Ph), 125.8 (C-1 Ph), 123.3 (C-3), 61.7 (C-6), 52.2 (C-5), 21.1, 21.0, 20.9 and 20.8 (4xMePh); HRMS calcd for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 431.1345, found 431.1346.

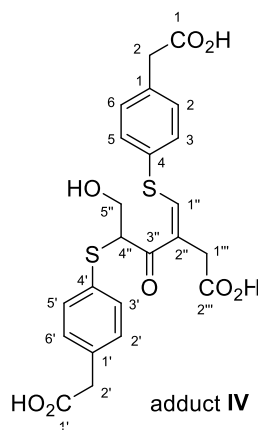
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Preparation of (Z)-4,4'-((2-(Carboxymethyl)-5-hydroxy-3-oxopent-1-ene-1,4-diyl)bis(sulfanediyl)) dibenzoic acid (Adduct III).



Adduct III (a *ca.* 4:1 mixture of *Z/E* isomers, 5.2 mg, 51%), a yellow oil, was obtained from a solution of patulin (3.4 mg, 0.022 mmol) in PB100 (4.0 mL) and a solution of the 4-mercaptobenzoic acid (7.5 mg, 0.49 mmol, 2.2 equiv) in Mili-Q H<sub>2</sub>O (4 mL) at room temperature. The EtOAc extract of the reaction mixture was purified by C<sub>18</sub>-reversed-phase flash chromatography using MeOH-H<sub>2</sub>O 7:3 as eluent. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3060m, 2361m, 1698s, 1596s, 1421m, 1281m; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) [only signals of major *Z*-isomer are given]  $\delta$  8.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2 Ph and H-6 Ph), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2' Ph and H-6' Ph), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3 Ph and H-5 Ph), 7.65 (s, 1H, H-1''), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3' Ph and H-5' Ph), 4.54 (dd, *J* = 7.7, 6.0 Hz, 1H, H-4''), 4.09 (dd, *J* = 11.2, 7.7 Hz, 1H, H-5''), 3.87 (dd, *J* = 11.2, 5.9 Hz, 1H, H'-5''), 3.78 (s, 2H, H-1'''); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) [only signals of major *Z*-isomer are given]  $\delta$  194.8 (C-3''), 172.6 (C-2'''), 167.0 and 166.9 (C-1 and C-1'), 147.4 (C-1''), 144.1 (C-4 Ph), 140.2 (C-4' Ph), 133.1 (C-1 Ph), 132.3-130.2 (8C, C-6 Ph, C-2 Ph, C-6' Ph, C-2' Ph, C-3 Ph, C-5 Ph, C-3' Ph and C-5' Ph), 130.6 (C-1' Ph), 127.6 (C-2''), 62.8 (C-5''), 53.9 (C-4''), 38.2 (C-1'''); HRMS calcd for C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 463.0516, found 463.0516.

### Preparation of (Z)-2,2'-(((2-(Carboxymethyl)-5-hydroxy-3-oxopent-1-ene-1,4-diyl)bis(sulfanediyl)) bis(4,1-phenylene))diacetic acid (Adduct IV).



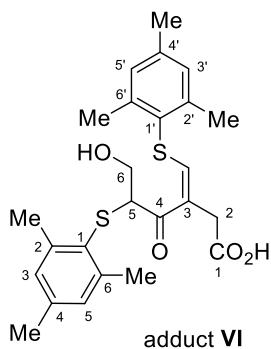
This adduct (7.2 mg, 49%), a yellow oil, was obtained from a solution of patulin (4.6 mg, 0.030 mmol) in PB100 (5.8 mL) and a solution of 2-(4-mercaptophenyl)acetic acid (10.1 mg, 0.06 mmol, 2 equiv) in a 20 mM aqueous solution of NaOH (5.8 mL, 0.116 mmol, 3.9 equiv) at room temperature. The ethyl acetate extract of the reaction mixture was purified by silica gel flash chromatography using CHCl<sub>3</sub>-MeOH 95:5, containing a 0.1% of HCO<sub>2</sub>H, as eluent. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3021w, 1711s, 1363m, 1221s, 1093w; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2 Ph and H-6 Ph), 7.49 (s, 1H, H-1''), 7.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2' Ph and H-6' Ph), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3' Ph and H-5' Ph), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3 Ph and H-5 Ph), 4.26 (dd, *J* = 7.8, 6.1 Hz, 1H, H-4''), 4.00 (dd, *J* = 11.1, 7.8 Hz, 1H, H-5''), 3.79 and 3.71 (each d, *J* = 17.3 Hz, 2H, H-1'''), 3.77 (dd, *J* = 11.1, 6.1 Hz, 1H, H-5''), 3.68 and 3.64 (each s, 2H each, H-2'' and H'-2''); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  194.6 (C-3''), 172.8 (C-2'''), 172.5 and 172.4 (C-1 and C-1'), 149.9 (C-1''), 147.7 (C-4 Ph), 136.9, 136.5 and 136.1 (3C, C-1 Ph, C-1' Ph and C-4' Ph), 135.0 (2C, C-6' Ph and C-2' Ph), 131.4 (2C, C-3' Ph and C-5' Ph), 131.3 (2C, C-6 Ph and C-2 Ph), 131.0 (2C, C-3 Ph and



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

C-5 Ph), 126.5 (C-2''), 62.4 (C-5''), 54.3 (C-4''), 40.8 and 40.7 (C-2 and C-2'), 38.3 (C-1'''); HRMS calcd for C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 491.0829, found 491.0810.

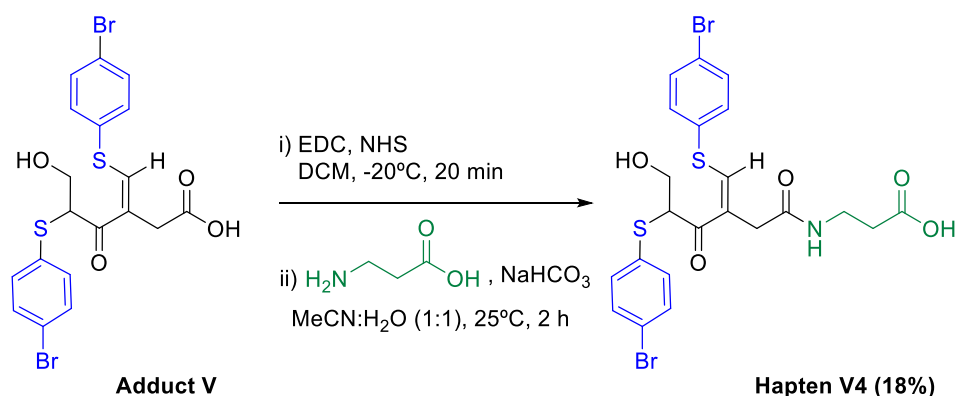
**Preparation of (Z)-6-Hydroxy-5-(mesitylthio)-3-((mesitylthio)methylene)-4-oxohexanoic acid (Adduct VI).** Adduct VI (3.0 mg, 18%), a yellow oil, was obtained from a solution of patulin (5.6 mg, 0.036 mmol) in PB100 (6.7 mL) and a solution of the sodium salt



of 2,4,6-trimethylbenzenethiol (13.8 mg, 0.079 mmol, 2.2 equiv) in 6.7 mL of Mili-Q H<sub>2</sub>O at room temperature. The EtOAc extract of the reaction mixture was purified by silica gel flash chromatography using CHCl<sub>3</sub>-MeOH 95:5 as eluent. As deduced from the analysis of the <sup>1</sup>H NMR spectrum, this compound exists in solution as a mixture of two isomers, most probably rotamers around the C-S bonds. IR  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3330m, 2922m, 2855m,

2100w, 1714s, 1671m, 1619m, 1602m, 1457m, 1399m, 1375m, 1164s, 1034 m, 1012m, 851m, 754s; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) [only signal of the major rotamer are given]  $\delta$  7.02 (s, 2H, H-3' Ph and H-5' Ph), 6.97 (s, 2H, H-3 Ph and H-5 Ph), 6.83 (br s, 1H, H-C=C3), 4.17 (m, 1H, H-5), 3.97 (dd, *J* = 10.7, 8.0 Hz, 1H, H-6), 3.75 (dd, *J* = 10.7, 5.3 Hz, 1H, H'-6), 3.27 and 3.05 (each d, *J* = 17.2 Hz, 1H each, H-2), 2.50 (s, 6H, Me-C2' and Me-C6'), 2.38 (s, 6H, Me-C2 and Me-C6), 2.26 and 2.24 (each s, 3H each, Me-C4 and Me-C4'); HRMS calcd for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>S [M-Me<sub>3</sub>PhS]<sup>+</sup> 307.0999, found 307.0998.

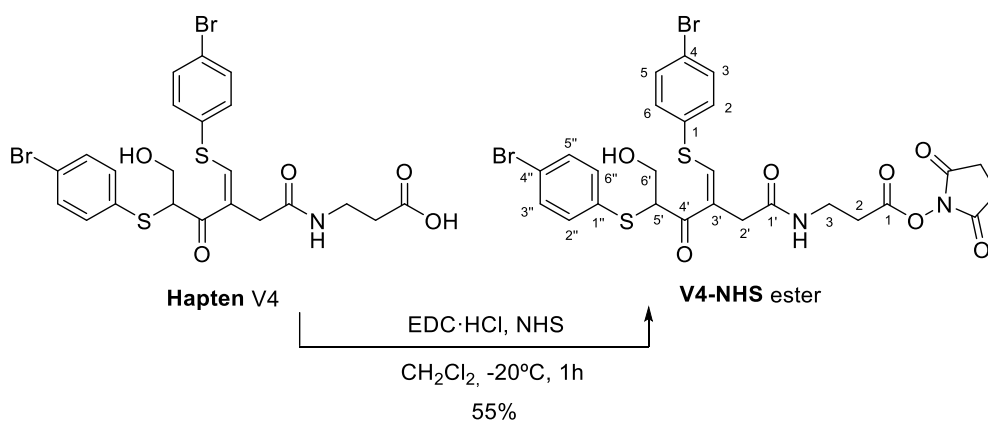
### 5.2.4 Synthesis of hapten V4



**Preparation of [(Z)-3-(5-((4-bromophenyl)thio)-3-(((4-bromophenyl)thio)methylene)-6-hydroxy-4-oxohexanamido)propanoic acid] (Hapten V4).** A mixture of adduct V (19.2 mg, 0.036 mmol), EDC·HCl (9.7 mg, 0.051 mmol, 1.4 equiv) and NHS (5.8 mg, 0.051 mmol, 1.4 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.8 mL) was stirred at -20°C for 1 hour. The solvent was eliminated under vacuum and the residue was dissolved in dry MeCN (0.4 mL). In a separate vial,  $\beta$ -alanine (19.2 mg, 0.216 mmol, 6.0 equiv) and NaHCO<sub>3</sub> (18.1 mg, 0.216 mmol, 6.0

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

equiv) were dissolved in Mili-Q H<sub>2</sub>O (0.4 mL), this solution was added to the former, and the mixture was stirred for 1 hour at 0°C and 1 hour at room temperature. The reaction mixture was cooled in an ice bath, acidified with citric acid, and extracted with EtOAc (3×20 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, concentrated in vacuo, and purified by silica gel flash chromatography, using CHCl<sub>3</sub>-MeOH (95:5) as eluent, to afford hapten **V4** as a light yellow oil (3.9 mg, 18%). IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3298m, 1653w, 1448m, 1230w, 1112w, 1019s, 611m; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3 Ph and H-5 Ph), 7.49 (m, 4H, H-2'' Ph, H-6'' Ph, H-2 Ph and H-6 Ph), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3'' Ph and H-5'' Ph), 7.42 (s, 1H, H-C=C3), 4.52 (br t, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-5'), 4.00 (dd, *J* = 11.0, 7.8 Hz, 1H, H-6'), 3.76 (dd, *J* = 11.1, 6.2 Hz, 1H, H'-6'), 3.64 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H-2'), 3.55 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H'-2') 3.43 (m, 2H, H-3), 2.50 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-2); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  194.8 (C-4'), 172.2 (C-1), 169.3 (C-1'), 147.9 (HC=C3), 138.2 (C-3), 136.6 (2C, C-3'' Ph and C-5'' Ph), 133.2 (2C, C-3 Ph and C-5 Ph), 133.0 (2C, C-2'' Ph and C-6'' Ph), 132.8 (2C, C-2 Ph and C-6 Ph), 128.1 (C-1'' Ph), 125.8 (C-1 Ph), 123.0 (C-4'' Ph), 122.4 (C-4 Ph), 62.4 (C-6'), 53.9 (C-5'), 40.3 (C-3), 36.2 (C-2'), 34.4 (C-2); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 601.9301 (51.4%), 603.9280 (100%) and 605.9260 (48.6%), found 601.9298, 603.9274 and 605.9270.



### 7.2. Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (Z)-3-(5-((4-bromophenyl)thio)-3-(((4-bromophenyl)thio)methylene)-6-hydroxy-4-oxohexanamido)propanoate (V4-NHS).

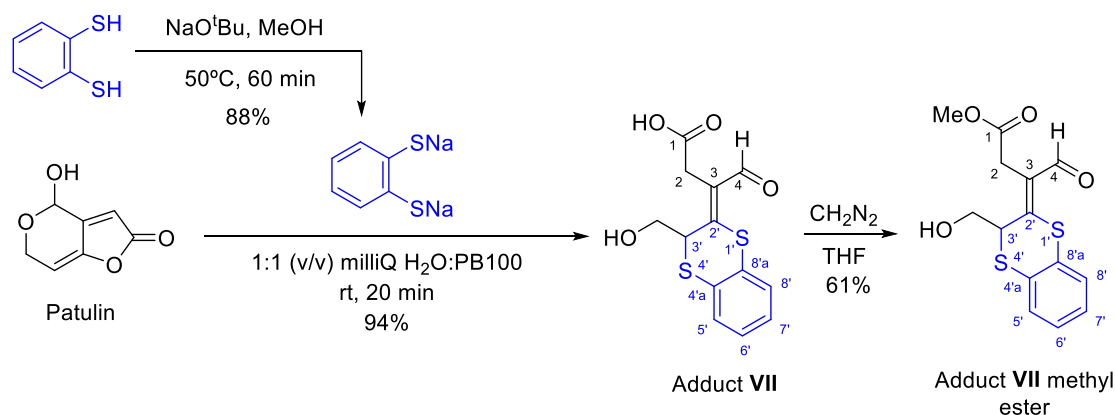
Hapten **V4** (8.6 mg, 0.014 mmol), NHS (2.3 mg, 0.020 mmol, 1.4 equiv) and EDC·HCl (3.8 mg, 0.020 mmol, 1.4 equiv) were dissolved in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL) and stirred for 1 hour at -20 °C under nitrogen atmosphere. Upon completion, the reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed successively with water and brine, and then dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>. Evaporation of the solvent under reduced pressure afforded compound **V4-NHS** (5.5 mg, 55%) as a brownish oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3 Ph and H-5 Ph), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3'' Ph and H-5'' Ph), 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2 Ph

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

and H-6 Ph), 7.49 (s, 1H, H-C=C3), 7.42 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2'' Ph and H-6'' Ph), 4.48 (dd,  $J = 7.8, 6.2$  Hz, 1H, H-5'), 4.00 (dd,  $J = 11.1, 7.8$  Hz, 1H, H-6'), 3.76 (dd,  $J = 11.1, 6.2$  Hz, 1H, H'-6'), 3.66 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1H, H-2'), 3.57 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1H, H'-2'), 3.56 (m, 2H, H-3), 2.88 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, H-2), 2.87 (s, 4H, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO).

### 5.2.5 Preparation of adducts VII-XII

#### 5.2.5.1 Preparation and methylation of adduct VII



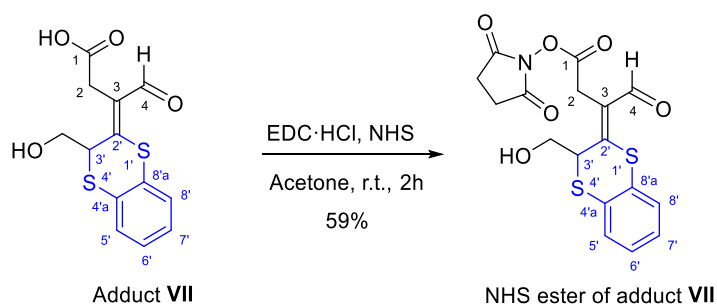
**Preparation of sodium benzene-1,2-bis(thiolate).** Benzene-1,2-dithiol (200 mg, 1.06 mmol) was added to a solution of sodium *tert*-butoxide (325 mg, 3.38 mmol, 2.4 equiv) in anhydrous methanol (1.5 mL) under nitrogen and the mixture was stirred at 50 °C for 60 minutes. After this time, the resulting mixture was cooled down to room temperature, concentrated at reduces pressure and the obtained solid residue washed with anhydrous THF (2x) and Et<sub>2</sub>O (2x). The resulting white solid was dried under high vacuum overnight to give sodium benzene-1,2-bis(thiolate) (229.4 mg, 88%) as a white solid that was used directly without further purification. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm) 7.41 (dd,  $J = 5.8, 3.5$  Hz, 2H, H-3 and H-6), 6.70 (dd,  $J = 5.8, 3.6$  Hz, 2H, H-4 and H-5).<sup>153</sup>

**Preparation of (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoic acid (Adduct VII).** A solution of the above obtained sodium benzene-1,2-bis(thiolate) (13.3 mg, 0.071 mmol, 1.1 equiv) in Milli-Q water (5 mL) was added into a stirred solution of patulin (10.0 mg, 0.065 mmol) in PB100 (5 mL) at room temperature. After 20 minutes of stirring, the resulting yellowish mixture was cooled in an ice-water bath, acidified with HCO<sub>2</sub>H to pH 3-4 and extracted with EtOAc (20 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to give adduct VII (18.0 mg, 94%) as a yellow oil. The crude product showed a purity  $\geq 95\%$  as judged by <sup>1</sup>H-NMR and was not subjected to further purification. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3447m, 2924m, 1783m, 1725s, 1654s, 1558m, 1451m, 1200s, 1062s; <sup>1</sup>H NMR

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 10.26 (s, 1H, HCO), 7.32-7.24 (m, 2H, H-5' and H-8'), 7.20-7.14 (m, 2H, H-6' and H-7'), 5.75 (br s, 2H, 2xOH), 4.30 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-3'), 3.73 (dd,  $J = 11.6, 7.7$  Hz, 1H, CHOH), 3.64 (dd,  $J = 11.6, 7.4$  Hz, 1H, CH'OH), 3.624 and 3.67 (each d, AB system,  $J = 16.8$  Hz, 1H each, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 188.7 (CH, C-4), 171.5 (C-1), 154.0 (C-2'), 131.2 (CH, C-8'), 130.7 (C, C-8'a), 128.6 (C, C-4'a), 127.9 (CH, C-6'), 127.64 and 127.61 (each CH, C-5' and C-7'), 127.5 (C, C-3), 62.9 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 43.7 (CH, C-3'), 32.4 ( $\text{CH}_2$ , C-2); HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  297.0250, found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  297.0250.

**Preparation of methyl (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoate (Adduct VII methyl ester).** A solution of adduct VII (6.9 mg, 0.023 mmol) in THF (500  $\mu\text{L}$ ) was added to the outside tube of an Aldrich MNNG diazomethane generation apparatus. A solution of diazald<sup>®</sup> (53.1 mg, 0.248 mmol, 10.8 equiv) in diethylene glycol monoethyl ether (800  $\mu\text{L}$ ) was then added to the inside tube and the system assembly was completed. After cooling the outer tube in an ice bath, 800  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution of KOH (51.0 mg, 0.909 mmol, 39.5 equiv) was added dropwise to allow diazomethane generation. Upon completion, the reaction mixture was concentrated in vacuo and purified by silica gel flash chromatography, using  $\text{CHCl}_3$  as eluent, to afford the methyl ester of adduct VII (4.1 mg, 61%) as a yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 10.31 (s, 1H, HCO), 7.32-7.27 (part AA' of an AA'BB' system, 2H, H-5' and H-8'), 7.22-7.14 (part BB' of an AA'BB' system, 2H, H-6' and H-7'), 4.30 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-3'), 3.78-3.72 (m, 1H, CHOH), 3.66 (ddd,  $J = 12.8, 7.4, 4.4$  Hz, 1H, CH'OH), 3.62 and 3.49 (AB system,  $J = 16.3$  Hz, each 1H, H<sub>2</sub>-2), 2.35 (dd,  $J = 7.9, 5.6$  Hz, 1H, OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 188.7 (CH, C-4), 171.5 (C-1), 154.0 (C-2'), 131.2 (CH, C-8'), 130.7 (C, C-8'a), 128.6 (C, C-4'a), 127.9 (CH, C-6'), 127.7 (CH, C-7'), 127.6 (CH, C-5'), 127.6 (C, C-3), 62.9 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 43.7 (CH, C-3'), 32.4 ( $\text{CH}_2$ , C-2).

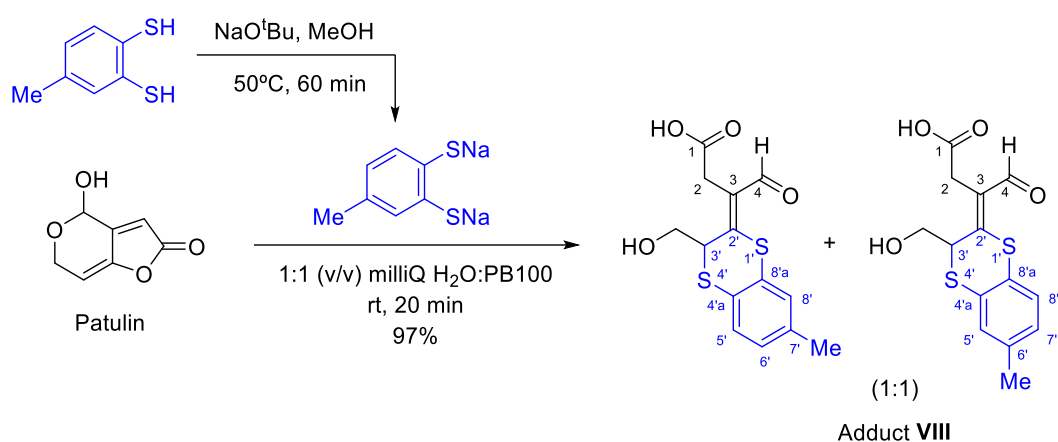


**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoate (VII-NHS).** Adduct VII (5.2 mg, 0.018 mmol), EDC·HCl (4.2 mg, 0.022 mmol, 1.25 equiv) and NHS (3.5 mg, 0.022 mmol, 1.25 equiv) were weighed into a reaction vial and purged with nitrogen. Then dry acetone was added

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

(400  $\mu\text{L}$ ) and the mixture was stirred for 2 hours at room temperature. Upon completion, cold water (5 mL) was added to the vial and the mixture was extracted with  $\text{CHCl}_3$  (10 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum to give the NHS ester of adduct **VII** (4.1 mg, 59%) as a yellowish oil.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 10.33 (s, 1H, H-4), 7.35–7.28 (m, 2H, H-8' and H-5'), 7.23–7.15 (m, 2H, H-6' and H-7'), 4.20 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-3'), 4.06 and 3.73 (each d, AB system,  $J = 17.3$  Hz, 1H each, H-2), 3.71 (dd,  $J = 11.7, 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.65 (dd,  $J = 11.7, 7.5$  Hz, 1H  $\text{CH}'\text{OH}$ ), 2.85 (wide s, 4H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ).

### 5.2.5.2 Preparation of adduct **VIII**

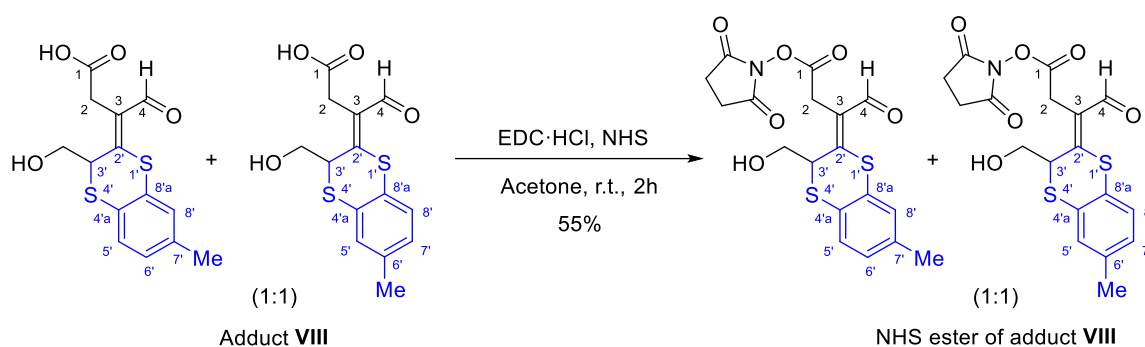


**Preparation of sodium 4-methylbenzene-1,2-bis(thiolate).** Prepared from 4-methylbenzene-1,2-dithiol following the same procedure described above for the preparation of sodium benzene-1,2-bis(thiolate). The yield of the sodium salt obtained in this case (46%) was significantly lower due to its partial solubility in the solvents used for washing.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) 7.30 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 7.28 (s, 1H, H-3), 6.53 (dd,  $J = 7.8, 1.5$  Hz, 1H, H-5), 2.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**Preparation of (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)-7-methylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoic acid/ (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)-6-methylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoic acid (Adduct **VIII**).** Adduct **VIII** was prepared as described above for adduct **VII**, using solutions of patulin (15.6 mg, 0.101 mmol) in PB100 (12.0 mL) and sodium 4-methylbenzene-1,2-bis(thiolate) (22.1 mg, 0.110 mmol, 1.1 equiv) in Milli-Q water (12.0 mL) and  $\text{CHCl}_3$  to extract. Adduct **VIII** (30.3 mg, 97%) was also obtained as a yellow oil, whose  $^1\text{H}$  NMR spectrum showed that it was a practically equimolecular mixture of two chromatographically homogeneous regioisomers. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3406m, 2922m, 1709s, 1655s, 1562m, 1469m, 1175s, 1044s;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 10.27 (br s, 1H, H-4), 7.18 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.5H, H-5'), 7.15 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.5H, H-8'), 7.12 (br s, 0.5H, H-8'), 7.09 (br s, 0.5H, H-5'), 6.99 (dd,  $J = 8.1, 1.0$  Hz, 0.5H, H-6'), 6.97

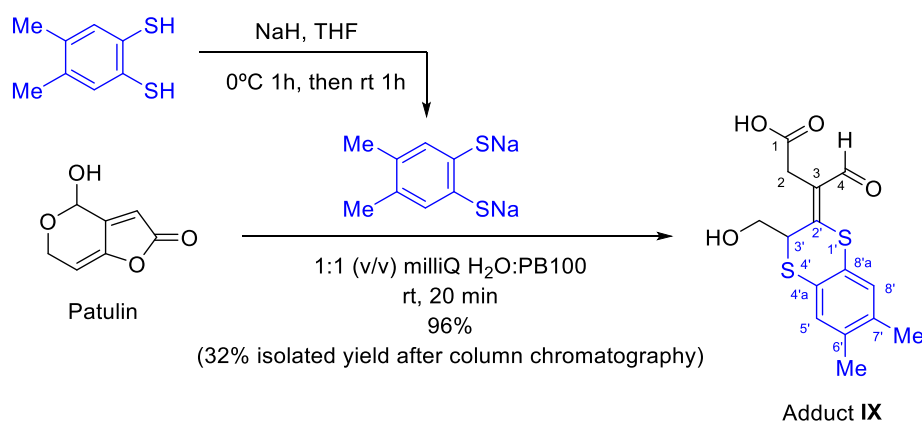
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

(dd,  $J = 8.1, 1.0$  Hz, 0.5H, H-7'), 4.27 (m, 1H, H-3'), 3.75–3.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.67 and 3.46 (each d, AB system,  $J = 16.6$  Hz, 1H each, H-2), 2.31 and 2.30 (each s, 1.5H each, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 188.3 (CH, C-4), 174.4 and 174.3 (C, C-1), 155.1 (C, C-2'), 137.6 and 126.0 (C, C-4'a), 137.4 and 129.1 (C, C-8'a), 131.1 and 127.5 (CH, C-8'), 130.5 and 127.0 (CH, C-5'), 128.4 and 128.3 (CH, C-7'/C-6'), 126.1 and 126.0 (C, C-3), 125.9 and 123.3 (C, C-6'/C-7'), 62.3 and 62.2 (CH<sub>2</sub>OH), 43.2 and 43.1 (CH, C-3'), 32.3 and 32.2 (CH<sub>2</sub>, C-2), 21.13 and 21.07 (CH<sub>3</sub>); HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> 293.0301, found [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> 293.0298.



**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)-7-methylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoate and 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)-6-methylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoate (VIII-NHS).** Adduct VIII (26.0 mg, 0.090 mmol), EDC·HCl (21.0 mg, 0.11 mmol, 1.25 equiv) and NHS (12.7 mg, 0.11 mmol, 1.25 equiv) were weighed into a reaction vial and purged with nitrogen. Then dry acetone was added (1.5 mL) and the mixture was stirred for 2 hours at room temperature. Upon completion, cold water (10 mL) was added to the vial and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give the NHS ester of adduct VIII (20.4 mg, 55%) as a yellowish oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 10.32 and 10.31 (each s, 0.5H each, H-4), 7.22 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.5H, H-5'), 7.17 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.5H, H-8'), 7.17 (m, 0.5H, H-8'), 7.11 (m, 0.5H, H-5'), 7.01 (m, 0.5H, H-6'), 6.99 (m, 0.5H, H-7'), 4.21–4.01 (m, 2H, H-3' and H-2), 3.80–3.58 (m, 3H, H'-2 and CH<sub>2</sub>OH), 2.84 (wide s, 4H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.31 and 2.30 (each s, 1.5H each, CH<sub>3</sub>).

## 5.2.5.3 Preparation of adduct IX



**Preparation of sodium 4,5-dimethylbenzene-1,2-bis(thiolate).** Sodium hydride 60 wt % dispersion in mineral oil (6.2 mg, 3.7 mg of NaH, 0.154 mmol, 2.2 eq.) was weighed into a round bottom flask fitted with a magnetic stir-bar and purged with nitrogen. The NaH-oil dispersion was then washed with several portions of dry pentane and back-flushed with N<sub>2</sub>, to give a dry white powder. The sodium hydride was then suspended in 150  $\mu$ L of dry THF and cooled in an ice bath. A solution of 4,5-dimethylbenzene-1,2-dithiol<sup>g,h</sup> (12 mg, 0.071 mmol) in 300  $\mu$ L of dry THF was then added dropwise (hydrogen evolution) and the mixture stirred for one hour at 0 °C and for a further hour at room temperature. The resulting white suspension was transferred to a centrifuge tube and centrifuged at high speed for several minutes. The supernatant was removed and the solid was washed with 500  $\mu$ L of dry THF and centrifuged again. This procedure was repeated for two more times. The supernatant and washing were concentrated to dryness in the rotary evaporator and then placed under high vacuum to give sodium 4,5-dimethylbenzene-1,2-bis(thiolate) as a white powder (15 mg, 99%).

**Preparation of (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)-6,7-dimethylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoic acid (Adduct IX).** Adduct IX was prepared as described above for adduct VII, using solutions of patulin (9.8 mg, 0.063 mmol) in PB100 (8.7 mL) and sodium 4,5-dimethylbenzene-1,2-bis(thiolate) (15 mg, 0.070 mmol, 1.1 equiv) in Milli-Q water (8.7 mL). Crude adduct IX (19.7 mg, 96.6%), also obtained as a yellow oil, showed by <sup>1</sup>H NMR a purity similar to those of the previously prepared adducts. As with the rest of above

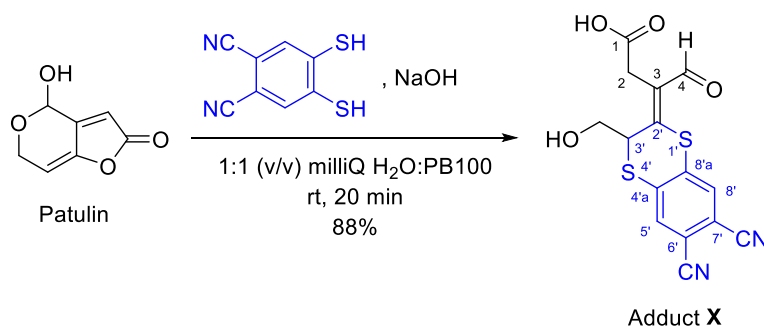
<sup>g</sup> 4,5-Dimethylbenzene-1,2-dithiol was prepared from 1,2-dibromo-4,5-dimethylbenzene in two steps by an adaptation of the procedure described by Gleiter for the preparation of aryl-1,2-dithiols (i. PhCH<sub>2</sub>SH, Cu<sub>2</sub>O, Py, 130 °C, 17 days; ii. BBr<sub>3</sub>, PhF, 70 °C, 17h).<sup>193-195</sup>

<sup>h</sup> NMR data of 4,5-dimethylbenzene-1,2-dithiol: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.16 (s, 2H, H-3 and H-6), 3.63 (s, 2H, 2xSH), 2.17 (2, 6H, 2xCH<sub>3</sub>).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

prepared adducts, adduct **IX** can be chromatography on silica gel, albeit at the cost of a significant reduction in the yield of the purified product. Thus, chromatographic purification of the above crude product, using 95:5 CHCl<sub>3</sub>-MeOH as eluent, afforded adduct **IX** in only 32% yield (6.5 mg). IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3375m, 2922m, 1716m, 1651s, 1558m, 1455m; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 10.23 (s, 1H, HCO), 7.14 (s, 1H, H-8'), 7.11 (s, 1H, H-5'), 4.47 (dd, *J* = 7.9, 6.8 Hz, 1H, H-3'), 3.69 (dd, *J* = 11.1, 7.9 Hz, 1H, *CHOH*), 3.66 and 3.58 (each d, AB system, *J* = 16.9 Hz, 1H each, H-2), 3.60 (dd, *J* = 11.1, 6.8 Hz, 1H, *CH'OH*), 2.82 (br s, 2H, 2xOH), 2.23 and 2.22 (each s, 3H each, 2xCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 188.5 (CH, C-4), 171.7 (C, C-1), 154.9 (C, C-2'), 136.9 (C, C-4'a), 136.8 (C, C-8'a), 131.8 (CH, C-8'), 128.2 (CH, C-5'), 127.3 (C, C-6'), 127.3 (C, C-7'), 125.0 (C, C-3), 62.9 (CH<sub>2</sub>OH), 43.9 (CH, C-3'), 32.4 (CH<sub>2</sub>, C-2), 19.2 (2xCH<sub>3</sub>); HRMS *m/z* calcd for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 325.0563, found [M+H]<sup>+</sup> 325.0558.

### 5.2.5.4 Preparation of adduct **X**



**Preparation of (Z)-3-(6,7-dicyano-3-(hydroxymethyl)benzo[*b*][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoic acid (Adduct **X**).** A solution of 4,5-dimercaptophthalonitrile<sup>ij</sup> (8.8 mg, 0.046 mmol, 1.05 equiv) in 16 mM aqueous NaOH (6.2 mL, 4.0 mg, 0.099 mmol, 2.2 equiv) was added to a stirred solution of patulin (7.0 mg, 0.045 mmol) in PB100 (6.2 mL) and the mixture was stirred for 20 minutes at room temperature. Work up as described above for the preparation of adduct **VII** afforded adduct **X** (17.4 mg, 88%) as a dark yellow oil. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3442m, 2232s, 1716s, 1668m, 1571s, 1518m, 1470m, 1220s, 1118s; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 10.19 (s, 1H, HCO), 8.08 (s, 1H, H-8'), 8.01 (s, 1H, H-5'), 4.77 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-3'), 3.76 (dd, *J* = 11.3, 7.8 Hz, 1H, *CHOH*), 3.75 and 3.68 (each d, AB system, *J* = 17.0 Hz, 1H each, H-2), 3.68 (dd, *J* = 11.3, 6.8 Hz, 1H, *CH'OH*); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz,

<sup>i</sup> 4,5-Dimercaptophthalonitrile was prepared from 4,5-dichlorophthalonitrile in two steps as described by Gudat (i. PhCH<sub>2</sub>SH, DMF, rt, 20h; ii. AlCl<sub>3</sub>, benzene, rt, 1.5h).<sup>154</sup>

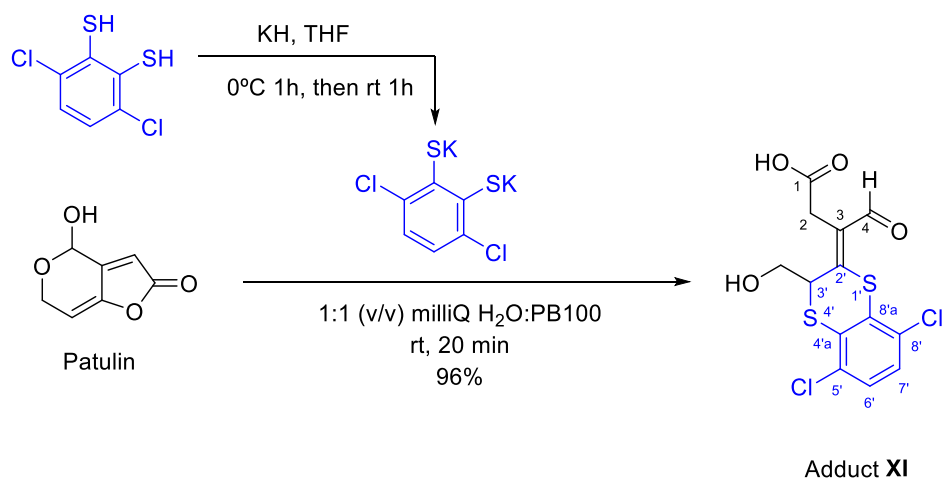
<sup>j</sup> NMR data of 4,5-dimercaptophthalonitrile: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.06 (s, 2H, H-3 and H-6); <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 140.6 (2C, C-1 and C-2), 134.2 (2C, C-3 and C-6), 116.0 (2C, 2xCN), 112.7 (2C, C-4 and C-5).



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 189.5 (CH, C-4), 171.2 (C, C-1), 148.6 (C, C-2'), 137.9 (C, C-4'a), 136.5 (C, C-8'a), 135.2 (CH, C-5'), 132.3 (CH, C-8'), 129.5 (C, C-3), 115.9 (2C, 2xCN), 113.0 (C, C-6'), 112.8 (C, C-7'), 63.0 (CH<sub>2</sub>OH), 43.2 (CH, C-3'), 32.9 (CH<sub>2</sub>, C-2); HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M-H]<sup>-</sup> 345.0009, found [M-H]<sup>-</sup> 344.9994.

### 5.2.5.5 Preparation of adduct **XI**

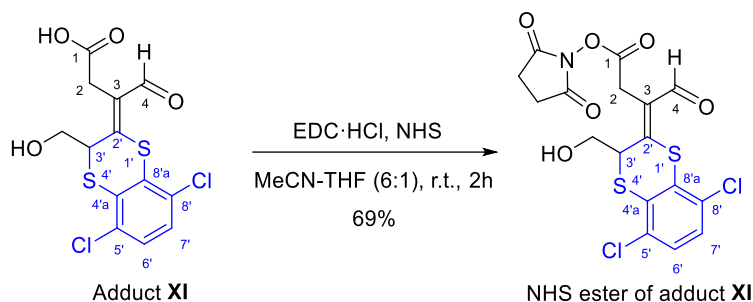


**Preparation of potassium 3,6-dichlorobenzene-1,2-bis(thiolate).** Potassium hydride dispersion in mineral oil (117.8 mg of KH, 2.94 mmol, 3.1 eq.) was weighed into a round bottom flask fitted with a magnetic stir-bar and purged with nitrogen. The KH-oil dispersion was then washed with several portions of dry pentane and back-flushed with N<sub>2</sub>, to give a dry white powder. The potassium hydride was then suspended in 2.5 mL of dry THF and cooled in an ice bath. A solution of 3,6-dichlorobenzene-1,2-dithiol (196.1 mg, 0.930 mmol) in 500  $\mu$ L of dry THF was then added dropwise (hydrogen evolution) and the mixture stirred for one hour at 0 °C and for a further hour at room temperature. The resulting white suspension was transferred to a centrifuge tube and centrifuged at high speed for several minutes. The supernatant was removed and the solid was washed with 500  $\mu$ L of dry THF and centrifuged again. This procedure was repeated for two more times. The supernatant and washing were concentrated to dryness in the rotary evaporator and then placed under high vacuum to give potassium 3,6-dichlorobenzene-1,2-bis(thiolate) as a yellow powder (174.7 mg, 66%).

**Preparation of (Z)-3-(5,8-dichloro-3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoic acid (Adduct XI).** Adduct **XI** was prepared as described above for adduct **VII**, using solutions of patulin (7.0 mg, 0.045 mmol) in PB100 (5.5 mL) and potassium 3,6-dichlorobenzene-1,2-bis(thiolate) (14.2 mg, 0.049 mmol, 1.1 equiv) in Milli-Q water (5.5 mL) and AcOEt to extract. Adduct **XI** (16.7 mg, 100%) was also obtained as a yellow oil. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3278m, 2920s, 2853m, 1701m, 1656s, 1559w, 1399s, 1162s; <sup>1</sup>H

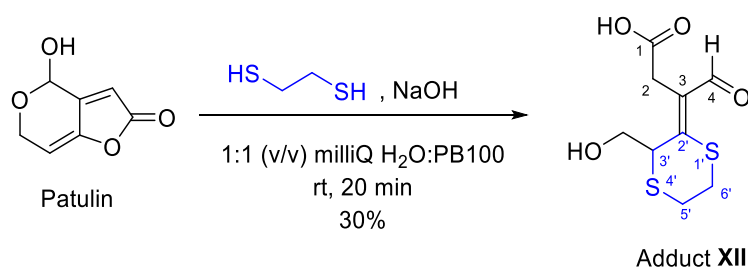
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 10.36 (s, 1H, HCO), 7.21 (s, 2H, H-6' and H-7'), 4.43 (dd,  $J$  = 8.2, 6.6 Hz, 1H, H-3'), 3.81 (dd,  $J$  = 11.5, 8.2 Hz, 1H, CHOH), 3.73 (dd,  $J$  = 11.5, 6.6 Hz, 1H, CH'OH), 3.66 and 3.56 (each d, AB system,  $J$  = 16.6 Hz, 1H each, H-2); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 188.7 (CH, C-4), 173.8 (C, C-1), 150.1 (C, C-2'), 132.3 (C, C-8'a), 129.7 (C, C-8'), 129.0 (C, C-4'a), 128.4 (C, C-5'), 128.4 (C, C-3), 127.7 (CH, C-6'), 127.5 (CH, C-7'), 63.0 (CH<sub>2</sub>OH), 42.5 (CH, C-3'), 31.7 (CH<sub>2</sub>, C-2); HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 364.9470, found [M+H]<sup>+</sup> 364.9454.



**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (Z)-3-(5,8-dichloro-3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-oxobutanoate (XI-NHS).** Adduct XI (13.0 mg, 0.036 mmol), EDC·HCl (8.5 mg, 0.045 mmol, 1.25 equiv) and NHS (5.4 mg, 0.047 mmol, 1.3 equiv) were weighed into a reaction vial and purged with nitrogen. Then a 6:1 mixture of anhydrous MeCN and THF (0.7 mL) was added and the mixture was stirred for 2 hours at room temperature. Upon completion, cold water (5 mL) was added to the vial and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give the NHS ester of adduct XI (11.5 mg, 69%) as a yellowish oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 10.38 (s, 1H, H-4), 7.21 (s, 2H, H-6' and H-7'), 4.34 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, H-3'), 4.05 and 3.79 (each d, AB system,  $J$  = 17.3 Hz, 1H each, H-2), 3.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 2.86 (wide s, 4H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO).

### 5.2.5.6 Preparation of adduct XII



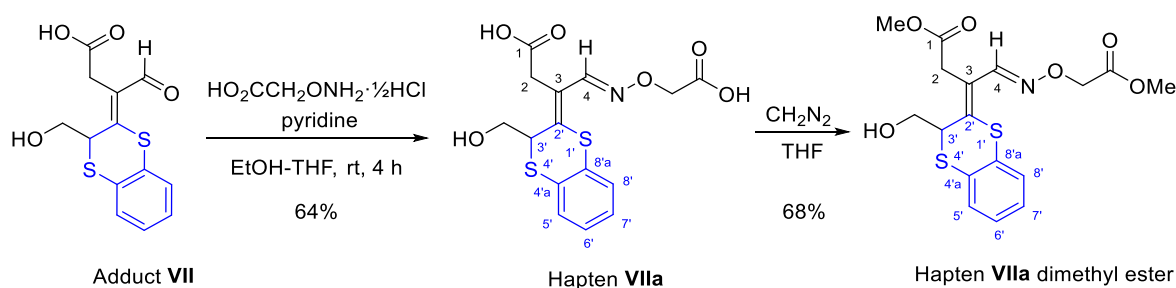
**Preparation of (Z)-3-(3-(hydroxymethyl)-1,4-dithian-2-ylidene)-4-oxobutanoic acid (Adduct XII).** A solution of ethane-1,2-dithiol (5.4  $\mu$ L, 6.05 mg, 0.064 mmol, 1.05 equiv) in

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

12 mM aqueous NaOH (12.0 mL, 5.7 mg, 0.143 mmol, 2.3 equiv) was added to a stirred solution of patulin (9.6 mg, 0.062 mmol) in PB100 (12.0 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 20 minutes. The reaction mixture was cooled in an ice-water bath, acidified with formic acid to pH 3 and extracted with CHCl<sub>3</sub> (20 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give an oily residue (18 mg). The addition of CHCl<sub>3</sub> (0.8 mL) resulted in the appearance of a white solid that was separated by centrifugation, washed with acetone and dried under reduced pressure. It was identified as the adduct **XII** (4.7 mg, 30%). IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3356m, 2920s, 2853m, 2113m, 1701m, 1654s, 1407s, 1196s; 1092s, 1047s, 967s; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  (ppm) 10.42 (s, 1H, HCO), 4.32 (dd, *J* = 11.2, 8.7 Hz, 1H, CHOH), 4.04 (dd, *J* = 11.2, 6.1 Hz, 1H, CH'OH), 3.78 (dd, *J* = 8.7, 6.1 Hz, 1H, H-3'), 3.55 and 3.36 (each d, AB system, *J* = 16.8 Hz, 1H each, H-2), 3.42 and 3.40 (each dd, *J* = 10.5, 1.1 Hz, 1H each, H-6') 2.97 and 2.63 (each ddd, *J* = 9.9, 4.7, 1.4 Hz, 1H each, H-5'); <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 190.9 (C-4), 170.0 (C-1), 148.1 (C-2'), 130.7 (C-3), 65.2 (CH<sub>2</sub>OH), 43.4 (C-3'), 34.6 (C-2), 33.3 (C-6'), 33.1 (C-5'); HRMS calcd for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 249.0250, found [M+H]<sup>+</sup> 249.0245.

### 5.2.6 Synthesis of haptens **VIIa**, **VIIIa** and **XIa**

#### 5.2.6.1 Synthesis and methylation of hapten **VIIa**



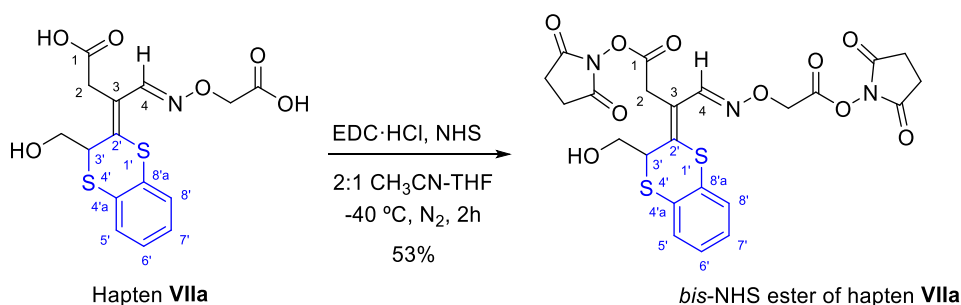
**Preparation of (3Z,4E)-4-((carboxymethoxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)butanoic acid (Hapten VIIa).** A solution of adduct **VII** (17.5 mg, 0.059 mmol), (aminooxy)acetic acid hemihydrochloride (10.31 mg, 0.094 mmol, 1.6 equiv) and dry pyridine (10  $\mu$ L, 9.8 mg, 0.124 mmol, 2.1 equiv) in a 3:1 (v/v) mixture of absolute EtOH and anhydrous THF (0.5 mL) was stirred at room temperature for 4 hours under nitrogen. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was suspended in a cold 1M aqueous solution of HCl (1 mL) and extracted with EtOAc (10 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated on the rotary evaporator to give hapten **VIIa** (14 mg, 64%) as a yellow film. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3006m, 2926s, 2113w, 1707s, 1628w, 1420m,

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

1360s, 1220s, 1092s;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.54 (s, 1H, H-4), 7.31 (dd,  $J = 7.9, 1.5$  Hz, 1H, H-5'), 7.29 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H, H-8'), 7.19 (td,  $J = 7.6, 1.7$  Hz, 1H, H-6'), 7.15 (td,  $J = 7.4, 1.5$  Hz, 1H, H-7'), 4.66 (s, 2H,  $\text{NOCH}_2$ ), 4.51 (dd,  $J = 7.9, 6.8$  Hz, 1H, H-3'), 3.71 (dd,  $J = 11.1, 7.9$  Hz, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.70 and 3.65 (each d, AB system,  $J = 16.9$  Hz, 1H each, H-2), 3.60 (dd,  $J = 11.1, 6.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}'\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 171.4 (C, C-1), 170.7 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 148.5 (CH, C-4), 140.0 (C, C-2'), 130.95 (CH, C-8'), 130.9 (C, C-8'a), 128.4 (C, C-4'a), 127.5 (CH, C-5'), 127.3 (CH, C-6'), 127.1 (CH, C-7'), 121.8 (C, C-3), 71.4 ( $\text{NOCH}_2$ ), 63.5 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 43.4 (CH, C-3'), 33.7 ( $\text{CH}_2$ , C-2); HRMS calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_6\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  370.0414, found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  370.0420.

### Preparation of methyl (3Z,4E)-3-(3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-((2-methoxy-2-oxoethoxy)imino)butanoate (Hapten VIIa dimethyl ester).

Hapten VIIa (5.5 mg, 0.0149) was methylated with diazomethane as described above for adduct VII. Upon completion, the reaction mixture was concentrated in vacuo and the residue chromatographed on silica gel, using a 95:5 mixture of  $\text{CHCl}_3$ -MeOH as eluent, to afford the dimethyl ester of hapten VIIa (4 mg, 68%) as a yellowish oil.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.60 (s, 1H, H-4), 7.26 (dd,  $J = 7.6, 1.8$  Hz, 1H, H-8'), 7.20 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H, H-5'), 7.14 (td,  $J = 7.6, 1.8$  Hz, 1H, H-6'), 7.10 (td,  $J = 7.4, 1.8$  Hz, 1H, H-7'), 4.66 (s, 2H,  $\text{NOCH}_2$ ), 4.27 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-3'), 3.78 (s, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.72 (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.69 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.62 (m, 1H,  $\text{CH}'\text{OH}$ ), 3.61 and 3.55 (each d, AB system,  $J = 16.5$  Hz, 1H each, H-2), 2.35 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H, HO);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 171.3 (C, C-1), 170.2 (C,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 148.2 (CH, C-4), 139.2 (C, C-2'), 130.4 (CH, C-8'), 130.3 (C, C-8'a), 127.1 (C, C-5'), 126.8 (CH, C-6'), 126.7 (CH, C-4'a), 126.5 (CH, C-7'), 120.8 (C, C-3), 71.2 ( $\text{NOCH}_2$ ), 63.0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 52.5 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 52.1 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 43.1 (CH, C-3'), 33.5 ( $\text{CH}_2$ , C-2); HRMS calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  398.0727, found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  398.0740.

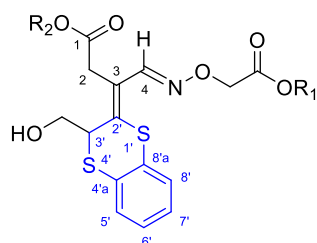


**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (3Z,4E)-4-((2-((2-(12-azaneylidene)-5-oxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethoxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)butanoate (bis-NHS-VIIa).** Hapten VIIa (13.4 mg, 0.036 mmol), EDC·HCl (21.6 mg, 0.112 mmol, 3.1 equiv) and NHS (12.8 mg, 0.112 mmol, 3.1 equiv) were

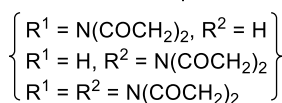
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

weighed into a reaction vial and purged with nitrogen. The vial was then cooled to  $-50^{\circ}\text{C}$  and a 2:1 mixture of anhydrous MeCN and THF (1.2 mL) was added. The mixture was stirred for 2 hours, keeping the temperature at  $-40^{\circ}\text{C}$ . Then cold water (5 mL) was added to the vial and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O (15 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give the *bis*-NHS ester of hapten **VIIa** (10.8 mg, 53%) as a yellowish oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.61 (s, 1H, H-4), 7.32–7.27 (m, 1H, H-8'), 7.24–7.08 (m, 3H, H-5', H-6' and H-7'), 5.08 (AB system,  $J = 16.7$  Hz, 2H, NOCH<sub>2</sub>), 4.24 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-3'), 4.00 and 3.84 (each d, AB system,  $J = 17.3$  Hz, 1H each, H-2), 3.72–3.64 (m, 1H, CHOH), 3.60 (dd,  $J = 11.8, 7.5$  Hz, 1H, CH'OH), 2.84 and 2.83 (each s, 4H each, 2xCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO).

### Preparation of (3Z,4E)-4-((2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethoxy)imino)-3-



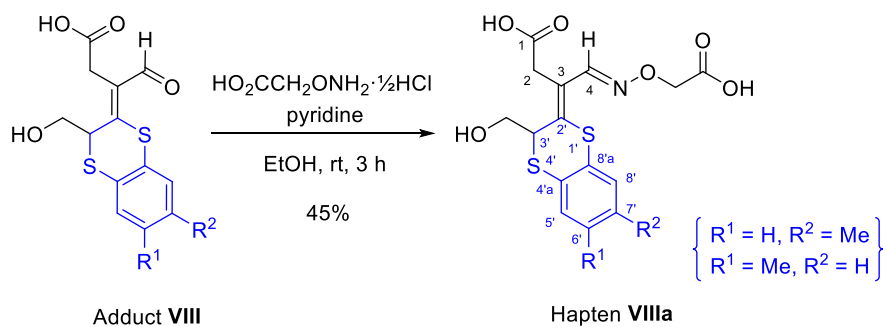
NHS ester of hapten **VIIa**



### (3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)

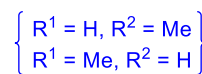
**butanoic acid (NHS-VIIa).** The mixture of NHS esters (11.0 mg), a brown film, was obtained from a solution of hapten **VIIa** (11.2 mg, 0.030 mmol), EDC·HCl (5.8 mg, 0.030 mmol, 1.0 equiv) and NHS (3.5 mg, 0.030 mmol, 1.0 equiv) in MeCN:THF (2:1) (0.4 mL) at  $-40^{\circ}\text{C}$ . The ethyl acetate extract of the reaction mixture was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>.

### 5.2.6.2 Synthesis of hapten **VIIIa**



Adduct **VIII**

Hapten **VIIIa**

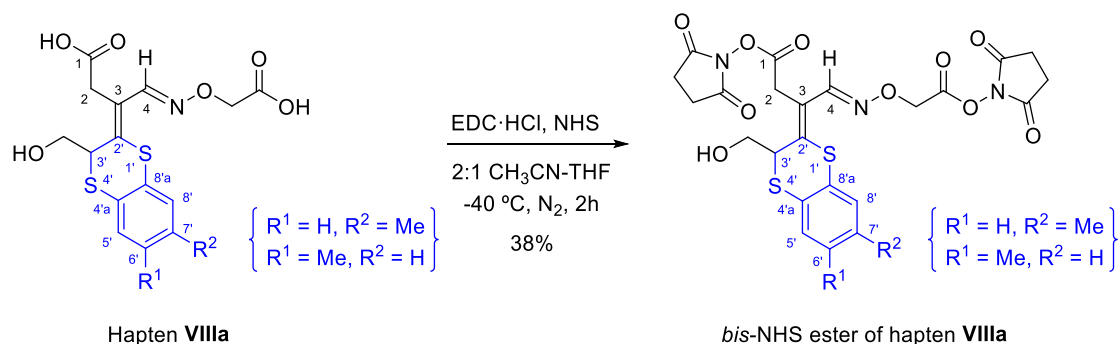


### Preparation of (3Z,4E)-4-((carboxymethoxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)-6-methylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)butanoic acid and (3Z,4E)-4-((carboxymethoxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)-7-methylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)

**butanoic acid (Hapten VIIIa).** A solution of adduct **VIII** (10.5 mg, 0.034 mmol), (aminoxy)acetic acid hemihydrochloride (4.8 mg, 0.044 mmol, 1.3 equiv) and dry pyridine (5.8  $\mu\text{L}$ , 5.7 mg, 0.071 mmol, 2.1 equiv) in absolute EtOH (0.2 mL) was stirred at room temperature for 3 hours under nitrogen. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was suspended in a cold 1M aqueous solution of HCl (1 mL) and

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

extracted with EtOAc (10 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and concentrated on the rotary evaporator to give hapten **VIIIa** (5.8 mg, 45%) as a yellow film. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3408m (wide), 2924s, 2118w, 1705s, 1631w, 1420m, 1358s, 1220s, 1094s;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.80 (wide s,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 8.530 and 8.528 (each s, 0.5H each, H-4), 7.18 (d,  $J = 8.1$  Hz, 0.5H, H-8'), 7.16 (d,  $J = 8.1$  Hz, 0.5H, H-5'), 7.13 (d,  $J = 2.1$  Hz, 0.5H, H-8'), 7.11 (d,  $J = 2.1$  Hz, 0.5H, H-5'), 7.02 (dd,  $J = 8.1, 2.1$  Hz, 0.5H, H-6'), 6.98 (dd,  $J = 8.1, 2.1$  Hz, 0.5H, H-7'), 4.67 and 4.66 (each s, 1H each,  $\text{NOCH}_2$ ), 4.48 and 4.47 (each dd,  $J = 7.9, 6.8$  Hz, 0.5H each, H-3'), 3.69 and 3.66 (each dd,  $J = 11.2, 7.9$  Hz, 0.5H each,  $\text{CHOH}$ ), 3.69 and 3.63 (each d, AB system,  $J = 17.2$  Hz, 1H each, H-2), 3.58 (dd,  $J = 11.2, 6.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}'\text{OH}$ ), 2.29 and 2.27 (each s, 1.5H each,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 171.4 (CH, C-1), 170.7 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 148.5 (C, C-2'), 148.5 (CH, C-4), 140.5 and 140.4 (C, C-4'a), 137.4 and 137.2 (C, C-6'/C-7'), 131.3 and 130.8 (CH, C-5'), 130.7 and 128.1 (C, C-8'a), 128.3 and 128.1 (CH, C-6'/C-7'), 127.7 and 127.3 (CH, C-8'), 121.5 and 121.4 (C, C-3), 71.3 ( $\text{NOCH}_2$ ), 63.5 and 63.4 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 43.6 and 43.5 (CH, C-3'), 33.7 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 20.8 and 20.7 ( $\text{CH}_3$ ); HRMS calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_6\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  384.0570, found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  384.0582.

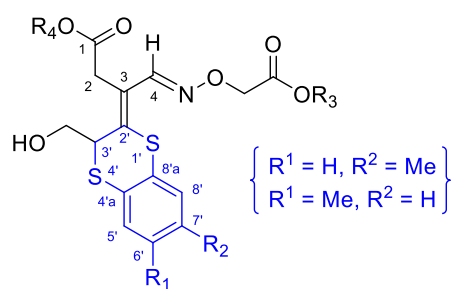


**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (3*Z*,4*E*)-4-((2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethoxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)-6-methylbenzo[*b*][1,4]dithiin-2(3*H*)-ylidene)butanoate and 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (3*Z*,4*E*)-4-((2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethoxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)-7-methylbenzo[*b*][1,4]dithiin-2(3*H*)-ylidene)butanoate (**VIIIa-NHS**).** Hapten **VIIIa** (7.1 mg, 0.019 mmol), EDC·HCl (10.7 mg, 0.056 mmol, 3.0 equiv) and NHS (6.4 mg, 0.056 mmol, 3.0 equiv) were weighed into a reaction vial and purged with nitrogen. The vial was then cooled to  $-50^\circ\text{C}$  and a 2:1 mixture of anhydrous MeCN and THF (450  $\mu\text{L}$ ) was added. The mixture was stirred for 2 hours, keeping the temperature at  $-40^\circ\text{C}$ . Then cold water (5 mL) was added to the vial and the mixture was extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum to give the *bis*-NHS ester of hapten **VIIIa** (4.2 mg, 38%) as a

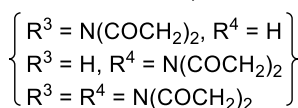
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

yellowish oil.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.56 and 8.55 (each s, 0.5H each, H-4), 7.20 (d,  $J = 8.1$  Hz, 0.5H, H-8'), 7.19 (d,  $J = 8.1$  Hz, 0.5H, H-5'), 7.17-7.15 (m, 1H, H-8' and H-5'), 7.06-6.96 (m, 1H, H-6' and H-7'), 5.20 and 5.19 (each s, 1H each,  $\text{NOCH}_2$ ), 4.75 (dd,  $J = 2.1$ , 1.0 Hz, 1H, H-3'), 4.58-4.49 (m, 2H, H-2), 3.68-3.58 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 2.90 and 2.88 (each s, 4H each,  $2 \times \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.30 and 2.28 (each s, 1.5H each,  $\text{CH}_3$ ).

### Preparation of (3Z,4E)-4-((2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethoxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)-6-methylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)butanoic acid and (3Z,4E)-4-((2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethoxy)imino)-3-(3-



NHS ester of haptin **VIIa**

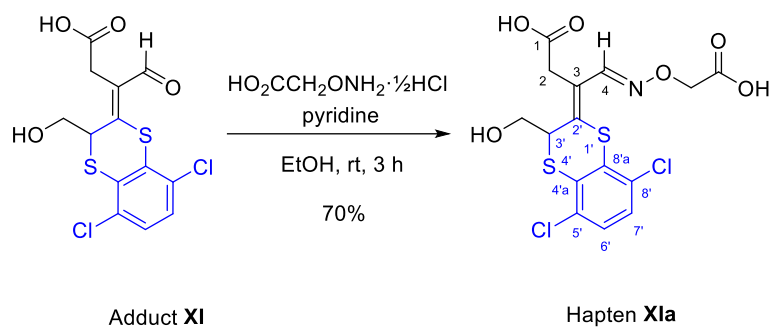


### (hydroxymethyl)-7-methylbenzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)butanoic acid (NHS-VIIIa).

The mixture of NHS esters (10.7 mg), a brown film, was obtained from a solution of haptin **VIIIa** (11.8 mg, 0.031 mmol), EDC·HCl (5.9 mg, 0.031 mmol, 1.0 equiv) and NHS (3.6 mg, 0.031 mmol, 1.0 equiv) in MeCN:THF (2:1) (0.4 mL) at  $-40^\circ\text{C}$ . The ethyl acetate extract of the reaction mixture was washed with brine and

dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ .

### 5.2.6.3 Synthesis of haptin **XIa**



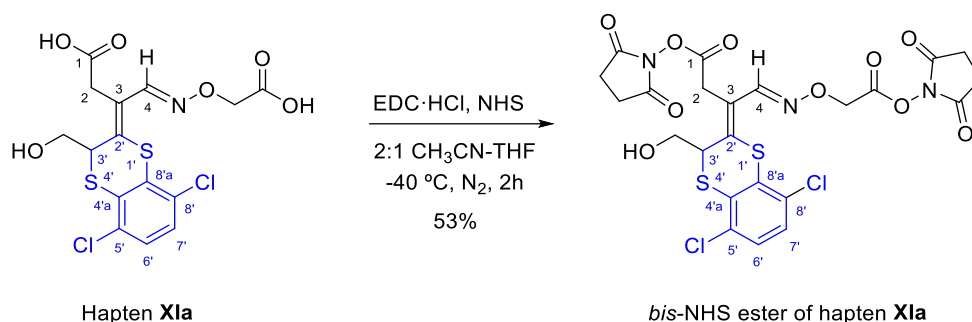
Adduct **XI**

Haptin **XIa**

**Preparation of (3Z,4E)-4-((carboxymethoxy)imino)-3-(5,8-dichloro-3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)butanoic acid (Haptin XIa).** A solution of adduct **XI** (16.3 mg, 0.045 mmol), (aminooxy)acetic acid hemihydrochloride (6.4 mg, 0.058 mmol, 1.3 equiv) and dry pyridine (7.6  $\mu\text{L}$ , 7.4 mg, 0.095 mmol, 2.1 equiv) in absolute EtOH (0.4 mL) was stirred at room temperature for 3 hours under nitrogen. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was suspended in a cold 1M aqueous solution of HCl (1 mL) and extracted with EtOAc (10 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and concentrated on the rotary evaporator to give haptin **VIIa** (13.7 mg, 70%) as a yellow film. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3054m,

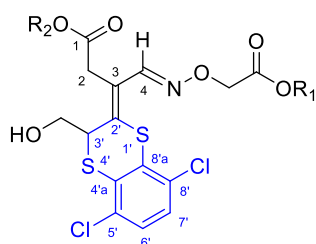
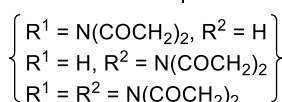
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

2924s, 2117w, 1701s, 1403s, 1353m, 1220s, 1164s, 1090s, 1071s;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.61 (s, 1H, H-4), 7.33 (each d, AB system,  $J = 8.6$  Hz, 1H each, H-6' and H-7'), 4.71 (dd,  $J = 8.4, 6.3$  Hz, 1H, H-3'), 4.69 (s, 2H,  $\text{NOCH}_2$ ), 3.78 and 3.69 (each d, AB system,  $J = 16.8$  Hz, 1H each, H-2), 3.77 (dd,  $J = 11.1, 8.4$  Hz, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.68 (dd,  $J = 11.1, 6.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}'\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 171.0 (C, C-1), 170.6 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 148.8 (CH, C-4), 136.2 (C, C-2'), 132.3 (CH, C-8'a), 130.4 (C, C-5'), 130.0 (C, C-8'), 129.7 (CH, C-4'a), 127.8 (CH, C-7'), 127.7 (CH, C-6'), 124.8 (C, C-3), 71.4 ( $\text{NOCH}_2$ ), 64.0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 43.1 (CH, C-3'), 33.8 ( $\text{CH}_2$ , C-2); HRMS calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{NO}_6\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  437.9634, found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  437.9632.

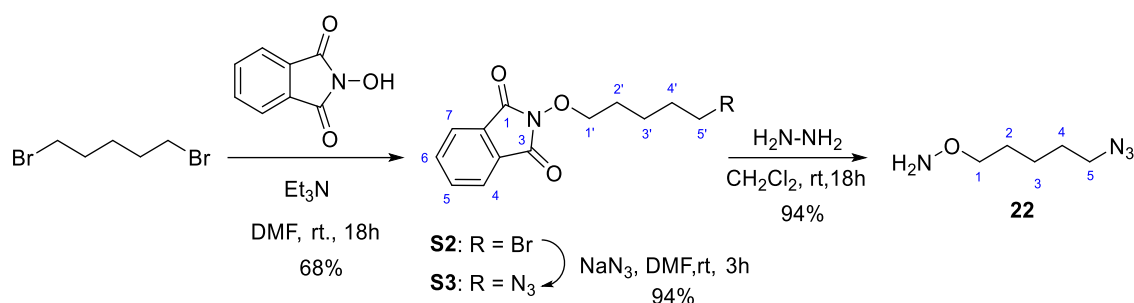


**Preparation of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (3*Z*,4*E*)-3-(5,8-dichloro-3-(hydroxymethyl)benzo[*b*][1,4]dithiin-2(3*H*)-ylidene)-4-((2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethoxy)imino)butanoate (**XIa-NHS**).** Hapten **XIa** (4.4 mg, 0.010 mmol), EDC·HCl (5.9 mg, 0.031 mmol, 3.1 equiv) and NHS (3.6 mg, 0.031 mmol, 3.1 equiv) were weighed into a reaction vial and purged with nitrogen. The vial was then cooled to  $-50^\circ\text{C}$  and a 2:1 mixture of anhydrous MeCN and THF (0.9 mL) was added. The mixture was stirred for 2 hours, keeping the temperature at  $-40^\circ\text{C}$ . Then cold water (5 mL) was added to the vial and the mixture was extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum to give the *bis*-NHS ester of hapten **XIa** (3.9 mg, 62%) as a yellowish oil.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.65 (s, 1H, H-4), 7.35 (each d, AB system,  $J = 8.5$  Hz, 1H each, H-6' and H-7'), 5.22 (each d, AB system,  $J = 16.9$  Hz, 2H,  $\text{NOCH}_2$ ), 4.80 (dd,  $J = 8.3, 6.4$  Hz, 1H, H-3'), 4.48 (t,  $J = 6.4$  Hz, 1H, -OH), 4.09 (each d, AB system,  $J = 17.4$  Hz, 1H each, H-2), 3.77-3.72 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 2.90 and 2.89 (each s, 4H each,  $2\times\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ).



**Preparation of (3Z,4E)-3-(5,8-dichloro-3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)-4-((2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethoxy)imino)butanoic acid (NHS-XIa).**

 NHS ester of haptent **XIa**


The mixture of NHS esters (7.6 mg), a brown film, was obtained from a solution of haptent **XIa** (9.4 mg, 0.022 mmol), EDC·HCl (4.1 mg, 0.022 mmol, 1.0 equiv) and NHS (2.5 mg, 0.022 mmol, 1.0 equiv) in MeCN:THF (2:1) (0.4 mL) at  $-40^\circ\text{C}$ . The ethyl acetate extract of the reaction mixture was washed with brine and dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ .

**5.2.7 Spacer arm synthesis**


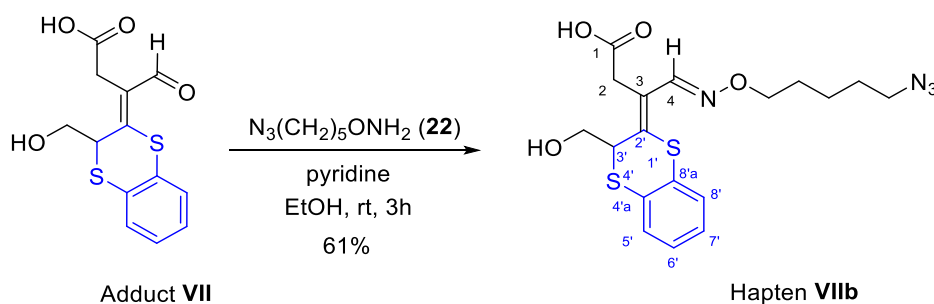
**Preparation of 2-((5-bromopentyl)oxy)isoindoline-1,3-dione (S2).** 1,5-Dibromopentane (3.4 mL, 5.74 g, 25 mmol, 2 equiv) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (3.8 mL, 27.3 mmol, 2.2 equiv) were added dropwise to a stirred solution of 2-hydroxyisoindoline-1,3-dione (2.0 g, 12.26 mmol) in anhydrous DMF (6 mL) under  $\text{N}_2$  at room temperature. The reaction mixture was stirred at this temperature for 6 hours, then diluted in water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and purified by silica gel flash chromatography, using Hexane/AcOEt (6:4) as eluent, to afford **S2** as a white solid (2.60 g, 68%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 7.87 (m, 4H, H-4, H-5, H-6 and H-7), 4.23 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H, H-1'), 3.55 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H-5'), 1.96 (dt,  $J = 14.1$ , 7.0 Hz, 1H, H-4'), 1.80 (m, 2H, H-2'), 1.70 (m, 2H, H-3').

**Preparation of 2-((5-azidopentyl)oxy)isoindoline-1,3-dione (S3).** A solution of the above obtained bromo-hydroxyisoindoline derivative **S2** (2.60 g, 8.33 mmol) and sodium azide (1.10 g, 16.92 mmol, 2 equiv) in anhydrous DMF (9 mL) was stirred at  $40^\circ\text{C}$  under  $\text{N}_2$  for 3 hours, then diluted with water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and concentrated in vacuo to afford azide-hydroxyisoindoline **S3** as a light yellow oil (2.15 mg, 94%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 7.87 (m, 4H, H-4, H-5, H-6 and H-7), 4.23 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H, H-1'), 3.39 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H-5'), 1.80 (pent,  $J = 6.5$  Hz, 1H, H-4'), 1.74-1.52 (m, 2H, H-2' and H-3').

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Preparation of *O*-(5-azidopentyl)hydroxylamine (22).** Hydrazine monohydrate (286  $\mu\text{L}$ , 5.84 mmol, 1.6 equiv) was added dropwise to the solution of azide-hydroxyisindoline **S3** (1.00 g, 3.65 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and washed, washed twice with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and purified by silica gel flash chromatography, using a mixture of hexane-EtOAc (8:2) as eluent, to afford hydroxylamine-azide **22** as a white amorphous solid (495 mg, 94%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.66 (t,  $J = 6.4$  Hz, 1H, H-1), 3.27 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H, H-5), 1.60 (m, 4H, H-2 and H-4), 1.47 (m, 2H, H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 75.8 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 51.5 ( $\text{CH}_2$ , C-5), 28.8 ( $\text{CH}_2$ , C-4), 28.0 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 23.4 ( $\text{CH}_2$ , C-3); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  145.1084, found  $[\text{M}+\text{H}]^+$  145.1083.

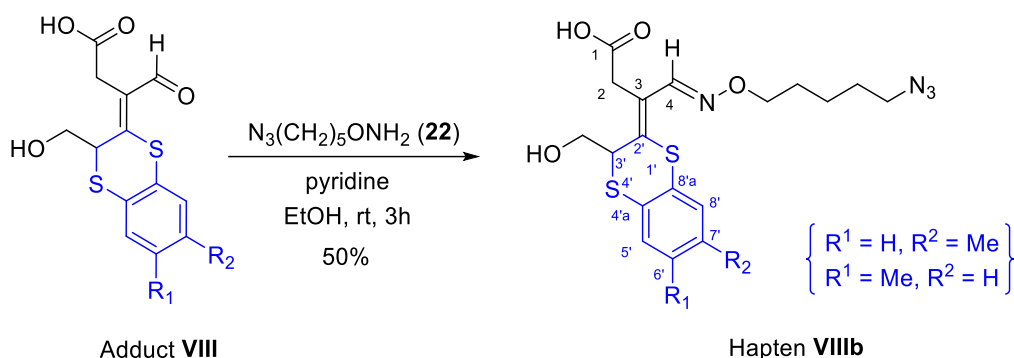
### 5.2.8 Synthesis of haptens **VIIb**, **VIIIb** and **XIb**



**Preparation of (3*Z*,4*E*)-4-(((5-azidopentyl)oxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)benzo[*b*][1,4]dithiin-2(3*H*)-ylidene)butanoic acid (Hapten **VIIb**).** A solution of adduct **VII** (10.9 mg, 0.038 mmol), hydroxylamine **22** (6.8 mg, 0.047 mmol, 1.24 equiv) and dry pyridine (6.2  $\mu\text{L}$ , 0.077 mmol, 2.0 equiv) in absolute EtOH (0.3 mL) was stirred at room temperature for 3 hours under nitrogen. Then, the solvents were removed under reduced pressure; the residue obtained was treated with 1 mL of a 1M cold aqueous solution of HCl (1 mL) and extracted with EtOAc (10 mL x 3). The combined organic phases were washed with brine (15 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by flash silica gel chromatography, using a 98:2 mixture of  $\text{CHCl}_3$ -MeOH as eluent, to provide the hapten **VIIb** (9.8 mg, 61%) as a clear oil. IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3181m, 2939s, 2871m, 2096s, 1707s, 1455m, 1422m, 1217s, 1187s, 1108s, 1049s, 933s;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.44 (s, 1H, H-4), 7.28 (m, 2H, H-5' and H-8'), 7.17 (m, 2H, H-6' and H-7'), 4.52 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-3'), 4.10 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H-1''), 3.73 and 3.66 (each d, AB system,  $J = 16.9$  Hz, 1H each, H-2), 3.70 (dd,  $J = 11.1, 7.8$  Hz, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.59 (dd,  $J = 11.1, 6.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}'\text{OH}$ ), 3.35 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H, H-5''), 2.82 (br s, 2H, 2xOH), 1.77–1.58 (m, 4H, H-2'' and H-4''), 1.52–1.41 (m, 2H, H-3'');  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 171.7 (C, C-1), 146.9 (CH, C-4), 138.4 (C, C-2'), 131.1 (C, C-8'a), 130.9

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

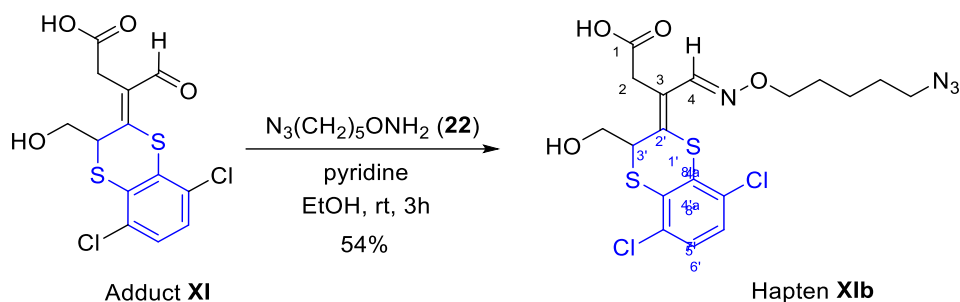
(CH, C-8'), 128.4 (C, C-4'a), 127.5 (CH, C-6'), 127.3 (CH, C-7'), 127.0 (CH, C-5'), 122.4 (C, C-3), 74.8 (CH<sub>2</sub>, C-1''), 63.5 (CH<sub>2</sub>OH), 51.9 (CH<sub>2</sub>, C-5''), 43.5 (CH, C-3'), 33.8 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29.5 and 29.4 (each CH<sub>2</sub>, C-2'' and C-4'', overlapped by solvent signal), 23.8 (CH<sub>2</sub>, C-3''); HRMS *m/z* calcd for C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 423.1155, found [M+H]<sup>+</sup> 423.1149.



**Preparation of (3*Z*,4*E*)-4-(((5-azidopentyl)oxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)-6-methylbenzo[*b*][1,4]dithiin-2(3*H*)-ylidene)butanoic acid/ (3*Z*,4*E*)-4-(((5-azidopentyl)oxy)imino)-3-(3-(hydroxymethyl)-7-methylbenzo[*b*][1,4]dithiin-2(3*H*)-ylidene)butanoic acid (Hapten **VIIIb**).** Hapten **VIIIb** was prepared as described above for hapten **VIIb**, using a solution of adduct **VIII** (14.2 mg, 0.046 mmol), hydroxylamine **22** (8.9 mg, 0.062 mmol, 1.34 equiv) and dry pyridine (7.8  $\mu$ L, 0.097 mmol, 2.1 equiv) in absolute EtOH (0.4 mL). The mixture was stirred for 3 hours at room temperature under nitrogen. Work up as described above for the preparation of hapten **VIIb** and purification by silica gel flash chromatography, using a 95:5 mixture of CHCl<sub>3</sub>-MeOH as eluent, afforded hapten **VIIIb** (10.0 mg, 50%) as a clear oil. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3408m, 2937s, 2870m, 2096s, 1709s, 1468m, 1377m, 1216s, 1114s, 1051s, 937s; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.43 and 8.42 (each s, 0.5H each, H-4), 7.17 and 7.16 (each d, *J* = 8.0 Hz, 0.5H each, H-5'/H-8'), 7.12 and 7.11 (each d, *J* = 1.9 Hz, 0.5H each, H-5'/H-8'), 7.01 and 6.98 (each dd, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 0.5H each, H-6'/H-7'), 4.48 (each t, *J* = 7.0 Hz, 0.5H each, H-3'), 4.10 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-1''), 3.71 and 3.66 (each d, AB system, *J* = 17.0 Hz, 1H each, H-2), 3.68 (dd, overlapped by 3.66 signal, 1H, CHOH), 3.57 (dd, *J* = 11.1, 7.0 Hz, 1H, CH'OH), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-5''), 2.28 and 2.27 (each s, 1.5H each, CH<sub>3</sub>), 1.71 (pent, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-2''), 1.64 (pent, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-4''), 1.47 (tt, *J* = 7.6, 7.1 Hz, 2H, H-3''); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 171.7 and 171.6 (C, C-1), 147.0 (CH, C-4), 146.9 (C, C-2'), 138.8 and 138.7 (C, C-4'a), 137.3 and 137.1 (C, C-6'/C-7'), 131.3 and 130.8 (CH, C-5'), 130.9 and 128.2 (C, C-8'a), 128.3 and 128.1 (CH, C-6'/C-7'), 127.7 and 127.3 (CH, C-8'), 122.2 and 122.1 (C, C-3), 74.8 and 74.7 (CH<sub>2</sub>, C-1''), 63.5 and 63.4 (CH<sub>2</sub>OH), 51.9 (CH<sub>2</sub>, C-5''), 43.7 and 43.6 (CH<sub>2</sub>, C-3'), 33.8 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29.4 (CH<sub>2</sub>, C-2'' and

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

C-4''), 23.8 (CH<sub>2</sub>, C-3''), 20.8 and 20.7 (CH<sub>3</sub>); HRMS *m/z* calcd for C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 437.1312, found [M+H]<sup>+</sup> 437.1305.



**Preparation of (3Z,4E)-4-(((5-azidopentyl)oxy)imino)-3-(5,8-dichloro-3-(hydroxymethyl)benzo[b][1,4]dithiin-2(3H)-ylidene)butanoic acid (Hapten XIb).** Hapten **XIb** was also prepared as described above for hapten **VIIb**, using a solution of adduct **XI** (11.1 mg, 0.031 mmol), hydroxylamine **22** (7.5 mg, 0.052 mmol, 1.7 equiv) and dry pyridine (5.3  $\mu$ L, 0.065 mmol, 2.1 equiv) in absolute EtOH (0.3 mL). The mixture was stirred for 3 hours at room temperature under nitrogen. Work up as described above for the preparation of hapten **VIIb** and purification by silica gel flash chromatography, using a 98:2 mixture of CHCl<sub>3</sub>-MeOH as eluent, afforded hapten **XIb** (8.1 mg, 54%) as a yellow oil. IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3181m, 2939s, 2871m, 2098s, 1705s, 1403s, 1353m, 1217s, 1164s, 1071s, 1038s, 930s; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.51 (s, 1H, H-4), 7.32 (each d, AB system, *J* = 8.7 Hz, 1H each, H-6' and H-7'), 4.72 (dd, *J* = 8.2, 6.4 Hz, 1H, H-3'), 4.12 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-1''), 3.81 and 3.70 (each d, AB system, *J* = 16.9 Hz, 1H each, H-2), 3.77 (dd, *J* = 11.1, 8.2 Hz, 1H, CHOH), 3.68 (dd, *J* = 11.1, 6.4 Hz, 1H, CH'OH), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-5''), 1.72 (pent, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-2''), 1.64 (pent, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-4''), 1.48 (m, 2H, H-3''); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 171.3 (C, C-1), 147.3 (CH, C-4), 134.5 (C, C-2'), 132.3 (C, C-8'a), 130.6 (C, C-4'a), 130.0 (C, C-8'), 129.7 (C, C-5'), 127.7 and 127.6 (each CH, C-6' and C-7'), 125.5 (C, C-3), 74.9 (CH<sub>2</sub>, C-1''), 64.0 (CH<sub>2</sub>OH), 51.9 (CH<sub>2</sub>, C-5''), 43.2 (CH, C-3'), 33.9 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29.3 (CH<sub>2</sub>, C-4''), 29.2 (CH<sub>2</sub>, C-2''), 23.9 (CH<sub>2</sub>, C-3''); HRMS *m/z* calcd for C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 491.0376, found [M+H]<sup>+</sup> 491.0364.

### 5.3 Preparation of protein-hapten conjugates

#### 5.3.1 Conjugation of carboxylate-based haptens

Following activation, hapten coupling was carried out by dropwise adding a 50 mM solution of the active ester in *N,N*-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide or acetonitrile to a 15 mg/mL BSA or OVA solution in PB100, under gentle stirring overnight at room temperature. BSA-hapten immunizing conjugates were prepared by employing 24 (hapten **C6**), 30

(haptens **C4** and **C7**; adducts **VII**, **VIII** and **XI**), 40 (hapten **V4**) or 60 (adduct **V**; haptens **VIIa**, **VIIIa** and **XIa**) equivalents of activated hapten per equivalent of protein, whereas for OVA-hapten assay conjugates 10 (haptens **C4**, **C6** and **C7**; adducts **VII**, **VIII** and **XI**; hapten **VIIIa**), 15 (adduct **V** and hapten **V4**), 20 (succinic pseudo-conjugate) or 35 (haptens **VIIa** and **XIa**) equivalents were used. Lastly, 8 (haptens **C4**, **C6** and **C7**; hapten **VIIIa**) and 20 (haptens **VIIa** and **XIa**) equivalents were employed for HRP-hapten assay conjugates. Conjugates were purified by size exclusion chromatography using three connected 5 mL Sephadex G-25 HiTrap desalting columns and using PB100 as eluent. BSA conjugates were filter-sterilized through 0.45  $\mu\text{m}$  pore filters and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Final hapten-to-protein molar ratios were determined by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS).

### 5.3.2 Conjugation of azide-based haptens

#### 5.3.2.1 Preparation of alkyne-modified proteins

Protein modification was carried out by dropwise adding alkyne **22** in DMF to a protein solution in PB100 buffer and then stirring overnight at room temperature. BSA-alkyne conjugate was prepared by employing 40 equivalents of activated hapten per equivalent of protein, whereas for OVA-alkyne and HRP-alkyne assay conjugates 12 and 10 equivalents were used, respectively. Conjugates were purified by size exclusion chromatography using PB100 buffer as eluent at 5 mL/min and collecting 1-mL fractions.

#### 5.3.2.2 Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction

Solutions of haptens **VIIb**, **VIIIb** and **XIb** in DMSO and THPTA/Cu(I) (5:1) complex in MiliQ  $\text{H}_2\text{O}$  were added to an alkyne-modified protein solution in PB100 buffer. BSA-hapten immunizing conjugates were prepared by employing 50 equivalents of hapten per equivalent of protein, whereas for OVA-hapten and HRP-hapten assay conjugates 15 and 4 equivalents were used, respectively. After adjusting the final volume with the same buffer, the mixture was purged by repeated vacuum-nitrogen cycles. Finally, a solution of sodium ascorbate in MiliQ  $\text{H}_2\text{O}$  was added and the mixture was incubated for 20 h at room temperature. The reaction was stopped using Amicon® Ultra 4 10K centrifugal filters and the protein conjugates were purified by size-exclusion chromatography using PB100 buffer as eluent at 5 mL/min flow rate and collecting 1-mL fractions.

### 5.3.3 Storage and conjugate characterization

**BSA conjugates.** The chromatographic fractions containing conjugate were gathered and sterilized using 0.45  $\mu\text{m}$  sterile filters. The final conjugate concentration was adjusted to 1

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

---

mg/mL using PB100 buffer, assuming there was no loss of protein during the purification process. After acquiring the absorption UV/Vis spectrum, solutions were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**OVA conjugates.** The chromatographic fractions containing conjugate were reunited and the final conjugate concentration was adjusted to 1 mg/mL using PB100 buffer, with 0.01% (m/v) thimerosal. After acquiring the absorption UV/Vis spectrum, solutions were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**HRP conjugates.** The chromatographic fractions containing enzymatic conjugate were reunited and the UV-Vis spectrum was acquired. The conjugate concentration was calculated using the absorbance value at 400 nm assuming that the hapten contribution in this wavelength was negligible. Molar extinction coefficient (65.38 mM/cm) at 400 nm was calculated using solutions in PB100 buffer of the non-modified protein. The final solution was diluted 2-fold with PBS-BSA-thimerosal and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Analysis of hapten bioconjugates was performed by mass spectrometry as follows:

*Sample preparation.* 100  $\mu\text{L}$  of protein conjugate (0.5–1 mg/mL) were dialyzed against milliQ water and 0.8  $\mu\text{L}$  was spotted onto the MALDI plate. After the droplet was air-dried at room temperature, 0.8  $\mu\text{L}$  of matrix (10 mg/mL sinapinic acid (Bruker) in 70% MeCN, 0.1% Trifluoroacetic acid) was added and allowed to air-dry at room temperature.

*Mass spectrometry analysis.* The resulting mixtures were analyzed in a 5800 MALDI TOF/TOF (ABSciex) in positive linear mode (1500 shots every position) in a mass range of 12000–100000  $m/z$ . Previously, the plate was calibrated with 1  $\mu\text{L}$  of the TOF/TOF calibration mixture (ABSciex), in 13 positions. Every sample was calibrated by ‘close external calibration’ method with a BSA, OVA or HRP spectrum acquired in a close position. The analysis of the results was performed using the mMass program (<http://www.mmass.org/>).

### 5.4 Generation of polyclonal antibodies

**Immunization procedure.** Female New Zealand white rabbits, 2 for each hapten, were each inoculated with 300  $\mu\text{g}$  of the BSA–hapten conjugate in a 1 mL dose of a 1:1 emulsion between sterile PB100 buffer and Freund’s adjuvant (complete for the first dose and incomplete for subsequent boosts). A total of 4 injections were subcutaneously administered in the dorsal area of the animals at 21-day intervals. Rabbits were exsanguinated 10 days after the final injection.

Evaluation of the immune response was carried out by analyzing blood samples obtained after the third immunization. Double centrifugation was also applied for the removal of

coagulates and the obtained supernatants were directly diluted 1:1 (v/v) with PBS-BSA-thimerosal.

**Purification of polyclonal antibodies.** Blood samples were allowed to coagulate overnight at 4 °C, and sera were separated by double centrifugation (3000×g, 20 min). Antibodies were precipitated twice with 1 volume of SAS and stored at 4 °C. A working stock was prepared by diluting the homogenized suspension with 1 volume of PBS-BSA-thimerosal and was also stored at 4 °C.

### 5.5 Generation of monoclonal antibodies

**Immunization procedure.** Similar to the procedure described above for rabbit immunization, 6 two-month old female balb/c mice were inoculated by intraperitoneal injection with 100 µg of the selected BSA-hapten conjugates in 200 µL of a water-in-oil emulsion using Freund's adjuvants. The mice were administered a total of 3 injections at 21-day intervals and, 4 days prior to animal sacrifice, a fourth injection was applied in sterile PBS with the same amount of protein conjugate at least 21 days after the third inoculation.

Immune response was also evaluated by analyzing blood samples obtained by submandibular puncture 10 days after the third immunization. The samples were stored overnight at 4 °C to allow coagulation and the sera was separated by double centrifugation (9660xg, 15 min). Lastly, supernatants were diluted ¼ with PBS-BSA-thimerosal and stored at 4 °C. A similar procedure was also employed to the blood samples obtained by intracardiac puncture after animal sacrifice.

**Hybridoma generation.** A modified procedure from the original protocol developed by Köhlet and Mistein allowed for hybridoma generation by means of cellular fusion of myeloma cell line P3-X63-Ag8.635<sup>190</sup> with B lymphocytes isolated from the spleen of 2 equally-inoculated mice.<sup>126,191</sup>

Once animal sacrifice had taken place, blood samples were obtained by intracardiac puncture, followed by spleen extirpation. Physical force using the piston of a sterile syringe was applied in order to extract cells from the spleen. Extracted erythrocytes were then lysed by osmotic shock employing 1 mL of lysis buffer at 4 °C for 1 min, and after washing with complete medium at 4 °C, the suspension was filtered to separate possible blood clots.

Cellular fusion was carried out by mixing cultured myeloma cells in complete medium with the extracted B lymphocytes at a 4:1 lymphocyte/myeloma ratio. The resulting mixture was then washed 3 times with incomplete medium and then collected by centrifugation, before adding 1 mL of PEG 1500 at 37 °C for 1 min. Afterwards, the cell mixture was suspended in

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

---

50 mL of complete medium and incubated for 30 min. After centrifugation, the cells were suspended in post-fusion medium and incubated in 96-well plates (100  $\mu$ L per well,  $1.5\text{-}2.0\cdot 10^5$  cells per well) for 24 h at 37  $^{\circ}$ C (5% CO<sub>2</sub>, 95% RH). Lastly, 100  $\mu$ L per well of HAT medium were added and the plates were once again incubated under the same conditions for 10-12 days.

**Hybridoma selection.** An initial screening of the produced hibridomas was carried out by analyzing the culture supernatants in differential competitive ELISA. Plates coated with 0.1  $\mu$ g/mL (100  $\mu$ L per well) of the homologous OVA-hapten conjugate were washed and 50  $\mu$ L of each supernatant were added to 2 adjacent wells of the ELISA plate. The first well, containing 50  $\mu$ L of PBS (blank), allowed for conjugate recognition, whereas the second well, containing 50  $\mu$ L of a 200 nM solution of the analyte in PBS, determined analyte affinity. The signal ratio between both wells was used to select the antibodies with the highest potential for competitive immunoassay development. HT-HFCS culture medium was added to the selected wells and incubated 24 h before they were reevaluated by checkerboard competitive ELISA. This reevaluation assay was carried out employing 2 coating concentrations of the homologous OVA-hapten conjugate (0.01 and 0.1  $\mu$ g/mL), 4 supernatant dilutions (1/10, 1/50, 1/250 and 1/1250) and 3 analyte concentrations (0, 10 and 100 nM).

**Hybridoma cloning and isolation.** Selected wells were diluted with HT-HFCS medium and cultured in one 96-well plate (100  $\mu$ L per well, 2 cells per well). The cells were then incubated for 7-10 days and were analyzed under the microscope in order to identify single clones. Afterwards, 100  $\mu$ L of complete medium were added and supernatants were once again analyzed by differential competitive ELISA. The cloning procedure was then repeated to the selected single clone wells at least twice in order to assure the isolation of the cell line. Each selected hybridoma was then cultured at large-scale in HT-HFCS culture medium. Cell line conservation was carried out by collecting part of the cells by centrifugation and cryopreserving in liquid nitrogen a suspension in conservation medium in sterile 1 mL microtubes. The remaining part was employed for antibody production.

**Monoclonal antibody production.** Hybridoma expansion was carried out in petri dishes and incubated for 7-10 days in HT-HFCS medium. Cells were then removed by centrifugation and the supernatants were then precipitated with 1 volume of SAS. In order to purify the monoclonal antibodies, these were once again centrifuged (3800xg, 20 min), dissolved in 8-10 mL of PB20 (pH 7.4) and then filtered through a nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m pore diameter). The resulting filtrate was then purified by affinity chromatography employing a 5 mL HiTrap Protein G HP column and a 5 mL Sephadex G 25



HiTrap Desalting column. Columns were loaded using PB20 (3 mL/min), whereas a 100 mM citric acid buffer was used as the elution buffer (3 mL/min). Eluted fractions (850  $\mu$ L) were collected and neutralized with 150  $\mu$ L of 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.5). Antibody containing fractions were gathered and the final solution was concentrated by centrifugation while exchanging the buffer to PB20 (pH 7.4) using Amicon® Ultra 4 10k centrifugal filters. Final antibody concentration was calculated using the absorption at 280 nm and a molar extinction coefficient of 1.4 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

The purified antibodies were then diluted to a known concentration with PB20 and precipitated with 1 volume of SAS, before storing at 4 °C. Working aliquots were prepared by diluting the precipitate with PBS-BSA-thimerosal and were also stored at 4 °C.

### 5.6 Preparation of lateral flow immunoassay components

**Gold nanoparticles-monoclonal antibody conjugates.** Selected monoclonal antibody was added to a 1/10 solution of commercial 40 nm GAM-modified gold nanoparticles (OD = 10) in Tris75-T buffer and incubated for 1 h at room temperature.

**Immunostrips preparation.** The BSA-hapten conjugate **TL** and GAM **CL** were formed by dispensing solutions of both in PB100 with 150 mM of NaCl on a nitrocellulose membrane (300x25 mm) at a flow rate of 0.5  $\mu$ L/cm employing a BioDot system. Distance of the **TL** and **CL** from the base of the membrane was 10 mm and 15 mm, respectively. Once dried for 1 h at room temperature, the membrane was fixed, 14 mm from the base, to the backing card (300x78 mm). A nitrocellulose sample pad (300x17 mm) and an absorbent pad (300x43 mm) were incorporated overlapping 3 mm and 4 mm, respectively, with the membrane. Lastly, a Biodot guillotine was used to cut the assembled components in to 4x78 mm immunostrips.

### 5.7 Competitive immunoassays

#### 5.7.1 Competitive ELISA

**Antibody-coated direct competitive ELISA.** Microtiter plates were coated by adding 100  $\mu$ L per well of the antibody solution in coating buffer. After overnight incubation at 4 °C, the plates were washed four times with a 150 mM NaCl solution. The competitive assay was carried out by adding 50  $\mu$ L per well of the analyte in PBS plus 50  $\mu$ L per well of the HRP tracer solution in PBS-T, and the plates were incubated one hour at room temperature. After plate washing, the signal was generated by adding 100  $\mu$ L per well of the enzyme substrate solution. Following incubation during 10 min at room temperature, the reaction was

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

---

stopped by adding 100  $\mu\text{L}$  per well of 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , and the absorbance's were immediately read.

When capture antibody (GAM for mAbs and GAR for pAbs) was employed, a coating concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was used. After overnight incubation at 4  $^\circ\text{C}$ , the plates were washed and then 100  $\mu\text{L}$  per well of a solution of the anti-analyte antibody in PBS-T was added. After incubating for 1 h at room temperature, the plates were once again washed and the competitive reaction step was carried out as previously described.

**Conjugate-coated indirect competitive ELISA.** Microtiter plates were coated by adding 100  $\mu\text{L}$  per well of the corresponding OVA-hapten conjugate solution in coating buffer. After overnight incubation at room temperature, the plates were washed four times with a 150 mM NaCl solution. The competitive assay was carried out by adding 50  $\mu\text{L}$  per well of the analyte in PBS plus 50  $\mu\text{L}$  per well of antibody solution in PBS-T, and the plates were incubated one hour at room temperature. After plate washing, 100  $\mu\text{L}$  per well of the enzyme-labeled secondary antibody (RAM-HRP (1/2000) for mAbs or GAR-HRP ((1/10000) + 10% (v/v) fetal bovine serum) for pAbs) in PBST was added and incubated at room temperature for an additional hour. The plates were washed again and the signal was generated by adding 100  $\mu\text{L}$  per well of the enzyme substrate solution. Following incubation during 10 min at room temperature, the reaction was stopped by adding 100  $\mu\text{L}$  per well of 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , and the absorbance's were immediately read. The coating concentrations of OVA-hapten were 10, 100 and 1000 ng/mL. Polyclonal antibody dilutions were 1/1 $\cdot$ 10<sup>3</sup>, 1/3 $\cdot$ 10<sup>3</sup>, 1/10 $\cdot$ 10<sup>3</sup>, 1/30 $\cdot$ 10<sup>3</sup> and 1/100 $\cdot$ 10<sup>3</sup> and monoclonal antibody concentrations were 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 ng/mL.

### 5.7.2 Competitive immunostrip

To carry out the assay in dipstick mode, a mixture of 25  $\mu\text{L}$  of the colloidal gold conjugate and 75  $\mu\text{L}$  of an analyte solution, both in Tris75-T buffer, was prepared in a 300  $\mu\text{L}$  well and incubated for 5 min at room temperature. The immunostrip was then vertically dipped into the well for 10 min and, afterwards, the sample pad was removed. Lastly, the membrane was dried under a cold airflow before being scanned for further signal processing.

### 5.7.3 Signal processing

**ELISA.** After adding the stop solution, the absorbance at 492 nm (OPD) or 450 nm (TMB) was immediately read using 650 nm as a reference wavelength. The obtained experimental values were then fitted to a four-parameter logistic equation 3 and the corresponding sigmoide curve was represented in semi-logarithmic scale using SigmaPlot software.<sup>192</sup>

$$y = \frac{A-D}{1+\left(\frac{x}{C}\right)^B} + D \text{ (Equation 3)}$$

In this equation,  $x$  represents the analyte concentration and  $y$  the assay signal. The maximum asymptote ( $A_{\max}$ ) is defined by the parameter  $A$ ; the slope of the inhibition curve at the inflexion point by parameter  $B$ ; the concentration at the inflexion point by parameter  $C$ , also known as  $IC_{50}$ ; and the minimum asymptote ( $A_{\min}$ ) is represented by parameter  $D$ .

**Immunostrip.** RGB signal was acquired immediately after strip drying and processed using ImageJ (version 1.52a) free software. The obtained values were applied for **TL/CL** ratios calculations. Final data was then fitted with SigmaPlot software to the sigmoidal four-parameter logistic curve.

### 5.8 Immunoassay optimization

#### 5.8.1 pH and ionic strength evaluation

**ELISA.** Evaluation of physicochemical parameters of the assay's medium was carried out by mixing 50  $\mu$ L of the analyte standard curve with 50  $\mu$ L of the corresponding immunoreagent, both prepared in Tris75 buffers with various pH and ionic strength conditions. pH buffers were prepared by acidifying a Tris75 buffer with 10 M HCl to the different acquired pH values (pH = 6.0 - 8.5) and, afterwards, the ionic strength was adjusted to the reference amount (167 mM) by addition of NaCl. Ionic strength buffers were prepared by varying the amount of NaCl added to a Tris75 buffer pH 7.4 ( $I = 65 - 260$  mM). Tween-20 was added at 0.05% (v/v) to the immunoreagent buffers.

**Immunostrip.** Buffers were prepared with 0.05% (v/v) Tween-20 following the same procedure described for ELISA. Immunoassays were carried out by combining 75  $\mu$ L of the analyte standard solution with 25  $\mu$ L of the colloidal gold conjugate, both prepared in the different evaluation buffers.

#### 5.8.2 Matrix effects evaluation

**Derivatization reaction.** Different proportions of apple juice (2/5, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 and 1/160) diluted in Tris75 buffer were spiked with 50 and 100 ng/mL of patulin and derivatized with 2% (v/v) of the derivatization reagent (1mg/mL). After 1 h incubation at room temperature, the samples were diluted 1/500 in Tris75 buffer and 50  $\mu$ L were combined with 50  $\mu$ L of the immunoreagent prepared in Tris75-T buffer.

**Assay parameters.** 50  $\mu$ L of analyte standard curves were prepared in Tris75 buffer containing different proportions of the matrix under evaluation and mixed with 50  $\mu$ L of the

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

---

immunoreagent in Tris75-T buffer. Final assayed matrix dilutions were 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000 and 1/3000.

### 5.9 Assay validation

**ELISA.** Samples were diluted 1/50 and /250 in Tris75 buffer and 1-mL aliquots were treated with 2% (v/v) of the corresponding derivatization reagent. 50  $\mu$ L of each sample were mixed with 50  $\mu$ L of the immunoreagent in Tris75-T buffer. An 8-point standard curve was concurrently run with the samples. The standard curve and samples were run as triplicates.

Analyte quantification was carried out by interpolating the average signals in the standard curve and the results were multiplied by the dilution factor to obtain the experimental patulin concentration in each sample.

**Immunostrips.** Validation was carried out according to the protocol described in the Commission Regulation (EU) No 519/2014.<sup>168</sup> **STC** was established at 25 ng/m. Five blank and five fortified samples with patulin at 25 and 5 ng/mL were analyzed for five consecutive days using the developed assays (n = 25). Cut-off values and t values were calculated as described in section 3.4.2.2. False-suspect rates were calculated using the t values and the spreadsheet function DISTR.T.

**High resolution mass spectrometry (QTOF-MS).** The performance of the method was evaluated essentially according to the guidelines of EU Commission Decision 2002/657/EC.<sup>167</sup> Matrix effects, linear working range, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), recovery and repeatability were determined in spiked blank samples of apple juice, pear juice, and apple compote.

Liquid (5 mL) or solid samples (5 g) were diluted 2-fold with PB200, centrifuged 5 min at 11000 rpm and then filtered through a 0.22  $\mu$ m nylon syringe filter. Samples were then reacted with the derivatization reagent for 1 h at room temperature and directly injected into the chromatographic system. Analyte quantification was carried out by interpolating the average signals in a standard curve and the results were multiplied by the dilution factor to obtain the experimental patulin concentration in each sample.

## 6 REFERENCES

1. Food, E., Authority, S. & Commission, E. Food Safety in the EU. in *EU Food Law : Protecting Consumers and Health in a Common Market* (Hart Publishing, 2014).
2. Bräse, S., Encinas, A., Keck, J. & Nising, C. F. Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. *Chem. Rev.* **109**, 3903–3990 (2009).
3. Moss, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. *Mycotoxins Anim. Foods* **2**, 37–56 (1991).
4. Nawaz, M. A. H. *et al.* Determination of Mycotoxins in Food. in *Analysis of Food Toxins and Toxicants* vol. 1 137–168 (John Wiley & Sons, Ltd, 2017).
5. European Union. Commission regulation (EU) no. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **364**, 5–24 (2006).
6. Park, D. L., Njapau, H. & Boutrif, E. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *Food Nutr. Agric.* 49–54 (1999).
7. Eskola, M. *et al.* Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25%. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**, 2773–2789 (2020).

## REFERENCES

---

8. Peraica, M. Mycotoxinoses. in *Environmental Mycology in Public Health* 45–49 (Elsevier, 2016).
9. Peraica, M., Radić, B., Lucić, A. & Pavlović, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.* **77**, 754–66 (1999).
10. Muir, E. G. Original articles. *Lancet* **241**, 1–3 (1943).
11. Patulin, O. F. & The, I. N. Clinical trial of patulin in the common cold. *Lancet* **244**, 373–375 (1944).
12. Frisvad, J. C. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin J.* **11**, 73–100 (2018).
13. Zheng, X. *et al.* Identification and toxicological analysis of products of patulin degradation by *Pichia caribbica*. *Biol. Control* **123**, 127–136 (2018).
14. Ciegler, A., Detroy, R. W. & Lillehoj, E. B. Patulin, Penicillic Acid, and other carcinogenic lactones. *Microb. toxins* **6**, 409–434 (1971).
15. Murphy, G. & Lynen, F. Patulin Biosynthesis : The Metabolism of m-Hydroxybenzyl Alcohol and m-Hydroxybenzaldehyde by Particulate Preparations from *Penicillium patulum*. *Eur. J. Biochem.* **58**, 467–475 (1975).
16. Forrester, P. I. & Gaucher, G. M. Conversion of 6-methylsalicylic acid into patulin by *Penicillium urticae*. *Biochemistry* **11**, 1102–1107 (1972).
17. London, B. N., Biochem, E. M. E. J., Biophys, R. A. B., Sekiguchit, J. & Gaucher, G. M. Identification of Phyllostine as an Intermediate of the Patulin Pathway in *Penicillium urticae*. *Biochemistry* **17**, 1785–1791 (1978).
18. Sekiguchi, J., Gaucher, G. M. & Yamada, Y. Biosynthesis of patulin in *Penicillium urticae*: Identification of isopatulin as a new intermediate. *Tetrahedron Lett.* **20**, 41–42 (1979).
19. Sekiguchi, J., Shimamoto, T., Yamada, Y. & Gaucher, G. M. Patulin biosynthesis: enzymatic and nonenzymatic transformations of the mycotoxin (E)-ascladiol. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1939–1942 (1983).
20. Mahato, D. K. *et al.* Patulin in food: A mycotoxin concern for human health and its management strategies. *Toxicon* **198**, 12–23 (2021).
21. Wei, C. *et al.* Progress in the distribution, toxicity, control, and detoxification of patulin: A review. *Toxicon* **184**, 83–93 (2020).

22. Woodward, R. B. & Singh, G. The synthesis of Patulin. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 1428 (1950).
23. Gill, G. B., Pattenden, G. & Stapleton, A. A concise synthesis of patulin from Arabinose. *Tetrahedron Lett.* **29**, 2875–2878 (1988).
24. Seijas, J. *et al.* New total synthesis of Patulin. *Heterocycles* **29**, 181–184 (1989).
25. Tada, M., Ohtsu, K. & Chiba, K. Synthesis of Patulin and its cyclohexane analogue from furan derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 2167–2169 (1994).
26. Boukouvalas, J. & Maltais, F. An efficient total synthesis of the antibiotic patulin. *Tetrahedron Lett.* **36**, 7175–7176 (1995).
27. Reiss, J. Mycotoxins in foodstuffs. VII. Inactivation of patulin in whole wheat bread by sulfhydryl compounds. *Cereal Chem.* **53**, 150–152 (1976).
28. Stott, W. T. & Bullerman, L. B. Instability of patulin in cheddar cheese. *J. Food Sci.* **41**, 201–203 (1976).
29. Scott, P. M. & Somers, E. Stability of Patulin and Penicillic Acid in Fruit Juices and Flour. *J. Agric. Food Chem.* **16**, 483–485 (1968).
30. Mintzlaff, H. J., Ciegler, A. & Leistner, L. Potential Mycotoxin Problems in Mould-fermented Sausage. *Zeitschrift für Leb. und Forsch.* **150**, 133–137 (1972).
31. Fliege, R. & Metzler, M. Electrophilic Properties of Patulin. Adduct Structures and Reaction Pathways with 4-Bromothiophenol and Other Model Nucleophiles. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 363–372 (2000).
32. Saleh, I. & Goktepe, I. The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food Chem. Toxicol.* **129**, 301–311 (2019).
33. Pal, S., Singh, N. & Ansari, K. M. Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: An overview. *Toxicology Research* vol. 6 764–771 (2017).
34. Moulé, Y. & Hatey, F. Mechanism of the in vitro inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from *Byssochlamys nivea*. *FEBS Lett.* **74**, 121–125 (1977).
35. Phillips, T. D. & Hayes, A. W. Effects of patulin on adenosine triphosphatase activities in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **42**, 175–187 (1977).
36. Arafat, W., Kern, D. & Dirheimer, G. Inhibition of aminoacyl-tRNA synthetases by the mycotoxin patulin. *Chem. Biol. Interact.* **56**, 333–349 (1985).

## REFERENCES

---

37. Ashoor, S. H. & Chu, F. S. Inhibition of muscle aldolase by penicillic acid and patulin In vitro. *Food Cosmet. Toxicol.* **11**, 995–1000 (1973).
38. Cooray, R., kiessling, K. H. & lindahl-kiessling, K. The effects of patulin and patulin-cysteine mixtures on dna synthesis and the frequency of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes. *Food Cosmet. Toxicol.* **20**, 893–898 (1982).
39. Hatey, F. & Gaye, P. Inhibition of translation in reticulocyte lysate by the mycotoxin patulin. *FEBS Lett.* **95**, 252–256 (1978).
40. Fliege, R. & Metzler, M. The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and  $\alpha$ -amino groups. *Chem. Biol. Interact.* **123**, 85–103 (1999).
41. Burghardt, R. C. *et al.* Patulin-induced cellular toxicity: A vital fluorescence study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **112**, 235–244 (1992).
42. Wichmann, G., Herbarth, O. & Lehmann, I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon- $\gamma$  rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ. Toxicol.* **17**, 211–218 (2002).
43. Mayer, V. W. & Legator, M. S. Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin. *J. Agric. Food Chem.* **17**, 454–456 (1969).
44. Malekinejad, H., Aghazadeh-Attari, J., Rezabakhsh, A., Sattari, M. & Ghasemsoltani-Momtaz, B. Neurotoxicity of mycotoxins produced in vitro by *Penicillium roqueforti* isolated from maize and grass silage. *Hum. Exp. Toxicol.* **34**, 997–1005 (2015).
45. Ciegler, A., Beckwith, A. C. & Jackson, L. K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 664–667 (1976).
46. Osswald, H., Frank, H. K., Komitowski, D. & Winter, H. Long-term testing of patulin administered orally to sprague-dawley rats and swiss mice. *Food Cosmet. Toxicol.* **16**, 243–247 (1976).
47. Becci, P. J. *et al.* Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. *J. Appl. Toxicol.* **1**, 256–261 (1981).
48. (IARC), I. A. for R. on C. Patulin. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. risks to humans* **40**, 83 (1986).
49. Walker, K. & Wiesner, B. P. Patulin and clavacin. *Lancet* **243**, 294 (1944).
50. Escoula, L., Moré, J., Baradat, C., Henry, G. & Brunel-Dubech, N. The toxins of



- Byssochlamys nivea* westling. I. Acute toxicity of Patulin in adult rats and mice. *Ann. Rech. vétérinaires* **8**, 41–49 (1977).
51. Mahfoud, R., Maresca, M., Garmy, N. & Fantini, J. The Mycotoxin Patulin Alters the Barrier Function of the Intestinal Epithelium: Mechanism of Action of the Toxin and Protective Effects of Glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **181**, 209–218 (2002).
  52. McKinley, E. R., Carlton, W. W. & Boon, G. D. Patulin mycotoxicosis in the rat: Toxicology, pathology and clinical pathology. *Food Chem. Toxicol.* **20**, 289–300 (1982).
  53. McKinley, E. R. & Carlton, W. W. Patulin mycotoxicosis in Swiss ICR mice. *Food Cosmet. Toxicol.* **18**, 181–187 (1980).
  54. JECFA, J. F. E. C. on F. A. W. H. O. & F. and A. *Evaluation of certain food additives and contaminants: thirty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.* (1990).
  55. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.* (1995).
  56. Scientific Committee on Food. *Minute statement on patulin.* [https://ec.europa.eu/food/system/files/2016-10/cs\\_contaminants\\_catalogue\\_patulin\\_out55\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/system/files/2016-10/cs_contaminants_catalogue_patulin_out55_en.pdf) (2000).
  57. European Commission. Commission Recommendation of 11 August 2003 on the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. *Off. J. Eur. Union* 54–59 (2003).
  58. National Health and Family Planning Commission of the People’s Republic of China and China Food and Drug Administration. *National Food Safety Standard Maximum Levels of Mycotoxins in Foods.* (2017).
  59. Nutrition Division. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. (2004).
  60. Federation, M. of H. of the R. Hygienic requirements for Safety and Nutrition value of Food Products. Sanitary and Epidemiological Rulea and Regulations. No. 3326. (2002).
  61. Gab-Allah, M. A., Choi, K. & Kim, B. Development of isotope dilution–liquid

## REFERENCES

---

- chromatography/tandem mass spectrometry as a candidate reference method for the accurate determination of patulin in apple products. *Anal. Bioanal. Chem.* **414**, 1867–1879 (2022).
62. Fan, Y. *et al.* Screening of multi-mycotoxins in fruits by ultra-performance liquid chromatography coupled to ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem.* **368**, 130858 (2022).
63. Guo, W. *et al.* A reliable and accurate UHPLC-MS/MS method for screening of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Alternaria* mycotoxins in orange, grape and apple juices. *Anal. Methods* **13**, 192–201 (2021).
64. Carballo, D., Fernández-Franzón, M., Ferrer, E., Pallarés, N. & Berrada, H. Dietary Exposure to Mycotoxins through Alcoholic and Non-Alcoholic Beverages in Valencia, Spain. *Toxins (Basel)*. **13**, 438 (2021).
65. Li, Y. *et al.* Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in apple and apple products from China. *Food Control* **118**, 107354 (2020).
66. İçli, N. Occurrence of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in apple sour, which is a traditional product of Kastamonu, Turkey. *Food Addit. Contam. Part A* **36**, 952–963 (2019).
67. Nafuka, S. *et al.* Variation of Fungal Metabolites in Sorghum Malts Used to Prepare Namibian Traditional Fermented Beverages Omalodu and Otombo. *Toxins (Basel)*. **11**, 165 (2019).
68. Torović, L. *et al.* Patulin in fruit juices: occurrence, bioaccessibility, and risk assessment for Serbian population. *Food Addit. Contam. Part A* **35**, 985–995 (2018).
69. Poapolathep, S. *et al.* Occurrence and Health Risk of Patulin and Pyrethroids in Fruit Juices Consumed in Bangkok, Thailand. *J. Food Prot.* **80**, 1415–1421 (2017).
70. Ji, X. *et al.* Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China. *Food Control* **78**, 100–107 (2017).
71. European Commission. RASFF Window. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search> (2022).
72. Heatley, N. G. & Philpot, F. J. The routine examination for antibiotics produced by moulds. *J. Gen. Microbiol.* **1**, 232–237 (1947).
73. Zheng, X. *et al.* Prevention and detoxification of patulin in apple and its products: A

- review. *Food Res. Int.* **140**, 110034 (2021).
74. European Parliament and of the Council the European Union. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed - Council statement. *Off. J. Eur. Union* **140**, 0010–0022 (2002).
  75. Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E. & Varzakas, T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods* vol. 9 (2020).
  76. Bayraç, C. & Camızci, G. Adsorptive removal of patulin from apple juice via sulfhydryl-terminated magnetic bead-based separation. *J. Hazard. Mater.* **366**, 413–422 (2019).
  77. Zhu, Y., Koutchma, T., Warriner, K. & Zhou, T. Reduction of Patulin in Apple Juice Products by UV Light of Different Wavelengths in the UVC Range. *J. Food Prot.* **77**, 963–971 (2014).
  78. Watkins, K. Food world. <https://kswfoodmicro.com/?s=patulin> (2022).
  79. Mol, H. G. J. J. *et al.* Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal. Chem.* **80**, 9450–9459 (2008).
  80. Martins, M. L. *et al.* Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples. **19**, 568–574 (2002).
  81. Murillo-arbizu, M., Amézqueta, S., González-peñas, E., López, A. & Cerain, D. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Chem.* **113**, 420–423 (2009).
  82. Cunha, S. C., Faria, M. A. & Fernandes, J. O. Determination of patulin in apple and quince products by GC–MS using 13C5–7 patulin as internal standard. *Food Chem.* **115**, 352–359 (2009).
  83. Roach, J. A. G., Brause, A. R., Eisele, T. A. & Rupp, H. S. Hplc detection of patulin in apple juice with GC/MS confirmation of patulin identity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **504**, 135–140 (2002).
  84. Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V. & Hernández, F. Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC–MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric

## REFERENCES

---

- pressure ionisation sources. *Food Chem.* **142**, 400–407 (2014).
85. Desmarchelier, A., Mujahid, C., Racault, L., Perring, L. & Lancova, K. Analysis of Patulin in Pear- and Apple-Based Foodstuffs by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 7659–7665 (2011).
86. Lee, T. P., Sakai, R., Manaf, N. A., Rodhi, A. M. & Saad, B. High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. *Food Control* **38**, 142–149 (2014).
87. MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J. & Felgueiras, I. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *J. AOAC Int.* **83**, 1387–1394 (2000).
88. Marsol-Vall, A., Delpino-Rius, A., Eras, J., Balcells, M. & Canela-Garayoa, R. A Fast and Reliable UHPLC-PDA Method for Determination of Patulin in Apple Food Products Using QuEChERS Extraction. *Food Anal. Methods* **7**, 465–471 (2014).
89. AOAC. Method number 2000.02. Patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree. *Off. methods Anal.* (2000).
90. Cho, M. S. *et al.* Occurrence of patulin in various fruit juices from South Korea: An exposure assessment. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 1–5 (2010).
91. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. & Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and. *J. AOAC Int.* **86**, 412–431 (2003).
92. Sadok, I., Szmagara, A. & Maria, M. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. *Food Chem.* **245**, 364–370 (2018).
93. Tamura, M., Takahashi, A., Uyama, A. & Mochizuki, N. A method for multiple mycotoxin analysis in wines by solid phase extraction and multifunctional cartridge purification, and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Toxins (Basel)*. **4**, 476–486 (2012).
94. Yalow, R. S. & Berson, S. A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **184**, 1648–1649 (1959).
95. Amino, N. & Hidaka, Y. Various types of immunoassay. *Nippon rinsho. Japanese J. Clin. Med.* **53**, 2107–2111 (1995).

96. Mehl, M., Starke, R., Jacobi, H. D., Schleinitz, K. D. & Wasicki, P. Immunologic detection of the mycotoxin patulin. *Pharmazie* **41**, 147–148 (1986).
97. McElroy, L. J. & Weiss, C. M. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate. *Can. J. Microbiol.* **39**, 861–863 (1993).
98. Sheu, F., Lee, O. & Shyu, Y. T. The synthesis of antigens and the production of antibodies against patulin derivatives. *J. Food Drug Anal.* **7**, (1999).
99. Mhadhbi, H., Benrejeb, S. & Martel, A. Studies on the affinity chromatography purification of anti-patulin polyclonal antibodies by enzyme linked immunosorbent assay and electrophoresis. *Food Addit. Contam.* **22**, 1243–1251 (2005).
100. De Champdoré, M. *et al.* A new competitive fluorescence assay for the detection of patulin toxin. *Anal. Chem.* **79**, 751–757 (2007).
101. D'auria, S., ROSSI, M., Bazzicalupo, P. & Champdore', M. De. Patent: A competitive immunoassay for patulin detection. (2007).
102. Pennacchio, A. *et al.* A surface plasmon resonance based biochip for the detection of patulin toxin. *Opt. Mater. (Amst).* **36**, 1670–1675 (2014).
103. Pennacchio, A., Varriale, A., Grazia, M., Staiano, M. & Auria, S. D. A near-infrared fluorescence assay method to detect patulin in food. *Anal. Biochem.* **481**, 55–59 (2015).
104. Funari, R. *et al.* Detection of parathion and patulin by quartz-crystal microbalance functionalized by the photonics immobilization technique. *Biosens. Bioelectron.* **67**, 224–229 (2014).
105. Song, X., Wang, D. & Kim, M. Immunoliposome-based fluorometric patulin assay by using immunomagnetic nanoparticles. *Microchim. Acta* **186**, 1–7 (2019).
106. Song, X., Wang, D. & Kim, M. Development of an immuno-electrochemical glass carbon electrode sensor based on graphene oxide/gold nanocomposite and antibody for the detection of patulin. *Food Chem.* **342**, 128257 (2021).
107. Riberi, W. I., Zon, M. A., Fernández, H. & Arévalo, F. J. Impedimetric immunosensor to determine patulin in apple juices using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide. *Microchem. J.* **158**, 105192 (2020).
108. Landsteiner, K. The specificity of serological reactions. *J. Pharm. Sci.* **52**, 1196 (1963).
109. Woodward, R. B. & Singh, G. The structure of patulin. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 758–759

## REFERENCES

---

- (1949).
110. Landsteiner, K. & Simms, S. Production of heterogenetic antibodies with mixtures of the binding part of the antigen and protein. *J. Exp. Med.* **38**, 127–138 (1923).
  111. Erlanger, B. F. The preparation of antigenic Hapten-Carrier conjugates: A survey. in *Methods in enzymology* vol. 70 85–104 (1980).
  112. Vallejo, R. P., Bogus, E. R. & Mumma, R. O. Effects of hapten structure and bridging groups on antisera specificity in parathion immunoassay development. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 572–580 (1982).
  113. Xu, Z.-L. *et al.* Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants: A review. *Anal. Chim. Acta* **647**, 125–136 (2009).
  114. Aboitiz, N. *et al.* NMR and Modeling Studies of Protein-Carbohydrate Interactions: Synthesis, Three-Dimensional Structure, and Recognition Properties of a Minimum Hevein Domain with Binding Affinity for Chitooligosaccharides. *ChemBioChem* **5**, 1245–1255 (2004).
  115. López-Moreno, R., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Immunoassays for trifloxystrobin analysis. Part I. Rational design of regioisomeric haptens and production of monoclonal antibodies. *Food Chem.* **152**, 230–236 (2014).
  116. Kim, Y. J. *et al.* Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. *Anal. Chim. Acta* **475**, 85–96 (2003).
  117. Hermanson, G. T. Vaccines and Immunogen Conjugates. in *Bioconjugate Techniques* 839–865 (Elsevier, 2013).
  118. Lemus, R. & Karol, M. H. Conjugation of Haptens. in *Methods in molecular medicine* 167–182 (2008).
  119. Esteve-Turrillas, F. A. *et al.* Hapten synthesis, monoclonal antibody generation, and development of competitive immunoassays for the analysis of picoxystrobin in beer. *Anal. Chim. Acta* **682**, 93–103 (2010).
  120. Adamczyk, M. *et al.* Characterization of Protein-Hapten Conjugates. 1. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Immuno BSA-Hapten Conjugates and Comparison with Other Characterization Methods. *Bioconjug. Chem.*

- 5, 631–635 (1994).
121. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Inmunobiología de Janeway*. (2009).
  122. Byars, N. E., Allison, A. C., Harmon, M. W. & Kendal, A. P. Enhancement of antibody responses to influenza B virus haemagglutinin by use of a new adjuvant formulation. *Vaccine* **8**, 49–56 (1990).
  123. Freund, J., Casals, J. & Hosmer, E. P. Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil. *Exp. Biol. Med.* **37**, 509–513 (1937).
  124. Osborne, B. A., Kubly, J., Goldsby, R. A. & Kindt, T. J. *Inmunología de Kubly*. (2007).
  125. Stills, H. F. Polyclonal Antibody Production. in *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* 259–274 (Elsevier, 2012).
  126. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
  127. Altshuler, E. P., Serebryanaya, D. V. & Katrukha, A. G. Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. *Biochem.* **75**, 1584–1605 (2010).
  128. Abad, A. & Montoya, A. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1818–1823 (1994).
  129. Brandon, D. L., Binder, R. G., Bates, A. H. & Montague, W. C. Monoclonal Antibody for Multiresidue ELISA of Benzimidazole Anthelmintics in Liver. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1588–1594 (1994).
  130. Abad, A., Primo, J. & Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 1. Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassay Formats. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1486–1494 (1997).
  131. Krska, R. & Molinelli, A. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 67–71 (2009).
  132. Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D’Arco, G. & Giraudi, G. Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 467–480 (2013).
  133. Ross, G. M. S., Salentijn, G. I. & Nielen, M. W. F. A Critical Comparison between Flow-through and Lateral Flow Immunoassay Formats for Visual and Smartphone-Based Multiplex Allergen Detection. *Biosensors* **9**, 143 (2019).

## REFERENCES

---

134. Jiang, N. *et al.* Lateral and Vertical Flow Assays for Point-of-Care Diagnostics. *Adv. Healthc. Mater.* **8**, 1900244 (2019).
135. Sajid, M., Kawde, A.-N. & Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *J. Saudi Chem. Soc.* **19**, 689–705 (2015).
136. Zhang, L., Mazouzi, Y., Salmain, M., Liedberg, B. & Boujday, S. Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. *Biosens. Bioelectron.* **165**, 112370 (2020).
137. Van Weemen, B. K. & Schuurs, A. H. W. M. The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays. *Immunochemistry* **12**, 667–670 (1975).
138. Esteve-Turrillas, F. A., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Site-heterologous haptens and competitive monoclonal antibody-based immunoassays for pyrimethanil residue analysis in foodstuffs. *LWT - Food Sci. Technol.* **63**, 604–611 (2015).
139. Shrivastav, T. G., Chaube, S. K., Kariya, K. P., Prasad, P. K. V. & Kumar, D. Influence of different length spacers containing enzyme conjugate on functional parameters of progesterone Elisa. *J. Immunoass. Immunochem.* **34**, 94–108 (2013).
140. Ceballos-Alcantarilla, E. *et al.* High-affinity Antibodies from a Full Penthiopyrad-mimicking Hapten and Heterologous Immunoassay Development for Fruit Juice Analysis. *Food Anal. Methods* **10**, 4013–4023 (2017).
141. Chen, L.-L., Ming, X. & Cen, J.-D. Improved and Practical Synthesis of 2-Deoxy-L-ribose by Hypophosphite-Mediated Deoxygenation. *Synth. Commun.* **42**, 1–7 (2012).
142. Shing, T. K. ., Leung, Y. C. & Yeung, K. W. Catalytic asymmetric epoxidation of alkenes with arabinose-derived uloses. *Tetrahedron* **59**, 2159–2168 (2003).
143. Akagi, M. *et al.* A Practical Synthesis of L-Ribose. *Chem. Pharm. Bull.* **50**, 866–868 (2002).
144. Cui, Y., Cheng, Z., Mao, J. & Yu, Y. Regioselective 6-detrimethylsilylation of per-O-TMS-protected carbohydrates in the presence of ammonium acetate. *Tetrahedron Lett.* **54**, 3831–3833 (2013).
145. Egger, J., Bretscher, P., Freigang, S., Kopf, M. & Carreira, E. M. Synthesis of Epoxyisoprostanes: Effects in Reducing Secretion of Pro-inflammatory Cytokines IL-



- 6 and IL-12. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 5382–5385 (2013).
146. Mercader, J. V., Abad-Somovilla, A., Agulló, C. & Abad-Fuentes, A. Aproximaciones inmunoanalíticas para el control de xenobióticos y biotoxinas en alimentos. *Arbor* **196**, 542 (2020).
147. Hassani, L. & Nourozi, R. Modification of Lysine Residues of Horseradish Peroxidase and Its Effect on Stability and Structure of the Enzyme. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172**, 3558–3569 (2014).
148. Cevallos-ceden, E. *et al.* Hapten Design and Antibody Generation for Immunoanalysis of Spirotetramat and Spirotetramat-enol. *ACS Omega* **3**, 11950–11957 (2018).
149. Rubio, F., Veldhuis, L. J., Clegg, B. S., Fleeker, J. R. & Hall, J. C. Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 691–696 (2003).
150. Zhu, Y., Song, S., Liu, L., Kuang, H. & Xu, C. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for acrylamide detection based on a monoclonal antibody. *Food Agric. Immunol.* **27**, 796–805 (2016).
151. Nie, D. *et al.* A flexible assay strategy for non-glucose targets based on sulfhydryl-terminated liposomes combined with personal glucometer. *Biosens. Bioelectron.* **175**, 112884 (2021).
152. Kang, Y., Gu, H.-X. X. & Zhang, X. A self-referenced method for determination of patulin by surface-enhanced Raman scattering using gold nanobipyramids as the substrate. *Anal. Methods* **11**, 5142–5149 (2019).
153. Khan, R. K. M., Torker, S. & Hoveyda, A. H. Readily Accessible and Easily Modifiable Ru-Based Catalysts for Efficient and Z -Selective Ring-Opening Metathesis Polymerization and Ring-Opening/Cross-Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10258–10261 (2013).
154. Simão, D. *et al.* Synthesis, Structure and Physical Properties of Tetrabutylammonium Salts of Nickel Complexes with the New Ligand dcbdt = 4,5-dicyanobenzene-1,2-dithiolate,  $[\text{Ni}(\text{dcbdt})_2]z^-$  ( $z = 0.4, 1, 2$ ). *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 3119–3126 (2001).
155. Allison, M. E. D. & Fearon, D. T. Enhanced immunogenicity of aldehyde-bearing antigens: a possible link between innate and adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2881–2887 (2000).

## REFERENCES

---

156. Pietrzak, E. R., Shanley, B. C. & Kroon, P. A. Antibodies made against a formaldehyde-protein adduct cross react with an acetaldehyde-protein adduct. Implications for the origin of antibodies in human serum which recognize acetaldehyde-protein adducts. *Alcohol Alcohol.* **30**, 373–378 (1995).
157. Xu, D. *et al.* Epitope Characterization of Malondialdehyde–Acetaldehyde Adducts Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 978–986 (1997).
158. Huisgen, R., Knorr, R., Möbius, L. & Szeimies, G. 1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXIII. Einige Beobachtungen zur Addition organischer Azide an CC-Dreifachbindungen. *Chem. Ber.* **98**, 4014–4021 (1965).
159. Sanders, M. *et al.* An immunogen synthesis strategy for the development of specific anti-deoxynivalenol monoclonal antibodies. *Food Addit. Contam. Part A* **31**, 1751–1759 (2014).
160. Vasylieva, N. *et al.* Sensitive Immunoassay for Detection and Quantification of the Neurotoxin, Tetramethylenedisulfotetramine. *Anal. Chem.* **89**, 5612–5619 (2017).
161. Liang, L. & Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **255**, 2933–2945 (2011).
162. Presolski, S. I., Hong, V., Cho, S.-H. & Finn, M. G. Tailored Ligand Acceleration of the Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction: Practical and Mechanistic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 14570–14576 (2010).
163. López-Puertollano, D., Agulló, C., Mercader, J. V., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Click Chemistry-Assisted Bioconjugates for Hapten Immunodiagnostics. *Bioconjug. Chem.* **31**, 956–964 (2020).
164. Joshi, A. V., Bhusare, S., Baidossi, M., Qafisheh, N. & Sasson, Y. Oxidative coupling of thiols to disulfides using a solid anhydrous potassium phosphate catalyst. *Tetrahedron Lett.* **46**, 3583–3585 (2005).
165. Kaur, J. *et al.* Immunochromatographic Dipstick Assay Format Using Gold Nanoparticles Labeled Protein–Hapten Conjugate for the Detection of Atrazine. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5028–5036 (2007).
166. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

167. European Commission. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. in *Official Journal of the European Communities* vol. 45 (2002).
168. EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis T. *Off. J. Eur. Union* **L 147**, 29–43 (2014).
169. López-Puertollano, D., Agulló, C., Mercader, J. V., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Immunoanalytical methods for ochratoxin A monitoring in wine and must based on innovative immunoreagents. *Food Chem.* **345**, 128828 (2021).
170. Iqbal, S. Z., Malik, S., Asi, M. R., Selamat, J. & Malik, N. Natural occurrence of patulin in different fruits, juices and smoothies and evaluation of dietary intake in Punjab, Pakistan. *Food Control* **84**, 370–374 (2018).
171. Hussain, S. *et al.* Patulin mycotoxin in mango and orange fruits, juices, pulps, and jams marketed in Pakistan. *Toxins (Basel)*. **12**, 1–10 (2020).
172. Notardonato, I. *et al.* Critical review of the analytical methods for determining the mycotoxin patulin in food matrices. *Rev. Anal. Chem.* **40**, 144–160 (2021).
173. Li, X., Li, H., Li, X. & Zhang, Q. Determination of trace patulin in apple-based food matrices. *Food Chem.* **233**, 290–301 (2017).
174. Sofie, M. *et al.* Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 66–71 (2010).
175. Li, X. X. X. *et al.* Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **257**, 1–6 (2018).
176. Shinde, R., Dhanshetty, M., Lakade, A., Elliott, C. T. & Banerjee, K. Development and validation of a liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the analysis of patulin in apple and apple juice. *Mycotoxin Res.* **37**, 119–127 (2021).
177. Juan, C., Raiola, A., Mañes, J. & Ritieni, A. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control* **39**, 227–236 (2014).
178. Lago, L. O., Nievierowski, T. H., Mallmann, L. P., Rodrigues, E. & Welke, J. E. QuEChERS-

## REFERENCES

---

- LC-QTOFMS for the simultaneous determination of legislated and emerging mycotoxins in malted barley and beer using matrix-matched calibration as a solution to the commercial unavailability of internal standards for some mycotoxins. *Food Chem.* **345**, 128744 (2021).
179. Vaclavikova, M. *et al.* Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC-MS/MS analytical procedure. *Food Control* **47**, 577–584 (2015).
180. Cortese, M., Gigliobianco, M. R., Magnoni, F., Censi, R. & Di Martino, P. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules* **25**, 3047 (2020).
181. Economou, A., Botitsi, H., Antoniou, S. & Tsiipi, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5856–5867 (2009).
182. Armarego, W. L. F. & Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*. (Butterworth Heinemann Press, Oxford, 1996).
183. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
184. REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
185. LEY 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
186. Smith, F. & Van Cleve, J. W. A Note on the Synthesis of Glycosides 1. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 3159–3160 (1955).
187. Bennett, M., Gill, G. B., Pattenden, G., Shuker, A. J. & Stapleton, A. Ylidenebutenolide mycotoxins. Concise syntheses of patulin and neopatulin from carbohydrate precursors. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 929 (1991).
188. Joseph, A. A. *et al.* TMSOTf-Catalyzed Silylation: Streamlined Regioselective One-Pot Protection and Acetylation of Carbohydrates. *European J. Org. Chem.* **2012**, 744–753 (2012).
189. Jin, L. *et al.* Novel eco-friendly solution for the regioselective acetylation of per-O-

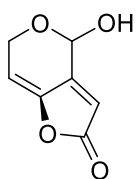
- TMS carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **495**, 108074 (2020).
190. Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**, 1548–1550 (1979).
  191. Nowinski, R. C., Lostrom, M. E., Tam, M. R., Stone, M. R. & Burnette, W. N. The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ecotropic murine leukemia viruses. *Virology* **93**, 111–126 (1979).
  192. Raab, G. M. Comparison of a logistic and a mass-action curve for radioimmunoassay data. *Clin. Chem.* **29**, 1757–1761 (1983).
  193. Gleiter, R. & Uschmann, J. Electronic structure of heterospirenes. PE spectroscopic investigations. *J. Org. Chem.* **51**, 370–380 (1986).
  194. Schlindwein, S. H. *et al.* New Selective Synthesis of Dithiaboroles as a Viable Pathway to Functionalized Benzenedithiolenes and Their Complexes. *Inorg. Chem.* **55**, 6186–6194 (2016).
  195. Altamura, M., Fedi, V., Giannotti, D., Paoli, P. & Rossi, P. Privileged structures: Synthesis and structural investigations on tricyclic sulfonamides. *New J. Chem.* **33**, 2219–2231 (2009).



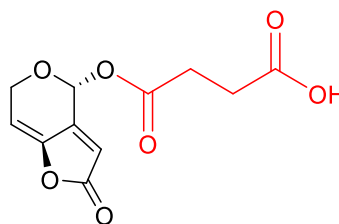
## 7 ANNEXES

### 7.1 Hapten synthesis and NMR spectra

- Conventional Haptens:

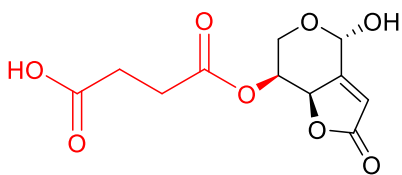


**Patulin**



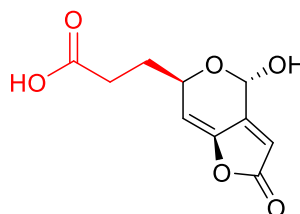
**Hapten C4**

(Mehl *et al.* approach)



**Hapten C7**

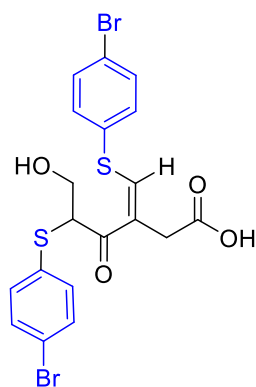
(de Champdoré *et al.* approach))



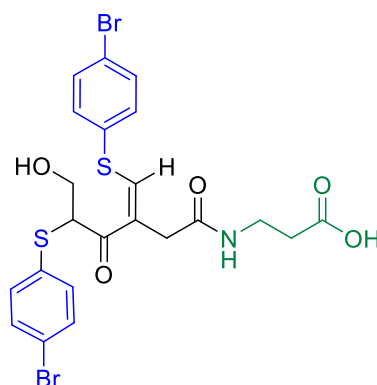
**Hapten C6** (Novel approach)

## ANNEXES

- Haptens based on derivatization with aromatic monothiolated compounds:

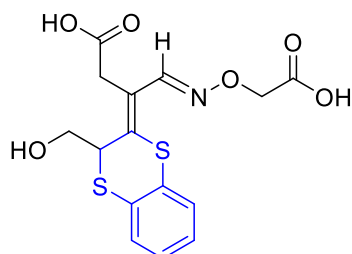


Adduct V

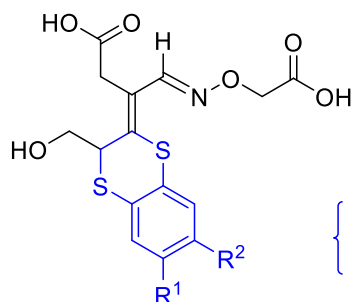


Hapten V4

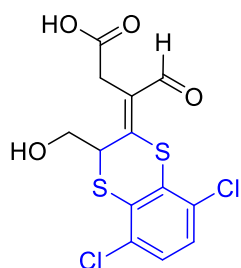
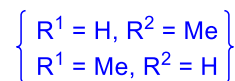
- Haptens based on derivatization with aromatic dithiolated compounds:



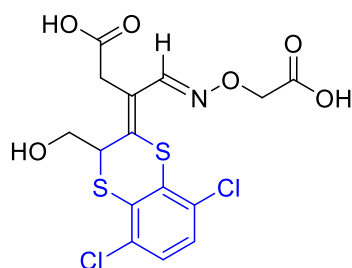
Hapten VIIa



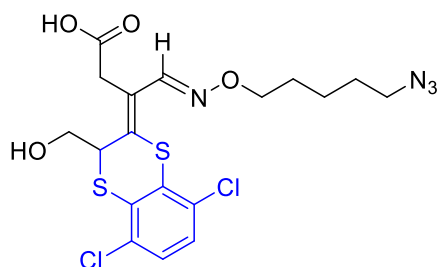
Hapten VIIIa



Adduct XI



Hapten XIa



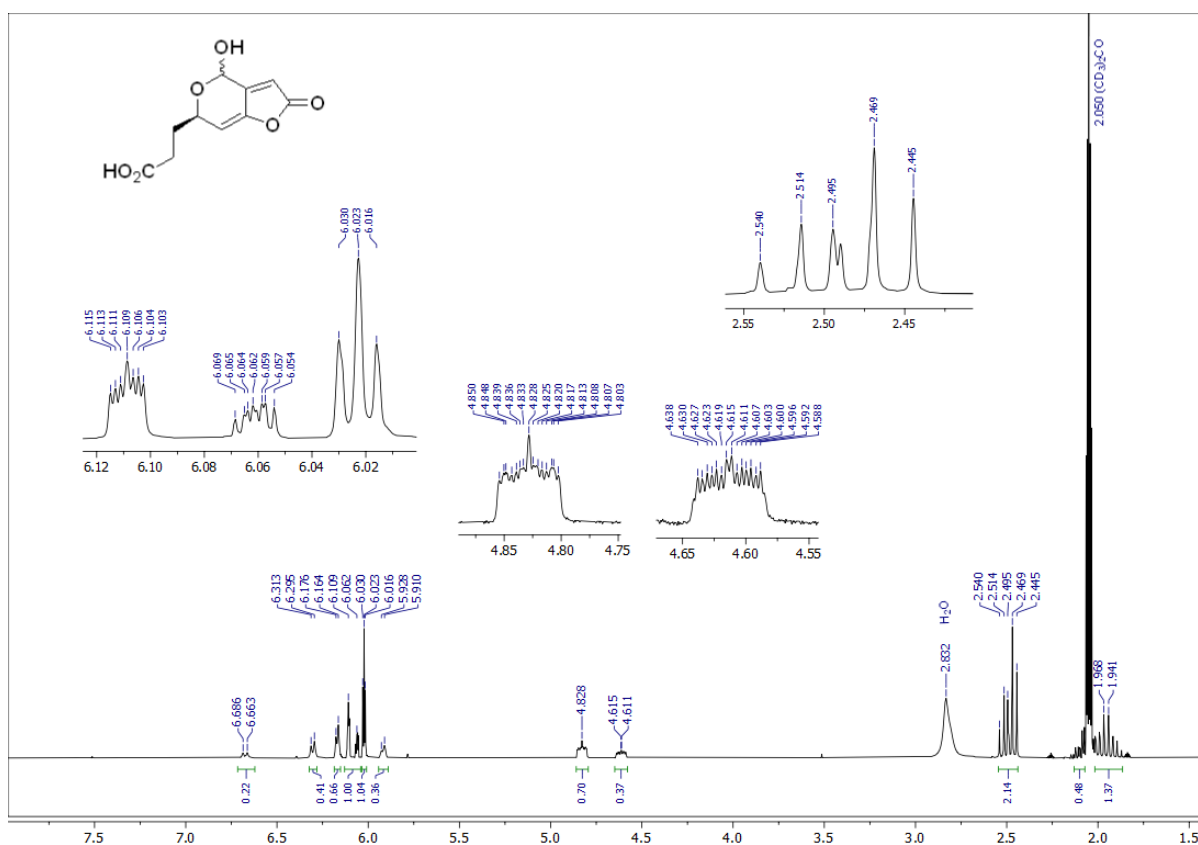
Hapten XIb



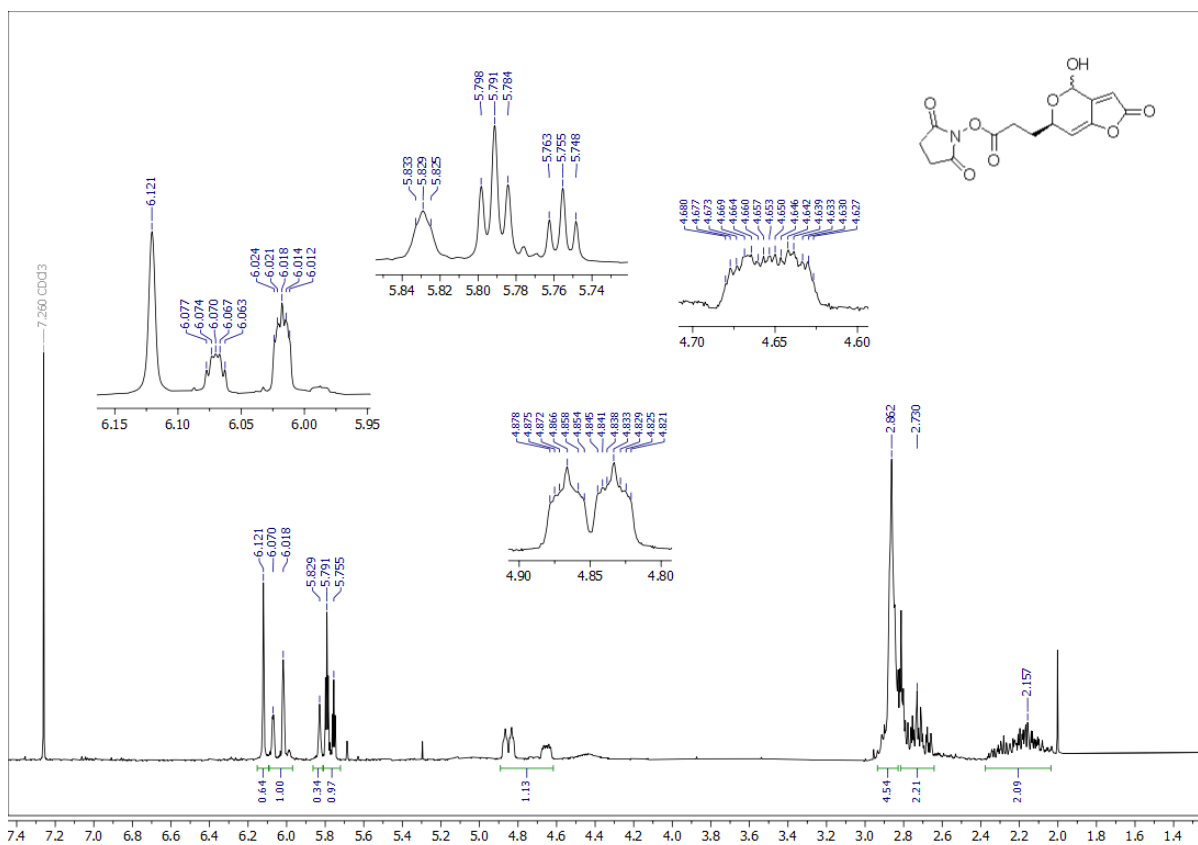


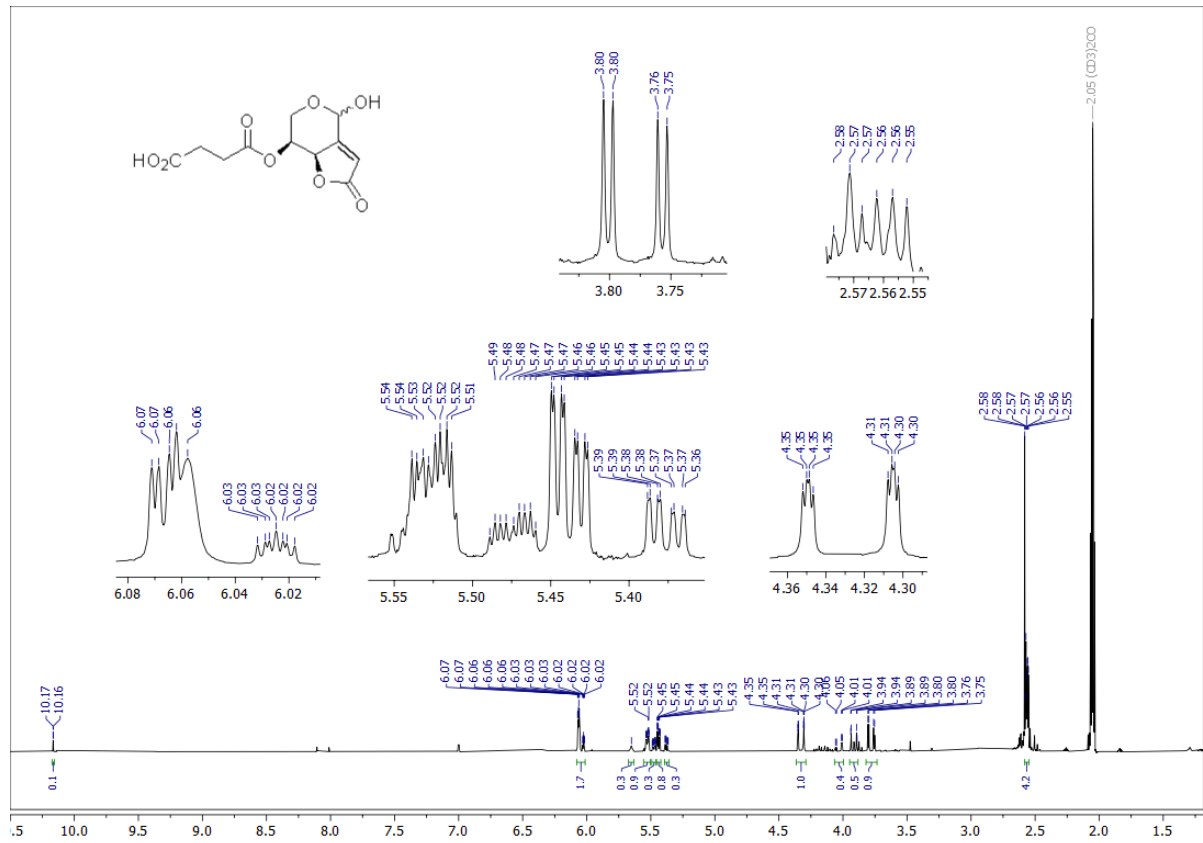
# ANNEXES

<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of haptin **C6** in acetone d<sub>6</sub>



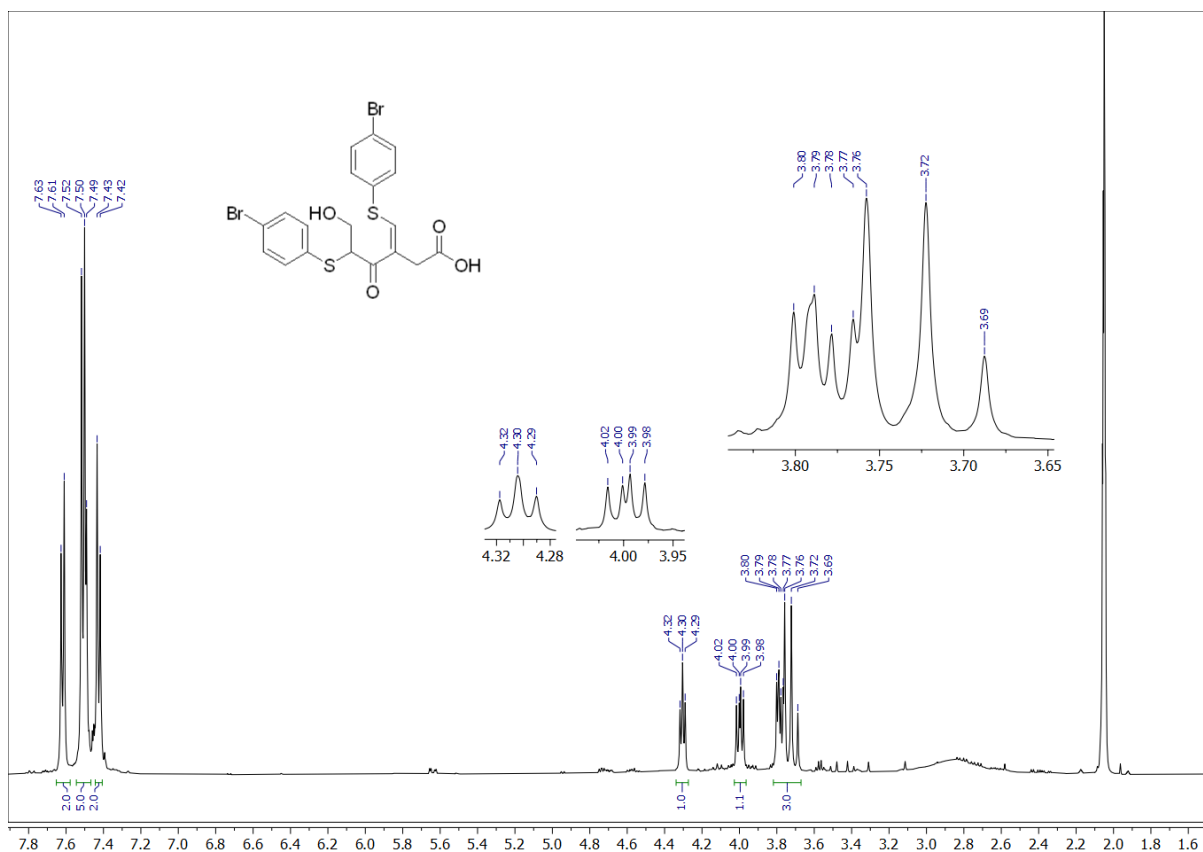
<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of NHS-C6 ester in CDCl<sub>3</sub>



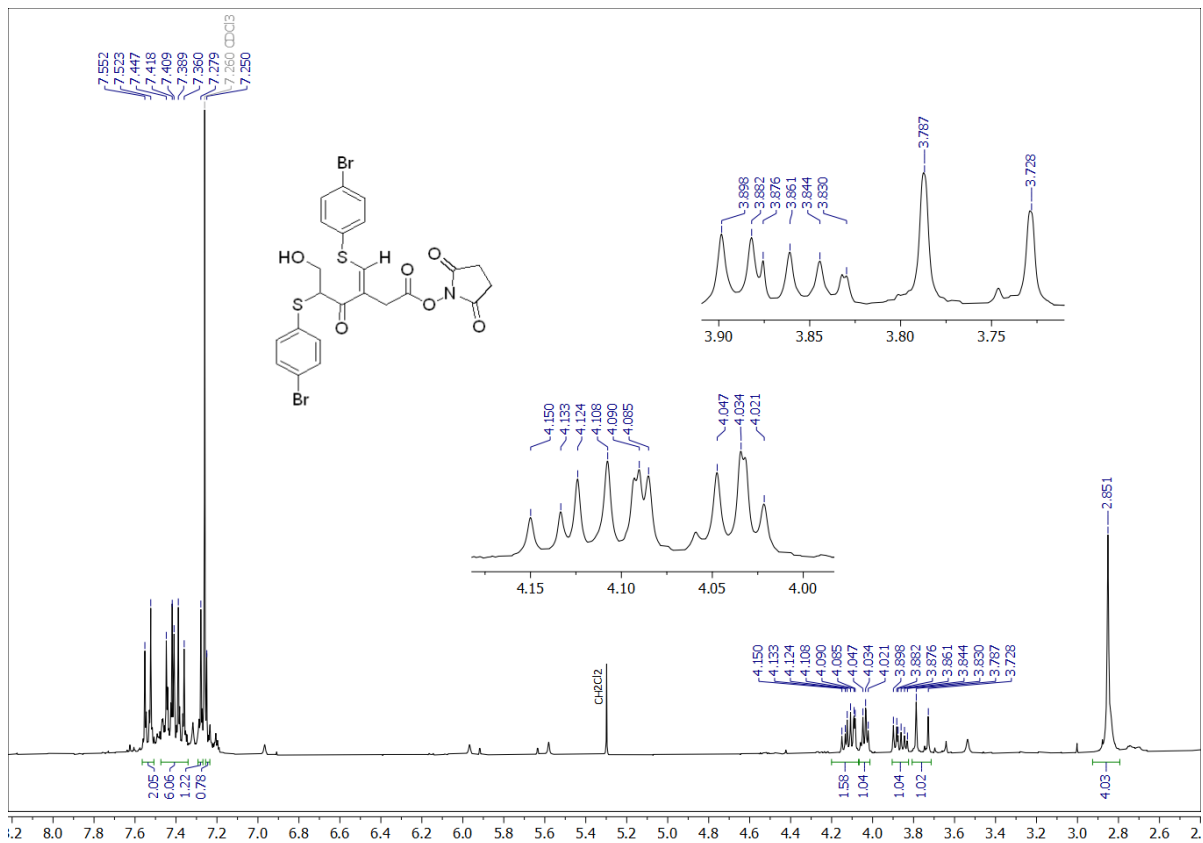
$^1\text{H}$  NMR spectrum (300 MHz) of haptan **C7** in acetone  $d_6$ 

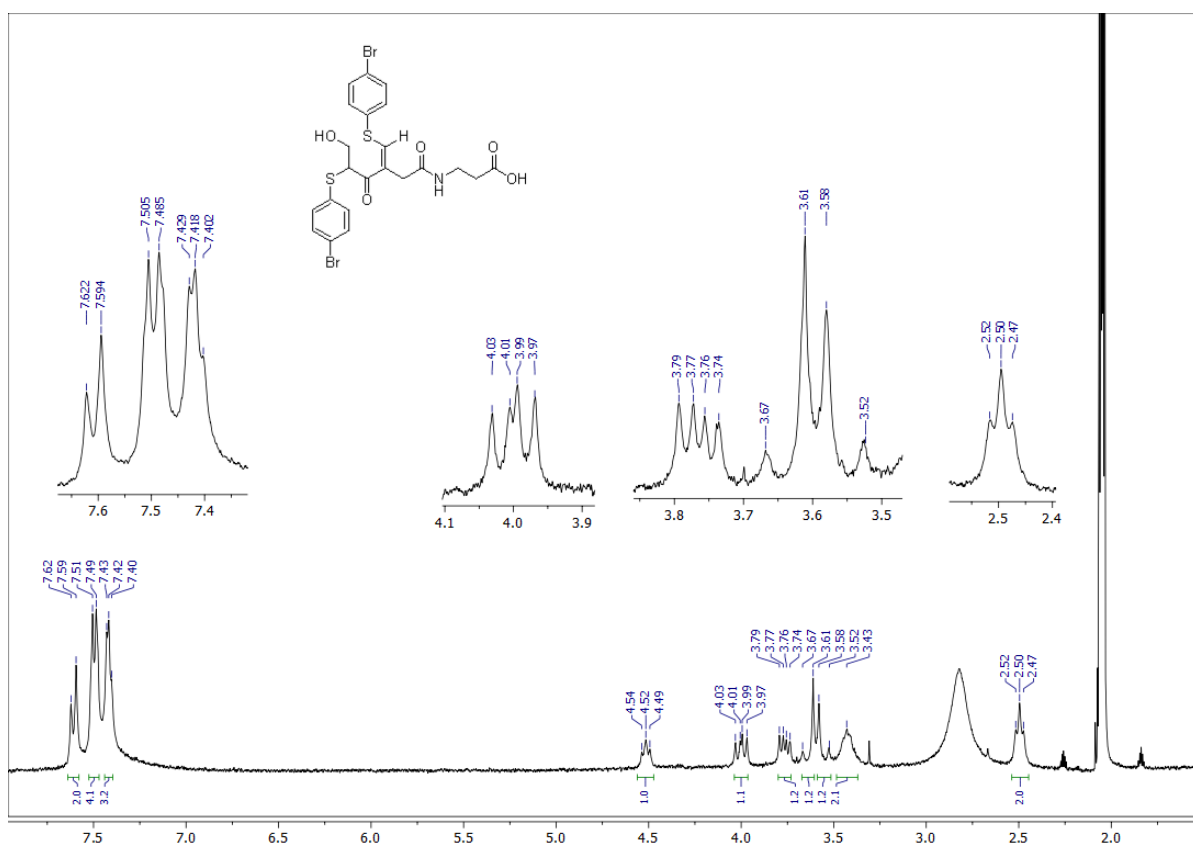
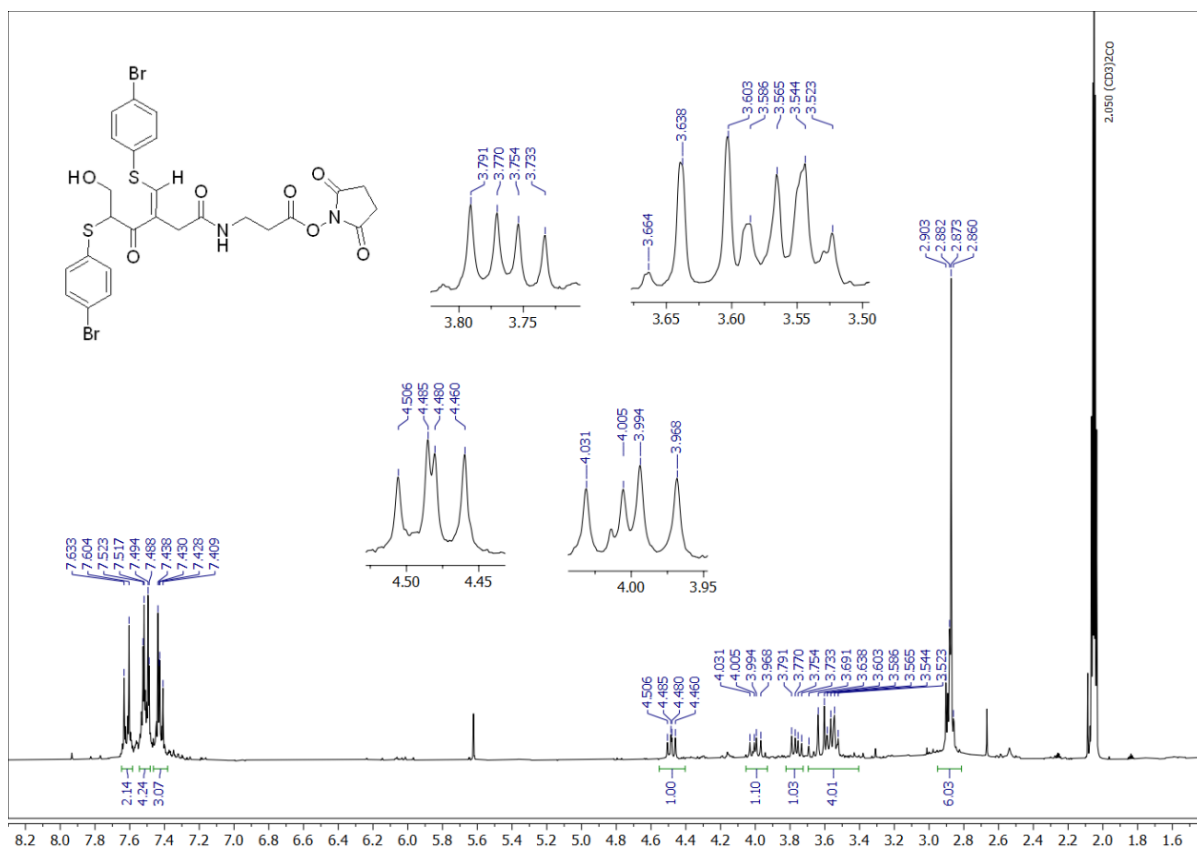
# ANNEXES

$^1\text{H}$  NMR spectrum (500 MHz) of adduct **V** in acetone  $\text{d}_6$



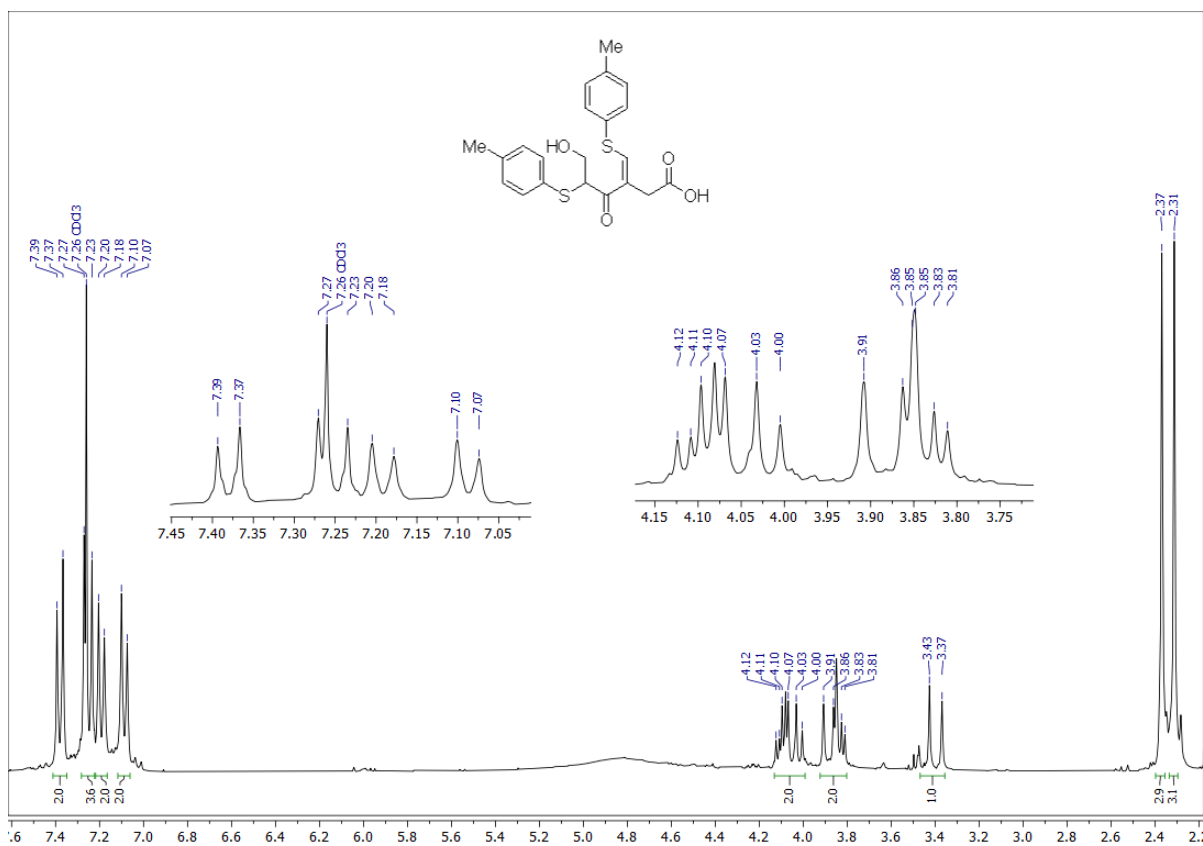
$^1\text{H}$  NMR spectrum (300 MHz) of adduct NHS-**V** ester in  $\text{CDCl}_3$



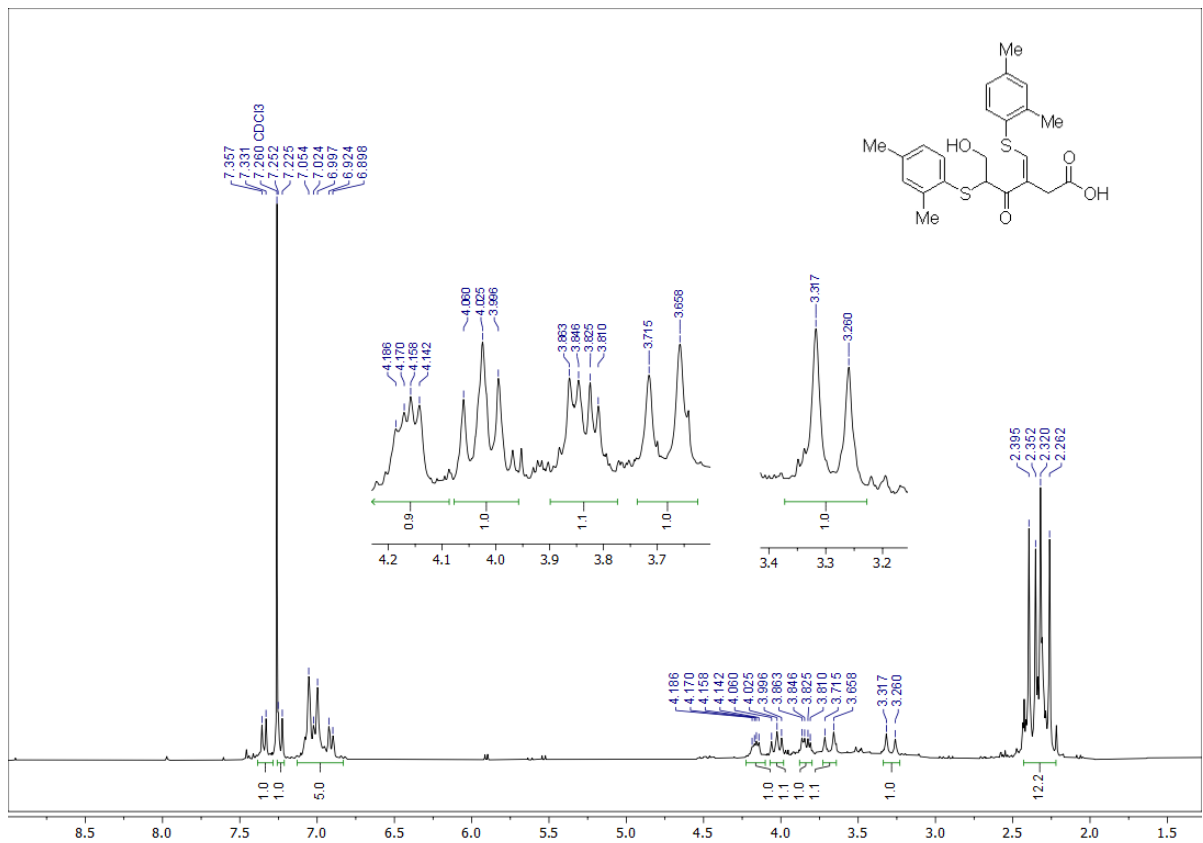
<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of hapten **V4** in acetone d<sub>6</sub><sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of NHS-V4 ester in acetone d<sub>6</sub>

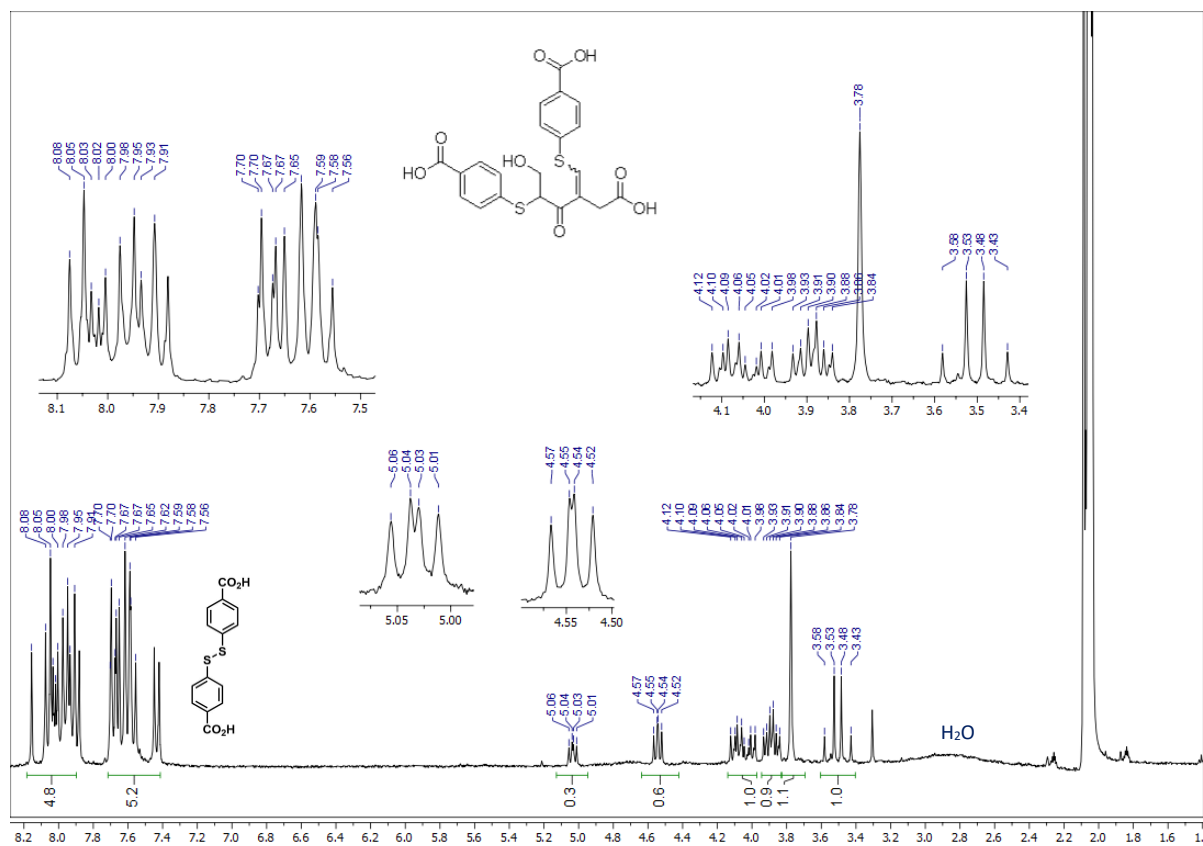
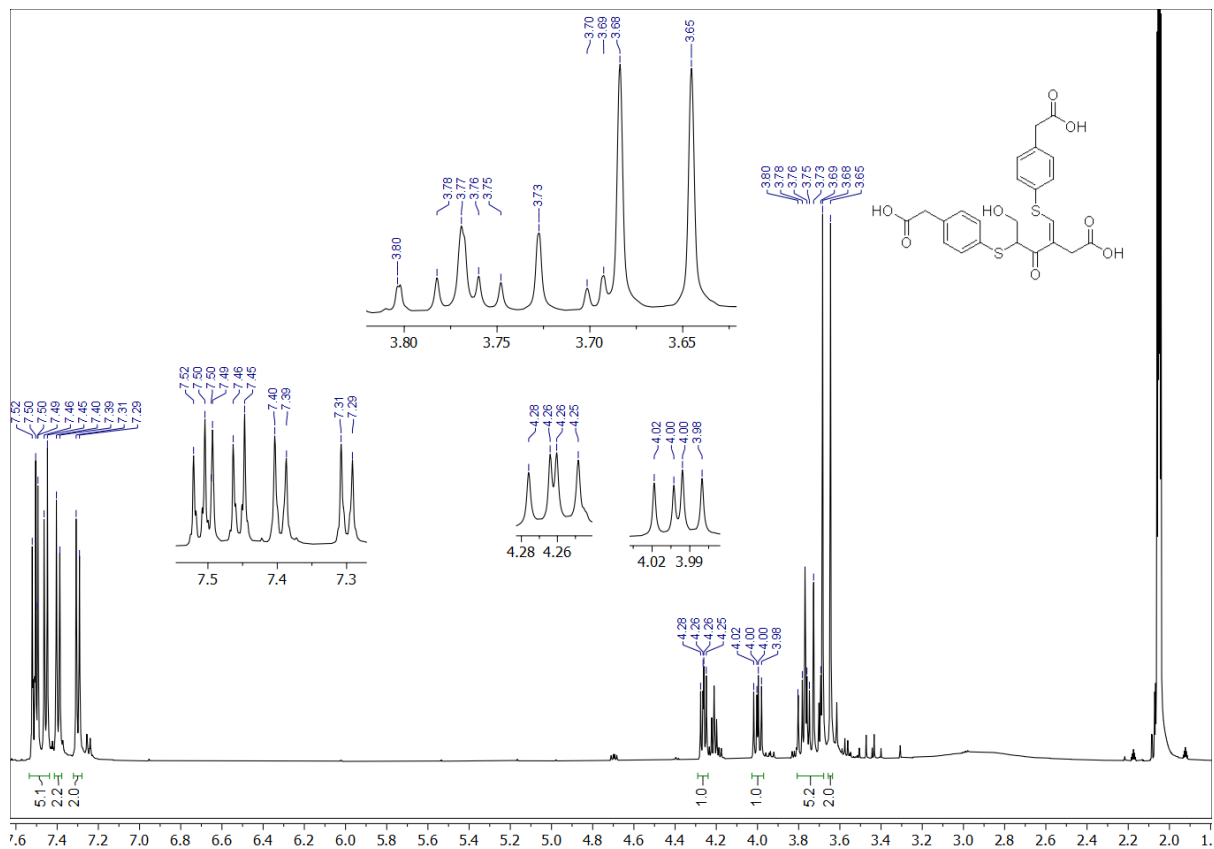
# ANNEXES

<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of adduct I in CDCl<sub>3</sub>



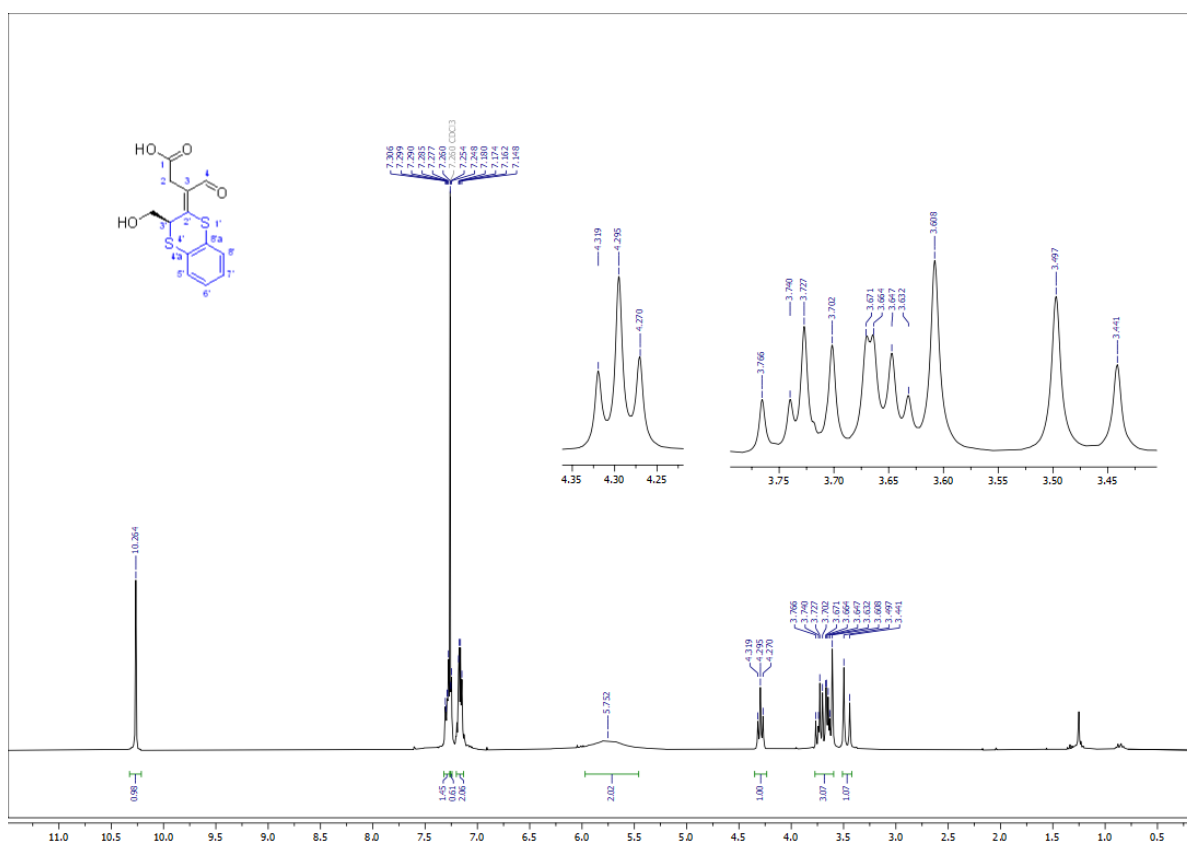
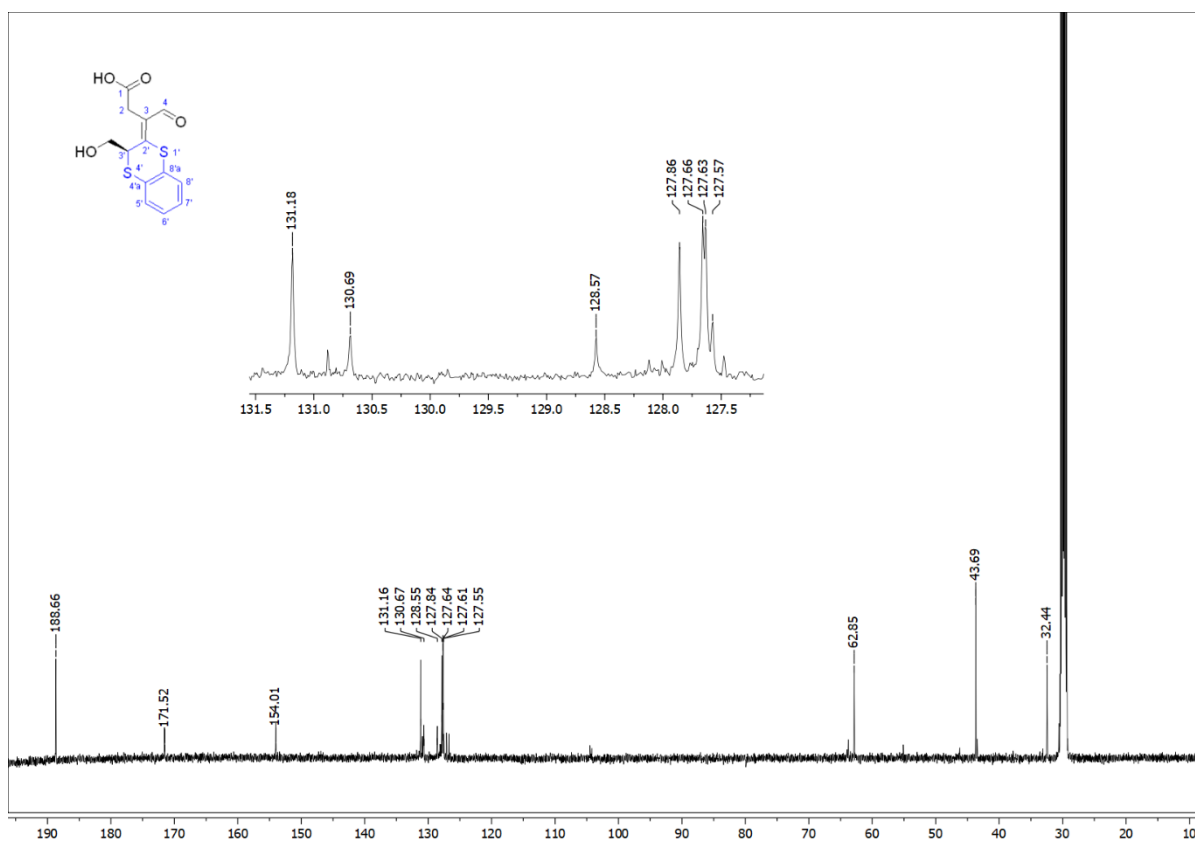
<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of adduct II in CDCl<sub>3</sub>



$^1\text{H}$  NMR spectrum (300 MHz) of adduct III (mixture of *E/Z* isomers) in acetone  $d_6$  $^1\text{H}$  NMR spectrum (500 MHz) of adduct IV in acetone  $d_6$ 

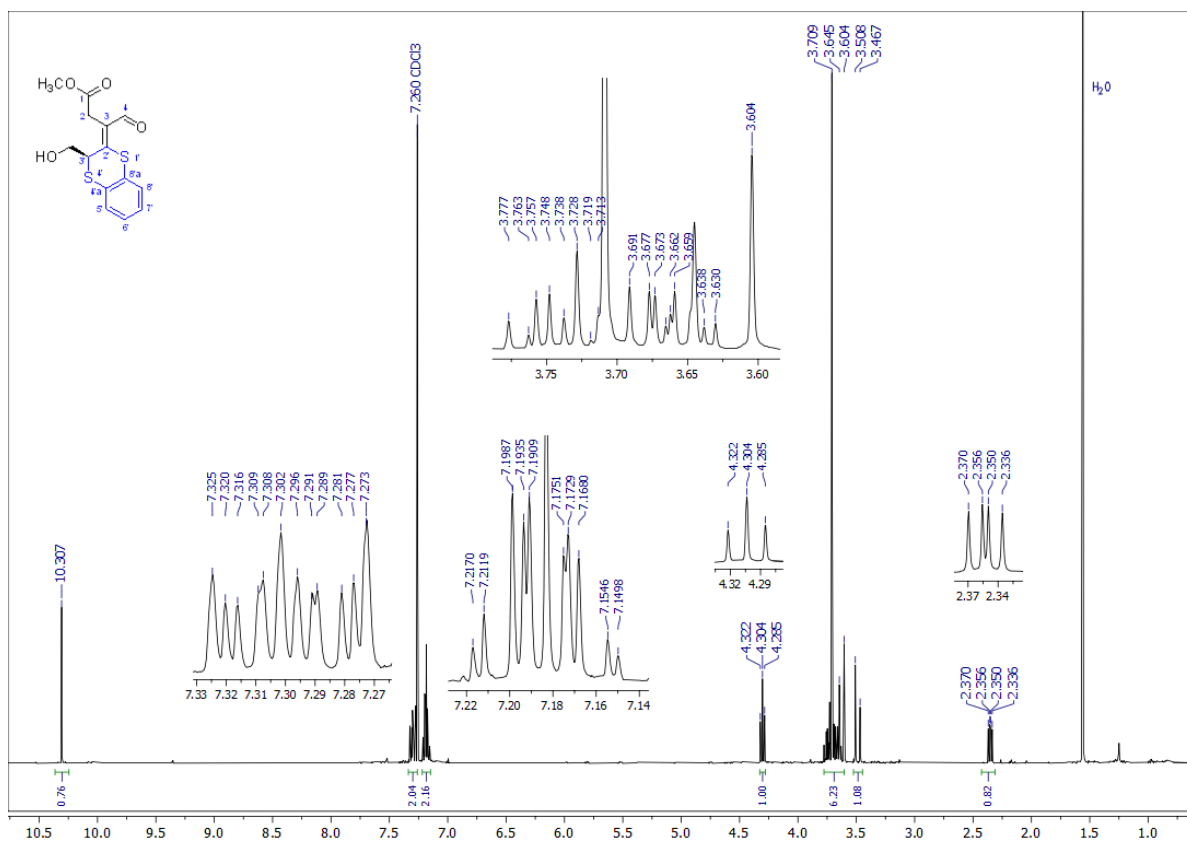




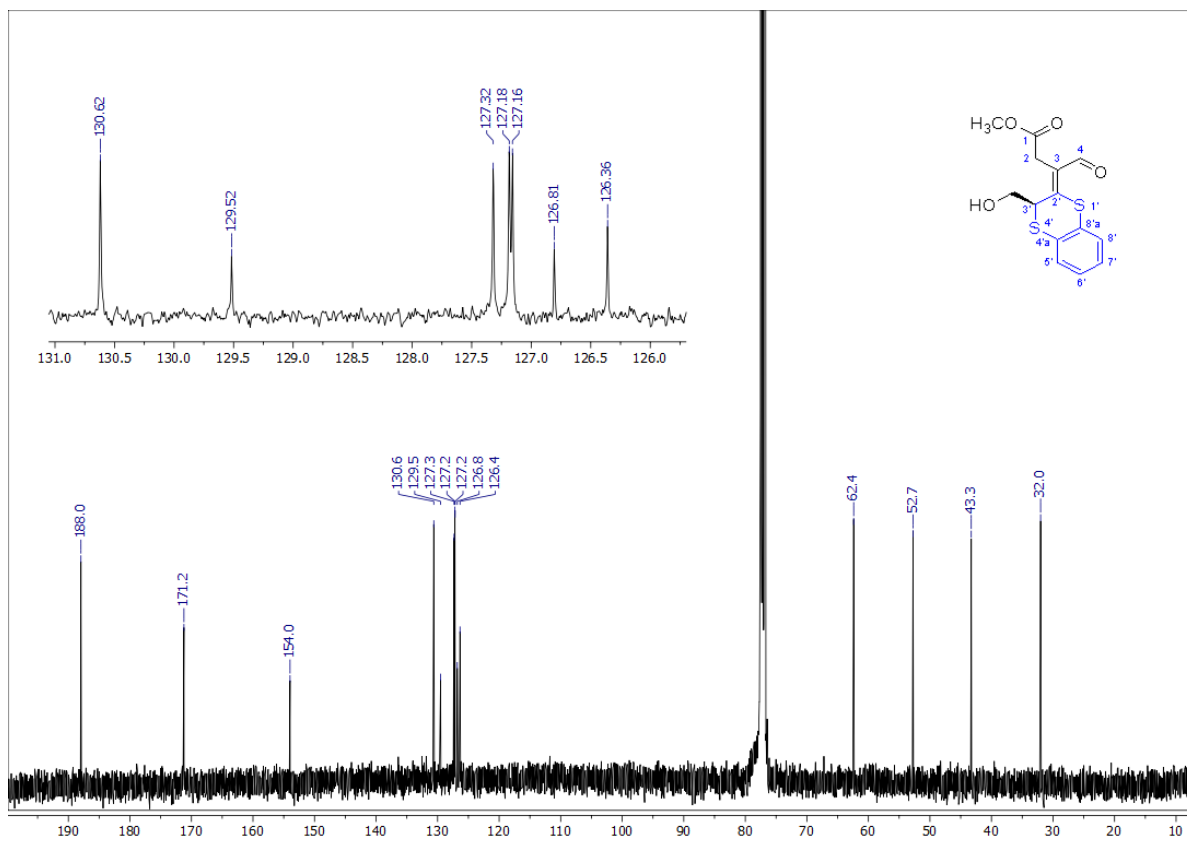
$^1\text{H}$  NMR spectrum (300 MHz) of adduct **VII** in  $\text{CDCl}_3$  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (126 MHz) of adduct **VII** in acetone- $d_6$ 

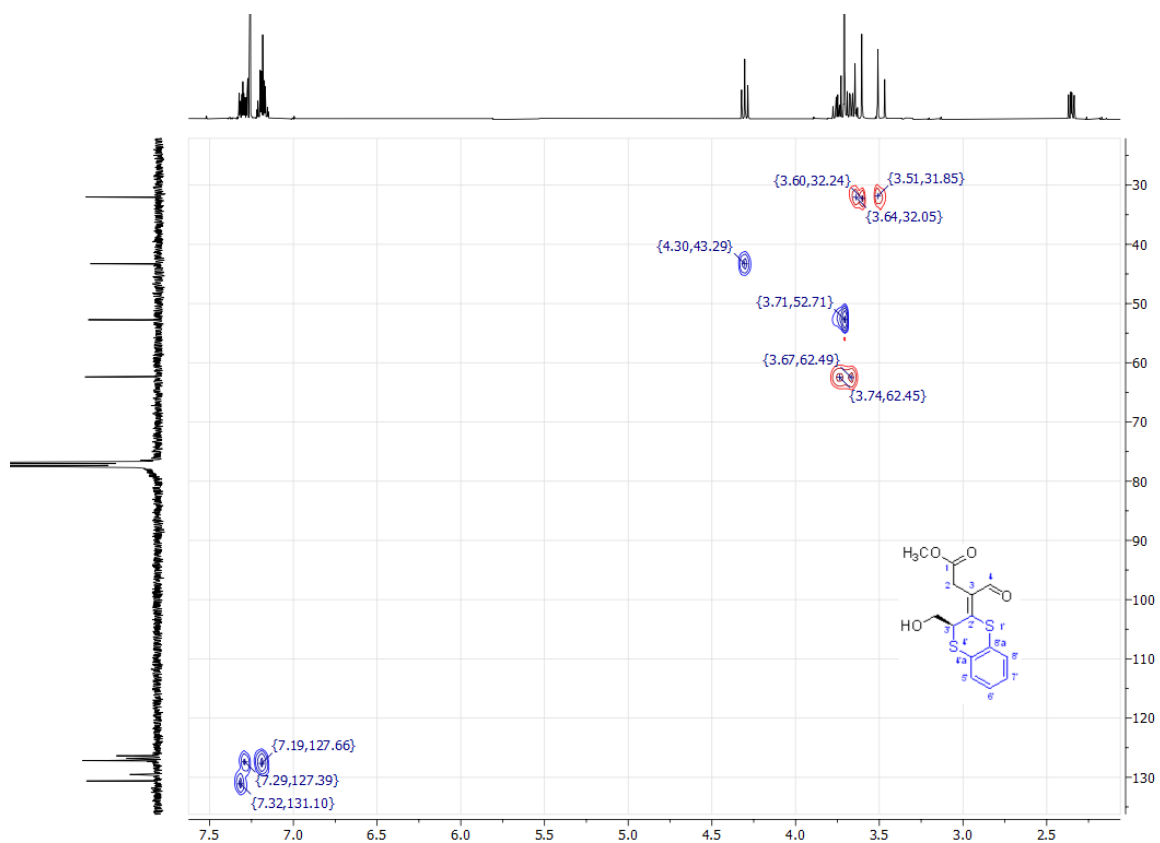
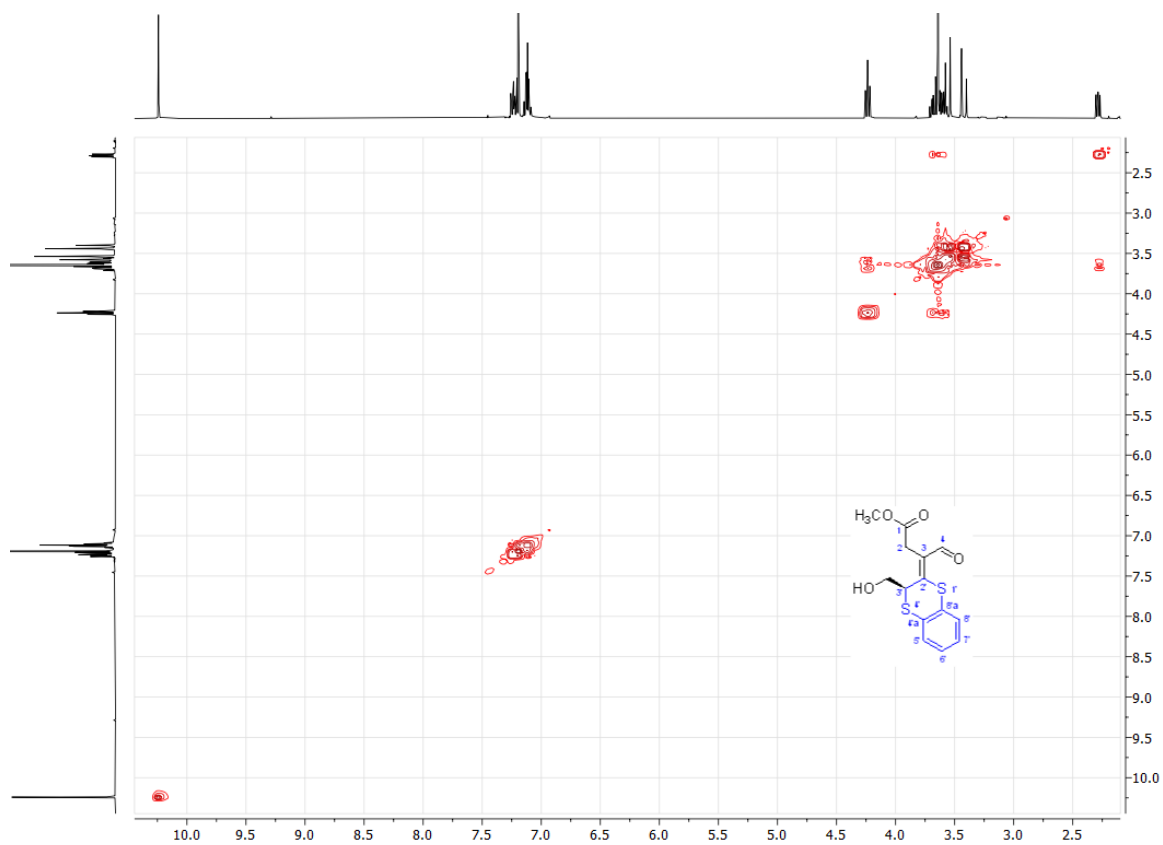
# ANNEXES

$^1\text{H}$  NMR spectrum (400 MHz) of methyl ester of adduct VII in  $\text{CDCl}_3$



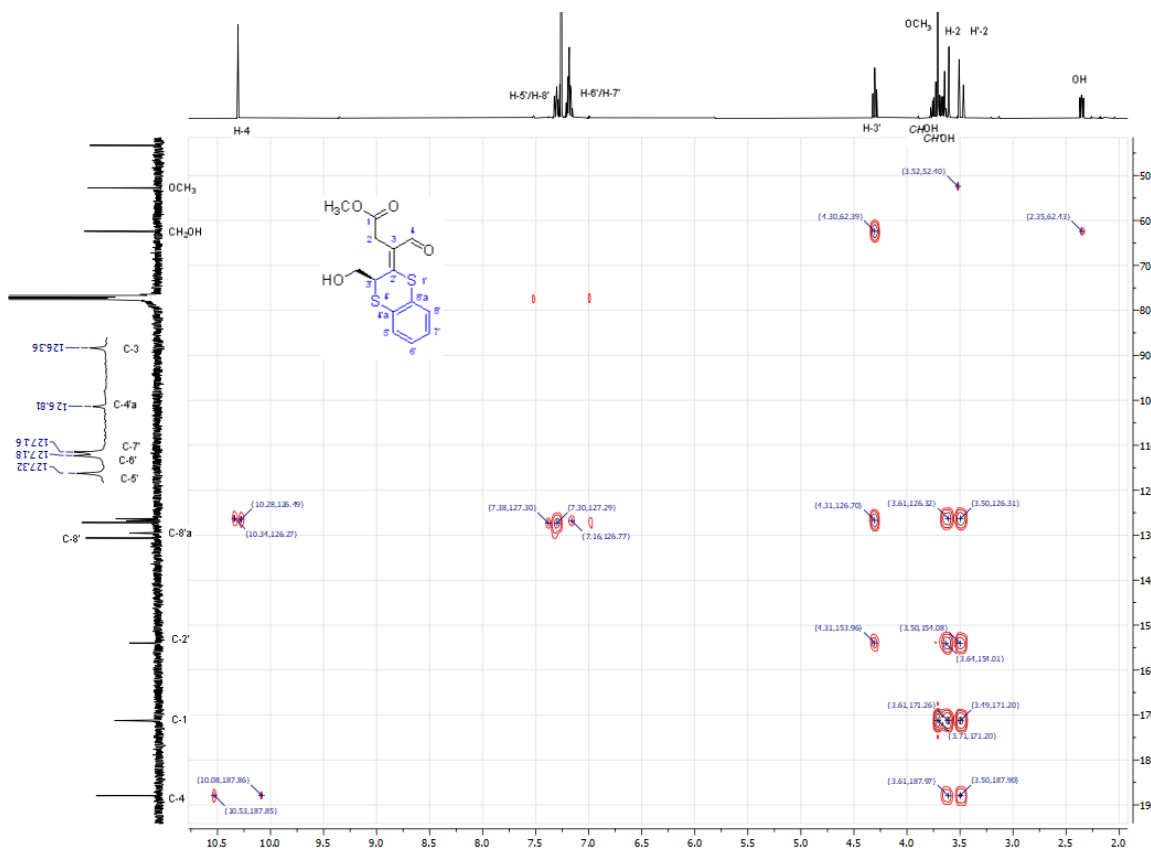
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (101 MHz) of methyl ester of adduct VII in  $\text{CDCl}_3$



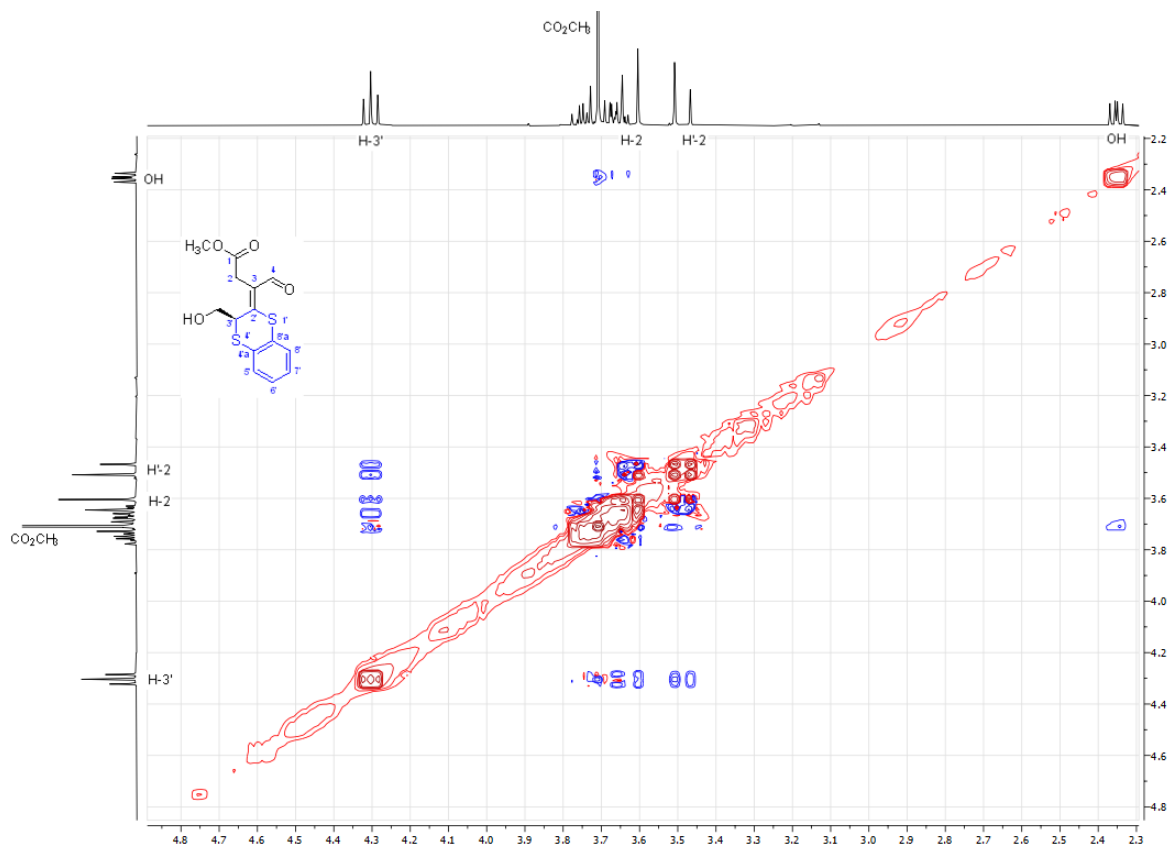
2D edited-HSQC spectrum of methyl ester of adduct VII in CDCl<sub>3</sub>2D COSY spectrum of methyl ester of adduct VII in CDCl<sub>3</sub>

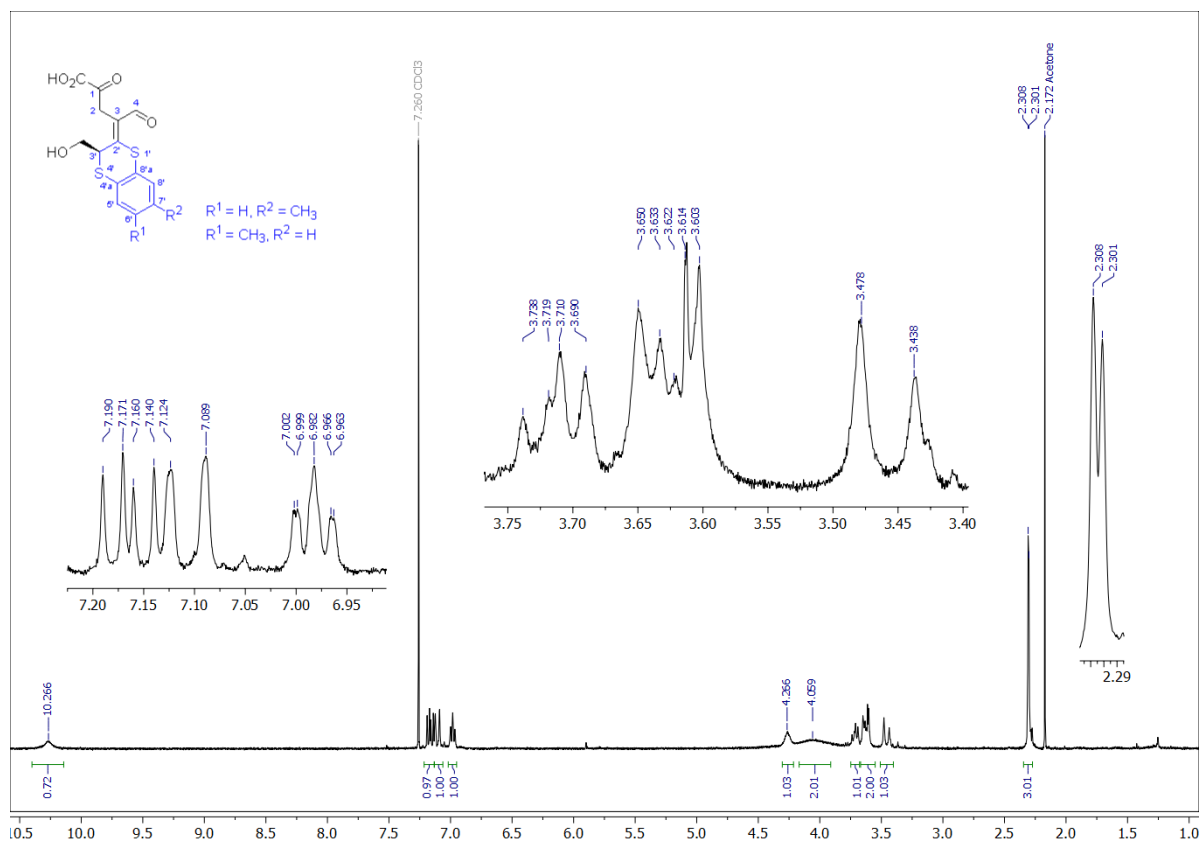
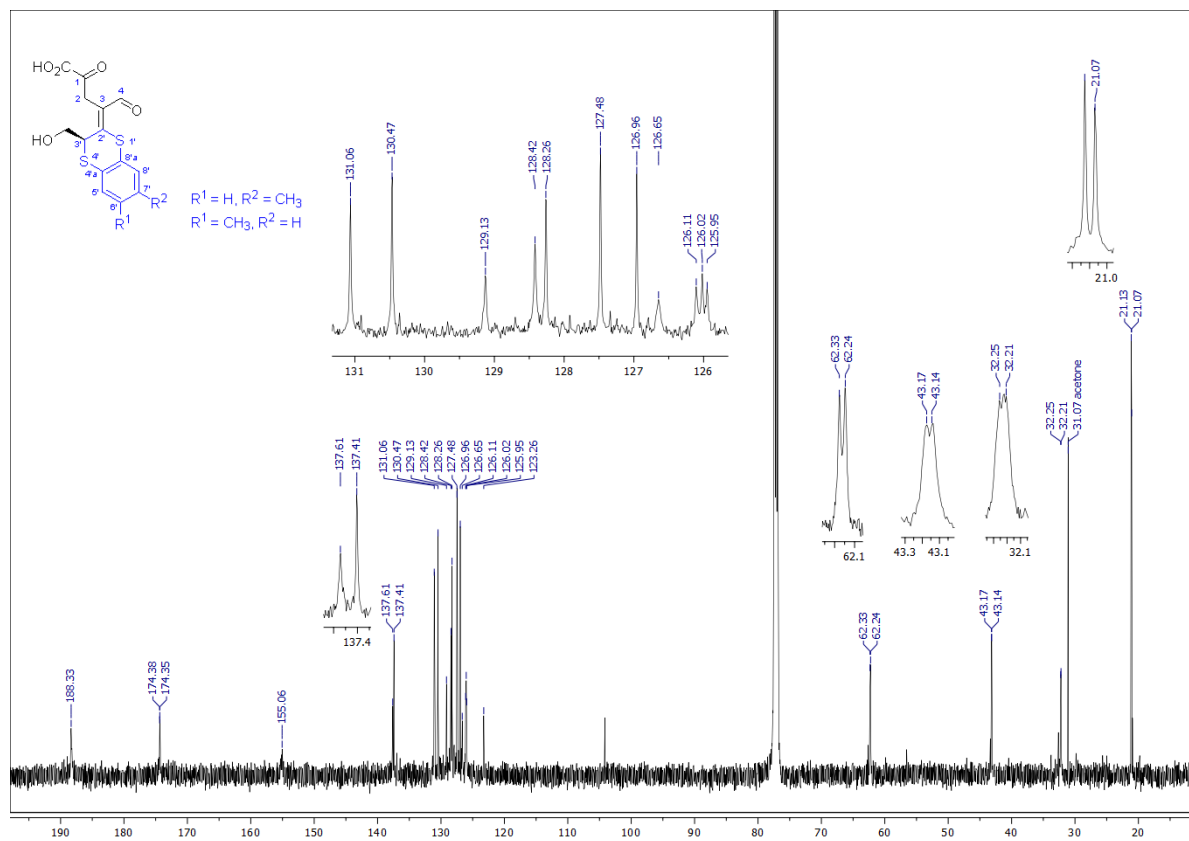
# ANNEXES

## 2D HMBC spectrum of methyl ester of adduct VII in CDCl<sub>3</sub>



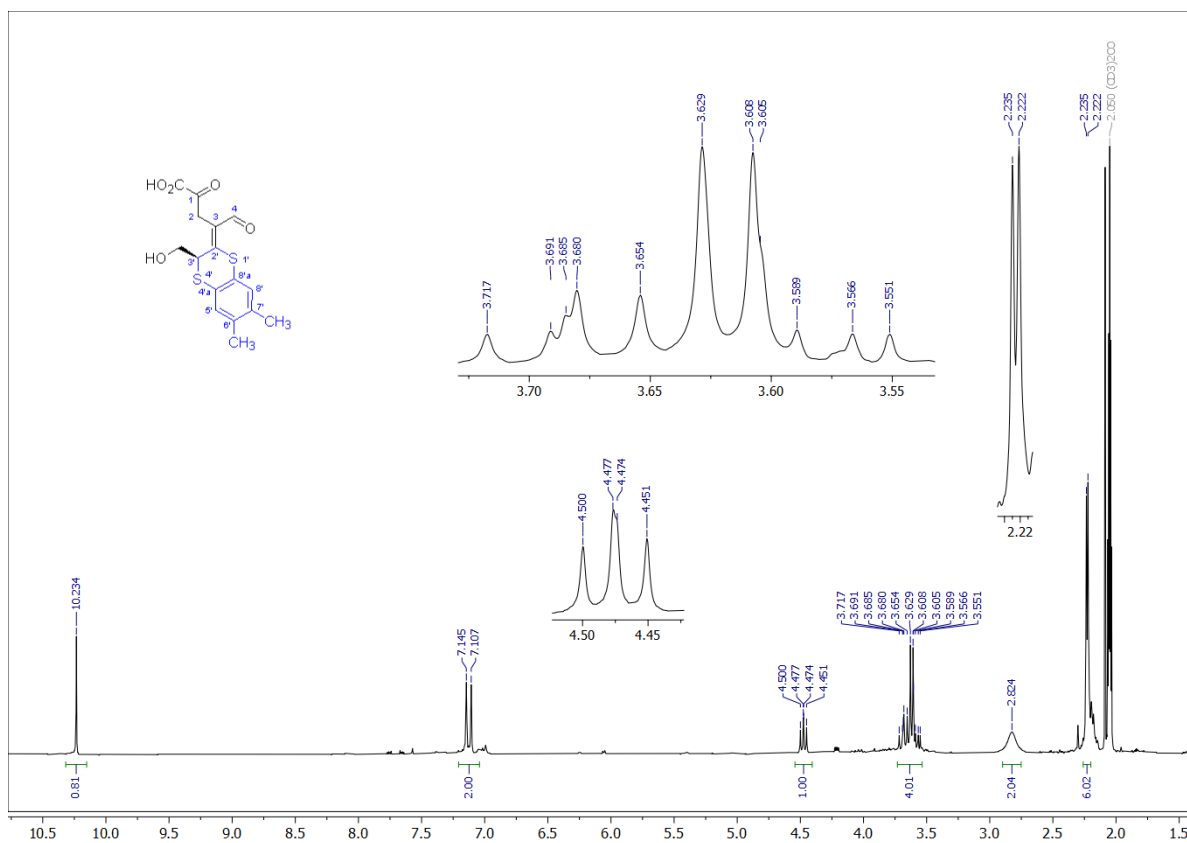
## 2D NOESY spectrum of methyl ester of adduct VII in CDCl<sub>3</sub>



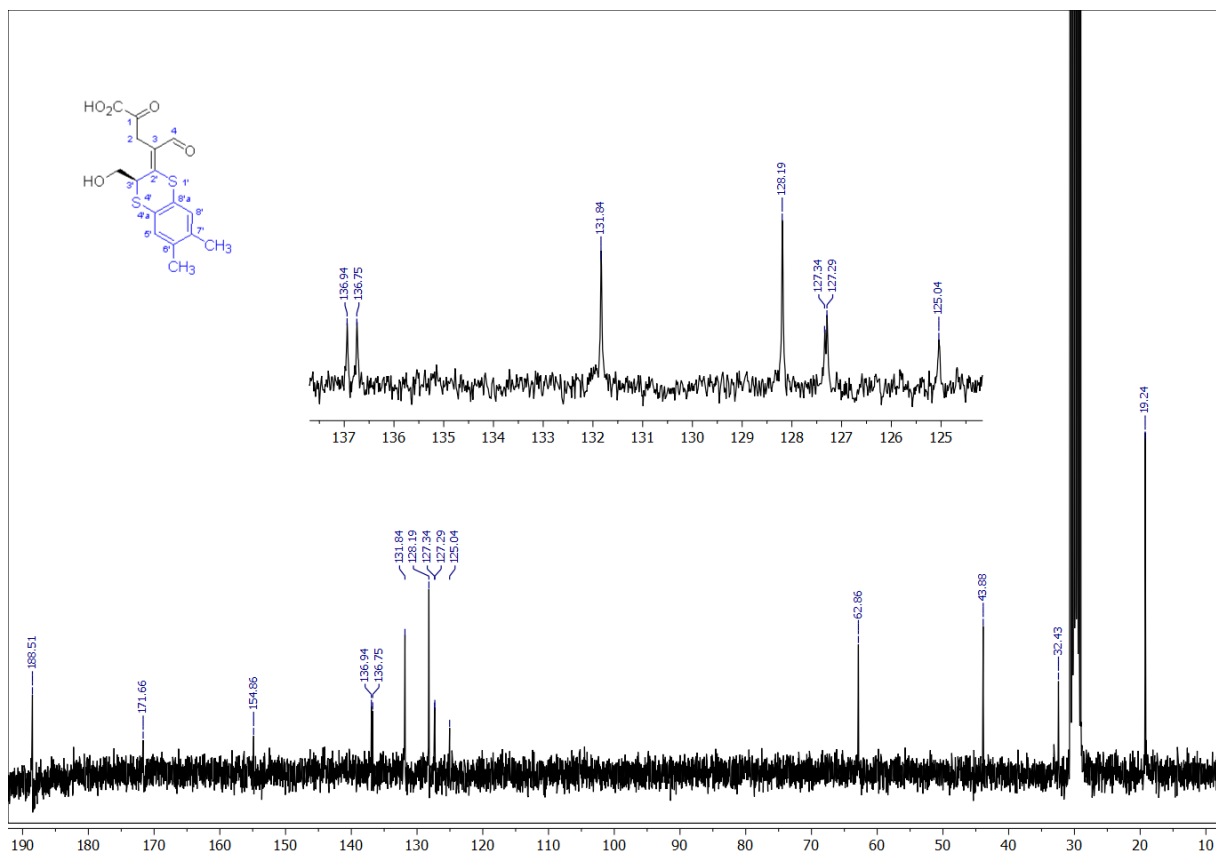
$^1\text{H}$  NMR spectrum (400 MHz) of adduct **VIII** in  $\text{CDCl}_3$  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (126 MHz) of adduct **VIII** in  $\text{CDCl}_3$ 

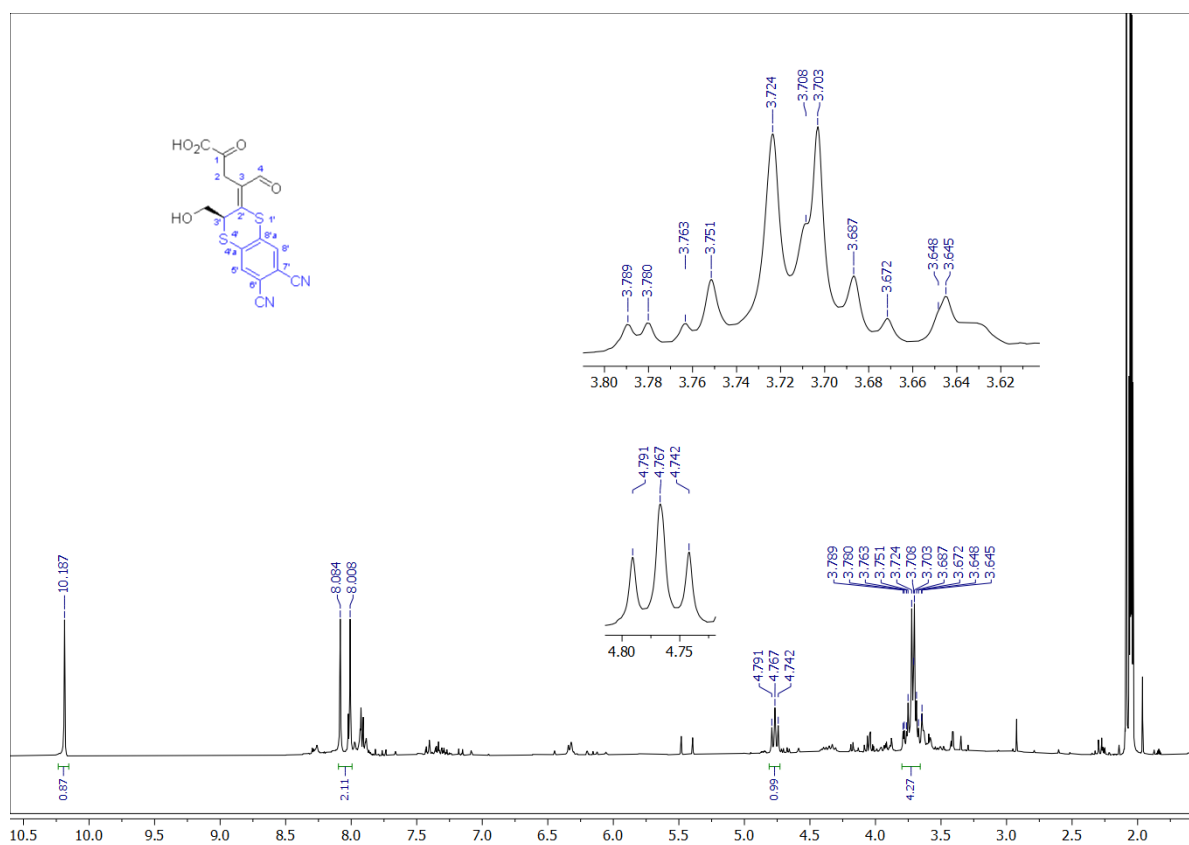
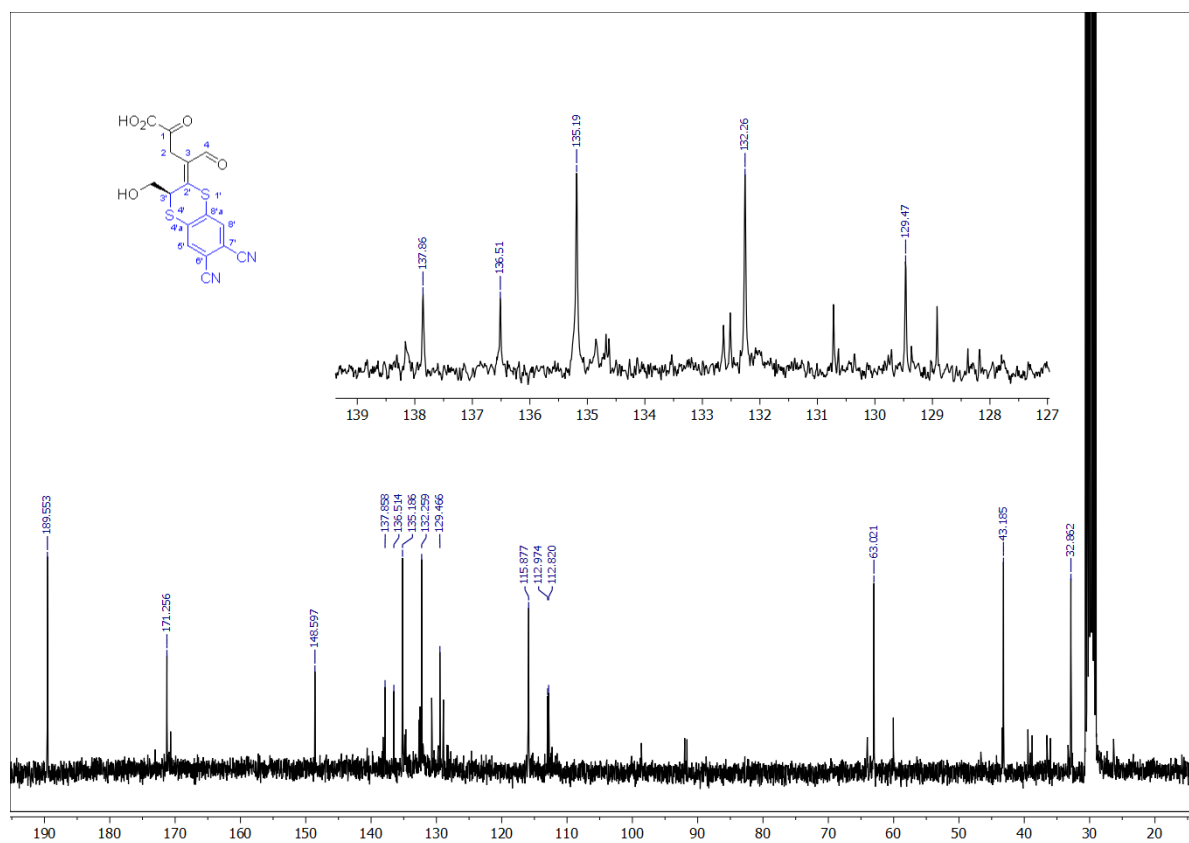
# ANNEXES

$^1\text{H}$  NMR spectrum (300 MHz) of adduct IX in acetone- $\text{d}_6$



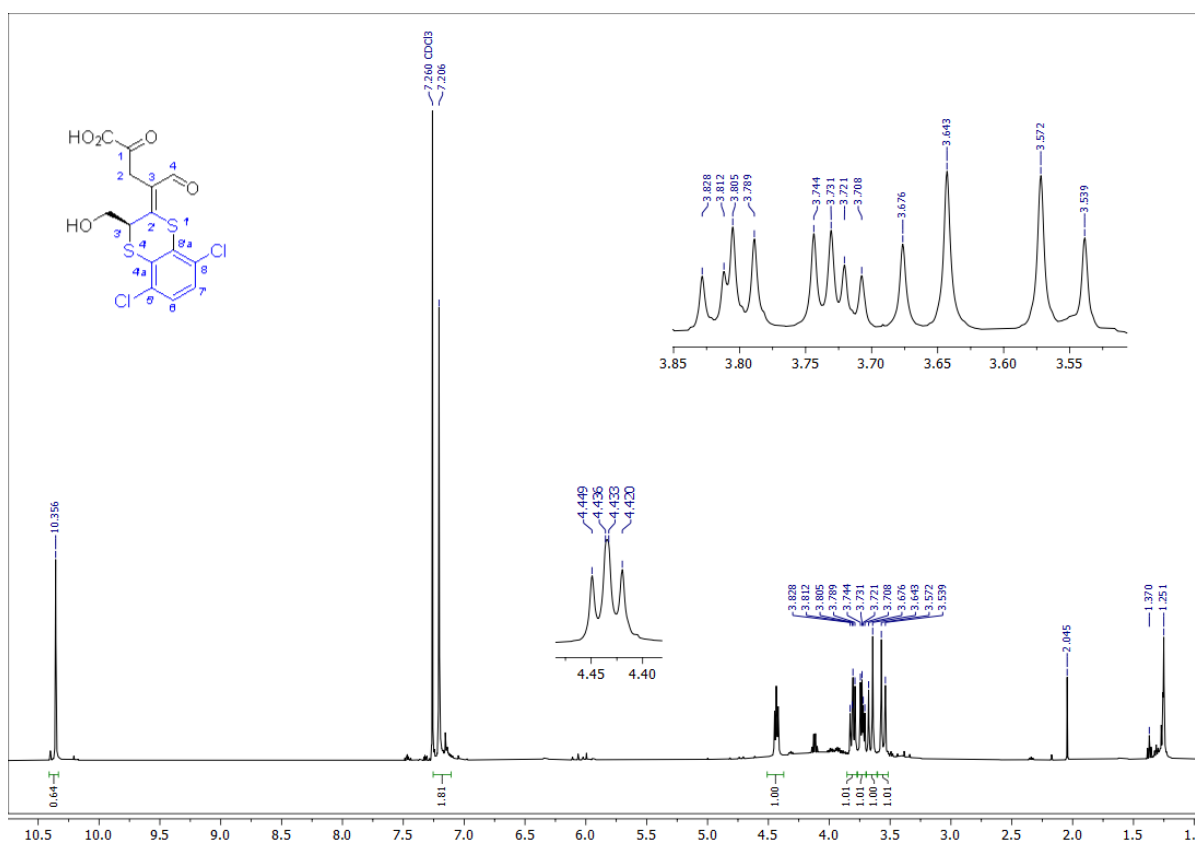
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (75 MHz) of adduct IX in acetone- $\text{d}_6$



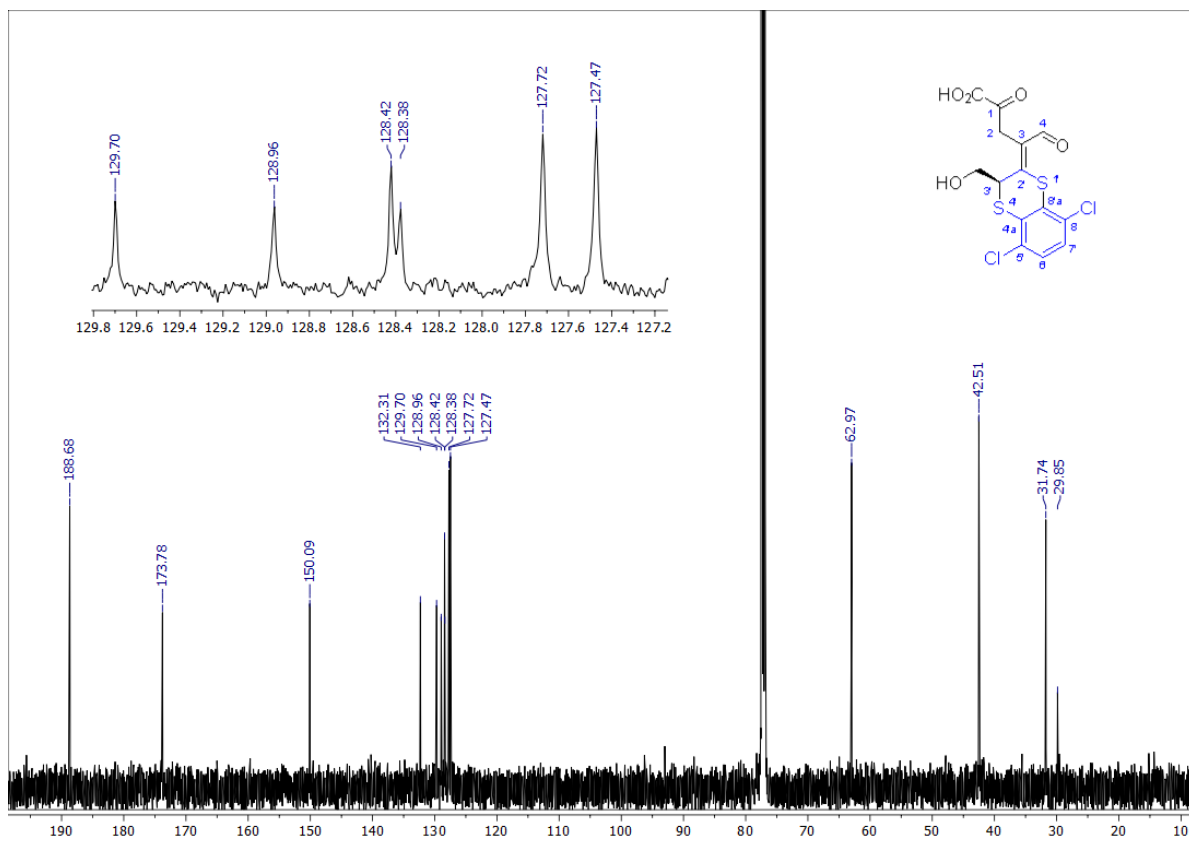
$^1\text{H}$  NMR spectrum (300 MHz) of adduct **X** in acetone- $d_6$  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (75 MHz) of adduct **X** in acetone- $d_6$ 

# ANNEXES

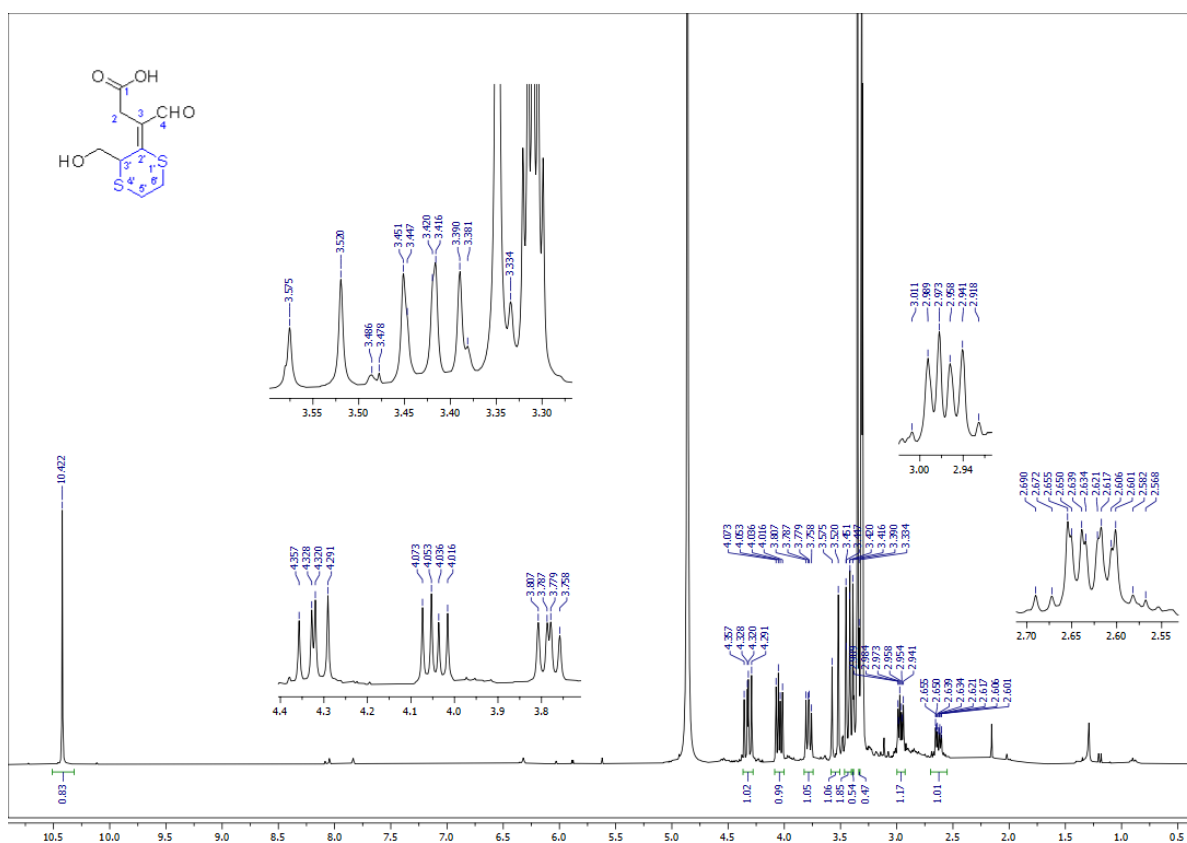
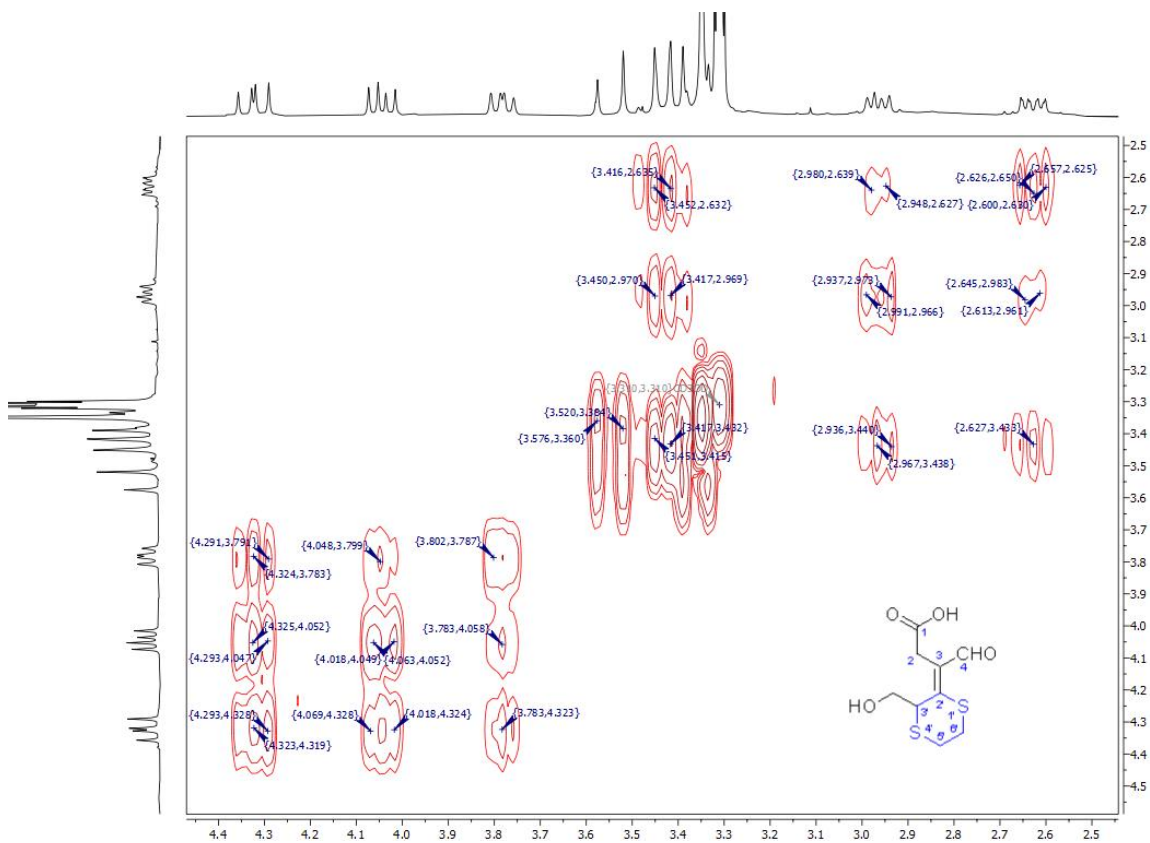
$^1\text{H}$  NMR spectrum (500 MHz) of adduct **XI** in  $\text{CDCl}_3$



$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (126 MHz) of adduct **XI** in  $\text{CDCl}_3$

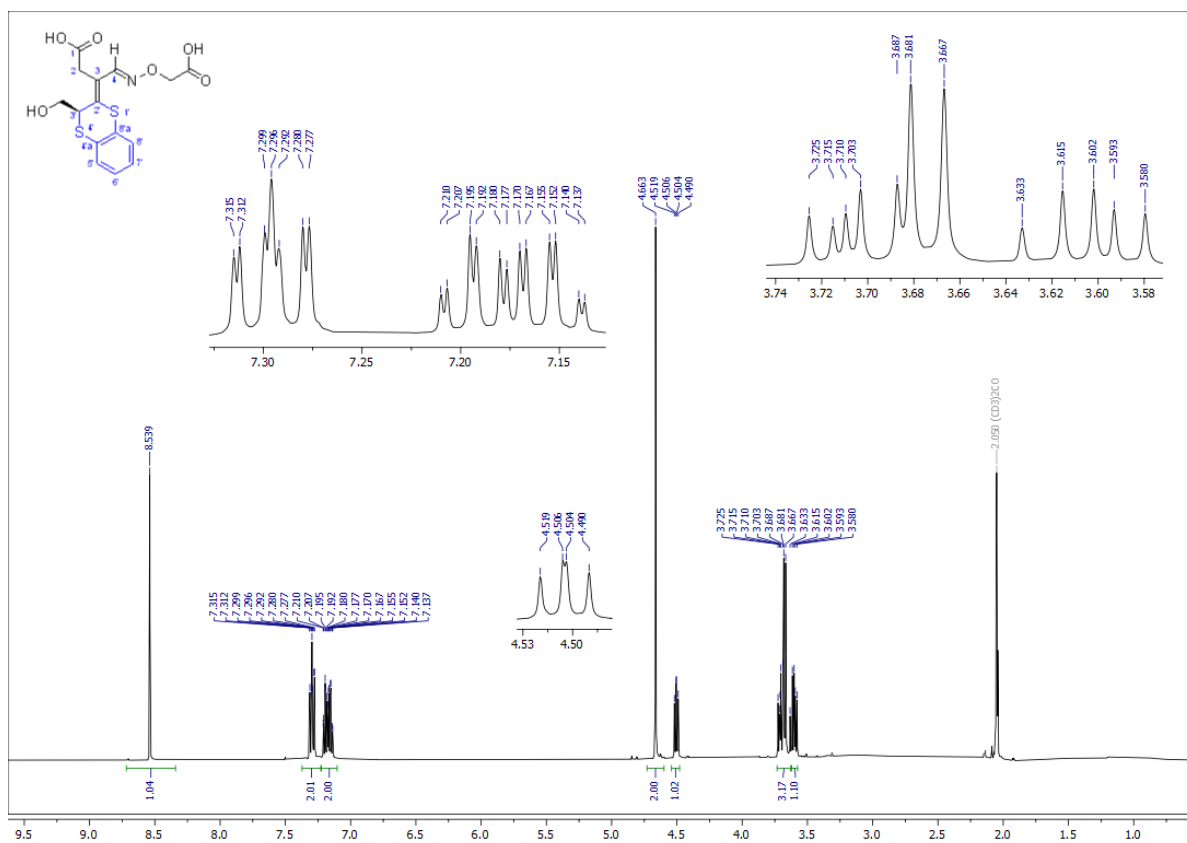




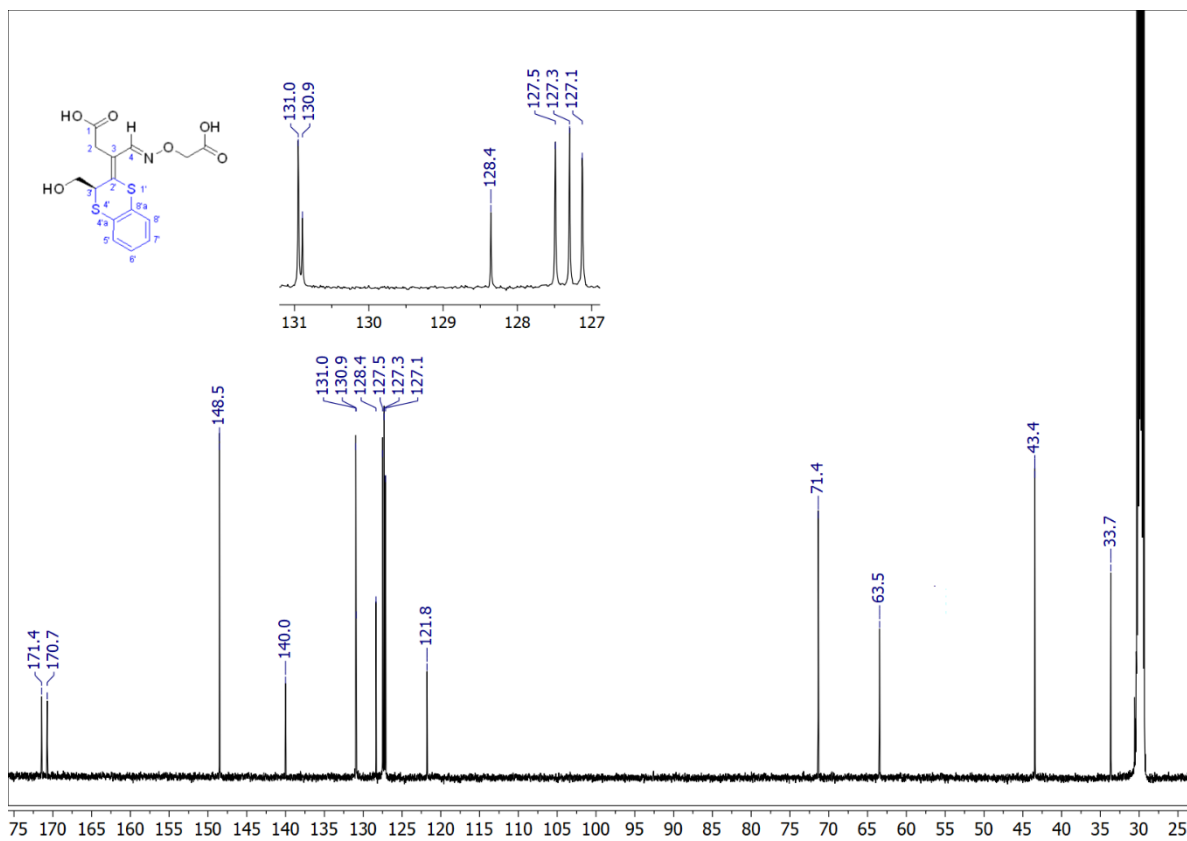
$^1\text{H}$  NMR spectrum (300 MHz) of adduct **XII** in Methanol- $d_4$ 2D COSY spectrum expansion (from 4.5 to 2.5 ppm) of adduct **XII** in Methanol- $d_4$ 

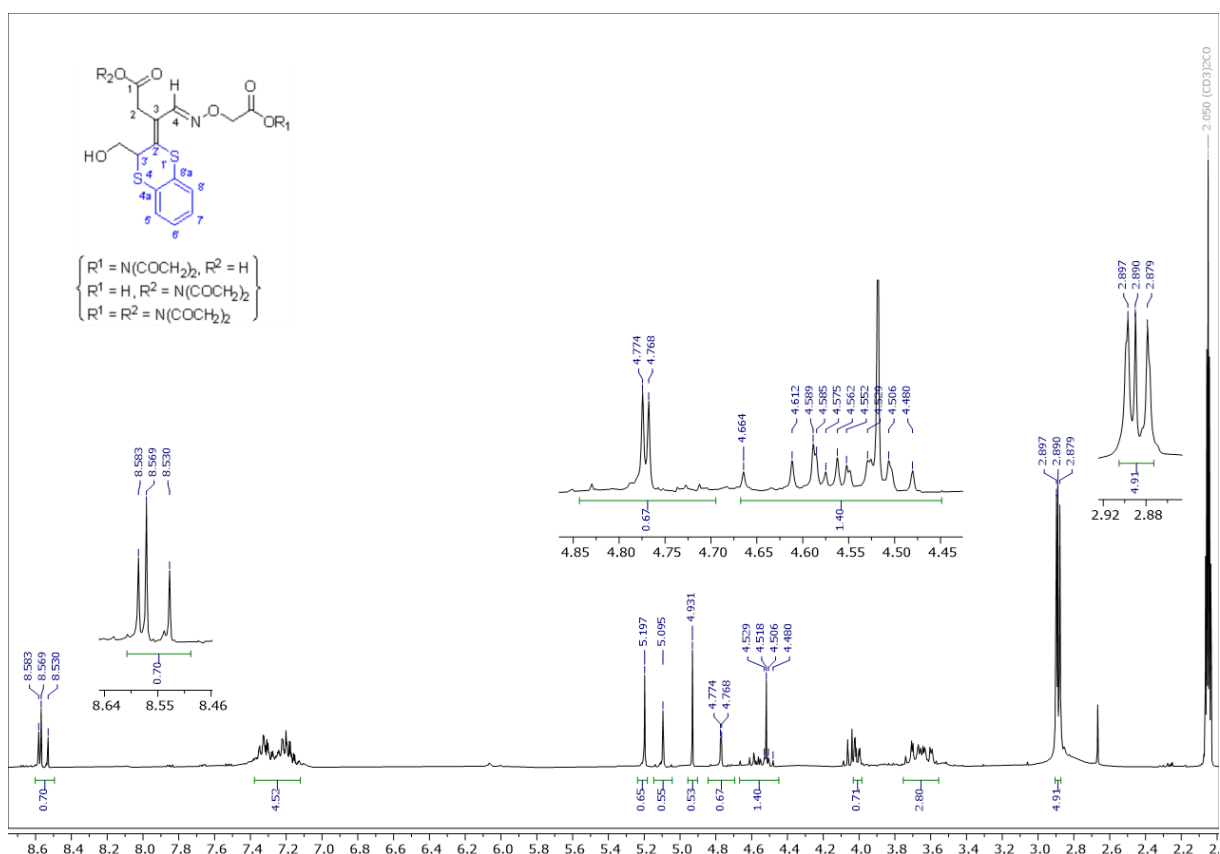
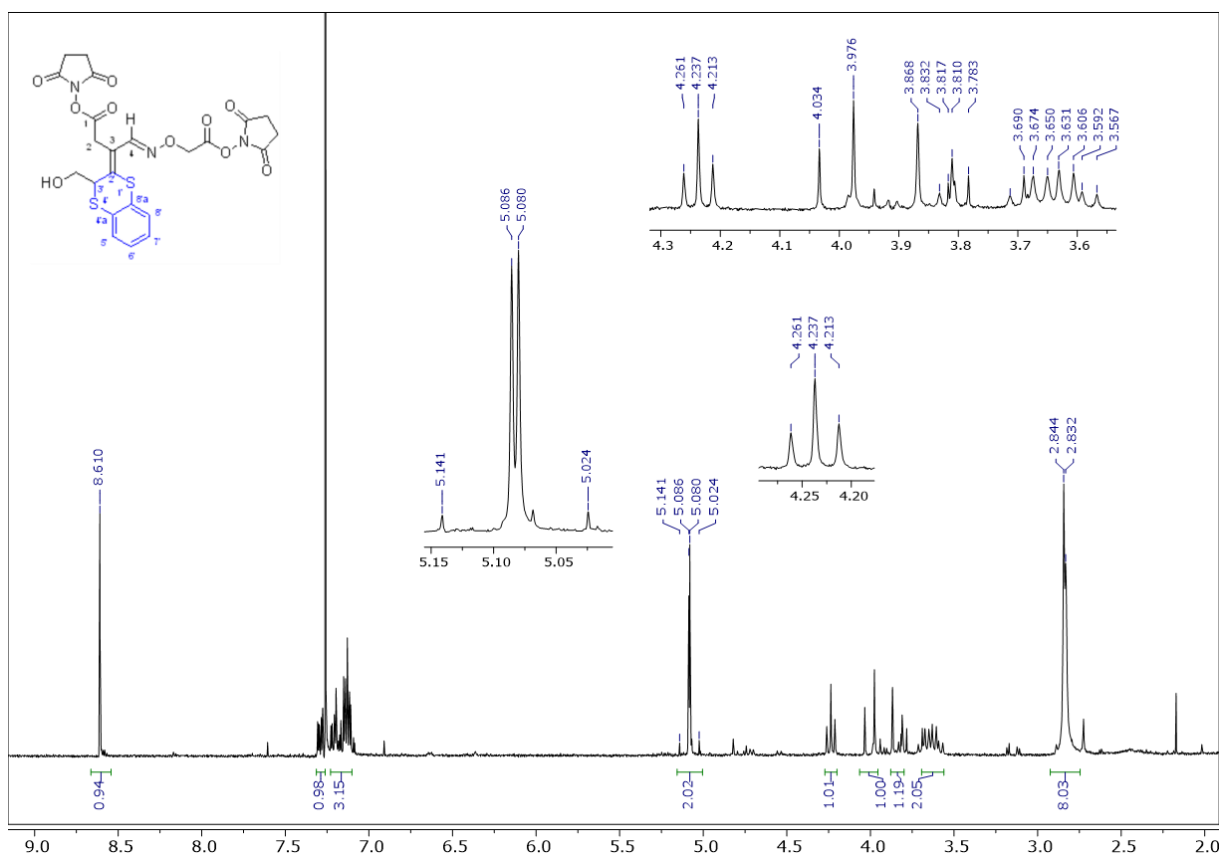
# ANNEXES

$^1\text{H}$  NMR spectrum (500 MHz) of haptin **VIIa** in acetone- $d_6$



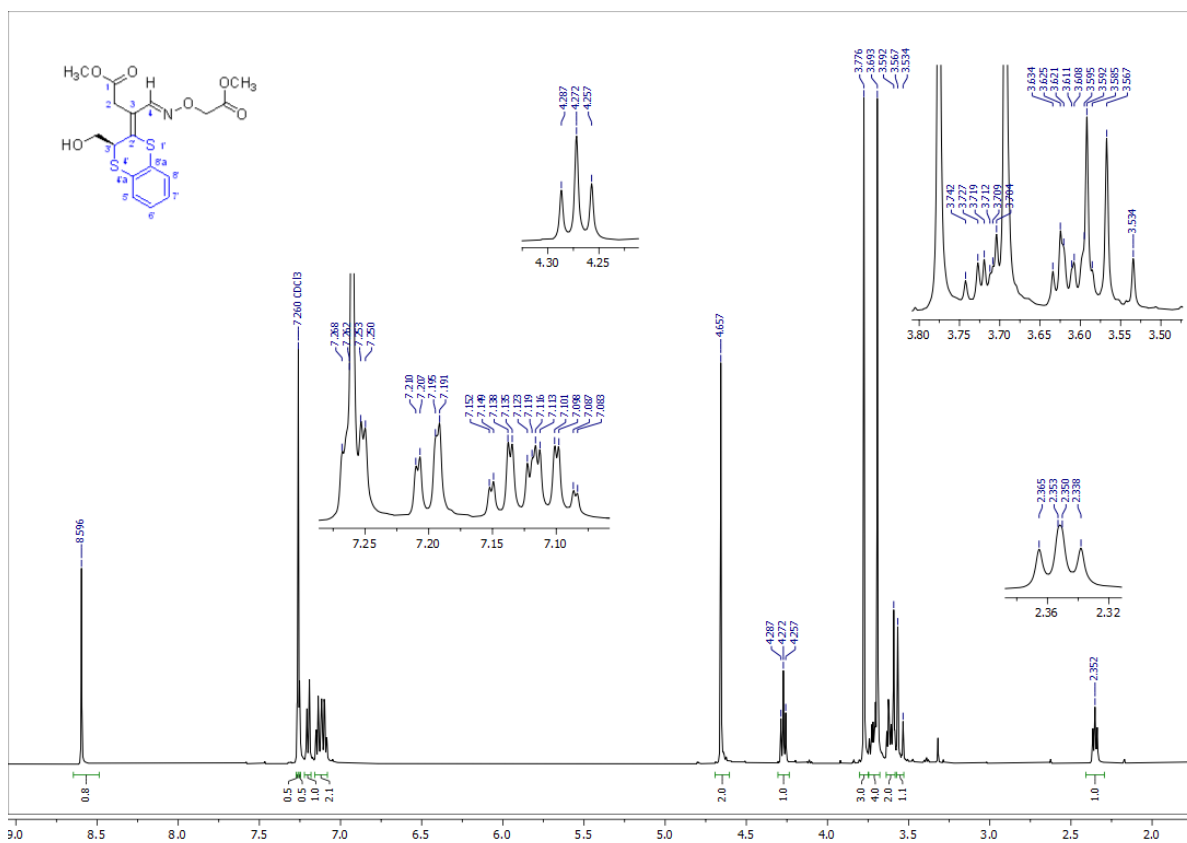
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (126 MHz) of haptin **VIIa** in acetone- $d_6$



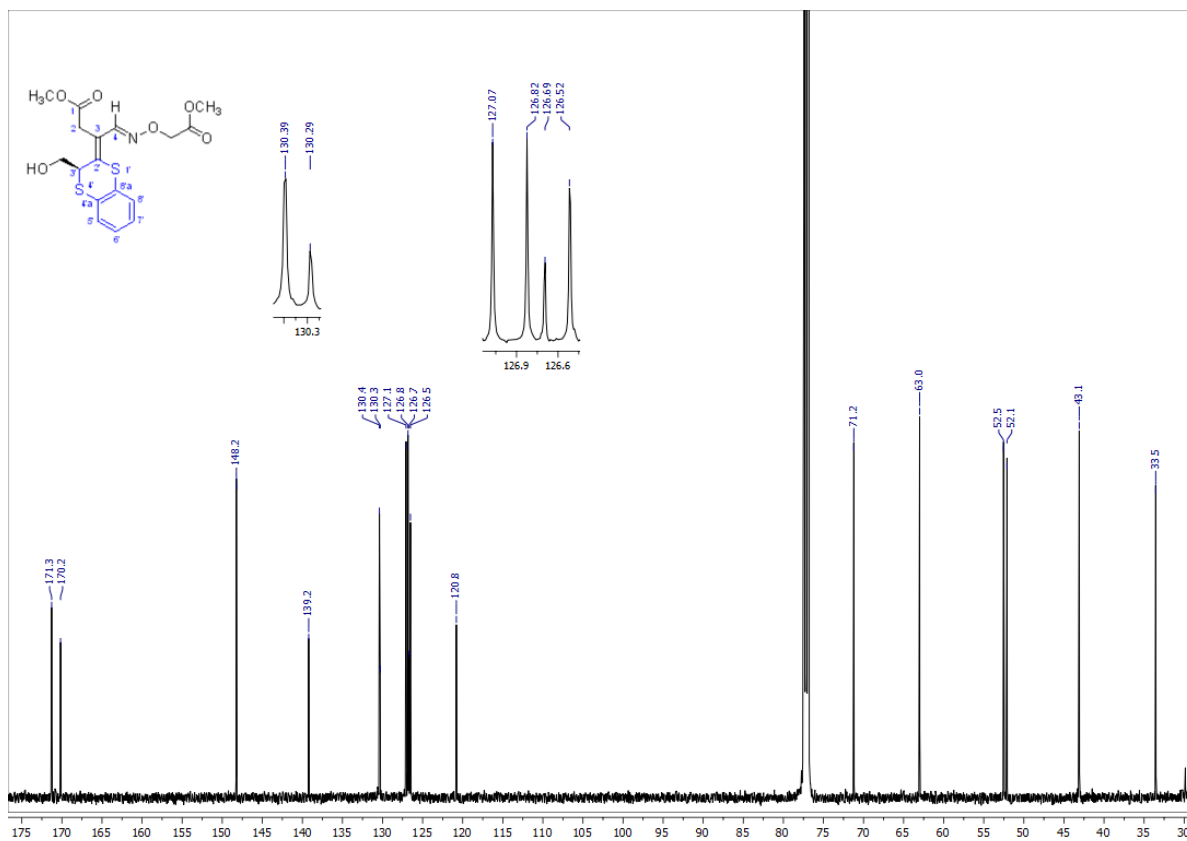
<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of NHS-VIIa ester in acetone-d<sub>6</sub><sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of bis-NHS-VIIa ester in CDCl<sub>3</sub>

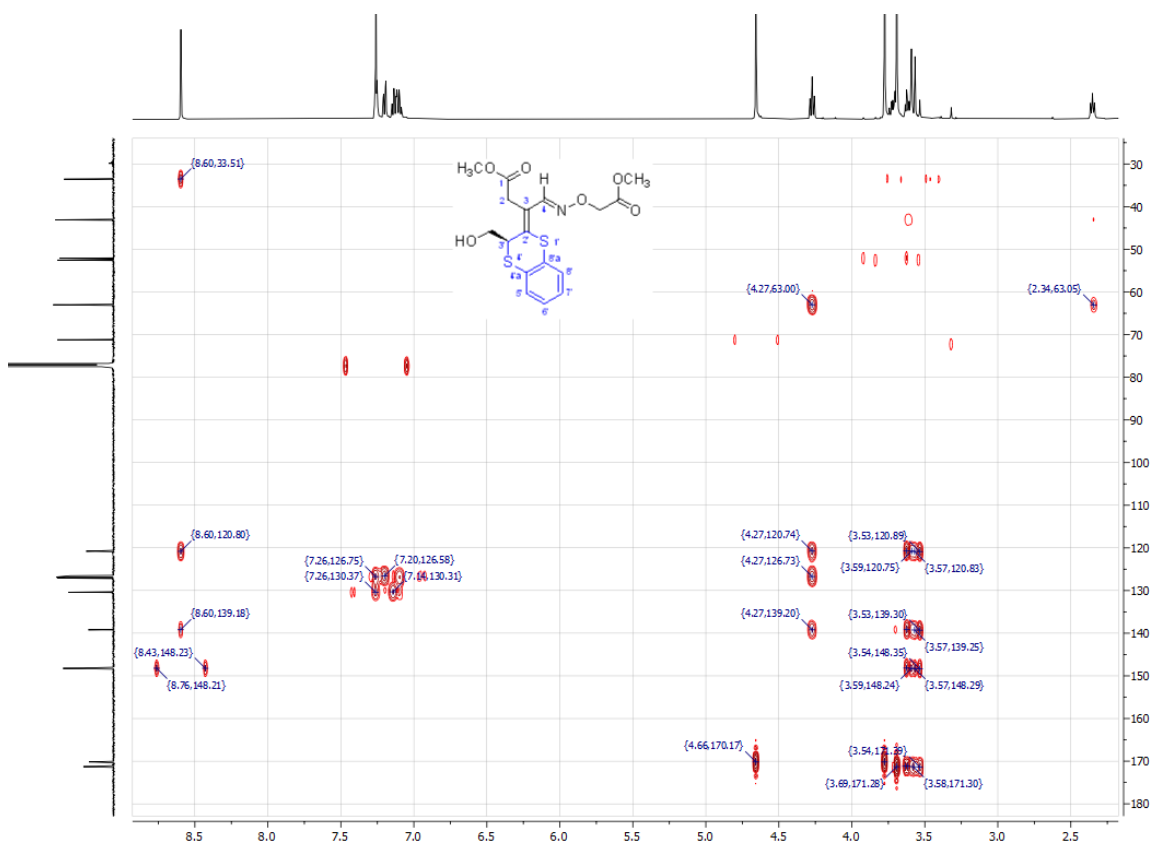
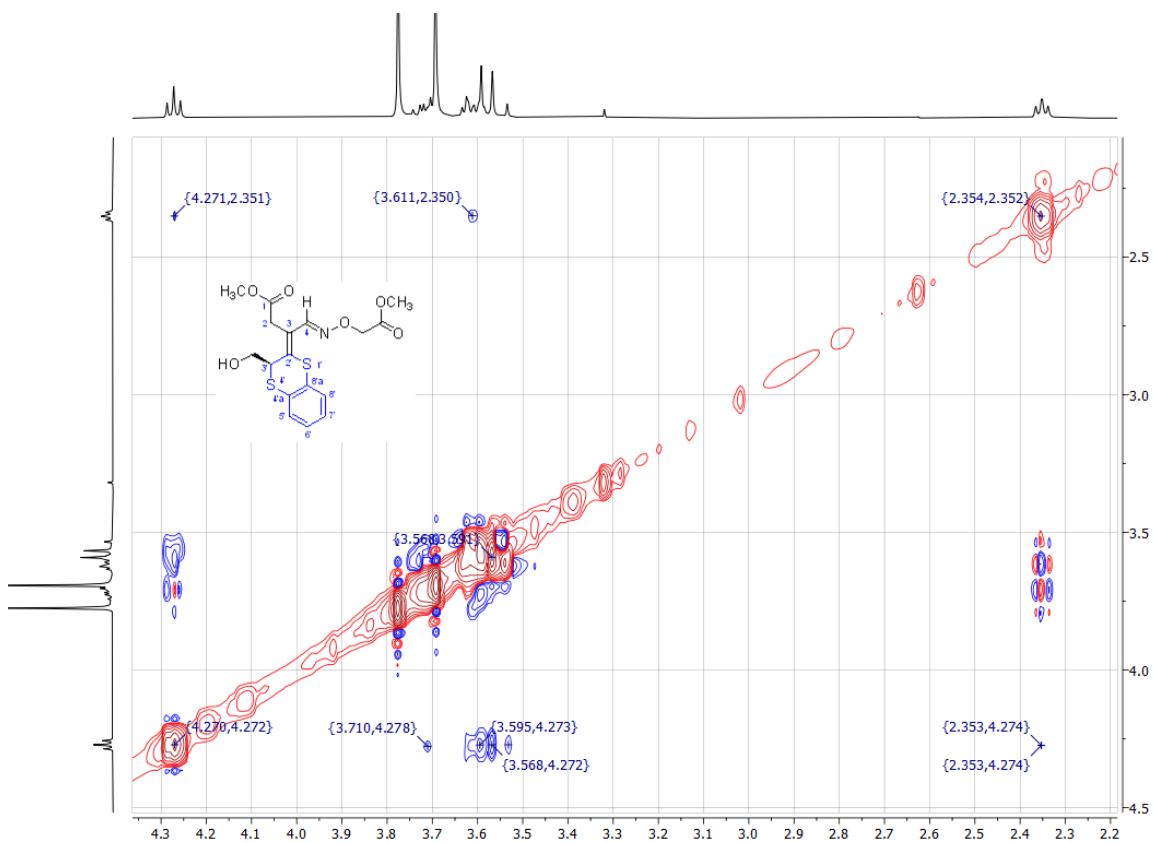
# ANNEXES

$^1\text{H}$  NMR spectrum (500 MHz) of dimethyl ester of hapten **VIIa** in  $\text{CDCl}_3$



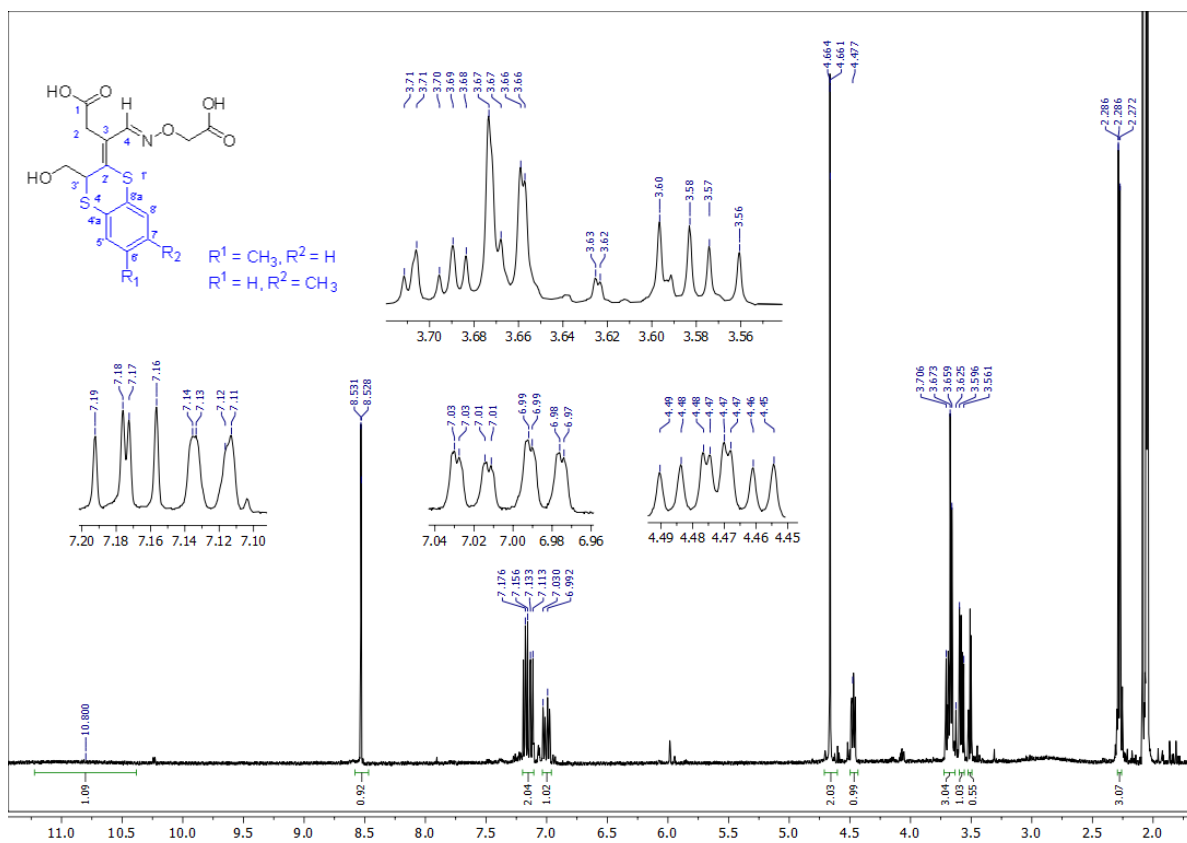
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (126 MHz) of dimethyl ester of hapten **VIIa** in  $\text{CDCl}_3$



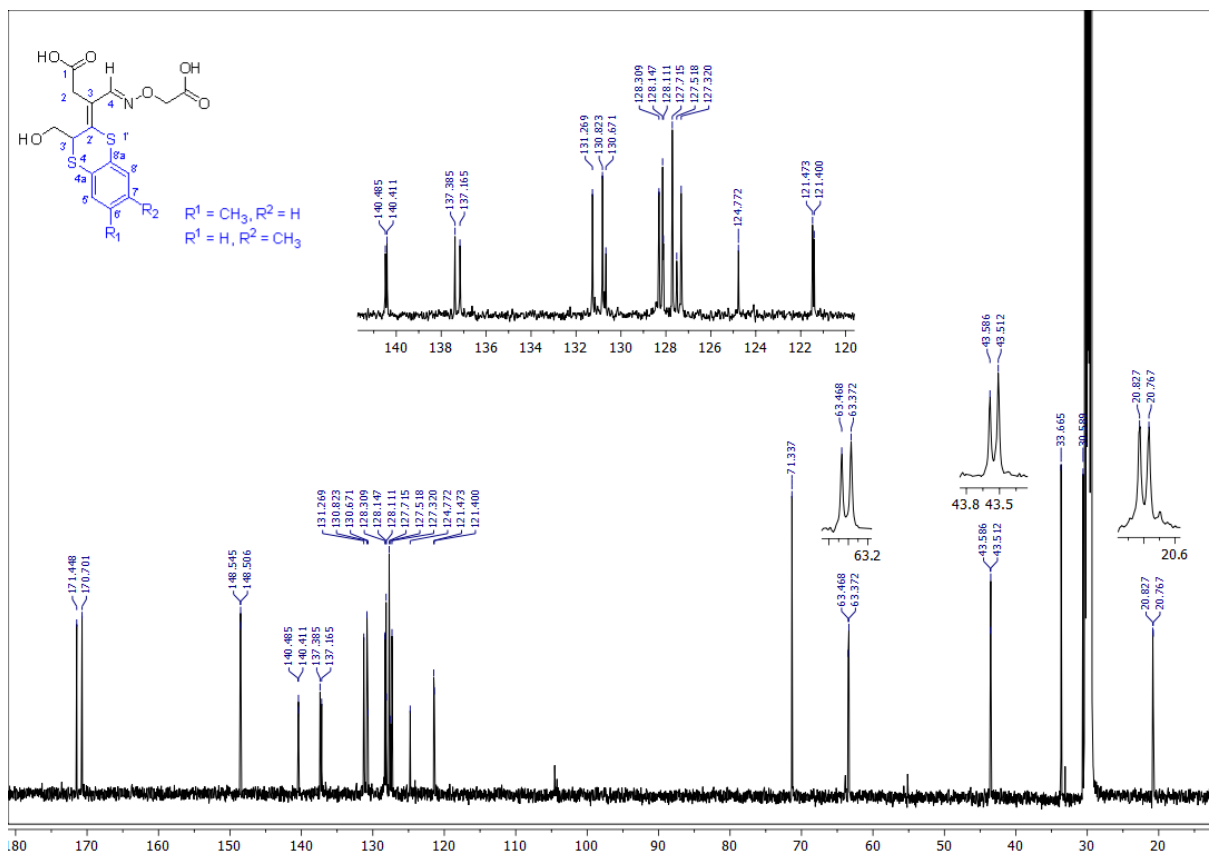
2D HMBC spectrum of methyl ester of hapten **VIIa** in CDCl<sub>3</sub>2D NOESY spectrum of methyl ester of hapten **VIIa** in CDCl<sub>3</sub>

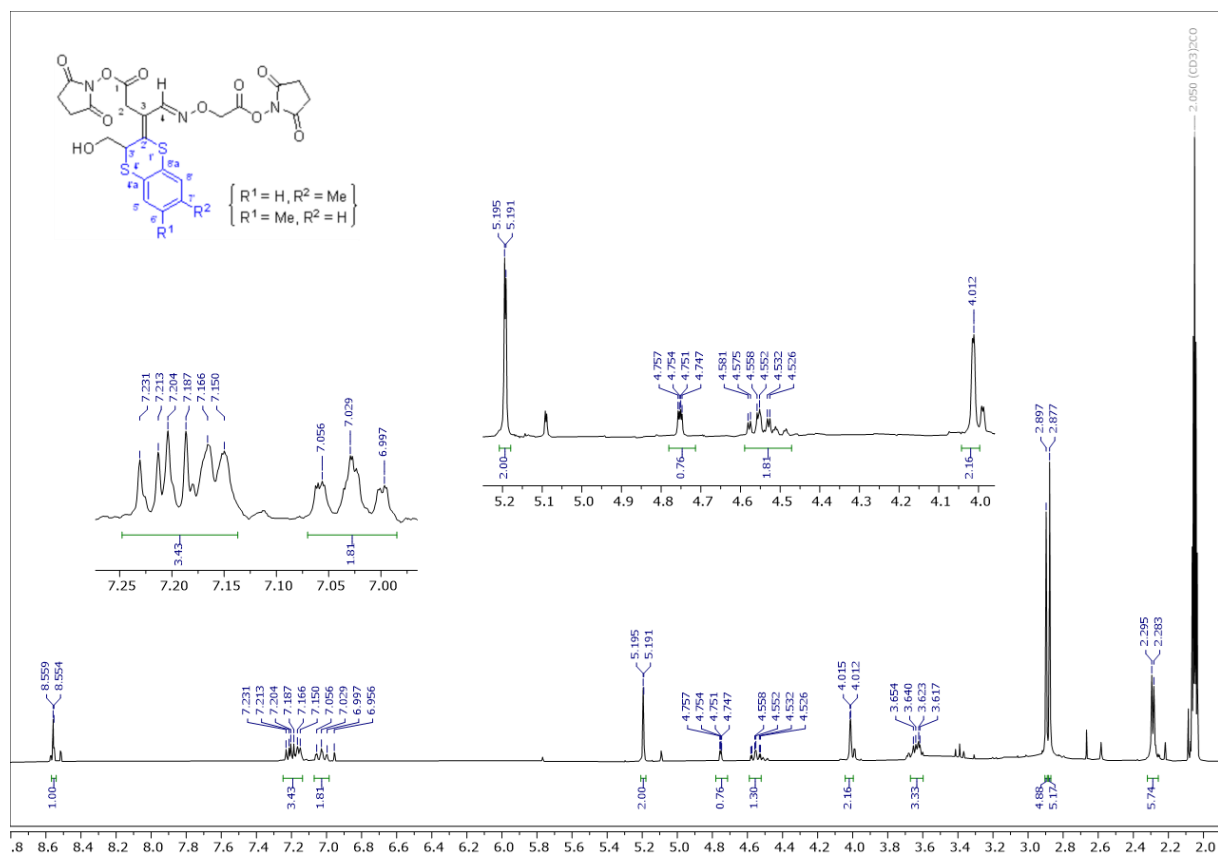
# ANNEXES

<sup>1</sup>H NMR spectrum (500 MHz) of haptén **VIIIa** in acetone-d<sub>6</sub>



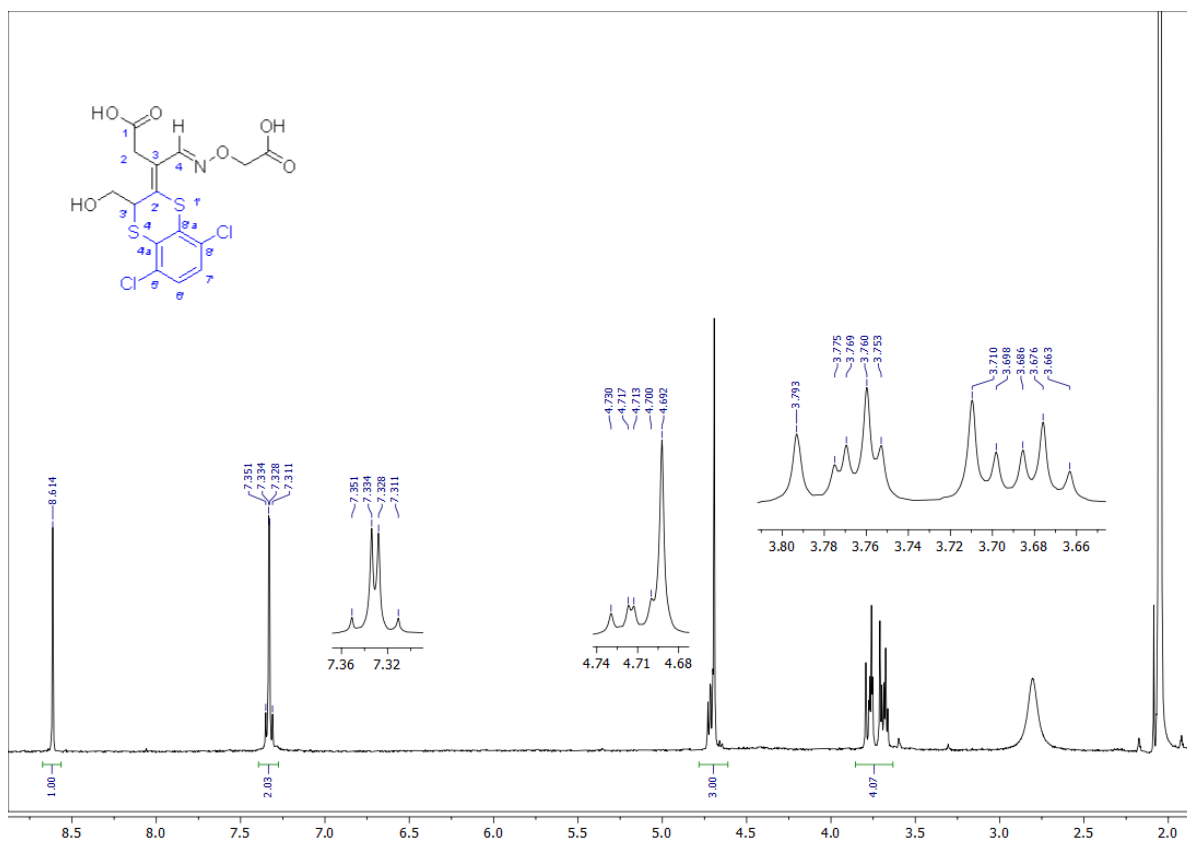
<sup>13</sup>C NMR spectrum (126 MHz) of haptén **VIIIa** in acetone-d<sub>6</sub>



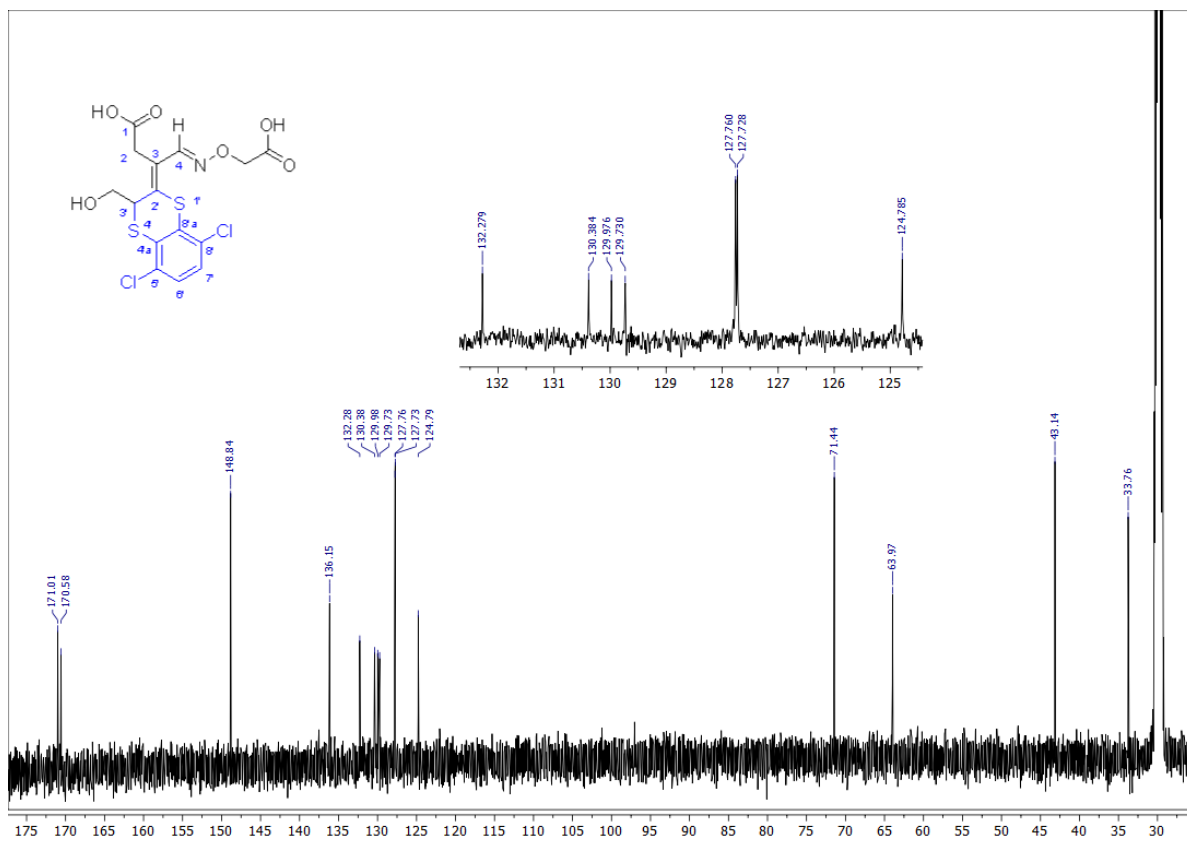
<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of *bis*-NHS–VIIIa ester in acetone-d<sub>6</sub>

# ANNEXES

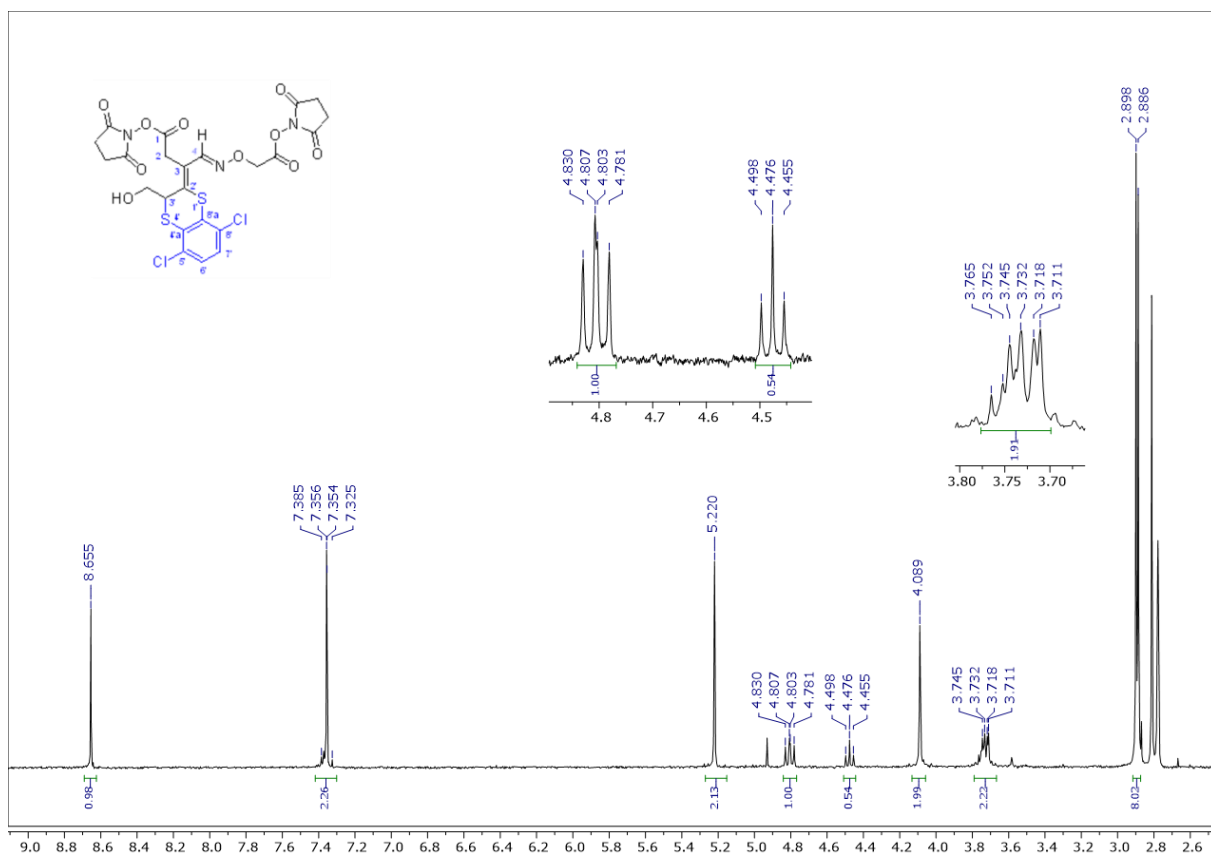
$^1\text{H}$  NMR spectrum (500 MHz) of hapten **XIa** in acetone- $\text{d}_6$



$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (126 MHz) of hapten **XIa** in acetone- $\text{d}_6$

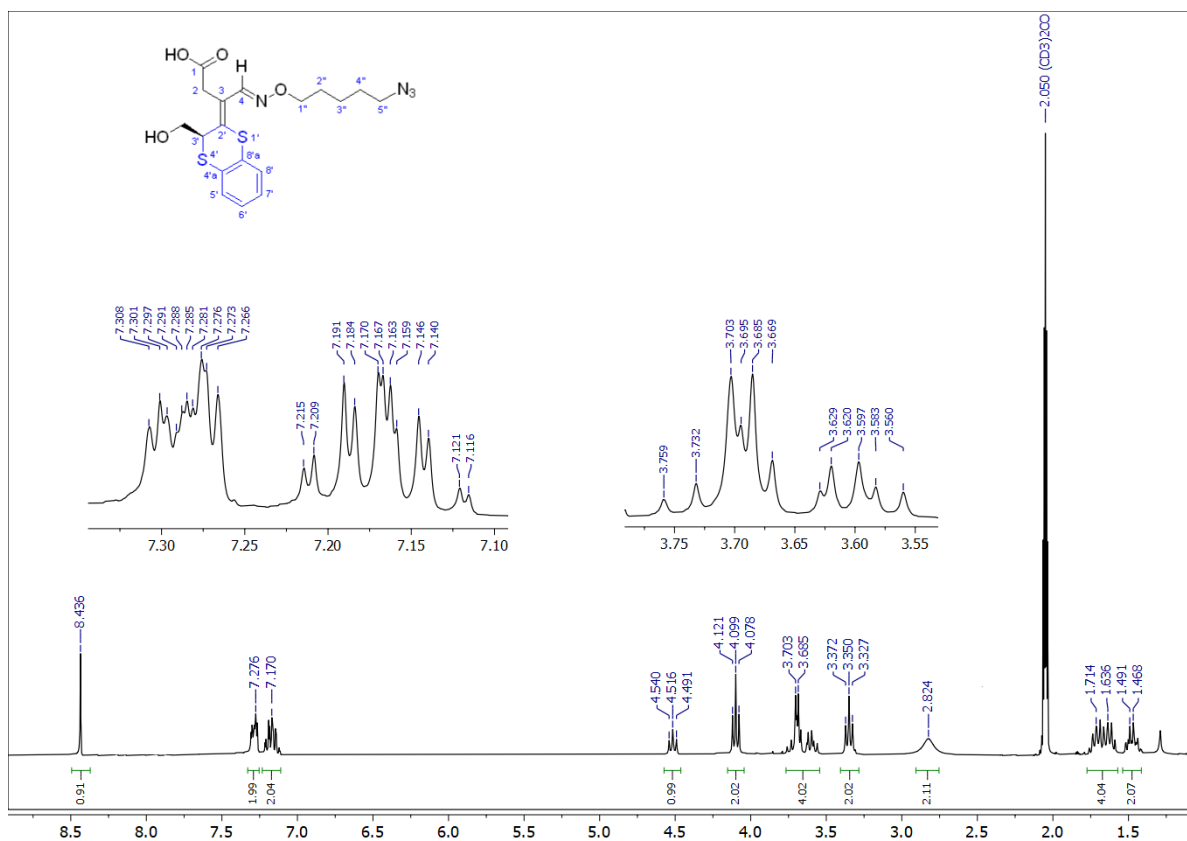




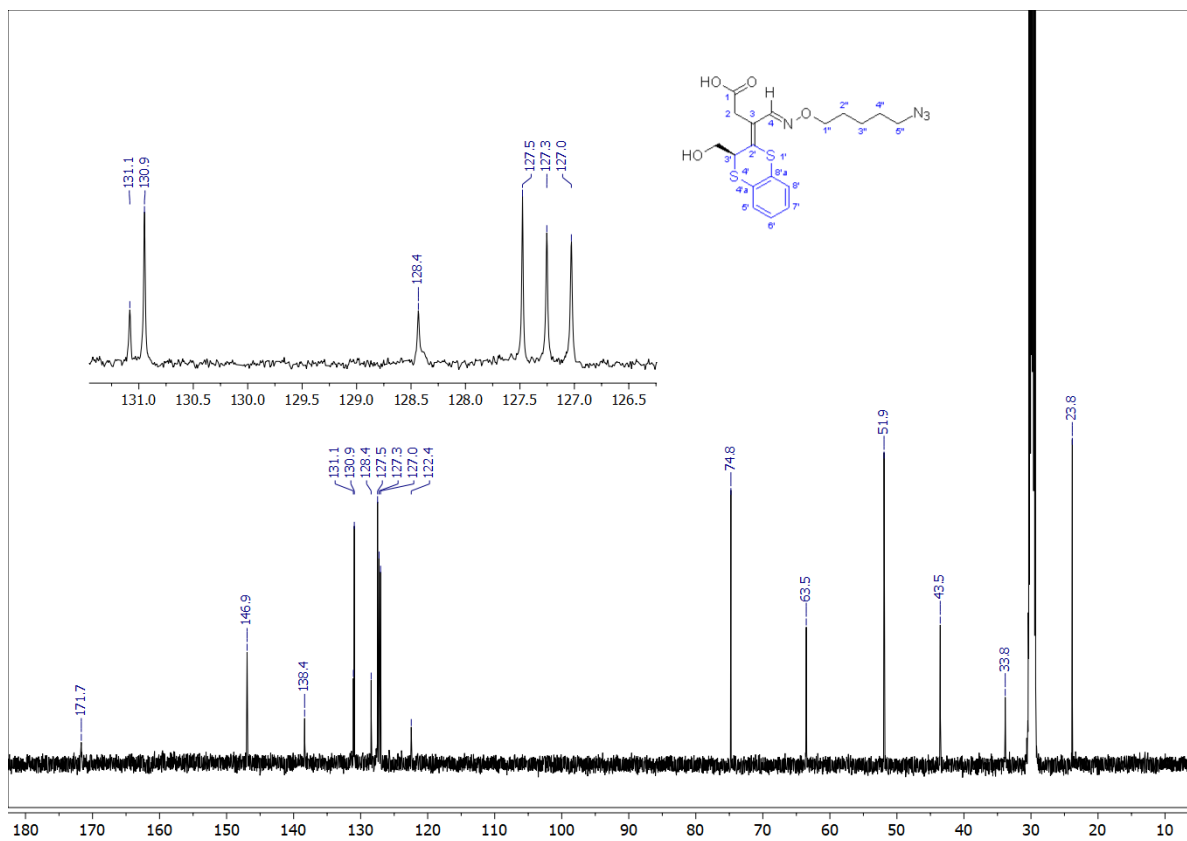
$^1\text{H}$  NMR spectrum (300 MHz) of *bis*-NHS-XIa ester in acetone- $d_6$ 

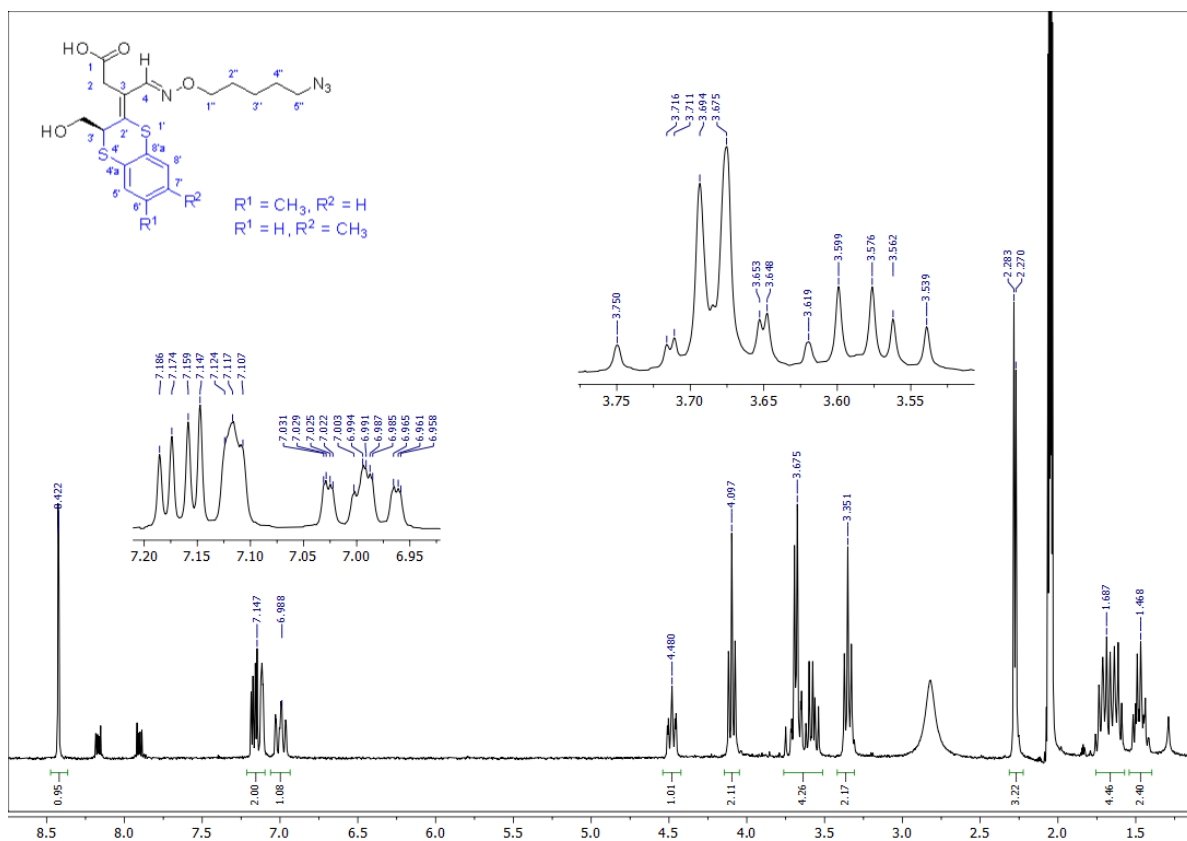
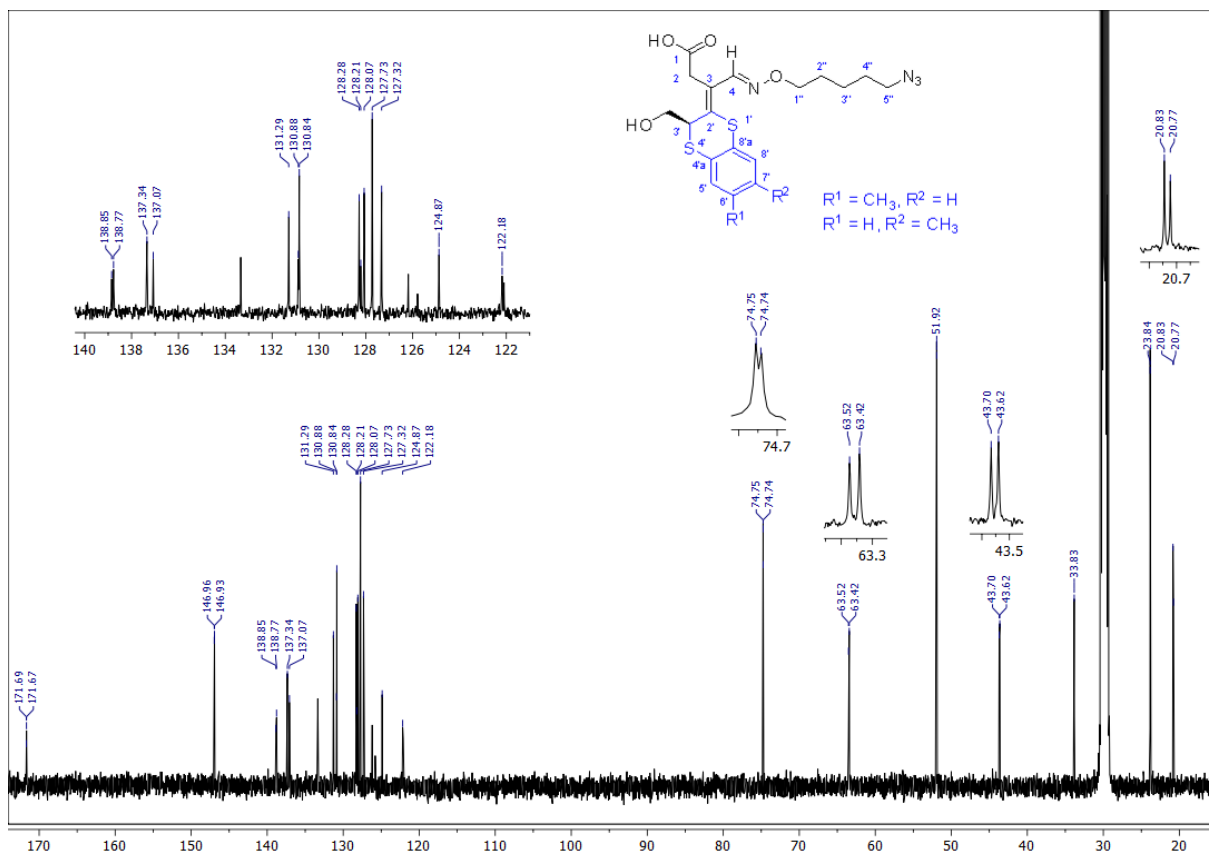
# ANNEXES

<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of hapten **VIIb** in acetone-d<sub>6</sub>



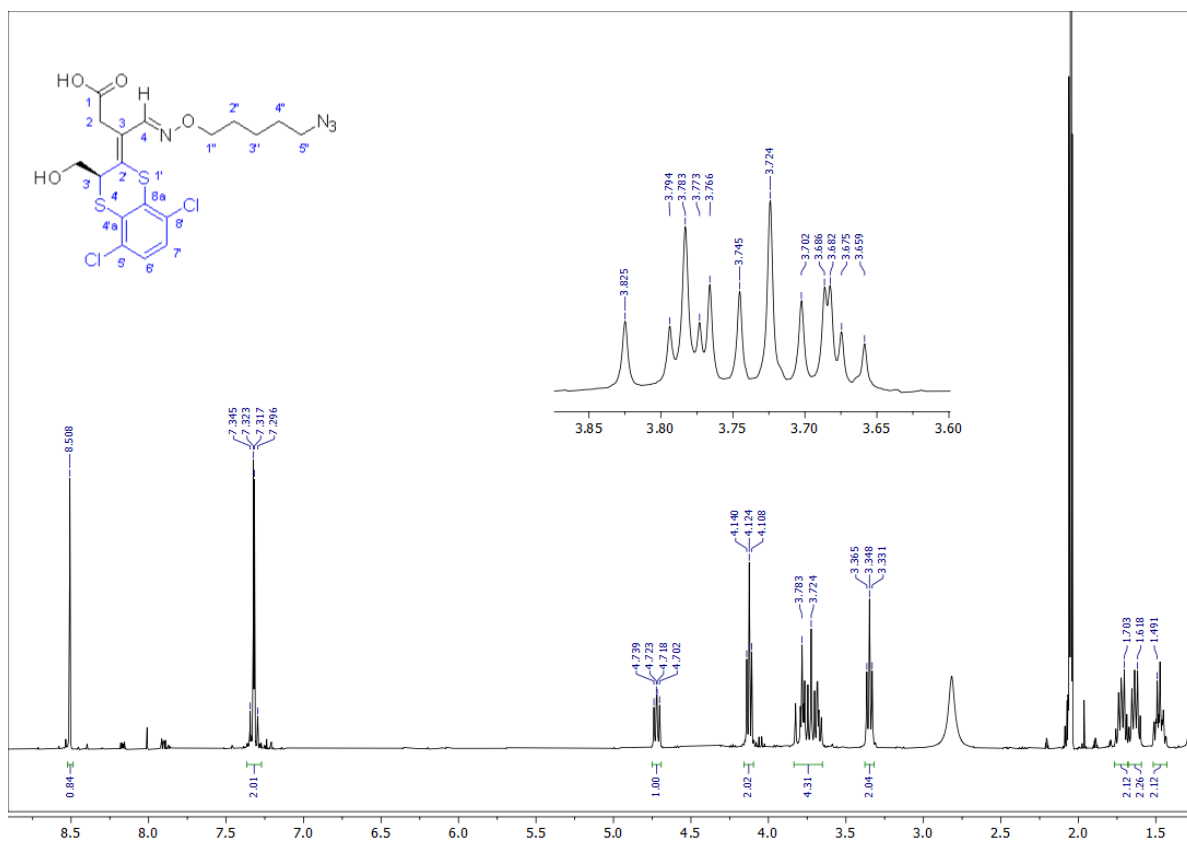
<sup>13</sup>C NMR spectrum (126 MHz) of hapten **VIIb** in acetone-d<sub>6</sub>



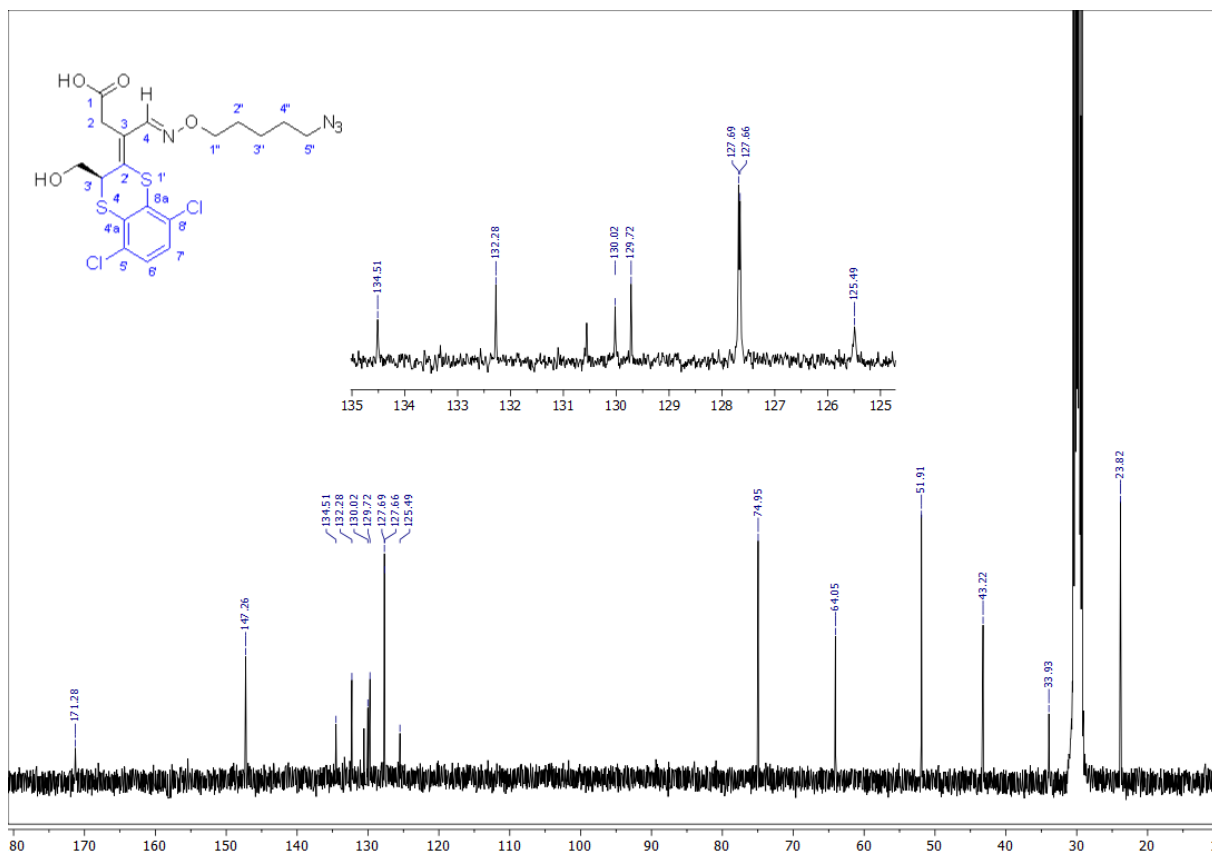
<sup>1</sup>H NMR spectrum (300 MHz) of haptin **VIIIb** in acetone-d<sub>6</sub><sup>13</sup>C NMR spectrum (126 MHz) of haptin **VIIIb** in acetone-d<sub>6</sub>

# ANNEXES

$^1\text{H}$  NMR spectrum (400 MHz) of hapten **XIb** in acetone- $\text{d}_6$



$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (101 MHz) of hapten **XIb** in acetone- $\text{d}_6$



## 7.2 ELISA data

**Tabla 7.1.** Caracterización de los anticuerpos policlonales de conejo mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura.

rAs	HRP-Homólogo			HRP-Pseudohomólogo		
	[rAs] <sup>b</sup>	[HRP] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[rAs]	[HRP]	IC <sub>50</sub>
VIIa#1	3	300	3.8	3	300	3.0
VIIa#2	3	300	6.5	3	300	15.0
VIIb#1	3	300	4.3	3	300	0.7
VIIb#2	3	300	50.5	3	300	18.1
VIIIa#1	3	300	17.9	3	300	6.0
VIIIa#2	3	300	5.0	3	300	3.8
VIIIb#1	3	300	6.4	3	100	48.2
VIIIb#2	3	300	12.1	10	300	>100
XIa#1	10	100	2.7	30	300	2.0
XIa#2	3	100	1.2	30	300	1.9
XIb#1	30	100	1.8	30	100	4.2
XIb#2	10	30	2.8	30	100	10.1

<sup>a</sup> Los valores indicados corresponden a la media de 3 determinaciones independientes. El anticuerpo de captura se empleó a 1 µg/mL. Los valores de la asíntota inferior fueron en todos los casos inferiores a 0.2.

<sup>b</sup> Factor de dilución  $\times 10^{-3}$ . <sup>c</sup> Concentración del trazador expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Valores expresados en nM.

**Tabla 7.2.** Caracterización de los anticuerpos policlonales de conejo mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto.<sup>a</sup>

rAs	OVA-VIIa			OVA-VIIIa			OVA-XIa		
	[rAs] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[rAs]	[OVA]	IC <sub>50</sub>	[rAs]	[OVA]	IC <sub>50</sub>
VIIa#1	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>&gt;100</b>	30	100	>100	30	100	3.3
VIIa#2	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>10.2</b>	100	100	8.7	10	100	8.7
VIIb#1	100	100	9.6	30	100	21.2	30	1000	4.0
VIIb#2	100	100	40.3	30	100	16.4	100	1000	11.3
VIIIa#1	100	100	11.8	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>33.5</b>	100	1000	11.9
VIIIa#2	100	100	6.5	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>4.4</b>	100	1000	12.0
VIIIb#1	100	100	9.0	100	100	8.4	30	1000	>100
VIIIb#2	100	100	6.4	100	100	7.1	100	100	13.7
XIa#1	30	100	0.9	100	1000	1.5	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>3.5</b>
XIa#2	30	100	0.6	100	1000	1.0	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>2.0</b>
XIb#1	30	100	<b>1.3</b>	100	1000	1.1	100	100	5.8
XIb#2	10	100	7.9	30	1000	6.4	100	100	8.1

rAs	OVA-VIIb			OVA-VIIIb			OVA-XIb		
	[rAs] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[rAs]	[OVA]	IC <sub>50</sub>	[rAs]	[OVA]	IC <sub>50</sub>
VIIa#1	100	100	9.4	10	100	>100	100	1000	>100
VIIa#2	100	100	11	30	100	8.1	30	1000	24.3
VIIb#1	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>&gt;100</b>	100	1000	>100	10	100	3.9
VIIb#2	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>&gt;100</b>	30	100	8.9	30	100	17.6
VIIIa#1	100	100	5.7	100	100	5.5	30	1000	12
VIIIa#2	100	100	1.4	100	100	2.2	30	1000	4.2
VIIIb#1	100	100	15.3	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>9.4</b>	30	1000	>100
VIIIb#2	100	100	10.1	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>10.9</b>	10	100	>100
XIa#1	10	100	0.9	30	1000	1.5	30	100	2.2
XIa#2	30	100	0.4	30	1000	1.5	30	100	1.5
XIb#1	100	100	0.9	100	1000	2.3	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>8.7</b>
XIb#2	30	100	11.1	100	1000	5.4	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>13.5</b>

<sup>a</sup> Los valores indicados corresponden a la media de 3 determinaciones independientes. Los valores de  $A_{max}$  estuvieron comprendidos entre 0.7 y 1.5, mientras que los valores de  $A_{min}$  fueron inferiores a 0.2. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. <sup>b</sup> Factor de dilución  $\times 10^{-3}$ . <sup>c</sup> Concentración del conjugado expresado en ng/mL. <sup>d</sup> Valores expresados en nM.

## 7.3 Patent and publications

### **Chemical strategies for triggering the immune response to the mycotoxin patulin.**

Hadyn Duncan, Josep V. Mercader, Consuelo Agulló, Marcos Gil-Sepulcre, Antonio Abad-Somovilla, Antonio Abad-Fuentes. *Scientific Reports*, 2021, 11, 23438.

### **Novel green derivatization strategy coupled to high-resolution mass spectrometry (QTOF-MS) for patulin monitoring in food products.**

Hadyn Duncan, Cristina Juan, Jordi Mañes, Josep V. Mercader, Antonio Abad-Somovilla, Antonio Abad-Fuentes. (Submitted).

### **Bioconjugates and antibodies for immunodetection assisted by derivatization of the mycotoxin patulin.**

Antonio Abad-Fuentes, Josep V. Mercader, Antonio Abad-Somovilla, Consuelo Agulló, Hadyn Duncan. Patent.

Application ES202030133A:

Filed application: 2020-02-07

Publication of ES2849398A1: 2021-08-17

Application granted: 2022-04-06

Publication of ES2849398B2: 2022-04-06

Application PCT/ES2021/070111:

Filed application: 2021-02-17

Publication of WO2021165557A1: 2021-08-26

The patent has been licensed to Eurofins Abraxis Inc. The company intends to extend the patent to at least the USA, Canada and Europe. R-Biopharm Rhone has a license option for the commercialization of immunoaffinity columns.

The commercial launch by Eurofins Abraxis of the ELISA kits for the detection of patulin took place in December 2021.



**Figure 7.3.1.** Commercial ELISA kit launched by Eurofins Abraxis (<https://abraxis.eurofins-technologies.com/home/news/rapid-detection-of-patulin>).





