



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultat de Química

Departamento de Química Orgánica



Departamento de Conservación y
Seguridad Alimentaria

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

Estrategias de funcionalización alternativas de la micotoxina alternariol y desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis rápido de alimentos

Luis Guillermo Addante

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. Josep Vicent Mercader Badia para optar al grado de Doctor en Química.

Valencia, enero de 2023

D. Antonio Abad Somovilla, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia y

D. Josep Vicent Mercader Badia, Científico Titular del Departamento de conservación y seguridad alimentaria del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada **Estrategias de funcionalización alternativas de la micotoxina alternariol y desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis rápido de alimentos**, ha sido realizada bajo su dirección por el graduado en Química **Luis Guillermo Addante** en el Departamento de Química Orgánica (Universidad de Valencia) y en el Departamento 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, enero de 2023.

Fdo. Dr. Antonio Abad Somovilla

Fdo. Dr. Josep V. Mercader Badia

“La verdadera sabiduría es reconocer tu propia ignorancia”

Sócrates

AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis doctoral es siempre un ejemplo de trabajo duro, constancia y perseverancia. Sin embargo, acabarla no es solo el resultado del esfuerzo de la persona que figura en la portada, durante la realización presente trabajo, son muchas las personas que han ayudado, apoyado y estado ahí en los momentos más duros. Sus consejos tanto profesionales como personales han servido de guía en esta travesía y para mí tienen un valor incalculable. Por todo ello, me gustaría en unas pocas líneas expresar mi agradecimiento

Primeramente, me gustaría empezar mis agradecimientos haciendo mención a mis directores de tesis el Dr. Antonio Abad Somovilla y al Dr. Josep Vicent Mercader Badia sin los cuales la realización de esta tesis no habría sido posible. Ambos habéis tenido una paciencia infinita, siempre habéis estado dispuesto a ayudarme, guiarme y explicarme todo de una manera amable y con máxima dedicación. He aprendido con vosotros un sin número de cosas que abarcan desde la manera correcta de desarrollar un trabajo de investigación a cómo enfocar problemas desde puntos de vista diferente hasta encontrar la solución más adecuada. Por todo lo que me llevo y todo lo aprendido, muchísimas gracias.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Consuelo Agulló Blanes, siempre he considerado que soy mejor químico orgánico sintético gracias a ti. Me alegra poder haber compartido contigo cada día en el laboratorio, nos ha enseñado la importancia no solo de realizar una buena síntesis sino también de ser organizado. Al Dr. Antonio Abad Fuentes por preocuparse que siempre dispusiéramos de los medios necesarios en el laboratorio para la realización de los experimentos, por su estar pendiente durante todo el proyecto, su pensamiento crítico y resolutivo sin duda único y, por último, por su paciencia y guía. A todos por haberme permitido formar parte del laboratorio y sobre todo por haber confiado en mí para desarrollar este trabajo.

También quería expresar mi mas sincero agradecimiento a Daniel Suay, Patricia Ruiz y Giovanni Montà que han colaborado en el marco de sus respectivos trabajos de finales de grado (TFG) o máster (TFM) en la parte de síntesis de haptenos. A Leo Musto, Paula

Peña y al Dr. José Gimeno por la ayuda prestada en la caracterización de anticuerpos y desarrollo de inmunoensayo. Y a todo el resto de compañeros de laboratorio, que sin duda cada uno tiene una cualidad que ha hecho única y más amena esta andadura; Daniel, Hadyn, Javier, Eric, Diego, Ana.

En cuarto lugar, a mi familia, a mi padre por ser un ejemplo sobre el valor del trabajo duro y la responsabilidad. A mi madre que nunca dejó de decirme: “si otros han podido, tú también puedes”. A mi “Ma” por siempre haberme cuidado tan desinteresadamente y todo el amor que siempre me ha dado. A Carola, Angelina, Jesús y Elisa siempre dispuestos a hacer cualquier plato de comida como excusa para poder vernos que, aunque no se dieran cuenta me ayudaba a desconectar en los momentos más necesarios. Y a todo el resto, que ha estado ahí de una manera u otra.

A mis amigos Alejandro, Raúl, Manolo, libertad, Marta, Estefanía, Esther (por todas esas cervezas y llamadas de horas siempre que hicieran falta), Carlos (por ser la voz de la experiencia en este capítulo de mi vida) y Jose Antonio (quien me aminó a emprender este camino en primer lugar, creyó en mí y compartió conmigo algunos momentos muy importantes).

Durante estos años he tenido el placer de conocer a gente maravillosa y es por ello que me gustaría agradecer especialmente a Artem y Nikita dos personas que han sido mi punto de apoyo sobre todo en el tramo final. Gracias por vuestra paciencia, cariño y amor que lo dais sin pedir nada a cambio, sinceramente no tengo palabras.

Finalmente, a las instituciones implicadas en el desarrollo de esta tesis doctoral, particularmente al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia y al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) “Centro de Excelencia Severo Ochoa”, y a todo el personal técnico y de apoyo en ambas partes. Esta tesis doctoral es parte del proyecto de I+D+i ref. RTI2018-096121-B-C21/22, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y “FEDER Una manera de hacer Europa”.

RESUMEN

El alternariol es un metabolito secundario producido por hongos del género *Alternaria* que se puede encontrar a concentraciones relativamente altas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en numerosos alimentos de origen vegetal. Debido a su toxicidad, con efectos mutagénicos y carcinogénicos demostrados, está considerado una amenaza emergente para la salud animal y humana. Por estos motivos, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido límites máximos tolerables de ingesta diaria de esta micotoxina y recomienda la realización de más estudios y controles en alimentos, particularmente en aquellos destinados al consumo infantil. En consecuencia, se requieren métodos de análisis que permitan la determinación de alternariol en diferentes tipos de alimentos y entornos analíticos. El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido el desarrollo y validación de ensayos rápidos para la determinación de esta micotoxina en alimentos empleado diferentes métodos inmunoquímicos, como el ensayo competitivo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) y el inmunoensayo de flujo lateral (LFICA), ampliamente utilizados en seguridad alimentaria debido a su simplicidad, bajo coste, portabilidad y alta capacidad de análisis.

La síntesis de derivados hapténicos de alternariol ha constituido la primera y más importante etapa para el desarrollo de nuevos métodos inmunoquímicos con prestaciones superiores, en términos de sensibilidad y selectividad, a los descritos previamente. En primer lugar, se han sintetizado tres haptenos regioisoméricos (*ALa*, *ALb* y *ALm*), con cuyos bioconjugados se han generado anticuerpos policlonales de conejo y monoclonales de ratón con excelente afinidad hacia alternariol. Además, se ha demostrado la relación estructura-función con respecto a la posición del brazo espaciador del hapteno inmunizante y la especificidad de los anticuerpos generados. Con los haptenos *ALb* y *ALm* se han obtenido anticuerpos totalmente específicos de alternariol, mientras que el hapteno *ALa* generó anticuerpos que también reconocían alternariol 9-metil éter con una afinidad similar. Adicionalmente, se han sintetizado tres haptenos heterólogos (*AMEb*, *ALh1* y *ALh2*) para la optimización de los inmunoensayos. A continuación, utilizando las mejores combinaciones anticuerpo/conjugado se han desarrollado inmunoensayos tipo ELISA, en diferentes formatos, y tiras

inmunorreactivas capaces de determinar alternariol a concentraciones subnanomolares. Estos inmunoensayos se han validado para la determinación de alternariol en alimentos. El ELISA competitivo en formato directo es capaz de cuantificar alternariol en zumos de pera y manzana, diluidos en tampón fosfato, a 10 y 30 ng/mL, respectivamente, en tan solo 30 min. Por su parte, los límites de cuantificación, determinados experimentalmente, para analizar alternariol fueron de 1 ng/mL en extractos de harina de avena y trigo sarraceno, y de 10 ng/mL en peras. Además, este inmunoensayo ha sido validado mediante comparación estadística de resultados con un método cromatográfico de referencia utilizando muestras de pera infectadas con *A. alternata* en el laboratorio. Finalmente, la tira inmunorreactiva desarrollada se ha validado para el análisis semicuantitativo de alternariol en zumo de fruta (manzana y pera) y en peras trituradas, siguiendo la normativa europea para métodos de cribado. Este inmunoensayo permite detectar muestras de pera y de zumo de frutas contaminadas con alternariol a concentraciones de 2 y 5 ng/mL, respectivamente, en tan solo 15 min.

ABSTRACT

Alternariol is a secondary metabolite produced by fungi of the genus *Alternaria* that can be found at relatively high concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in many foods of plant origin. Due to its toxicity, with proven mutagenic and carcinogenic effects, it is considered an emerging threat to animal and human health. For these reasons, the European Food Safety Authority (EFSA) has established maximum tolerable daily intake limits for this mycotoxin, and further studies and controls on foodstuffs are recommended, particularly those intended for children's consumption. Consequently, analytical methods are required for the determination of alternariol in different types of food and analytical environments. The objective of this doctoral thesis has been the development and validation of rapid assays for the determination of this mycotoxin in foods using different immunochemical methods, such as the enzyme-linked immunosorbent competitive assay (ELISA) and the lateral flow immunoassay (LFICA), both widely used in food safety due to its simplicity, low cost, portability and high analysis capacity.

The synthesis of hapten derivatives of alternariol has constituted the first and most important stage for the development of new immunochemical methods with superior performance, in terms of sensitivity and selectivity, to those previously described. Firstly, three regioisomeric haptens (*ALa*, *ALb* and *ALm*) have been synthesized, and rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies with excellent affinity towards alternariol have been generated using the corresponding bioconjugates. In addition, the structure–function relationship has been demonstrated with respect to the position of the spacer arm of the immunizing hapten and the specificity of the generated antibodies. Fully specific antibodies have been obtained with haptens *ALb* and *ALm*, whereas the hapten *ALa* generated antibodies that also recognized alternariol 9-methyl ether with similar affinity. Additionally, three heterologous haptens (*AMEb*, *ALh1* and *ALh2*) have been synthesized for immunoassay optimization. Subsequently, ELISA-type immunoassays in different formats and immunostrips capable of determining alternariol at subnanomolar concentrations have been developed using the best antibody/conjugate combinations. These immunoassays have been validated for the determination of alternariol in foodstuffs. The competitive ELISA in direct format is

capable of quantifying alternariol in pear and apple juices, diluted in phosphate buffer, at 10 and 30 ng/mL, respectively, in just 30 min. On the other hand, the experimental limits of quantification for alternariol were 1 ng/mL in oats and buckwheat flour extracts, and 10 ng/mL in pears. Furthermore, this immunoassay has been validated by statistical comparison of results with a reference chromatographic method using *A. alternata*-infected pear samples prepared in the laboratory. Finally, the developed immunostrip has been validated for the semiquantitative analysis of alternariol in fruit juice (apple and pear) and in crushed pears, following the European regulations for screening methods. This immunoassay allows the detection of pear and fruit juice samples contaminated with alternariol at concentrations of 2 and 5 ng/mL, respectively, in just 15 min.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS | 9 |
| RESUMEN | 11 |
| ABSTRACT | 13 |
| ABREVIATURAS | 22 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 25 |
| 1.1. Alternariol..... | 27 |
| 1.1.1. Biosíntesis..... | 29 |
| 1.1.2. Síntesis química de alternariol..... | 30 |
| 1.1.3. Toxicidad de alternariol y metabolismo | 34 |
| 1.1.4. Incidencia y marco legal | 35 |
| 1.2. Análisis de alternariol en alimentos | 36 |
| 1.2.1. Métodos cromatográficos | 37 |
| 1.2.2. Métodos inmunoquímicos..... | 38 |
| 1.2.3. Antecedentes de inmunoensayos para la determinación de alternariol | 39 |
| 1.3. Preparación de inmunorreactivos | 44 |
| 1.3.1. Diseño y síntesis de haptenos..... | 45 |
| 1.3.2. Preparación de conjugados proteicos | 49 |
| 1.3.3. Generación de anticuerpos específicos..... | 51 |
| 1.3.4. Estructura de las inmunoglobulinas | 55 |
| 1.3.5. Tipos de anticuerpos según su modo de generación | 57 |
| 1.3.6. Generación de anticuerpos monoclonales..... | 58 |
| 1.4. Desarrollo de inmunoensayos | 61 |
| 1.4.1. El ELISA competitivo | 62 |
| 1.4.1.1. Formatos de ELISA competitivo..... | 65 |
| 1.4.1.1.1. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta | 65 |
| 1.4.1.1.2. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa | 65 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 1.4.2. | Tiras inmunorreactivas | 69 |
| 1.5. | Optimización de la sensibilidad | 72 |
| 1.6. | Validación analítica del ensayo..... | 74 |
| 2. | OBJETIVOS | 77 |
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 79 |
| 3.1. | Síntesis de haptenos..... | 79 |
| 3.1.1. | Diseño y síntesis de haptenos para alternariol..... | 80 |
| 3.1.1.1. | Síntesis del hapteno AL α y el éster de N-hidroxisuccinimidilo AL α -NHS..... | 83 |
| 3.1.1.2. | Síntesis del hapteno AL b y el éster de N-hidroxisuccinimidilo AL b -NHS..... | 88 |
| 3.1.1.3. | Síntesis del éster de N-hidroxisuccinimidilo AL m -NHS..... | 93 |
| 3.1.1.4. | Síntesis del hapteno heterólogo AL $h1$ y el éster AL $h1$ -NHS | 99 |
| 3.1.1.5. | Síntesis del hapteno AL $h2$ y el éster AL $h2$ -NHS..... | 104 |
| 3.1.1.6. | Síntesis de hapteno AME b y el éster AME b -NHS..... | 105 |
| 3.2. | Conjugación de haptenos activados a proteínas..... | 106 |
| 3.3. | Generación y evaluación de anticuerpos policlonales | 111 |
| 3.3.1. | Estudio de la inmunogenicidad de los conjugados..... | 111 |
| 3.3.2. | Evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales | 112 |
| 3.3.2.1. | Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta | 113 |
| 3.3.2.2. | Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa..... | 114 |
| 3.3.3. | Determinación de la especificidad de los anticuerpos policlonales | 116 |
| 3.3.4. | Uso de conjugados heterólogos | 118 |
| 3.3.4.1. | Evaluación de la sensibilidad de ensayo | 118 |
| 3.3.4.1.1. | Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta | 118 |
| 3.3.4.1.2. | Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa | 119 |
| 3.3.4.2. | Influencia de la heterología sobre la reactividad cruzada | 120 |
| 3.3.5. | Propuesta de inmunoensayo con policlonales para alternariol | 123 |
| 3.4. | Generación y evaluación de anticuerpos monoclonales..... | 124 |
| 3.4.1. | Obtención, cuantificación e isotipación de anticuerpos | 124 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 3.4.2. | Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales | 128 |
| 3.4.2.1. | Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta | 128 |
| 3.4.2.2. | Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa..... | 129 |
| 3.4.3. | Especificidad de los anticuerpos monoclonales | 130 |
| 3.4.4. | Uso de la heterología de hapteno | 133 |
| 3.4.4.1. | Evaluación de la sensibilidad de ensayo | 133 |
| 3.4.4.1.1. | Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta | 134 |
| 3.4.4.1.2. | Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa | 137 |
| 3.4.4.1.3. | Evaluación cinética de anticuerpos en formato directo..... | 140 |
| 3.5. | Caracterización y desarrollo de inmunoensayos | 143 |
| 3.5.1. | Propuesta de inmunoensayos | 143 |
| 3.5.2. | Influencia del pH y la fuerza iónica..... | 144 |
| 3.5.3. | Influencia de la presencia de disolventes..... | 147 |
| 3.5.4. | Características de los inmunoensayos seleccionados | 151 |
| 3.6. | Validación y aplicación de inmunoensayos tipo ELISA competitivo | 153 |
| 3.6.1. | Preparación de las muestras y estudio del efecto matriz | 153 |
| 3.6.2. | Análisis de muestras fortificadas | 156 |
| 3.6.3. | Validación frente a un método analítico de referencia..... | 159 |
| 3.6.3.1. | Obtención de muestras contaminadas con alternariol | 159 |
| 3.6.3.2. | Comparación estadística con un método de referencia..... | 161 |
| 3.7. | Desarrollo de tiras inmunorreactivas | 165 |
| 3.7.1. | Selección de anticuerpos | 166 |
| 3.7.2. | Selección del conjugado competidor | 168 |
| 3.7.3. | Caracterización del conjugado con nanopartículas | 170 |
| 3.7.4. | Influencia de pH y fuerza iónica..... | 172 |
| 3.7.5. | Validación de la tira inmunorreactiva..... | 174 |
| 4. | CONCLUSIONES | 179 |
| 5. | EXPERIMENTAL SECTION..... | 183 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.1. | Reagents, instruments and techniques | 183 |
| 5.1.1. | Synthesis of haptens..... | 183 |
| 5.1.2. | Buffers and solutions | 185 |
| 5.1.3. | Materials for conjugate preparation | 185 |
| 5.1.1. | Materials for antibody production and cell culture | 186 |
| 5.1.4. | Materials for immunoassays | 188 |
| 5.1.5. | Materials for liquid chromatography | 189 |
| 5.2. | Preparation of hapten derivates..... | 189 |
| 5.2.1. | Synthesis of immunizing haptens | 189 |
| 5.2.1.1. | Synthesis of the N-hydroxysuccinimidyl ester of hapten <i>ALa</i> (<i>ALa</i> -NHS ester).... | 189 |
| 5.2.1.2. | Synthesis of the N-hydroxysuccinimidyl ester of hapten <i>ALb</i> (<i>ALb</i> -NHS ester).... | 196 |
| 5.2.1.3. | Synthesis of the N-hydroxysuccinimidyl ester of hapten <i>ALm</i> (<i>ALm</i> -NHS ester) . | 203 |
| 5.2.2. | Synthesis of heterologous haptens | 211 |
| 5.2.2.1. | Synthesis of the N-hydroxysuccinimidyl ester of hapten <i>ALh1</i> (<i>ALh1</i> -NHS ester) | 211 |
| 5.2.2.2. | Synthesis of the N-hydroxysuccinimidyl ester of hapten <i>ALh2</i> (<i>ALh2</i> -NHS ester) | 216 |
| 5.2.2.3. | Synthesis of the N-hydroxysuccinimidyl ester of hapten <i>AMEb</i> (<i>AMEb</i> -NHS ester) | 218 |
| 5.3. | Preparation of protein–hapten conjugates..... | 220 |
| 5.4. | Generation of polyclonal antibodies | 222 |
| 5.5. | Generation of monoclonal antibodies..... | 222 |
| 5.5.1. | Immunisation procedure | 223 |
| 5.5.2. | Hybridoma generation..... | 223 |
| 5.5.3. | Hybridoma selection..... | 224 |
| 5.6. | Cloning and isolation of hybridomas | 224 |
| 5.7. | Production of monoclonal antibodies | 225 |
| 5.8. | Preparation of lateral flow immunoassay components | 225 |
| 5.8.1. | Gold nanoparticle–monoclonal antibody conjugates | 225 |
| 5.8.2. | Immunostrip preparation | 225 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| 5.9. | Competitive immunoassays..... | 226 |
| 5.9.1. | Competitive ELISA..... | 226 |
| 5.9.1.1. | Antibody-coated direct competitive ELISA..... | 226 |
| 5.9.1.2. | Conjugate-coated indirect competitive ELISA | 226 |
| 5.9.2. | Competitive LFICA..... | 227 |
| 5.10. | Data processing | 227 |
| 5.10.1. | ELISA | 228 |
| 5.10.2. | Immunostrip | 228 |
| 5.11. | Immunoassay characterization..... | 228 |
| 5.11.1. | pH and ionic strength evaluation | 228 |
| 5.11.1.1. | ELISA | 229 |
| 5.11.1.2. | Immunostrip..... | 229 |
| 5.11.2. | Solvents..... | 229 |
| 5.12. | Validation of immunoassays..... | 229 |
| 5.12.1. | Sample preparation | 230 |
| 5.12.2. | ELISA | 230 |
| 5.12.2.1. | Matrix effects | 230 |
| 5.12.2.2. | Recovery studies | 230 |
| 5.12.2.3. | Alternariol-contaminated blind samples..... | 231 |
| 5.12.2.3.1. | HPLC analysis..... | 232 |
| 5.12.3. | Immunochromatographic assays..... | 232 |
| 6. | ANEXES | 235 |
| 7. | REFERENCES | 271 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| A ₀ | Absorbancia en ausencia de analito |
| Ab | Anticuerpo |
| Ag | Antígeno |
| A _{max} | Absorbancia máxima de ensayo |
| A _{min} | Absorbancia mínima de ensayo |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| C | Señal de la línea control |
| CE | Comisión Europea |
| EDC | 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida |
| EFSA | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria |
| 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 |
| HATU | Hexafluorofosfato de 3-óxido-(1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio) |
| 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 |
| IC _x | Concentración de analito que inhibe la reacción inmunoquímica en un determinado porcentaje |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IGF | Intercambio de grupo funcional |
| LFICA | Ensayo de inmunocromatografía de flujo lateral |
| LOD | Límite de detección |
| LOQ | Límite de cuantificación |
| T | Señal de la línea test |
| T/C | Relación de señal de línea test y línea control |

| | |
|--------|---|
| m/z | 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 | <i>N</i> -Hidroxisuccinimida |
| NP | Nanopartícula |
| NP–mAb | Conjugado nanopartícula–anticuerpo monoclonal |
| OD | Densidad óptica |
| OPD | <i>o</i> -Fenilendiamina |
| OVA | Ovoalbúmina |
| pAb | Anticuerpo policlonal |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PEG | Polietilenglicol |
| PRPP | Fosforribosil pirofosfato |
| R | Coeficiente de recuperación |
| rAb | Anticuerpo recombinante |
| RAM | Anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón |
| rAs | Antisuero de conejo |
| RC | Reactividad cruzada |
| RGB | <i>Red, Green, Blue</i> |
| RM | Relación molar hapteno/proteína |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| STC | Concentración de cribado |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina |
| TOF | Detector de tiempo de vuelo |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| vLOD | Límite de detección visual |

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos son cualquier sustancia destinada a aportarnos la energía y los nutrientes que necesitamos para la vida, principalmente proteínas, hidratos de carbono, grasas, minerales y vitaminas. La ingesta de dichos alimentos ha de producirse de manera segura, por ello es necesario que estén libres de toxinas o cualquier otro tipo de contaminante tóxico. Estos contaminantes pueden ser generados por contaminación externa o natural, fundamentalmente debido a su deterioro o mal almacenamiento. Las toxinas de origen natural o biotoxinas, pueden clasificarse según el organismo que las produzca en fitotoxinas (plantas), zootoxinas (animales), cianotoxinas (bacterias) o micotoxinas (hongos).

En los últimos años la contaminación por hongos de productos alimentarios y piensos está cobrando una importancia considerable a nivel mundial, ya que la proliferación de mohos en este tipo de materias puede producir metabolitos secundarios que tienen un impacto directo sobre la salud y la economía. Estos metabolitos secundarios son también conocidos como micotoxinas y son producidos por cuatro grandes géneros: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*.¹ Por tanto, es especialmente importante poder detectarlos y así evitar su consumo o eliminarlas, siempre que sea posible. Los efectos perjudiciales asociados a la ingesta de micotoxinas

se pueden observar rápidamente tras su ingesta o bien tras un periodo más largo, como es la aparición de cáncer o inmunodeficiencia. Los efectos producidos a corto o largo plazo varían en función del tipo de micotoxina e incluso pueden estar asociados al efecto acumulativo de algunas de ellas.^{2,3} El análisis de micotoxinas en alimentos comprende un gran número de moléculas de amplia diversidad estructural, generalmente de bajo peso molecular, que presentan un innegable interés analítico, ya que potencialmente representan una amenaza para la salud humana debido a su abundancia como contaminantes en una amplia variedad de distintos alimentos como son los cereales, los frutos secos, la leche, el café, el cacao, las especias o las frutas.¹

Son numerosos los informes de organismos internaciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organisation*), que cifra en torno a un 25% los cultivos alimentarios contaminados por hongos productores de alguna micotoxina,⁴ lo que se traduce en la retirada de toneladas de alimentos contaminados y pérdidas económicas millonarias. Ambos aspectos, el económico y el impacto sobre la salud humana, y también animal, ha promovido un incremento de la preocupación social y científica que busca desarrollar técnicas cada vez más eficaces para su determinación.⁵

De los varios cientos de micotoxinas diferentes identificadas y estructuralmente caracterizadas,⁶ la OMS (Organización Mundial de la Salud) ha identificado como más importantes las aflatoxinas (principalmente aflatoxinas B₁ y M₁), la ocratoxina A, la patulina, las fumonisinas, la zearalenona, los tricotecenos (sobre todo deoxinivalenol y las toxinas T-2 y HT-2), los alcaloides ergóticos, la citrinina y el alternariol, para la mayoría de las cuales se han establecido Límites Máximos Permitidos (LMP) por parte de los organismos reguladores de cada región o país (Figura 1).^{7,8} Estos niveles suelen ser muy bajos, si bien dependen de la toxicidad de cada micotoxina, y van desde 0.05 µg/kg para aflatoxina M₁ hasta 4000 µg/kg para fumonisinas.

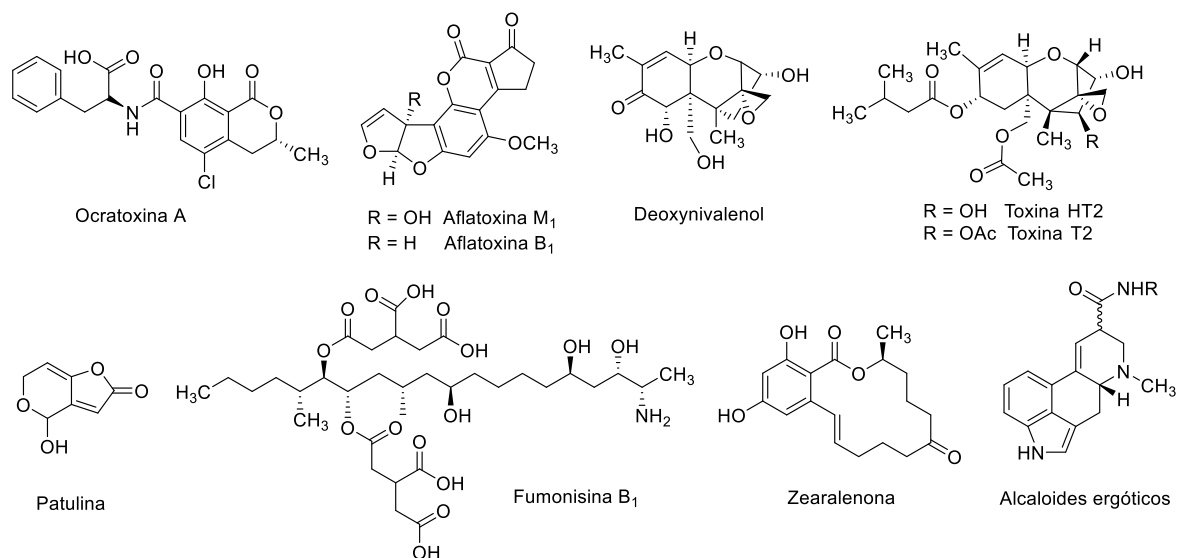


Figura 1. Estructura de las principales toxinas para las cuales existen límites máximos regulados

1.1. Alternariol

El término «micotoxina» fue acuñado por primera vez en 1962 en una crisis veterinaria acontecida en Londres (Inglaterra), relacionada con la muerte de aproximadamente 100.000 paveznos. Esta muerte masiva fue asociada a la contaminación de los piensos con los que se nutría a estos pavos con metabolitos derivados del *Aspergillus flavus*, en concreto las aflatoxinas. Esto llevó a los científicos a pensar que podrían existir otra serie de metabolitos secundarios que pudieran ser altamente tóxicos. De esta manera se comenzaron a englobar en esta categoría otros metabolitos previamente conocidos como «toxinas fúngicas», así como compuestos considerados antibióticos (por ejemplo, la patulina) y otra amplia variedad de metabolitos como el alternariol.⁹

Datos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*)¹⁰ indican que *Alternaria* es el género fúngico más común de la división *Ascomycota*, el grupo taxonómico más grande del reino *Fungi*. Se han llegado a identificar más de 300 especies de estos «mohos negros» como los causantes de importantes enfermedades en plantas. La amplia mayoría de especies del género *Alternaria* (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, etc.) son capaces de producir micotoxinas catalogadas actualmente como emergentes. Dado que la toxicidad de

muchas micotoxinas emergentes no es bien conocida, o no son tóxicas o en su defecto son menos tóxicas para los consumidores, su impacto para la seguridad alimentaria no se aborda adecuadamente. Y a pesar de la alta prevalencia, la determinación y las regulaciones legislativas de las mismas se encuentran muy limitadas. De entre las micotoxinas más relevantes producidas por hongos del género *Alternaria* cabe destacar fundamentalmente alternariol y, en menor medida, alternariol 9-metil éter y altenueno (Figura 2).

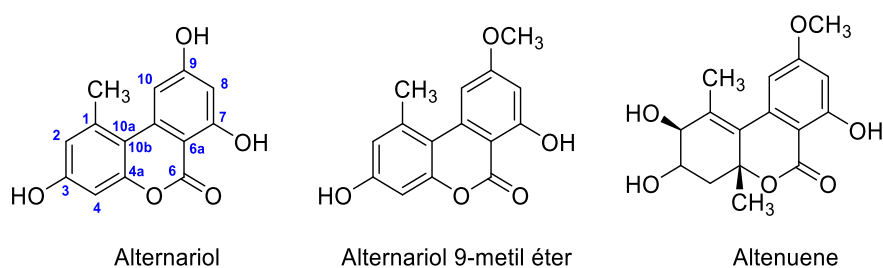


Figura 2. Principales metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Alternaria*.

El alternariol representa la principal micotoxina generada por hongos del genero *Alternaria*, en particular la especie *Alternaria alternata* (Figura 3). Atendiendo a su estructura química, el alternariol se clasifica dentro del grupo de las dibenzo- α -pironas. Formalmente puede considerarse una lactona derivada del ácido resorcílico (ácido 2,4-dihidroxibenzoico) y posee un esqueleto de benzo[c]cumarina o benzo[c]cromen-6-ona [3,7,9-trihidroxi-1-metil-6H-benzo[c]cromen-6-ona]. Se trata de un sólido de color blanquecino a temperatura ambiente, con un punto de fusión de 350 °C (cristalizado de etanol), soluble en la mayoría de disolventes orgánicos polares. Presenta fluorescencia de color azul-violeta,¹¹ característica del esqueleto de dibenzo- α -pirona. Fue aislado por primera vez por Raistrick *et al.* en 1953,^{12,13} tratándose de una de las primeras dibenzo- α -pironas de origen fúngico documentadas.



Figura 3. Mancha foliar de la hoja de brócoli producida por *Alternaria alternata* en Bangladsh. (Autoría de imagen: Nira S.T., Hossain M.F., Mahmud N.U., Hassan O., Islam T., Akanda A.M. (2022): *Alternaria* leaf spot of broccoli caused by *Alternaria alternata* in Bangladesh. *Plant Protect. Sci.*, 58: 49–56).

1.1.1. Biosíntesis

La biosíntesis de alternariol, y otros metabolitos análogos estructurales, se ha relacionado con la ruta biosintética de policétidos, que es una vía común para la formación de muchos metabolitos secundarios fúngicos, de forma que el alternariol se biosintetizaría a través de condensaciones tipo Claisen implicando una molécula de acetil coenzima-A y seis moléculas de malonil coenzima-A (Figura 4).^{14,15}

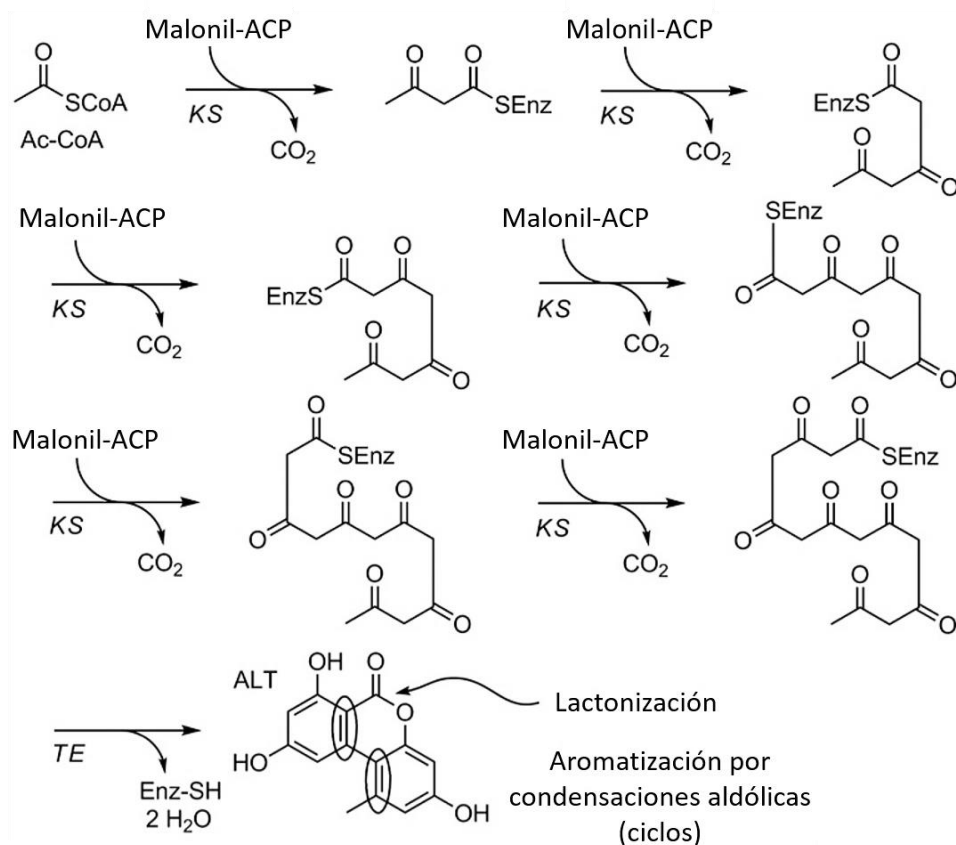


Figura 4. Biosíntesis de alternariol vía el policétido ácido 3,5,7,9,11,13-hexaoxotridecanoico. (ACP: proteína transportadora de acilo; KS: β -cetoacil sintasa; TE: tioesterasa).

La biosíntesis de alternariol comienza con acetil-CoA y consta de seis condensaciones de Claisen, en cada una de las cuales se integra malonato activado con pérdida concomitante de carbonato. Estas condensaciones estarían catalizadas por solo dos dominios de cetosintasa. La aromatización que conduce al producto natural final es posible antes o después de la liberación del complejo enzimático catalizada por una tioesterasa. La lactonización es posible junto con la liberación o inmediatamente después. Ambos pasos, aromatización y lactonización, son probablemente reacciones espontáneas sin la necesidad de ningún apoyo enzimático.¹⁶

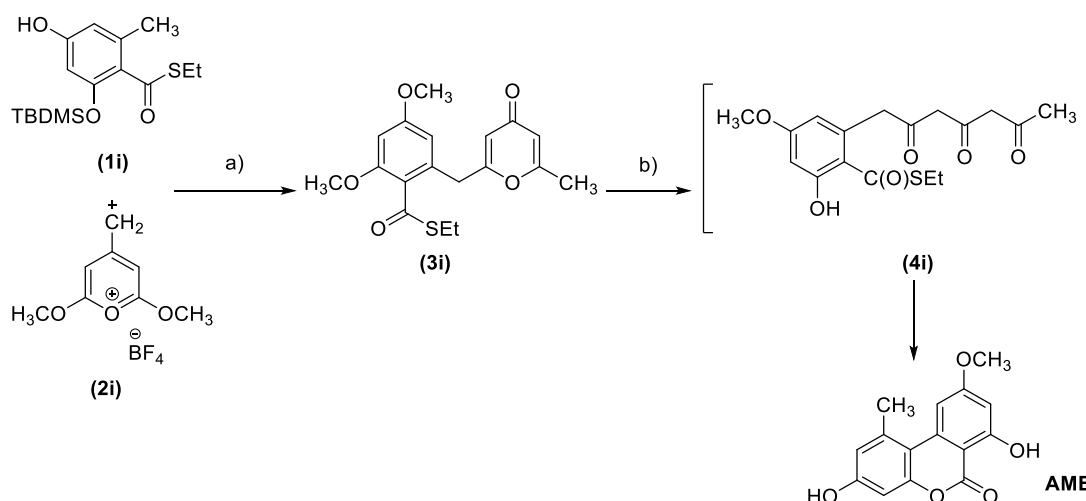
Por otro lado, el crecimiento de *Alternaria* y, por consiguiente, la producción de alternariol, se ve notablemente afectada por diferentes factores ambientales, principalmente temperatura y humedad. Se acelera sustancialmente a temperatura ambiente y periodos de almacenamiento largos.¹⁰ La temperatura óptima de crecimiento reportadas para *Alternaria* oscilan entre 22 y 30 °C, aunque también es capaz de crecer a bajas temperaturas en un rango que va desde 2.5 a 6.5 °C, e incluso más bajas, de 0 a 5 °C.¹⁷ Por esta razón, a menudo este hongo está involucrado en el deterioro de alimentos almacenados en frío; no obstante, las temperaturas de refrigeración representan la mejor estrategia para el control de este patógeno. Con respecto a su propagación, se pueden encontrar en reservorios como suelo, vegetales (madera enmohecida), alimentos o fómites. Las toxinas de *Alternaria spp.* se aíslan con frecuencia de una gran variedad de productos vegetales frescos y procesados, siendo muy común en cereales debido al almacenamiento de los granos en condiciones favorables para el crecimiento del moho y a que permanece inalterable en condiciones de cocción húmedas, como en la cocción del pan. Si bien aparecen fundamentalmente en la materia orgánica, también se encuentran en el suelo, paredes (empapelado), textiles, etc.

1.1.2. Síntesis química de alternariol

Desde su descubrimiento, la síntesis química de alternariol se ha llevado a cabo por diferentes aproximaciones sintéticas. En este apartado se hace un breve resumen de las principales estrategias sintéticas desarrolladas hasta la fecha. La mayoría de ellas se caracterizan por seguir una aproximación convergente de acoplamiento de dos sintones aromáticos para la formación del esqueleto principal.

La primera síntesis de alternariol, publicada en 1986 por Staunton *et al.*, sigue una estrategia de tipo biomimético para la formación tanto de alternariol como alternariol 9-metil éter (Esquema 1-1).^{18,19} En ella se describe cómo el tioéster **1i** se hace reaccionar con diisopropilamiduro de litio (LDA) para generar el correspondiente anión metiltiolato que posteriormente reacciona con la sal de tetrafluoroborato de pirilio (**2i**). Tras el procesamiento ácido se desprotege el grupo *terc*-butildimetilsililo, obteniéndose el producto **3i** que, a continuación, por calentamiento posterior con hidróxido de sodio en una

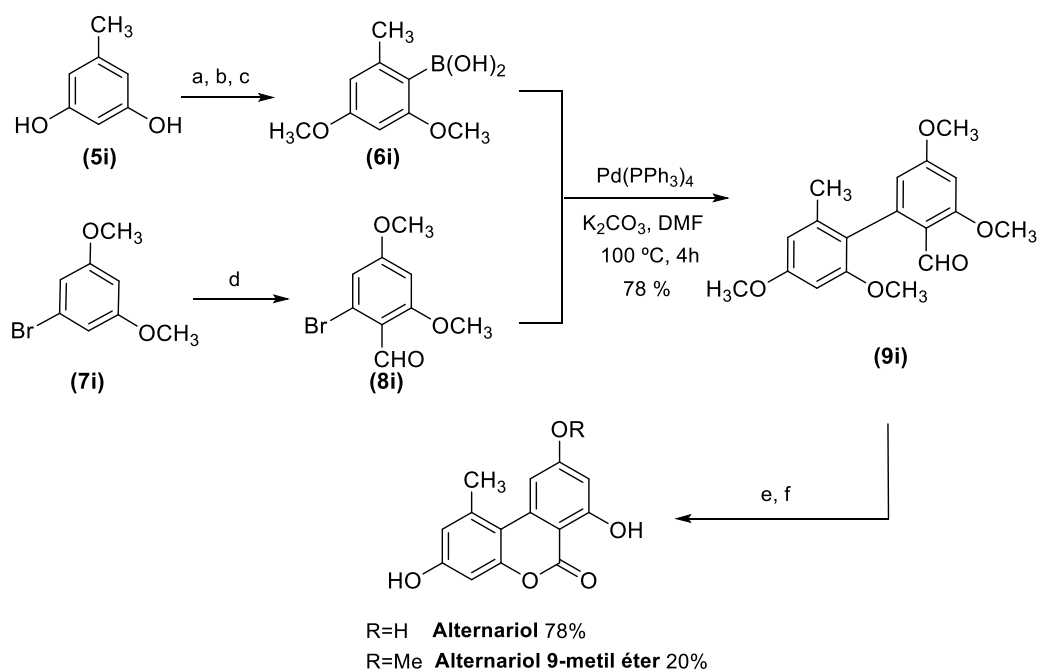
mezcla de metanol/agua a reflujo, seguido de tratamiento ácido, conduce a la formación exclusiva de alternariol 9-metil éter. Las condiciones demasiado energéticas de la reacción de ciclación no permiten el aislamiento del presunto intermedio tricarbónico (**4i**) formado por la apertura del anillo de pirona de **3i**.



Esquema 1-1. Síntesis biomimética del alternariol y alternariol 9-metil éter. Reactivos y condiciones: (a) LDA, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego H^+ , 20%; (b) NaOH, MeOH/ H_2O (4/1), luego H^+ ; rendimiento >75%.

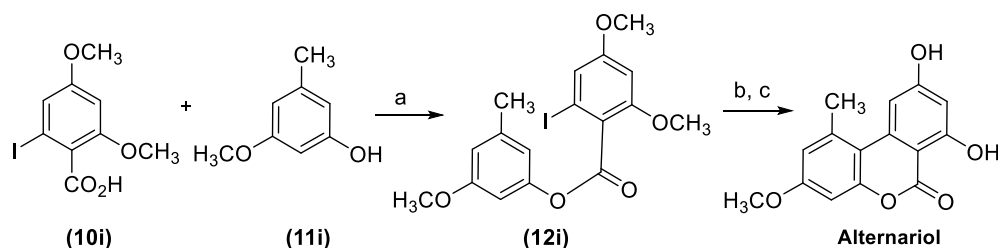
Años más tarde, en 2005, Podlech *et al.* publicaron una de las primeras síntesis totales de alternariol que implican como etapa clave una reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura catalizado por paladio entre dos anillos bencénicos convenientemente funcionalizados.¹³ La síntesis comienza con la metilación y bromación con *N*-bromosuccinimida (NBS) de orcinol (**5i**),²⁰ para formar a continuación el correspondiente ácido borónico (**6i**) por tratamiento del bromuro arílico intermedio con *n*-butil litio y posterior reacción *in situ* del organolítico generado con triisopropil borato.²¹ (Esquema 1-2). El bromuro de arilo (**8i**) al que se acopla el ácido borónico se obtiene a través de una formilación de Vilsmeier del 3,5-dimetoxibromobenceno (**7i**).²²

El acoplamiento cruzado entre el bromo-aldehído **8i** y el ácido borónico **6i** se produce de forma eficaz en condiciones estándar para dar el producto de acoplamiento correspondiente, el bifenilo **9i**. La síntesis finaliza mediante la oxidación del grupo formilo de **9i** a ácido con NaClO_2 y desmetilación de los grupos metoxilo con BBr_3 , condiciones en las que también se produce la ciclación intramolecular que completa el núcleo de dibenzo- α -pirona y la síntesis de alternariol.



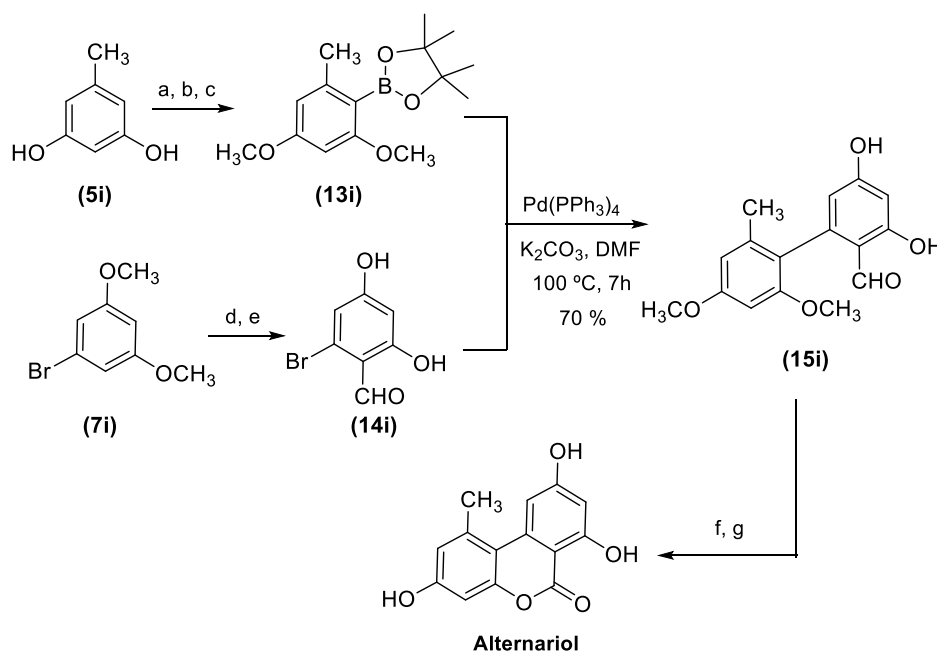
Esquema 1-2. Síntesis de alternariol basada en una reacción de acoplamiento de Suzuki según Podlech *et al.* Reactivos y condiciones: a) Me_2SO_4 , K_2CO_3 , acetona, reflujo, 4 h, 99%; b) NBS, CHCl_3 , t.a., 99%; c) BuLi, $\text{B}(\text{O}i\text{-Pr})_3$, THF, -78°C , 15 min, t.a., 12 h, 99%; d) POCl_3 , DMF, 100°C , 4 h, 78%; e) NaClO_2 , NaH_2PO_4 , 2-metil-2-buteno, $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5/1), t.a., 2 h, 85%; f) BBr_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 24 h, 73%.

Posteriormente, en 2007, Harayama *et al.* describieron una síntesis total alternativa a la publicada por Podlech *et al.* cuyo objetivo era evitar la formación de alternariol 9-metil éter como subproducto de la síntesis de alternariol.²³ Para ello partieron del ácido 2-yodo-4,6-dimetoxibenzoico (**10i**) que se esterificó con el 3-metoxi-5-metilfenol (**11i**), utilizando N,N' -diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-dimetilamino-piridina (DMAP), para dar el producto **12i**. Con el producto obtenido se realizó un acoplamiento de Suzuki utilizando $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ como catalizador, dimetilacetamida (DMA) como disolvente, K_2CO_3 como base y a reflujo. Finalmente, al igual que en la síntesis de Podlech, la síntesis de alternariol se completa mediante la desmetilación de los grupos metoxilo por tratamiento con BBr_3 en diclorometano (Esquema 1-3).



Esquema 1-3. Síntesis de alternariol de Harayama. Reactivos y condiciones: a) DCC, DMAP, DCM, 24 h, t.a. 70%; b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10% mol), K_2CO_3 , DMA, 190°C , 40 min, 61%; c) BBr_3 (en CH_2Cl_2 1 M), t.a. 9 h, 87%.

Finalmente, en 2015, Kim *et al.* presentaron una propuesta sintética alternativa que mejoraba los rendimientos obtenidos en las síntesis previamente descritas, y en la que además no se obtiene alternariol 9-metil éter como subproducto. Esta aproximación se basa también en una reacción de acoplamiento de Suzuki como etapa clave (Esquema 1-4).²⁴ La síntesis parte del orcinol (**5i**) e implica inicialmente la protección de los grupos hidroxilo como de éteres metílicos, seguido de la bromación con NBS, para dar el dimetoxi-orsinol bromado, y posterior formación del correspondiente éster borónico (**13i**). La preparación del otro componente utilizado en la reacción de acoplamiento parte del 1-bromo-3,5-dimetoxibenceno (**7i**) que se formula por medio de una reacción de Vilsmeier-Haak, seguido de desprotección de los grupos metoxilo para dar el producto **14i**. El acoplamiento entre los sintones **13i** y **14i** se realiza en condiciones análogas a la utilizadas por Podlech, para dar el sistema biarílico **15i**. Finalmente, el grupo formilo se oxida al grupo carboxílico y se promueve la desprotección de los grupos metoxilos y la lactonización por medio de BBr_3 .



Esquema 1-4. (a) Me_2SO_4 , K_2CO_3 , acetona, t.a.; (b) NBS, CHCl_3 , t.a.; (c) 1. *n*-BuLi, 2. 2-isopropoxi-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ hasta t.a., 12 h.; (d) POCl_3 , DMF, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h.; (e) BBr_3 , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min.; (f) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , DMF, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h.; (g) BBr_3 , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min.; (h) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , DMF, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 12 h.; (g) H_2SO_4 , NaClO_2 , DMSO, t.a., 4 h.; (h) BBr_3 , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$ hasta t.a., 12 h.

1.1.3. Toxicidad de alternariol y metabolismo

Pese a la baja toxicidad del alternariol ($LD_{50} > 400 \text{ mg/kg}$),²⁵ su peligrosidad se debe a sus efectos a largo plazo en el organismo. Además, debido a su elevada incidencia a concentraciones relativamente altas ($\mu\text{g/kg}$) en alimentos de origen vegetal (granos, frutos secos, frutas y vegetales), el alternariol representa una potencial amenaza para la salud humana (Tabla 1-1). El estudio del metabolismo de alternariol ha demostrado que se puede conjugar con otras moléculas más polares, como la glucosa, aminoácidos y sulfatos, presentes en los sustratos vegetales donde se produce. La formación de conjugados en los alimentos dificulta el desarrollo de métodos analíticos para su detección, debido a los cambios de polaridad que presentan respecto a las micotoxinas precursoras.^{13,26,27} En estudios recientes se ha podido demostrar que el alternariol puede regular el sistema endocrino por interferencia de las señales con los receptores, regulando de esta forma los receptores de hormonas esteroideas, tanto como agonista como antagonista de estas. Esto conlleva a la alteración de la producción de hormonas e interfiere en la expresión génica de algunas enzimas esteroideas.²⁸ El alternariol, debido a su estructura de tipo difenólico, es muy parecido a algunos disruptores endocrinos como son el resveratrol, genisteína y el bisfenol A, todas sustancias capaces de alterar el equilibrio hormonal del organismo.²⁹

Tabla 1-1. Ejemplos de la abundancia relativa de alternariol en algunos alimentos.¹⁷

| País | Alimento | Media ($\mu\text{g/kg}$) | Rango ($\mu\text{g/kg}$) | LOD/LOQ ^a ($\mu\text{g/kg}$) | Referencia |
|-----------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|---|------------|
| Argentina | Salsa de tomate | 141 | 187–8.8 | 5 | 30 |
| República Checa | Salsa de tomate | 7.9 | 1.2–14.1 | 0.08 | 31 |
| Canadá | Vino tinto | 1.0 | 0.03–5.0 | 0.01 | 32 |
| República Checa | Trigo | 7.7 | 6.3–44.4 | 5 | 33 |
| Suecia | Cebada, trigo, avena | – | 9–335 | – | 34 |

^a Límite de detección o cuantificación del método analítico utilizado.

El alternariol ha manifestado poseer capacidad esteroidea, lo que implica el aumento de las concentraciones de progesterona y estradiol, así como un aumento en la expresión del receptor de la progesterona. Este efecto conlleva a la aparición de células de carcinoma adrenocortical,³⁵ por lo que esta biotoxina se ha relacionado con distintos tipos de cáncer (mama, esófago, etc).³⁶ En estudios más dirigidos a la evaluación de la toxicidad, el alternariol ha mostrado ser una sustancia tóxica,

mutagénica y genotóxica.^{37,38} Otros autores revelaron que el crecimiento de *Alternaria* aislada en determinados cultivos de laboratorio genera efectos tóxicos ratas y pollos,³⁹ embriones de pollo,⁴⁰ y cultivos celulares humanos. Además, los cultivos de laboratorio mostraron ser teratogénicos y fetotóxicos en ratones.⁴¹ Los extractos de cultivos de *A. Alternata* son mutagénicos en varios sistemas *in vitro* y cancerígenos en ratas alimentadas con piensos contaminados.⁴² Alternariol también presenta una actividad mutagénica elevada tanto en cultivos de *Bacillus subtilis*⁴³ como de *Escherichia coli*.⁴⁴

Por otro lado, se ha podido demostrar que el alternariol es citotóxico. Esto se evidencia en que la presencia de alternariol a nivel celular produce daño mitocondrial, lo que conlleva a la aparición de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La presencia de estas especies genera catecoles activos e hidroxiquinonas que permiten la formación de otros metabolitos (semiquinonas y quinonas) que desencadenan la formación de nuevas especies reactivas de oxígeno. Además, los catecoles pueden reaccionar covalentemente con el ADN y pueden intervenir en el ciclo redox celular inactivándolo por metilación o sulfonación de las especies intermedias.^{45,46,47}

En investigaciones recientes se han evaluado los efectos del alternariol como potencial estructura base para el diseño de nuevas terapias antiinflamatorias.⁴⁸ También se ha reportado que el alternariol y otros análogos sintéticos muestran propiedades inhibitoras de la cadena de transporte de electrones fotosintética en cloroplastos aislados de espinaca.⁴⁹ El alternariol también ha sido identificado como un potente inhibidor de la topoisomerasa I y II, y como inductor de fragmentos de cadenas de ADN en diferentes líneas celulares de mamíferos.⁵⁰

1.1.4. Incidencia y marco legal

El alternariol se encuentra en el 31% de los alimentos consumidos en Europa, con concentraciones que oscilan entre el 6.3 y 1.84 µg/kg. Según la EFSA, los niveles medios más altos de alternariol se encuentran en algunos granos, en particular, el trigo sarraceno (27.9–33.1 µg/kg) y la avena (35.3–39.7 µg/kg). Por otro lado, en este estudio se observó que la exposición más elevada a alternariol ocurre en niños, con una

exposición media de entre 3.8 y 71.6 ng/kg de peso corporal por día y una exposición del percentil 95 entre 11.4 y 270.5 ng/kg de peso corporal por día. En general, las frutas y los productos preparados a base de frutas, particularmente tomates y peras, son los contribuyentes más importantes a la exposición dietética a alternariol.¹⁰

En la actualidad, no hay ningún tipo de regulación sobre la presencia de alternariol en alimentos. La EFSA, no obstante, establece el parámetro de «Umbral de Preocupación Toxicológica» (TTC, por sus siglas en inglés: *Threshold of Toxicological Concern*) para sustancias genotóxicas cuyo límite es de 2.5 ng/kg de peso corporal por día. Sin embargo, se estima que el consumo humano en la dieta es de 19–39 ng/kg, lo que excede las recomendaciones realizadas por la EFSA.⁵¹ A raíz de esta situación, en abril de 2022 se publicó la Recomendación (UE) 2022/553 de la Comisión sobre el seguimiento de la presencia de toxinas de *Alternaria* en los alimentos, donde se indica que los Estados miembros, en estrecha cooperación con los explotadores de empresas alimentarias, deben controlar la presencia en los alimentos de las toxinas de *Alternaria*, concretamente alternariol, alternariol 9-metil éter y ácido tenuazónico (TeA). Resulta por lo tanto importante disponer de técnicas analíticas adecuadas que permitan detectar estas micotoxinas, y particularmente alternariol, en pequeñas concentraciones, al objeto de proteger a la población de la ingesta indiscriminada de estas biotoxinas.

1.2. Análisis de alternariol en alimentos

La correcta detección y análisis de alternariol en muestras alimentarias implica necesariamente el empleo de técnicas que sean capaces de cuantificar cantidades muy pequeñas, del orden de trazas del analito. Dichas técnicas deben contar con características muy exigentes, tienen que ser extremadamente sensibles, selectivas y, además, deben tener una adecuada reproducibilidad. Esto es de vital importancia para evitar que los alimentos contaminados lleguen al consumidor.

Las técnicas de referencia más utilizada para la detección de alternariol son los métodos cromatográficos convencionales, siendo la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) la que más

aceptación tiene. Esta técnica puede estar acoplada con diferentes tipos de detectores, tales como los de espectroscopía de ultravioleta (UV), fluorescencia o espectrometría de masas simple o en tándem.⁵² Sin embargo, existen otros tipos de técnicas alternativas basadas en el reconocimiento molecular, como son los métodos inmunoquímicos, que tienen una considerable relevancia en el análisis de micotoxinas, particularmente en el cribado inicial de gran cantidad de muestras, así como en la purificación de muestras previa al análisis por métodos cromatográficos.

1.2.1. Métodos cromatográficos

Como se ha mencionado previamente, los métodos más frecuentemente utilizados para el análisis de alternariol en muestras alimentarias hacen uso de las técnicas cromatográficas, técnicas que actualmente permiten la cuantificación de las toxinas de *Alternaria* en una amplia variedad de matrices alimentarias con elevados niveles de sensibilidad. La ventaja principal de este tipo de técnicas es que permiten el análisis multiresiduo, es decir, analizar simultáneamente diferentes analitos presentes en una misma muestra. Esto les confiere una gran utilidad en relación a la vigilancia y control de contaminantes en alimentos. El principio básico de las técnicas cromatográficas se basa en la separación de los componentes de una mezcla en función de las características, tanto de la fase estacionaria como de una fase móvil que la componen. Existen numerosos tipos de detectores, pero los más frecuentemente utilizados actualmente son espectrómetros de masas (MS) simples o en tándem (MS/MS).

Por sus características, este tipo de técnicas cromatográficas juegan un papel fundamental en el análisis de micotoxinas, debido a que son muy sensibles, selectivas y reproducibles. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes y/o limitaciones, entre las que destacan el sofisticado instrumental necesario para el análisis, difícil de mantener y con un elevado coste económico, y la necesidad de tener personal altamente cualificado para su manipulación. Además, tampoco pueden utilizarse cuando la determinación quiere llevarse a cabo *in situ*. En la amplia mayoría de casos se requiere un procesamiento de la muestra, que en el caso del alternariol normalmente implica una etapa de extracción con disolventes orgánicos a fin de eliminar las interferencias de la matriz. Un aspecto este último que se traduce en mayores tiempos de análisis, coste

económico e impacto ambiental. No obstante, los métodos cromatográficos siguen siendo la técnica de referencia de la mayoría de los métodos analíticos utilizados actualmente para el análisis de toxinas de *Alternaria*, e incluyen fundamentalmente HPLC en fase reversa o cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) acoplada a MS simple o en tándem.^{53,54}

Herebian en 2009⁵⁵ reportó límites de detección (LOD) para alternariol en maíz y trigo de 1 µg/kg utilizando tecnología de triple cuadrupolo y del orden de 100 a 200 µg/kg utilizando tecnología de trampa de iones. Más recientemente, Carrasco en 2016⁵⁶ notificó LOD de 1.4 µg/kg en zumo de tomate y productos a base de tomate usando HPLC-ESI-MS/MS. Por su parte, Aroud en 2021⁵⁷ con el objetivo de desarrollar un método de limpieza para reducir la cantidad de alternariol y otras micotoxinas de zumos de manzana, llegó a límites de cuantificación de 4.6 µg/L para alternariol mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en tándem.

En la bibliografía se han descrito numerosos métodos cromatográficos alternativos para el análisis de micotoxinas en alimentos, tales como los basados en cromatografía de capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) o cromatografía de gases (GC, del inglés *Gas Chromatography*), aunque el empleo de esta última técnica requiere la derivatización previa de la muestra.⁵⁸ En el caso de alternariol se ha publicado la utilización de GC para su análisis en diversas matrices de alimentos y piensos, utilizando la espectrometría de masas de impacto electrónico (EI) para la detección, llegando a un LOD de 1 µg/kg en zumo de manzana.⁵⁹

1.2.2. Métodos inmunoquímicos

Complementariamente a los métodos clásicos cromatográficos para el análisis de micotoxinas se encuentran los métodos inmunoquímicos, que presentan algunas ventajas significativas frente a los anteriores. Los inmunoensayos han demostrado ser también muy sensibles y específicos, pero destacan sobre todo por su rapidez ya que permiten el análisis de un gran número de muestras en un corto espacio de tiempo y con un coste inferior al de los métodos basados en las técnicas cromatográficas. Es por

todo esto por lo que las técnicas inmunoanalíticas se han convertido en una herramienta ampliamente utilizada en la detección y cuantificación de micotoxinas.⁶⁰

Todos los tipos de técnicas inmunoanalíticas se basan en las interacciones antígeno-anticuerpo, cuyo principio se fundamenta en la interacción específica y selectiva de los antígenos que se quieren cuantificar con el anticuerpo utilizado para realizar el análisis. En concreto, para el análisis de biotoxinas, una de las técnicas inmunocromatográficas más utilizado es el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).⁶¹ Se basa en la inmovilización previa de uno de los componentes de la reacción antígeno-anticuerpo sobre un soporte sólido y el marcaje enzimático del inmunorreactivo no inmovilizado. Posteriormente, el grado de reconocimiento se evalúa por adición de un sustrato de la enzima de marcaje que da lugar a una señal medible, como absorbancia o luminiscencia. Aunque existen diferentes soportes, lo más habitual es que los inmunoensayos enzimáticos se lleven a cabo en microplacas de poliestireno de 96 pocillos, de modo que la inmovilización inicial se produce por adsorción inespecífica sobre el plástico activado mediante irradiación con rayos gamma. Por otra parte, los inmunoensayos de flujo lateral, conocidos como tests de antígenos, tiras inmunorreactivas o tiras inmunocromatográficas, también se utilizan para el inmunoanálisis de micotoxinas, aunque normalmente son utilizados como métodos semicuantitativos. Este formato de ensayo no requiere de etapas de lavado, lo que redundará 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.⁶²

1.2.3. Antecedentes de inmunoensayos para la determinación de alternariol

El primer inmunoensayo para alternariol fue desarrollado por Burkin y Kononenko en 2011 empleando anticuerpos policlonales de conejo producidos a partir de un conjugado de alternariol con albúmina de suero bovino (BSA).⁶³ El conjugado inmunogénico proteína-alternariol fue preparado mediante una condensación de la proteína directamente con alternariol por reacción con formaldehído acuoso y acetato potásico (reacción tipo Mannich), a partir del cual obtuvieron los anticuerpos con los

que desarrollaron un inmunoensayo específico para el alternariol, con una reactividad cruzada hacia alternariol 9-metil éter muy baja. La sensibilidad del inmunoensayo desarrollado fue de 0.4 ng/mL (1.55 nM) y se usó para la determinación de alternariol en maíz, trigo, semillas de girasol y piensos contaminados.

Paralelamente, Ackermann *et al.* estudiaron también la producción de anticuerpos mono- y policlonales para el desarrollo de inmunoensayos para la determinación analítica de alternariol.⁶⁴ Este estudio permitió extender los resultados previos de Burkin a frutas y hortalizas, además de desarrollar un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales. En este caso, el inmunógeno también se sintetizó por medio de una reacción de Mannich entre el alternariol, la hemocianina de lapa californiana (KLH, del inglés *Keyhole Limpet Hemocyanin*) y formaldehído acuoso. El inmunoensayo desarrollado demostró ser bastante sensible, observándose un límite de detección de 35 ± 6.9 pg/mL para el inmunoensayo basado en monoclonales y de 59 ± 16 pg/mL para el inmunoensayo que utiliza policlonales. En este artículo, los autores ya reconocen que no saben la posición por la que se introdujo el brazo espaciador sobre la molécula de alternariol, y que incluso es posible que se formara una mezcla de haptenos con el brazo espaciador por diferentes posiciones.

Unos años después se publicó la producción de anticuerpos monoclonales sin dar detalles del inmunógeno utilizado para la generación de estos.⁶⁵ En este artículo se describe la preparación de un conjugado de alternariol con BSA por conjugación directa mediada por el 1,1-carbonildiimidazol y también por la reacción tipo Mannich con formaldehído. Estos conjugados se utilizaron como antígenos de ensayo para el desarrollo de tiras inmunocromatográficas para la detección de alternariol en muestras de cereales y zumos de frutas. El límite de detección del inmunoensayo fue de 15.5–19.4 ng/g en cereales y de 2.8 y 3.5 ng/mL en zumos de manzana y naranja, respectivamente.

Posteriormente, se han publicado dos artículos describiendo la producción de anticuerpos frente a alternariol, pero en ningún caso se aisló y caracterizó el derivado funcionalizado de alternariol. En el primero de ellos,⁶⁶ se preparan hasta cuatro inmunógenos distintos; dos con las proteínas BSA y KLH, derivatizando alternariol con anhídrido glutárico previamente a la conjugación, y otros dos con las proteínas

seroalbúmina humana (HSA, del inglés *Human Serum Albumin*) y tiroglobulina bovina (BTG, del inglés *Bovine ThyroGlobulin*), conjugando directamente el alternariol con el formaldehído. Sólo con estos dos últimos conjugados fueron capaces de obtener anticuerpos policlonales, desarrollándose un inmunoensayo para la cuantificación de alternariol en pan y salvado de trigo utilizando los anticuerpos generados a partir del conjugado HSA–alternariol. El límite de detección de este inmunoensayo es de 2.4 ± 0.6 ng/g en pan y 52.8 ± 10.8 ng/g en salvado. En el segundo de estos artículos se lleva a cabo la producción de anticuerpos policlonales a partir del inmunógeno preparado por conjugación de alternariol a KLH, tras la previa derivatización del mismo por reacción de alquilación de los grupos hidroxilo con bromobutirato de metilo.⁶⁷ Los anticuerpos policlonales generados no son específicos de alternariol y reconocen también casi por igual a alternariol 9-metil éter. A partir de los mismos se desarrolló un inmunoensayo genérico para ambos analitos que tiene un límite de detección en trigo de 0.7 ng/mL y 1.0 ng/mL para alternariol y alternariol 9-metil éter, respectivamente.

Finalmente, Yao *et al.* han desarrollado recientemente un nuevo inmunoensayo utilizando un hapteno que introduce un brazo espaciador carboximetilado en la posición C-3 de la molécula de alternariol.⁶⁸ A partir de los anticuerpos policlonales obtenidos, desarrollaron un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente indirecto competitivo (ciCLEIA, del inglés *competitive indirect ChemiLuminescence Enzyme Immunoassay*), que demostró presentar muy buena sensibilidad, con límites de detección de 0.068 ng/mL. En el trabajo se utilizaron como control conjugados de alternariol preparados vía la reacción de Mannich, con peores resultados. Los autores postulan que la modificación estructural y electrónica que se introduce en la molécula de alternariol mediante la estrategia utilizada en la mayoría de los trabajos previos para la preparación del inmunógeno, puede ser la responsable de la afinidad más baja de los anticuerpos obtenidos. Aunque en el artículo se resalta, a través de una serie de cálculos muy simples de modelado molecular y cálculos de distribución electrónica, la idoneidad del hapteno utilizado para la preparación del inmunógeno, lo cierto es que no se dan detalles de su preparación ni datos espectroscópicos que demuestren la estructura de este, particularmente la posición de incorporación del brazo espaciador carboxilado, por lo

que lo más probable es que también en este caso los anticuerpos se hayan generado a partir de una mezcla indefinida de haptenos funcionalizados.

La Tabla 1-2 recoge un resumen de todos los anticuerpos producidos y los inmunoensayos desarrollados tanto para alternariol como alternariol 9-metil éter y la Figura 5 ilustra las estructuras de los diferentes conjugados preparados. Como puede observarse, y se ha comentado en los párrafos previos, todos los conjugados utilizados para la generación de anticuerpos frente a alternariol, tanto monoclonales como policlonales, se han obtenido sin control de la posición de derivatización del esqueleto, en la mayoría de los casos por conjugación directa de alternariol y en algún caso incluso con una modificación sustancial de las características estereoelectrónicas de la estructura molecular. Este es el caso de los conjugados preparados por conjugación directa de alternariol con formaldehído, en los que, aunque en alguno de los artículos se menciona que la derivatización y unión a la proteína se produce a través de los grupos hidroxilo, lo cierto es que en este tipo de reacción (tipo Mannich) se genera inicialmente un grupo metiléniminio ($R-N^+=CH_2$) por condensación de formaldehído con los grupos NH_2 de la proteína, grupo que actúa como electrófilo en una reacción de sustitución electrofílica aromática que se produce a través de las posiciones carbonadas del sistema aromático. Sólo en dos casos, el mencionado en último lugar en el párrafo precedente y en otro previo que conduce a la producción de anticuerpos específicos frente a alternariol 9-metil éter,⁶⁹ se afirma controlar la posición de derivatización a través de una reacción de alquilación selectiva del grupo hidroxilo en C-3. Sin embargo, este último artículo es el único en el que se describe una mínima caracterización espectroscópica del hapteno obtenido previamente a su conjugación, aunque los datos espectroscópicos aportados (solo RMN de 1H) no permiten asegurar que el producto formado en el proceso de *O*-alquilación sea realmente el que resulta de la reacción del grupo hidroxilo indicado, si bien parece que efectivamente podría ser así según el Principio de Landsteiner⁷⁰ dada la especificidad de los anticuerpos generados hacia alternariol 9-metil éter.

Tabla 1-2. Antígenos y anticuerpos obtenidos e inmunoensayos desarrollados para alternariol (AOH) y alternariol 9-metil éter (AME).

| Método de conjugación | Conjugado inmunización ^a | Conjugado inmovilizado | Tipo Ab | IC ₅₀ (analito) | Tipo ensayo | LOD (analito), (matriz) | Ref. |
|--|---|-------------------------------|------------------|---|------------------------------|--|-----------------|
| Conjugación directa de AOH con CH ₂ =O (Mannich) | Tipo I BSA-AOH | Tipo I BSA-AOH GEL-AOH | pAb | 0.4 ng/mL | ELISA indirecto | < 10 ng/mL (AOH) (trigo, avena, cebada, maíz) | 63 ^f |
| Conjugación directa de AOH con CH ₂ =O (Mannich) | Tipo I KLH-AOH | Tipo I BSA-AOH | pAb y mAb | 408 pg/mL (AOH) 108 pg/mL (AOH) | ELISA indirecto | pAb, 59 pg/mL (AOH) mAb, 35 pg/mL (AOH) (1-2 µg/kg en manzana, tomate y vino) | 64 ^f |
| Alquilación OHS AOH con BrCH ₂ CO ₂ Me | Tipo II BSA-AOH | Tipo II OVA-AOH | pAb | 16.5 ng/mL (AOH) | ELISA indirecto | – | 71 |
| Conjugación AOH con CDI y con CH ₂ =O (Mannich) | BSA-AOH ^b | Tipo I Tipo III BSA-AOH | mAb | 4.3 ng/mL (AOH) | LFICA | Lectura visual, 160 ng/g Lector tiras, 2.8–19.4 ng/g (AOH) (zumo y cereal) | 65 |
| Alquilación OHS de AME con Br(CH ₂) ₃ CO ₂ Me | Tipo IV BSA-AME ^c | Tipo IV OVA-AME | mAb | 0.227 ng/mL (AME) ^d | LFICA | Lectura visual, 10 ng/mL (AME) (cerezas y naranjas) | 69 ^f |
| Alquilación OHS de AOH con Br(CH ₂) ₃ CO ₂ Me | Tipo V KLM-AOH | Tipo V BSA-AOH | mAb ^e | 9.4 ng/mL (AOH) 9.7 ng/mL (AME) | ELISA indirecto | 0.7 ng/mL (AOH) 1.0 ng/mL (AME) (trigo) | 67 |
| Acilación AOH con anhídrido glutárico Conjugación directa AOH con CH ₂ =O (Mannich) | Tipo VI BSA-AOH KLH-AOH HSA-AOH BTG-AOH | Tipo VI OVA-AOH | pAb ^f | 15.2 ng/g (AOH) (pan) 8.4 ng/g (AOH) (salvado) | ELISA indirecto ^g | 2.4 ng/g (AOH) (pan) 52.8 ng/g (AOH) (salvado de trigo) | 66 |
| Alquilación OHS de AOH con XCH ₂ CO ₂ R (no exper.) Conjugación directa de AOH con CH ₂ =O (Mannich) | Tipo I KLH-AOH Tipo II BSA-AOH | Tipo II OVA-AOH | pAb | 0.37 ng/mL | ELISA indirecto | 0.068 ng/mL (maíz, arroz, trigo, zumo manzana y zumo uva) | 68 |

^a Ver Figura 5. ^b No se especifica, pero debe tratarse de uno de los conjugados preparados también como antígeno de ensayo, antígeno Tipo I o III. ^c Único conjugado en el que el hapteno se caracteriza espectroscópicamente previamente a la conjugación.

^d 2.1% de reactividad cruzada con AOH. ^e mAb genérico para AOH y AME. ^f Solo se obtienen pAb a partir conjugados preparados por reacción tipo Mannich. ^g Inmunoensayo desarrollado a partir de pAbs obtenidos con el conjugado HSA-AOH. *Abreviaturas*: BSA, albúmina de suero bovino; BTG, tiroglobulina bovina; CDI, 1,1-carbonildiimidazol; GEL, gelatina; HSA, albúmina de suero humano; KLH, hemocianina de lapa californiana; OVA, ovoalbúmina; pAb, anticuerpos policlonales; LOD, Límite de detección.

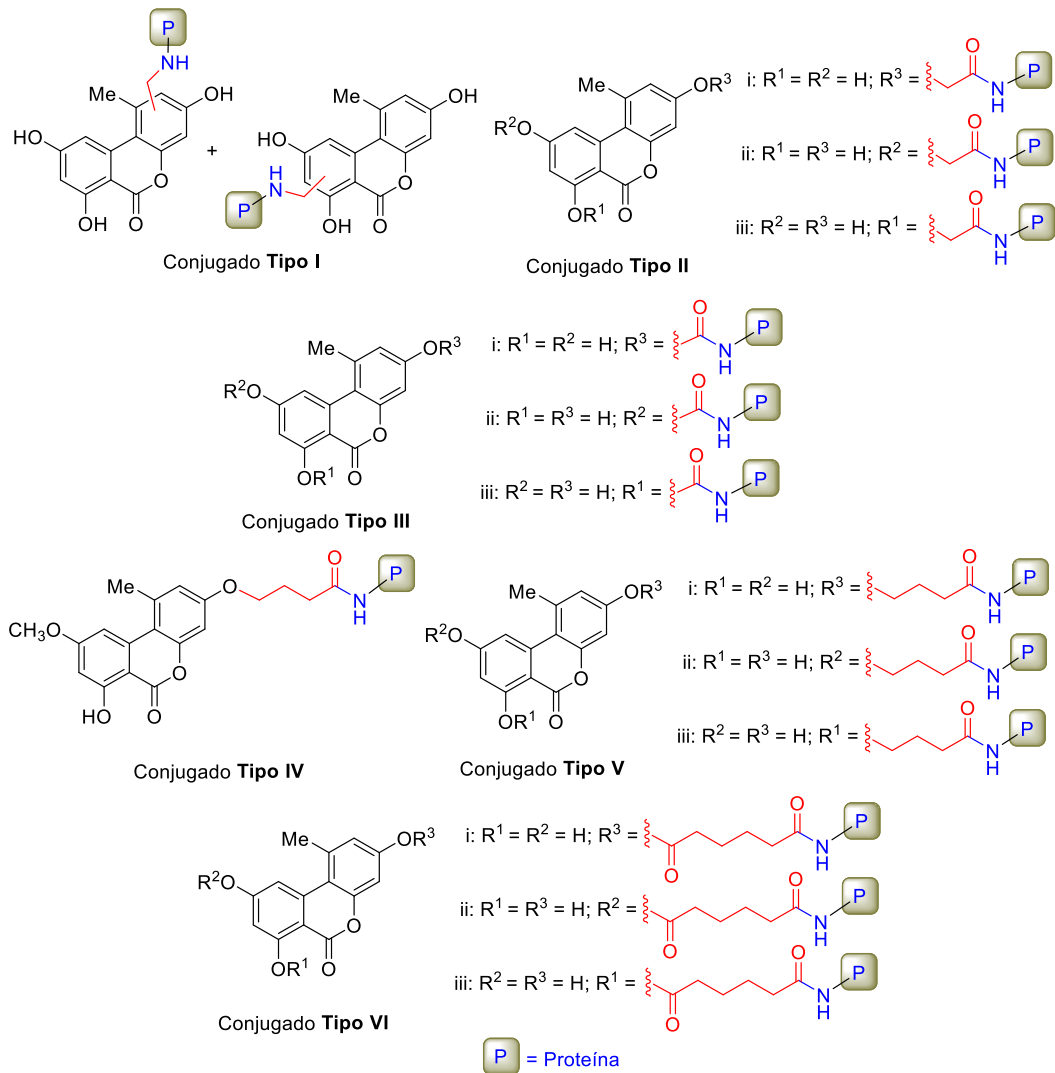


Figura 5. Estructuras de los inmunógenos mencionadas en la Tabla 1-2.

1.3. Preparación de inmunorreactivos

El desarrollo de un método inmunoquímico para el análisis rápido y a bajas concentraciones de sustancias de bajo peso molecular, como las micotoxinas, requiere generar previamente los anticuerpos necesarios con las prestaciones adecuadas. El procedimiento más habitual para obtener anticuerpos consiste en la inmunización de animales de laboratorio utilizando bioconjugados constituidos por un análogo de la molécula diana, llamado hapteno, y una proteína portadora. En consecuencia, la primera etapa para el desarrollo de un inmunoensayo empieza por el diseño y síntesis de haptenos, seguido de la preparación de bioconjugados y la generación de anticuerpos específicos. En etapas posteriores se evalúa la calidad de los inmunorreactivos

generados y se validan las condiciones idóneas para la detección de la molécula de interés.

1.3.1. Diseño y síntesis de haptenos

La respuesta inmunitaria es un mecanismo de defensa que se da en los animales vertebrados cuando un agente biológico externo, principalmente virus, bacterias o sustancias de naturaleza proteica, entra en el organismo. Una parte de esta reacción consiste en la generación de anticuerpos frente a fragmentos de dichos cuerpos extraños, llamados antígenos. De esta forma, si el sistema inmunitario de un animal de laboratorio se enfrenta periódicamente a cualquiera de estos agentes patogénicos resultaría, a priori, sencillo obtener anticuerpos capaces de reconocer específicamente a un determinado antígeno.

No obstante, las moléculas de bajo peso molecular como fármacos, plaguicidas o micotoxinas no son capaces de generar por sí mismos una respuesta inmunitaria, pero sí pueden ser reconocidos por anticuerpos, es decir tienen carácter antigénico, pero no inmunogénico. Generalmente se trata de pequeños compuestos orgánicos con pesos moleculares inferior a 1000 Da. Hace años, Karl Landsteiner, uno de los padres de la inmunología moderna galardonado en 1930 con el premio Nobel de Medicina y Fisiología por el descubrimiento de los grupos sanguíneos, bautizó a estos compuestos con el nombre de haptenos. Por lo tanto, el alternariol, con un peso molecular de 258 Da, forma parte de este tipo de sustancias.⁷² Por otro lado, K. Landsteiner también descubrió que es posible obtener anticuerpos frente a haptenos si estos se unen covalentemente a una proteína portadora (Figura 6). Es decir, los haptenos se pueden modificar con el fin de convertirlos en inmunógenos capaces de desencadenar la respuesta del sistema inmunitario.⁷³

La unión covalente del hapteno a una proteína portadora se ha de realizar a través de un grupo funcional preexistente en la molécula o por modificación de su estructura. La conjugación directa del hapteno puede resultar en la generación de anticuerpos; sin embargo, generalmente esta estrategia provoca tanto el bloqueo, por alteración o por impedimentos estéricos, de grupos químicos que pueden ser determinantes antigénicos

relevantes como la modificación de la conformación y las propiedades estereoelectrónicas de la molécula. El resultado es la generación de anticuerpos con pobres prestaciones analíticas. Por el contrario, la estrategia basada en el diseño y preparación de análogos estructurales de la molécula diana resulta más adecuada para obtener anticuerpos de elevada afinidad y con la especificidad deseada, ya que evita el bloqueo de grupos químicos importantes inmunogénicamente y permite, por un lado, la introducción de un brazo espaciador con una funcionalización específica para el acoplamiento covalente a la proteína portadora y, por otro lado, facilita obtener la orientación espacial de la molécula que mejor expone sus estructuras químicas más características.

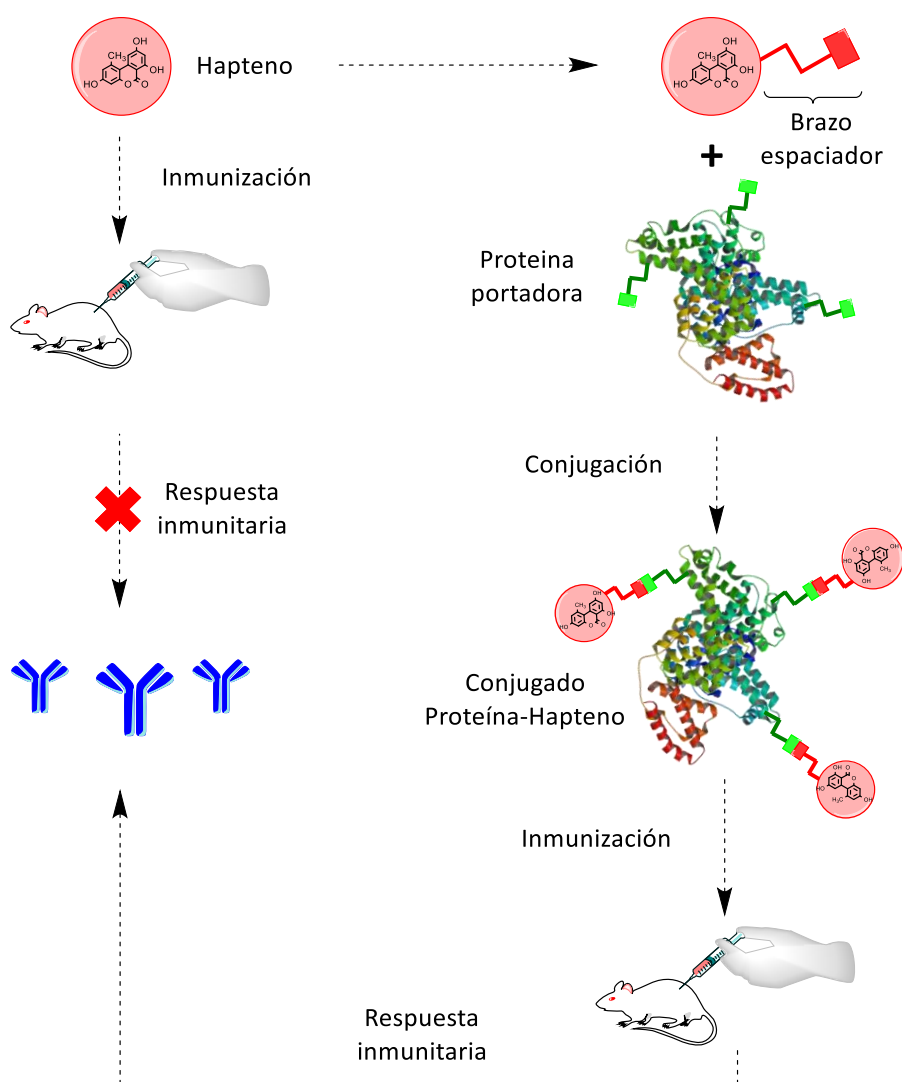


Figura 6. Esquema simplificado del proceso de inmunización y obtención de anticuerpos para analitos de bajo peso molecular.

Lógicamente, existe una gran variedad de posibilidades a la hora de funcionalizar una molécula y, por tanto, de derivados que pueden ser utilizados en el proceso de inmunización. A grandes rasgos, un hapteno funcionalizado consta de tres partes básicas: un núcleo formado por una estructura similar al analito de interés, un grupo químico funcional que permita su conjugación covalente a proteínas y un brazo espaciador entre ambos elementos. Con todo esto, el correcto diseño del hapteno de inmunización es una etapa crítica si se quiere obtener anticuerpos con las características necesarias para el desarrollo de inmunoensayos de elevada sensibilidad.

Para el diseño racional de haptenos se debe seguir una serie de postulados basados en los estudios pioneros de Karl Landsteiner y en la experiencia acumulada a lo largo de décadas. Landsteiner en sus trabajos postuló que la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria depende de cuatro características básicas del inmunógeno: alteridad (con el objeto de inducir una respuesta inmunitaria, el sistema biológico debe reconocer una molécula como ajena), tamaño molecular, complejidad química y susceptibilidad a procesamiento y presentación de antígeno. Por lo tanto, estas características repercuten directamente sobre la afinidad y la especificidad de los anticuerpos generados, es decir, sobre su capacidad para unirse a un analito en concreto y no a otro similar estructuralmente.

Alternativamente, otro recurso que suele ser de utilidad en el diseño de haptenos es la modelización molecular. Esta técnica permite establecer de modo teórico las similitudes estructurales, electrónicas y conformacionales entre el analito y los diferentes haptenos diseñados.⁷⁴ Con este objetivo, se realiza una búsqueda conformacional extensiva, calculando computacionalmente los confórmeros de menor energía, y una vez obtenidos, se selecciona como hapteno “idóneo” aquel cuyo confórmero más estable se asemeje lo más posible al del analito en cuestión.⁷⁵ Sin embargo, cabe mencionar que, aunque estas herramientas nos pueden ser de gran utilidad, su uso se ve limitado por ciertos factores como la complejidad sintética del hapteno diseñado, la propia estabilidad de los haptenos o la relación coste-beneficio, entre otras.

Una vez vistos los recursos disponibles para el diseño de un hapteno, podemos abordar las partes que componen el mismo. Por lo que respecta al núcleo del hapteno, ya se ha mencionado que debe imitar al máximo la conformación y las propiedades estereoelectrónicas de la molécula diana. Además, la posición donde se introduce el brazo espaciador y el tipo de enlace químico que los une son factores críticos que se deben considerar con el objetivo de mantener dichas propiedades a la vez que exponer en su parte distal aquellas estructuras químicas que mejor la caracterizan. De esta forma se incrementa la probabilidad de que los anticuerpos producidos frente al hapteno reconozcan también al analito. Sin embargo, la funcionalización directa del analito no siempre es sencilla, o incluso no es posible, por lo que a veces es necesario recurrir a la síntesis total partiendo de compuestos comerciales más simples. Desde un punto de vista químico, se recomienda emplear estrategias de síntesis que conlleven el menor número de etapas, mayores rendimientos y bajos costes.⁷⁶

Por su parte, la principal función del brazo espaciador es servir de puente entre la estructura del analito y la proteína portadora, evitando el enmascaramiento del hapteno y facilitando su interacción con los elementos que constituyen el sistema inmunitario, como receptores de células T y anticuerpos. Un elemento muy importante a tener en consideración es que el brazo espaciador no presente grupos altamente inmunogénicos (heteroátomos, insaturaciones, anillos aromáticos o grupos polares), ya que la respuesta inmunitaria podría dirigirse hacia ellos y no hacia la estructura que mimetiza la molécula diana.⁷⁷ Por eso, se suelen utilizar cadenas hidrocarbonadas alifáticas lineales de entre 4 y 6 átomos de carbono como brazo espaciador. Esta longitud de brazo permite la exposición de la estructura del analito sin que llegue a plegarse sobre sí mismo.

Por su parte, existen diferentes tipos de grupo funcionales mediante los cuales se puede llevar a cabo la conjugación a la proteína de manera ortogonal, es decir, sin producirse uniones por sitios diferentes y manteniendo inalteradas las estructuras del analito y de la proteína. Los grupos funcionales de conjugación más usuales son carboxilato ($-\text{COOH}$) principalmente, amino ($-\text{NH}_2$), sulfhidrilo ($-\text{SH}$) e hidroxilo ($-\text{OH}$), aunque también se han descrito ejemplos con vinilsulfonas, azidas y otros grupos funcionales.⁷⁸

1.3.2. Preparación de conjugados proteicos

Finalizada la síntesis de los haptenos análogos de la molécula diana, el siguiente paso es su unión covalente a una proteína portadora. Esto se realiza aprovechando los grupos funcionales de los aminoácidos libres de la proteína. Entre los grupos funcionales más utilizados con este fin se encuentran los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, los grupos carboxilo de los residuos de los ácidos aspártico y glutámico, o los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína. El número de residuos disponibles y la manera de conjugar puede variar en función de la proteína seleccionada. A priori, una proteína exógena al animal que se quiere inmunizar siempre que contenga un número suficiente de residuos accesibles del tipo deseado es válida para la preparación de un bioconjugado proteína–hapteno. Entre las proteínas más utilizadas se encuentran las albúminas BSA y HSA, la ovoalbúmina (OVA, del inglés *Ovalbumin*) y la hemocianinas KLH y la del cangrejo herradura (HCH, del inglés *Horseshoe Crab Hemocyanin*). Particularmente, la BSA es la más frecuentemente utilizada para la preparación de bioconjugados debido principalmente a su elevada inmunogenicidad en roedores, tolerancia a cargas hapténicas elevadas sin pérdida de solubilidad, elevada estabilidad física y química, disponibilidad y bajo coste. Además, con el empleo de espectrometría de masas se puede determinar fácilmente el número de moléculas de haptenos que se han conjugado por molécula de BSA. Otra característica importante es que presenta una elevada tolerancia a diferentes disolventes orgánicos como DMSO o DMF, en los cuales normalmente son solubles los haptenos. Otros conjugados proteína–hapteno empleados en el desarrollo de inmunoensayos se preparan con enzimas, como la peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *Horseradish Peroxidase*). Los conjugados resultantes se denominan trazadores enzimáticos.

Existe un amplio abanico de posibilidades a la hora de preparar un conjugado proteína–hapteno.⁷⁸ Como se ha comentado anteriormente, la estrategia más utilizada para la conjugación de haptenos es la funcionalización con un ácido carboxílico en el extremo del brazo espaciador. Este grupo se podrá emplear para generar un enlace amida por reacción con los grupos amino de los residuos de lisina de la proteína portadora.^{79,80} Debido a que la reactividad del grupo carboxilo es relativamente baja frente a adiciones nucleofílicas, la formación del enlace de tipo amida en condiciones

suaves se ve favorecida por una etapa previa de activación del hapteno. La aproximación más empleada consiste en la preparación de un éster activo de *N*-hidroxisuccinimido (método del éster activo). La ventaja más destacada de este método es que el producto activado presenta una estabilidad asumible en condiciones anhidras y se puede purificar, lo que hace posible controlar los equivalentes de hapteno durante el proceso de conjugación, mejorar los rendimientos de la reacción de conjugación y así reducir la cantidad necesaria de hapteno.⁸¹ Una vez concluida la etapa de activación del grupo carboxilo se hace reaccionar con la proteína en medio neutro o ligeramente básico, de forma que los grupos amino estén desprotonados y así, incrementar su reactividad. Los métodos más usuales de conjugación de haptenos funcionalizados con grupos carboxilo se recogen en la Figura 7.

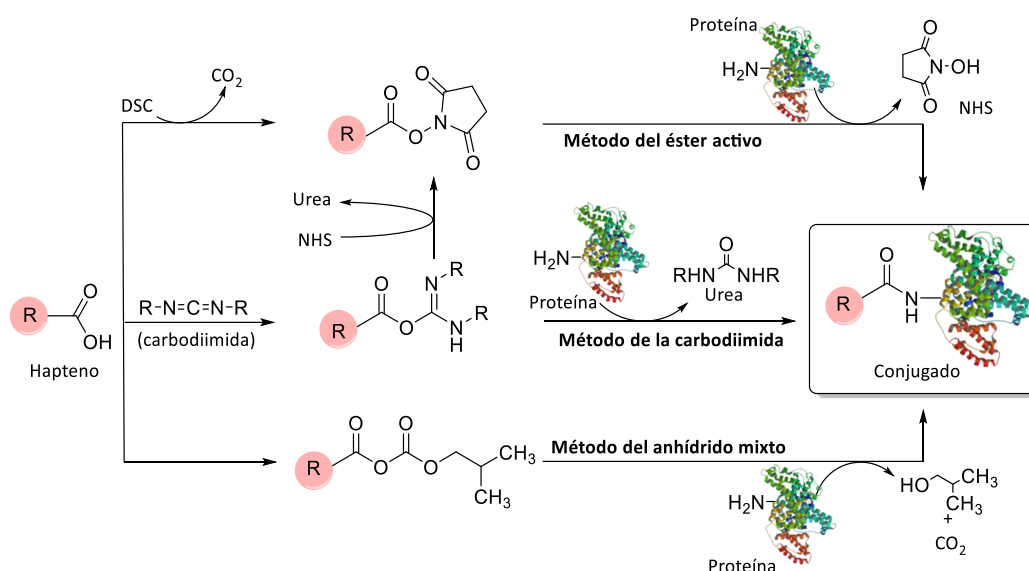


Figura 7. Diferentes métodos de conjugación para haptenos funcionalizados con un grupo carboxilo.

Una vez preparado, el conjugado se purifica y a continuación se calcula la relación molar hapteno–proteína obtenida, abreviada como RM, que arroja información sobre su carga hapténica. Dependiendo de la finalidad del conjugado, su valor óptimo será mayor o menor. En general, un conjugado utilizado como inmunógeno requiere un valor moderadamente elevado de RM para potenciar la respuesta inmunitaria. Por el contrario, para los conjugados destinados al desarrollo de inmunoensayos competitivos es recomendable un valor más reducido de RM con el fin de favorecer la interacción del anticuerpo con el analito.

El cálculo de la RM se puede estimar empleando espectrofotometría UV/Vis, siempre que el hapteno absorba en esta región del espectro electromagnético. No obstante, existen otras técnicas más avanzadas, como la espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador por tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS), que permiten la medida precisa de la masa de macromoléculas, y cuyo uso para el cálculo de la densidad hapténica de conjugados ha experimentado un gran auge en los últimos años.⁸²

1.3.3. Generación de anticuerpos específico

La exposición de un antígeno inmunogénico al sistema inmunitario trae consigo la producción y secreción de anticuerpos específicos procedente de células especializadas, principalmente linfocitos B.⁸⁰ Los anticuerpos son glicoproteínas, también denominadas inmunoglobulinas, capaces de unirse al antígeno frente al cual se han generado con elevada afinidad. Esta unión inicia un proceso de metabolización del agente patógeno a través de diferentes mecanismos en el interior del organismo. A escala de laboratorio es posible la utilización de modelos animales que, tras la inoculación controlada y periódica de un reactivo inmunogénico acompañado de un agente inmunopotenciador,⁸³ genere anticuerpos deseados. Habitualmente para estos experimentos se suelen utilizar animales de experimentación como ratones, ratas, conejos o cabras.

Desencadenar una respuesta inmunitaria frente a un determinado antígeno es un proceso complejo que comprende a un gran número de componentes del sistema inmunitario que actúan de manera coordinada. La respuesta primaria es la primera línea de defensa del organismo y se conoce como la inmunidad innata. Se basa en la protección vía barreras tanto anatómico-fisiológicas como humorales y celulares, y tiene como objetivo la eliminación rápida e inespecífica del agente patógeno. A nivel celular, el sistema inmunitario activa dos mecanismos, por un lado, interviene el sistema del complemento y, por otra parte, se inicia la fagocitosis del antígeno por parte de los leucocitos. Ambos juegan papeles muy importantes en esta primera acción de protección. El sistema del complemento está conformado por una serie de proteínas séricas inactivas, las cuales se pueden activar por diferentes vías, ya sea mediante la

unión de un anticuerpo o reacción con moléculas superficiales de microorganismos, promoviendo diferentes procesos para destruir el antígeno. Complementariamente, los leucocitos vigilan constantemente al organismo, encargándose de la fagocitosis y degradación intracelular de los antígenos dentro del mismo. La fagocitosis por parte de células especializadas (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) presentadoras de antígeno (APCs, del inglés *Antigen-Presenting Cells*) constituye la primera etapa en la cascada de acontecimientos que desembocan en la conocida como respuesta inmunitaria adaptativa (Figura 8).⁸⁴

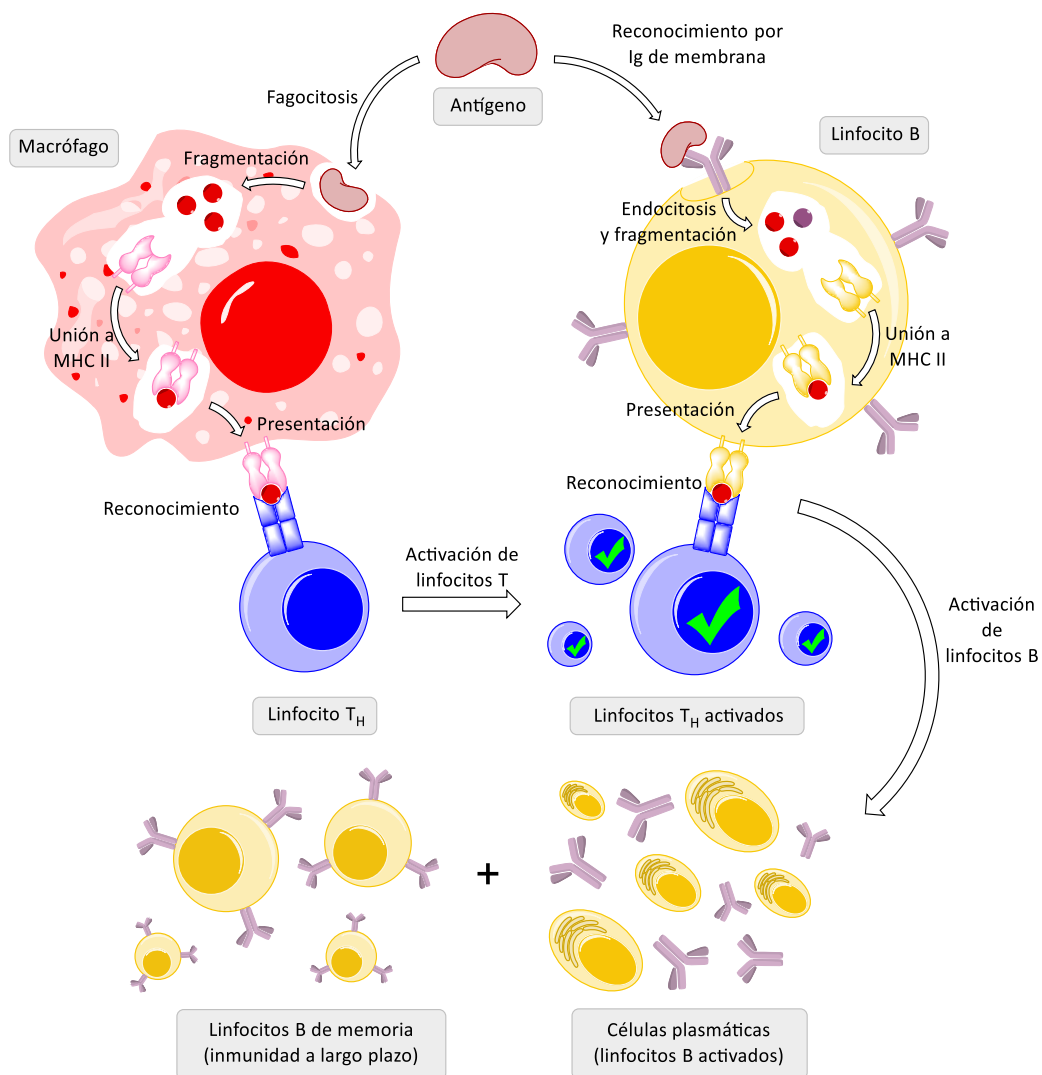


Figura 8. Mecanismo de la respuesta inmunitaria tras la entrada de un agente exógeno.

Tras la entrada en el organismo, el elemento extraño es detectado por una célula APC, y seguidamente es fagocitado mediante su adhesión a la membrana. Una vez

interiorizado, el cuerpo extraño se degrada por la acción de enzimas hidrolíticas presentes en el lisosoma al cual se unen. La fusión de esta vesícula con un lisosoma provoca su degradación por parte de las enzimas hidrolíticas contenidas en el lisosoma, produciendo la formación de oligopéptidos de aproximadamente unos 10 aminoácidos de longitud. Pese a que el macrófago elimina gran parte del antígeno degradado, una parte de los péptidos formados se unen con moléculas del denominado complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), para presentarlo en su membrana. El MHC II es una glucoproteína compuesta por dos cadenas polipeptídicas diferentes unidas mediante interacciones no covalentes. Esta proteína actúa a modo de anclaje, de modo que las dos cadenas peptídicas se distribuyen para formar un espacio interior a modo de surco que permite la unión del péptido. Además, cada cadena presenta 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. La presentación del antígeno en la superficie de la APC da lugar al reconocimiento por parte algunos linfocitos T auxiliares (TH, del inglés *T-Helper cells*) preexistentes capaces de interactuar, aunque con relativamente baja afinidad, con el complejo péptido–MHC II en la superficie de la APC por medio de su receptor específico de antígeno. Sin embargo, las células TH sólo son capaces de expresar un único modelo de receptor específico para cada complejo péptido–MHC II, por lo que debe existir un reconocimiento eficaz para que se produzca su activación. Entonces, el linfocito TH experimenta una activación y proliferación clonal y se diferencia en células T de memoria y células T efectoras. Adicionalmente, el linfocito TH activado secreta diversas citoquinas, moléculas encargadas de activar otras células inmunitarias importantes como los linfocitos T citotóxicos (TC) y los linfocitos B, siendo ambos específicos al antígeno. Los linfocitos TC cumplen un papel vital, ya que vigilan las células del organismo y provocan la degradación celular de cualquier cuerpo que exhiba antígeno (respuesta inmunitaria celular). Por otro lado, los linfocitos B activados son los que tienen la tarea de la generación de anticuerpos específicos para el agente exógeno (respuesta inmunitaria humoral).

Los linfocitos B, además de producir anticuerpos, tienen la capacidad de fagocitar agentes exógenos de forma específica a través de inmunoglobulinas situadas en su

membrana. De igual manera que lo ocurrido con los linfocitos TH, los linfocitos B también tienen la capacidad de reconocer a prácticamente cualquier antígeno, expresando cada uno de ellos un sólo tipo de inmunoglobulina receptor específico de membrana. El complejo anticuerpo–antígeno formado mediante la endocitosis es degradado de manera análoga a lo que ocurre en cualquier otra APC, produciendo pequeños péptidos, los cuales más tarde son capturados y trasladados a la membrana por una molécula de MCH II. La maduración de la respuesta inmunitaria, o respuesta secundaria, se consigue cuando un linfocito TH previamente activado por el reconocimiento de un cierto complejo péptido–MHC II, reconoce el mismo complejo presentado por un linfocito B. Dicha activación de linfocitos B provoca a la expansión clonal del mismo y su diferenciación en células plasmáticas y linfocitos B de memoria. El objetivo principal de las células plasmáticas es generar una secreción masiva de inmunoglobulinas que sean capaces de reconocer con una afinidad igual a los anticuerpos de la membrana del linfocito B inicial. Puesto que los anticuerpos secretados tienen un tiempo de vida limitado (unos pocos días) en el organismo, la función de los linfocitos B de memoria es constituir y asegurar una inmunidad a largo plazo. Este proceso produce la maduración de la afinidad y la especificidad de los anticuerpos. Las células de memoria tienen, por tanto, la tarea de generar una respuesta más eficaz frente a una posible reexposición al antígeno.

Con el objetivo de propiciar una mayor eficiencia en el proceso de fagocitosis, y generar una respuesta inmunitaria más potente, es habitual el uso de adyuvantes.⁸⁵ Existen varios tipos de adyuvantes cuya función es específicamente la estimulación del sistema inmunitario. Los comúnmente más utilizados son sales de aluminio y los aceites minerales con capacidad de formar emulsiones. Dentro de este último grupo se encuentra el conocido como adyuvante de Freund, formulado por primera vez en 1937.⁸⁶ Disponible en dos versiones, la completa e incompleta, ambas compuestas por una combinación de aceite de parafina, monooleato de manosa y, en su forma completa incluye formas inactivadas de las bacterias *Mycobacterium tuberculosis* o *M. butyricum*. La inoculación de la mezcla de este adyuvante (medio apolar) con una disolución del antígeno (medio acuoso) permiten la formación de una emulsión para la liberación lenta del antígeno. La activación inmunitaria con la versión completa aumenta las

probabilidades de fagocitar un antígeno por una APC, resultando en su procesado y exposición; mientras que la inmunización posterior con la versión incompleta resultaría en principio suficiente para madurar dicha respuesta en cuanto a afinidad y especificidad.

1.3.4. Estructura de las inmunoglobulinas

Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, son glicoproteínas producidas por un tipo de leucocito denominado linfocito B, y son un componente muy importante de la respuesta generada por el sistema inmunológico ante la presencia de moléculas o agentes exógenos en el organismo. Existen diferentes tipos de inmunoglobulinas, siendo las de tipo G (IgG) las predominantes en la respuesta inmunitaria madura, ya que constituyen aproximadamente el 80% del total de las inmunoglobulinas presentes en el suero sanguíneo.

Las IgG están constituidas por dos unidades estructurales básicas duplicadas. Cada molécula consta de dos grandes cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos ligeras (L) de menor tamaño, ambas idénticas entre ellas, que forman heterodímeros de unos 150 kDa de peso molecular (Figura 9). Las cadenas pesadas están unidas entre sí por dos enlaces disulfuro, mientras que un único puente disulfuro une cada una de ellas a una de las cadenas ligeras. Las IgG son receptores divalentes, ya que presentan dos sitios de unión a antígeno o paratopos. Dichos sitios de unión se encuentran en los extremos *N*-terminal de las cadenas pesadas y ligeras, por tanto, capaces de unirse a dos moléculas de antígeno de forma simultánea. Su estructura cuaternaria recuerda a una “Y”.

La estructura primaria de las cadenas que componen las IgG se compone de dominios estructurales. Estos dominios contienen entre 70 y 110 aminoácidos y se clasifican en diferentes categorías; por ejemplo, en variables (V) y constantes (C) de acuerdo con su tamaño y función. La digestión con papaína genera dos fragmentos Fab (del inglés, *Fragment antigen binding*) y el fragmento Fc (del inglés, *Fragment that crystallizes*). Cada uno de los fragmentos Fab están formados por cuatro dominios, dos de la cadena pesada y dos de la cadena ligera. Dentro de los cuatro dominios de cada fragmento Fab, uno pesado (V_H) y uno ligero (V_L) conforman la región variable de los

fragmentos Fab que es concretamente donde se encuentra el paratopo o sitio de unión del antígeno. Esta región es diferente para cada inmunoglobulina ya que su secuencia depende del antígeno contra el cual ha sido generado, de modo que los aminoácidos presentes en esta región determinarán la afinidad. Los dos dominios restantes del Fab (C_{H1} y C_L) son constantes e idénticos para todas las IgG.

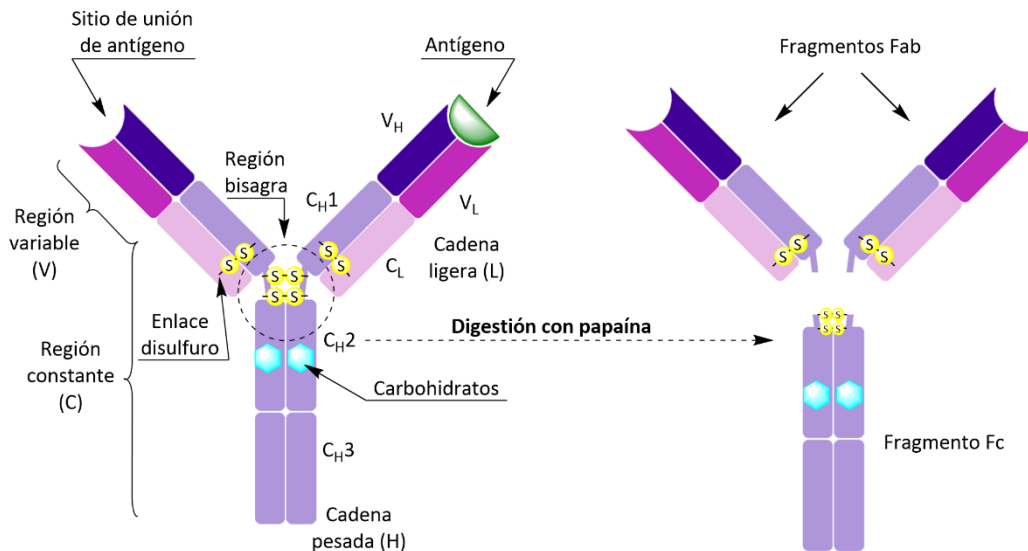


Figura 9. Estructura de una inmunoglobulina de tipo IgG.

El fragmento Fc está compuesto por cuatro dominios pesados constantes, idénticos entre sí, dos C_{H2} y dos C_{H3} , que contienen los sitios de glicosilación. La agrupación de dominios C_H y C_L constituye la región constante de la IgG, mientras que la región variable está formada por los dominios V_H y V_L . Los diferentes dominios de una IgG se agregan para dar lugar a tres lóbulos, obteniéndose así la forma de "Y". En la región central de la macromolécula se encuentra la región bisagra, denominada de esta forma dada su elevada flexibilidad, que permite la movilidad de los lóbulos que conforman la IgG.⁸⁷

Cambios en las secuencias de las regiones constantes de las inmunoglobulinas originan diferencias en sus características básicas, como son el tamaño, carga, solubilidad y función, dando lugar a las diferentes clases o isotipos. Las cadenas pesadas se clasifican como α , δ , ϵ , γ o μ , mientras que en las cadenas ligeras solo son de dos tipos, κ o λ . La función de una inmunoglobulina 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 un isotipo: IgA (cadena α), IgD (cadena δ), IgE (cadena ϵ), IgG (cadena γ) e IgM (cadena μ).

1.3.5. Tipos de anticuerpos según su modo de generación

Dentro de la producción artificial de anticuerpos, independientemente del fin que se persiga con ellos (analíticos, biomédicos o biotecnológicos), se pueden clasificar en tres categorías en función de su modo de obtención: policlonales, monoclonales y recombinantes.

Los anticuerpos policlonales, también llamados antisueros, se obtienen de un modo rápido, sencillo y económico (habitualmente de 3 a 4 meses). Su preparación consiste en el aislamiento de estos a partir del suero sanguíneo de un animal inmunizado, generalmente conejos, ovejas y cabras. Este tipo de anticuerpos está conformado por una mezcla heterogénea de inmunoglobulinas con diferentes afinidades y especificidades, y representan por tanto un promedio de la respuesta inmunitaria global del animal inmunizado frente a un antígeno,⁸⁸ lo que convierte a los antisueros en reactivos muy adecuados para llevar a cabo estudios comparativos con diferentes inmunógenos. Sin embargo, la generación de este tipo de inmunorreactivo no está exento de inconvenientes, ya que el uso de estas inmunoglobulinas para el desarrollo de métodos inmunoanalíticos se ve limitado por el volumen finito de suero y por el hecho de que diferentes animales inmunizados con el mismo inmunógeno producen antisueros con propiedades variables, lo que resulta en una baja tasa de reproducibilidad. Sin embargo, el uso de anticuerpos policlonales sigue estando muy extendida, por lo que podemos encontrar incluso kits comerciales basados en la utilización de este tipo de anticuerpos, pues la producción que se obtiene a partir de un solo animal es suficiente para realizar miles de inmunoensayos.

Por su parte, los anticuerpos monoclonales son un tipo de inmunoglobulinas que se obtienen *in vitro* a partir de una única línea celular. Esto se consigue mediante la generación y cultivo de las denominadas células de hibridomas.⁸⁹ Estas inmunoglobulinas provienen de un clon de linfocito B del animal inmunizado, y presentan características en cuanto a afinidad y especificidad bien definidas. Haciendo

uso de 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.⁹⁰ Por contra, este método es mucho más costoso y lento (alrededor de 6–9 meses), por lo que se emplea para los inmunógenos con más potencial de generar anticuerpos con elevada afinidad y especificidad.

Finalmente, partiendo de librerías génicas sintéticas o mediante clonación de los genes que codifican las inmunoglobulinas y su expresión en otros sistemas biológicos, las técnicas de biología molecular permiten el aislamiento del tercer grupo de anticuerpos, los anticuerpos recombinantes.⁹¹ 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.

1.3.6. Generación de anticuerpos monoclonales

Ante la necesidad de obtener anticuerpos de manera reproducible y homogénea, en 1975 surgió la denominada tecnología de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales. A partir de los años 80 la producción de anticuerpos monoclonales pasó de ser una curiosidad científica a ser una normalidad. Esta tecnología está basada en la generación y aislamiento de una única línea celular, secretora de un único tipo de inmunoglobulina, obtenida mediante la fusión de dos células diferentes.⁸⁹ Para ello, un linfocito B productor de anticuerpos aislado de un animal previamente inmunizado 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 10).

El motivo por el que es necesario fusionar los linfocitos B reside en el hecho de que la vida media de este tipo de célula está limitada a unos pocos días *in vitro*, por lo que su cultivo no es una técnica viable para la producción de anticuerpos. Al fusionarlos con células tumorales capaces de dividirse indefinidamente, las células híbridas resultantes poseen la capacidad de producir anticuerpos y de crecer en cultivo de manera ilimitada. Con este fin se utiliza polietilenglicol (PEG), un compuesto que se caracteriza por tener la capacidad de disolver de manera parcial las membranas celulares. Al retirar el PEG se

produce el cierre de las membranas, de modo que unas células se fusionarán con otras, y tras la reorganización posterior del material genético de las dos células parentales se llega a obtener células híbridas linfocito–mieloma. Dado que el proceso de fusión entre ambas poblaciones de células se produce de manera aleatoria, la mezcla de estas es muy heterogénea y se obtienen tanto hibridomas linfocito–mieloma como células resultantes de la unión de dos células de mieloma o dos linfocitos, además de células no fusionadas. Por un lado, la presencia de linfocitos sin fusionar o sus correspondientes híbridos no constituye un problema en el proceso debido a que mueren a los pocos días. Por el contrario, las células de mieloma y sus respectivos híbridos mieloma–mieloma sí suponen un inconveniente. La selección de los hibridomas linfocito–mieloma se consigue empleando líneas celulares de mieloma deficientes en uno de los genes que participan en la síntesis de purinas mediante rutas “alternativas” e introduciendo en el medio de cultivo un fármaco, la aminopterina, que bloquea selectivamente las “rutas naturales” de biosíntesis de estos nucleótidos.⁹²

En presencia de aminopterina, las células de mieloma modificadas no son capaces de incorporar el pirofosfato de fosforribosilo en los nucleótidos de purina. Sin embargo, los hibridomas linfocito–mieloma pueden emplear las “rutas alternativas” para su biosíntesis, puesto que poseen los genes necesarios procedentes de los linfocitos B. En definitiva, sólo los híbridos resultantes de la fusión de un linfocito B con 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, ya que son necesarias para el funcionamiento de las rutas biosintéticas no bloqueadas.

El potencial de producción de anticuerpos específicos frente al analito de interés, se evalúa transcurridos 10–12 días desde la fusión mediante el análisis de los sobrenadantes de cultivo. Ensayos como el ELISA diferencial permiten determinar simultáneamente la capacidad de un anticuerpo para reconocer el hapteno inmovilizado a partir del cual se ha producido y el analito diana en su forma libre. Una vez identificados los hibridomas productores de anticuerpos específicos, conviene reevaluarlos mediante ELISA competitivo bidimensional con fines confirmatorios y comparativos.⁹³

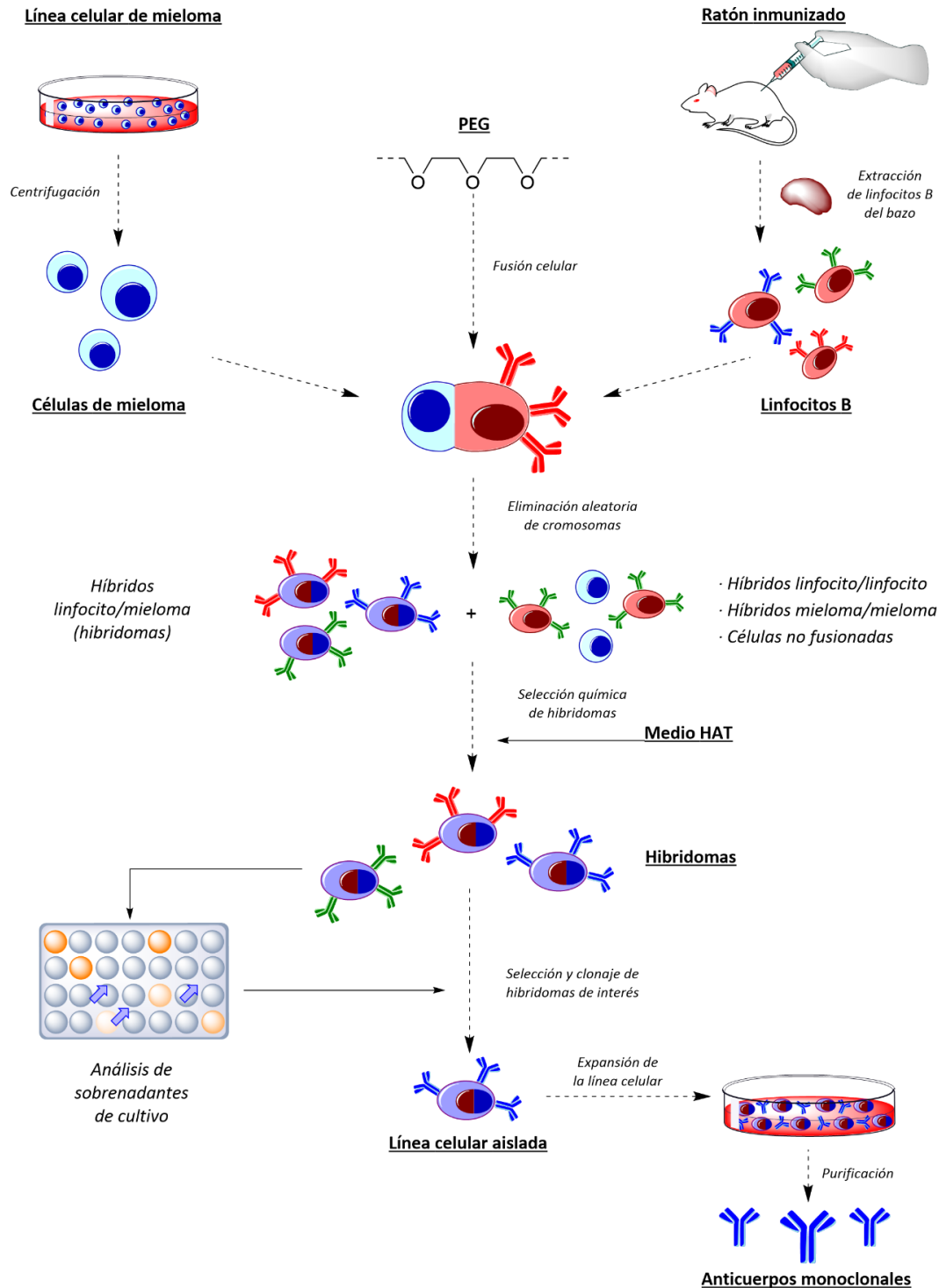


Figura 10. Procedimiento de producción de anticuerpos monoclonales a través de la tecnología de hibridomas.

Tras seleccionar los hibridomas de mayor interés se requiere un proceso de aislamiento y estabilización de las líneas celulares seleccionadas. Este proceso se conoce como clonación celular. El procedimiento de clonación más habitual es el de la dilución

límite, que consiste en distribuir el contenido celular del pocillo original en una nueva placa a una concentración de una célula híbrida (linfocito–mieloma) por pocillo. Pasados varios días se reanalizan los sobrenadantes de cultivo y se repite el ciclo hasta asegurar que el hibridoma seleccionado procede de una única célula. Una vez conseguido, el hibridoma se cultiva hasta obtener una cantidad suficiente de células para su congelación y conservación, y el sobrenadante se utiliza para purificar el anticuerpo monoclonal con el que desarrollar los ensayos inmunoquímicos.

1.4. Desarrollo de inmunoensayos

El proceso de desarrollo de un inmunoensayo que tenga una aplicación real en la determinación de un analito consta de varias etapas. Evidentemente la obtención de los anticuerpos que se emplean en dicho desarrollo es solo la primera de ellas. Así, tras la obtención de los inmunorreactivos necesarios, el siguiente paso consiste en realizar una evaluación de los mismos. De la capacidad de reconocimiento de un anticuerpo hacia un analito destacan la afinidad y la especificidad, siendo estas las características más importantes a la hora de definir las propiedades de cualquier anticuerpo.

El término afinidad de un anticuerpo hace referencia a la suma de todas las fuerzas atractivas (enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, de van der Waals y/o hidrofóbicas) que tienen lugar entre el determinante antigénico (epítipo) y los aminoácidos que constituyen el sitio de unión del anticuerpo (paratopo). La afinidad de un anticuerpo hacia un analito suele expresarse en términos de constante de disociación del complejo anticuerpo–analito. De esta forma, un anticuerpo será más afín cuanto menor sea su constante de disociación. Por otro lado, la especificidad se define como la capacidad para interactuar de forma exclusiva con un epítipo. Un anticuerpo altamente específico suele ser deseable, ya que así se evitan posibles interferencias debidas al reconocimiento de compuestos estructuralmente relacionados al analito. No obstante, en ocasiones puede ser interesante que el anticuerpo sea capaz de interactuar con compuestos similares.⁹³

Para caracterizar los anticuerpos en función de su afinidad y especificidad se puede hacer uso de diferentes metodologías inmunoquímicas. Lo más habitual es utilizar la

propia técnica que se quiere desarrollar. De entre la gran variedad de técnicas inmunoquímicas, las más empleadas para la detección de analitos de bajo peso molecular son el método ELISA competitivo y el ensayo de flujo lateral.

1.4.1. El ELISA competitivo

El método ELISA es una técnica muy versátil que sirve para la detección de una amplia variedad de moléculas, independientemente de su tamaño, lo cual la convierte en una de las técnicas más utilizadas en el inmunodiagnóstico. Como su nombre indica se caracteriza por dos aspectos: el primero es que la señal se obtiene mediante un marcador enzimático y el segundo es que uno de los inmunorreactivos está inmovilizado sobre un soporte sólido. Atendiendo al tipo de molécula para la cual se quiera aplicar, los métodos ELISA se engloban principalmente en dos tipos, competitivos y no competitivos.

El ELISA no competitivo queda reservado habitualmente para la detección y cuantificación de analitos de mayor tamaño, como macromoléculas y/o microorganismos. Existen dos formatos de ELISA no competitivo. El primero de ellos consiste en la inmovilización del antígeno, y se utiliza principalmente para la evaluación de anticuerpos que reconocen al antígeno inmovilizado. Este formato tiene principalmente aplicaciones clínicas para la determinación de anticuerpos en el suero sanguíneo, son los denominados tests serológicos. En este caso se utiliza un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente que reconoce al primario. Por otro lado, los ELISA no competitivos más habituales son los conocidos como ELISA tipo sándwich. Su funcionamiento consiste en realizar en primer lugar la inmovilización de un anticuerpo, posteriormente se añade el analito de interés y finalmente se realiza la adición de otro anticuerpo marcado enzimáticamente que posee un paratopo diferente al primero, o incluso el mismo anticuerpo si el antígeno presenta epítomos repetidos. Por lo tanto, este tipo de ensayos no puede llevarse a cabo en el caso de moléculas de pequeño tamaño, como es el alternariol, ya que este tipo de analitos constituyen un único epítomo. El ELISA tipo sándwich es posible siempre y cuando el tamaño del analito permita la unión simultánea de al menos dos moléculas de anticuerpo.

Para determinar analitos de bajo peso molecular mediante métodos inmunoquímicos es necesario que el ensayo sea competitivo. El ELISA competitivo se fundamenta en evaluar la interacción antígeno–anticuerpo en presencia de un conjugado competidor. Como competidor se emplean conjugados proteicos, con o sin actividad enzimática, marcados covalentemente con un hapteno. En presencia de analito, se establece una competición con el conjugado hapteno–proteína por los sitios de unión del anticuerpo. La señal obtenida tras la adición del sustrato de la enzima dependerá de la proporción de analito y de conjugado que haya interactuado con el anticuerpo.

Para que el proceso de competición se produzca de una manera adecuada, la concentración de ambos reactivos (conjugado y anticuerpo) ha de ser limitante, de forma que las variaciones en la concentración de analito ocasionen diferencias significativas en la formación del complejo anticuerpo–conjugado. En ausencia total de analito, la concentración de dicho complejo será máxima, y por tanto dará lugar a la mayor señal posible, mientras que en presencia de analito se provocará el desplazamiento del conjugado del sitio de unión del anticuerpo, produciéndose un descenso progresivo de la señal a medida que aumenta su concentración. 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 detección de la interacción anticuerpo–conjugado mediante la medición de la señal generada a través de un amplio abanico de técnicas, de entre las que destacan la absorbancia, fluorescencia, electroquímica o luminiscencia. Las enzimas de marcaje que habitualmente se suelen emplear son la fosfatasa alcalina y la HRP. En particular, la HRP es capaz de catalizar la oxidación de ciertos sustratos con la ayuda de H_2O_2 . Los sustratos cromogénicos comúnmente empleados para esta enzima son la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), la *o*-fenilendiamina (OPD) y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), para dar lugar a un producto coloreado y cuantificable por absorbancia.

La representación a escala semilogarítmica de la señal generada en función de la concentración de analito da lugar a una curva decreciente, denominada curva de inhibición, de tipo sigmoidea que se suele ajustar a una función logística de cuatro parámetros (Figura 11). La señal que se obtiene en ausencia de analito es la señal máxima del ensayo ($A_{\text{máx}}$), y teóricamente corresponde a la asíntota superior de la curva de inhibición. Por otro lado, un exceso de analito provocará la inhibición total de la reacción inmunoquímica, generando una pérdida completa de la señal en ausencia de interacciones inespecíficas ($A_{\text{mín}}$). La sensibilidad de un inmunoensayo se suele estimar como la concentración de analito en el punto de inflexión de la curva, considerándose más sensible cuanto más bajo sea dicho parámetro. Tradicionalmente este valor se denomina IC_{50} , ya que coincide con la concentración de analito que inhibe al 50% la unión con el conjugado, proporcionando una disminución equivalente del valor de la $A_{\text{máx}}$, siempre y cuando el valor de la asíntota inferior ($A_{\text{mín}}$) tienda a cero. Además de los tres parámetros anteriores, la curva vendrá definida por una pendiente cuyo valor óptimo se encuentra alrededor de 1.

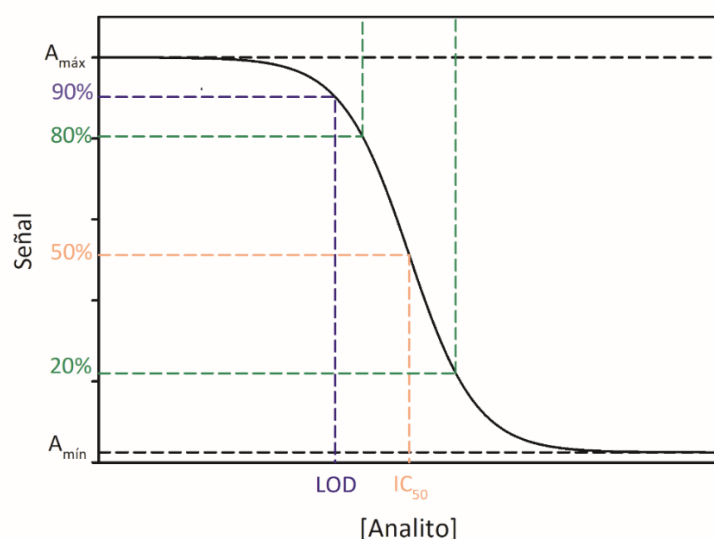


Figura 11. Representación a escala semilogarítmica de la señal generada en función de la concentración de analito.

En cuanto a los parámetros analíticos de un ELISA competitivo, habitualmente se asume que el límite de detección del inmunoensayo (LOD) es la concentración de analito que genera un 10% de inhibición de la reacción inmunoquímica (IC_{10}). Por otro lado, el rango de cuantificación, se suele definir entre las concentraciones que provocan una inhibición del 20% y 80% (IC_{20} – IC_{80}), rango donde los análisis son más precisos.

1.4.1.1. Formatos de ELISA competitivo

Existen diversas variantes posibles del ELISA competitivo. A continuación, se describen los dos formatos más típicamente utilizados. Ambos están basados en el principio de competencia, diferenciándose entre sí por la especie inmunorreactiva que está inmovilizada sobre la fase sólida (la superficie del pocillo de la placa de poliestireno) y la especie en disolución marcada con la enzima responsable de la generación de la señal.^{94,95} En este tipo de inmunoensayos, por lo general, la etapa competitiva se desarrolla hasta alcanzar el equilibrio de ambas reacciones inmunoquímicas. En todos los formatos, se incluye una etapa de lavado después de cada incubación para eliminar el exceso de inmunorreactivo, además de una etapa final de revelado en la que se adiciona el sustrato enzimático.

1.4.1.1.1. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

El formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta, también conocido como formato indirecto, se basa en el recubrimiento de los pocillos con un conjugado proteína–hapteno. A continuación, tiene lugar la etapa de competición entre el analito y el conjugado por la unión hacia el anticuerpo. En este formato el anticuerpo se encuentra en disolución, y por lo general no está marcado enzimáticamente. Dada la ausencia de un marcador enzimático en las etapas anteriores, la generación de señal se consigue indirectamente adicionando un anticuerpo secundario con actividad enzimática y con capacidad de reconocimiento del anticuerpo primario,⁹⁶ es la etapa de amplificación (Figura 12).

1.4.1.1.2. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

Este formato de ensayo se caracteriza por la inmovilización del anticuerpo sobre la superficie del soporte, generalmente mediante adsorción pasiva. Seguidamente, se adiciona el analito y el conjugado enzima–hapteno (trazador), comenzando la etapa de competición entre ambos reactivos en disolución por unirse al anticuerpo inmovilizado. En función de la afinidad del anticuerpo hacia cada uno de ellos y de sus concentraciones, se formará más o menos complejo anticuerpo–trazador. Dado que en la etapa de competición el conjugado que participa ya está marcado con la enzima, este tipo de ELISA competitivo se conoce como formato directo.

El principal inconveniente de este formato es que la adsorción del anticuerpo sobre la placa se produce de manera inespecífica; es decir, no se produce de forma orientada, lo que puede ocasionar la pérdida de paratopos disponibles y la desnaturalización parcial o total del anticuerpo. Para evitar este problema hay una variante de este tipo de ensayo conocida como ensayo directo de captura. En este formato, la inmovilización del anticuerpo primario se produce a través de la interacción con un anticuerpo secundario que reconoce al primario y que previamente ha sido inmovilizado sobre el soporte sólido. De esta manera, el anticuerpo de interés no está en contacto con la superficie de la microplaca, conservando así en mayor medida su actividad (Figura 13).

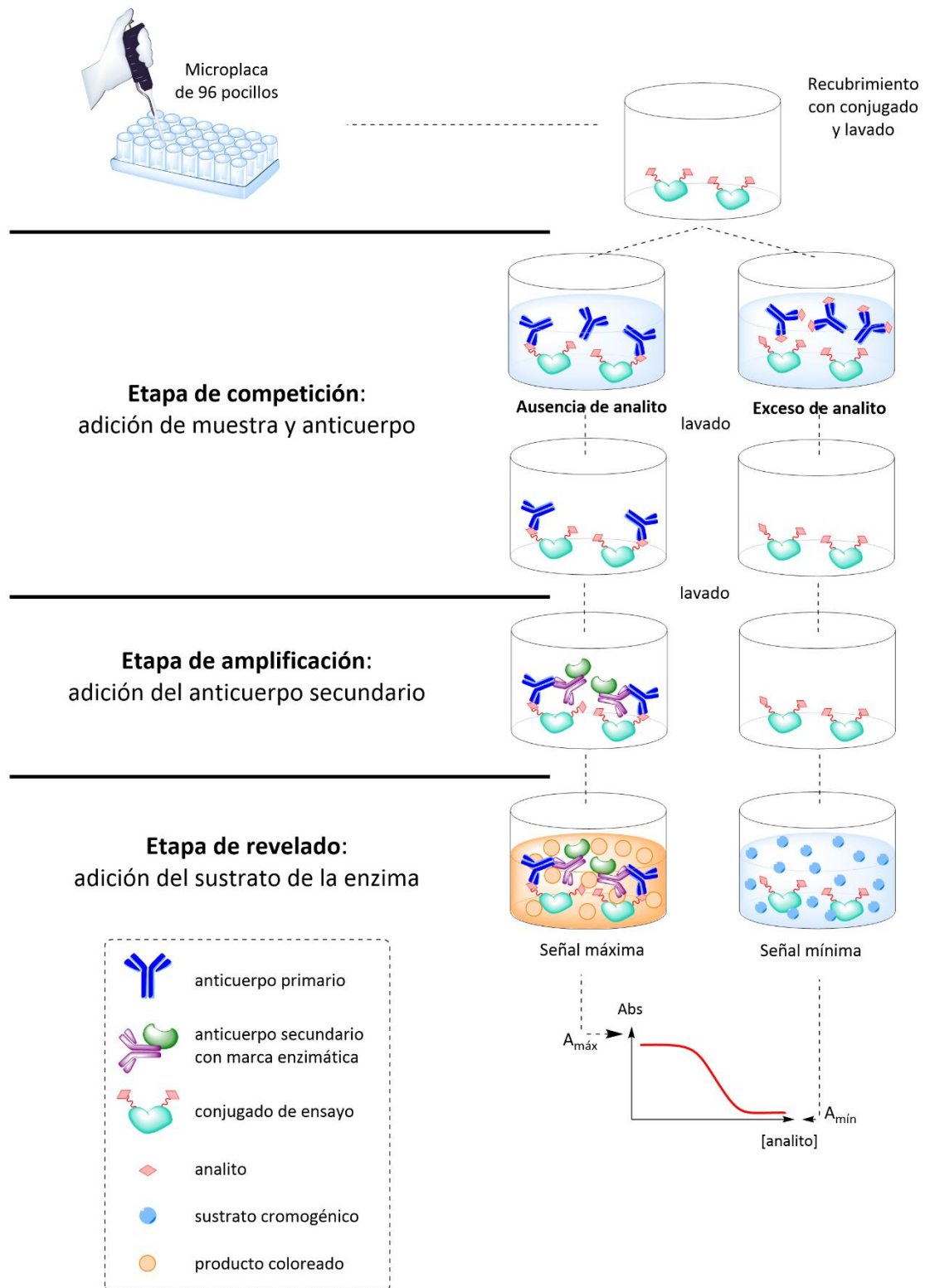


Figura 12. Representación esquemática de un ensayo competitivo ELISA de conjugado inmovilizado con detección indirecta.

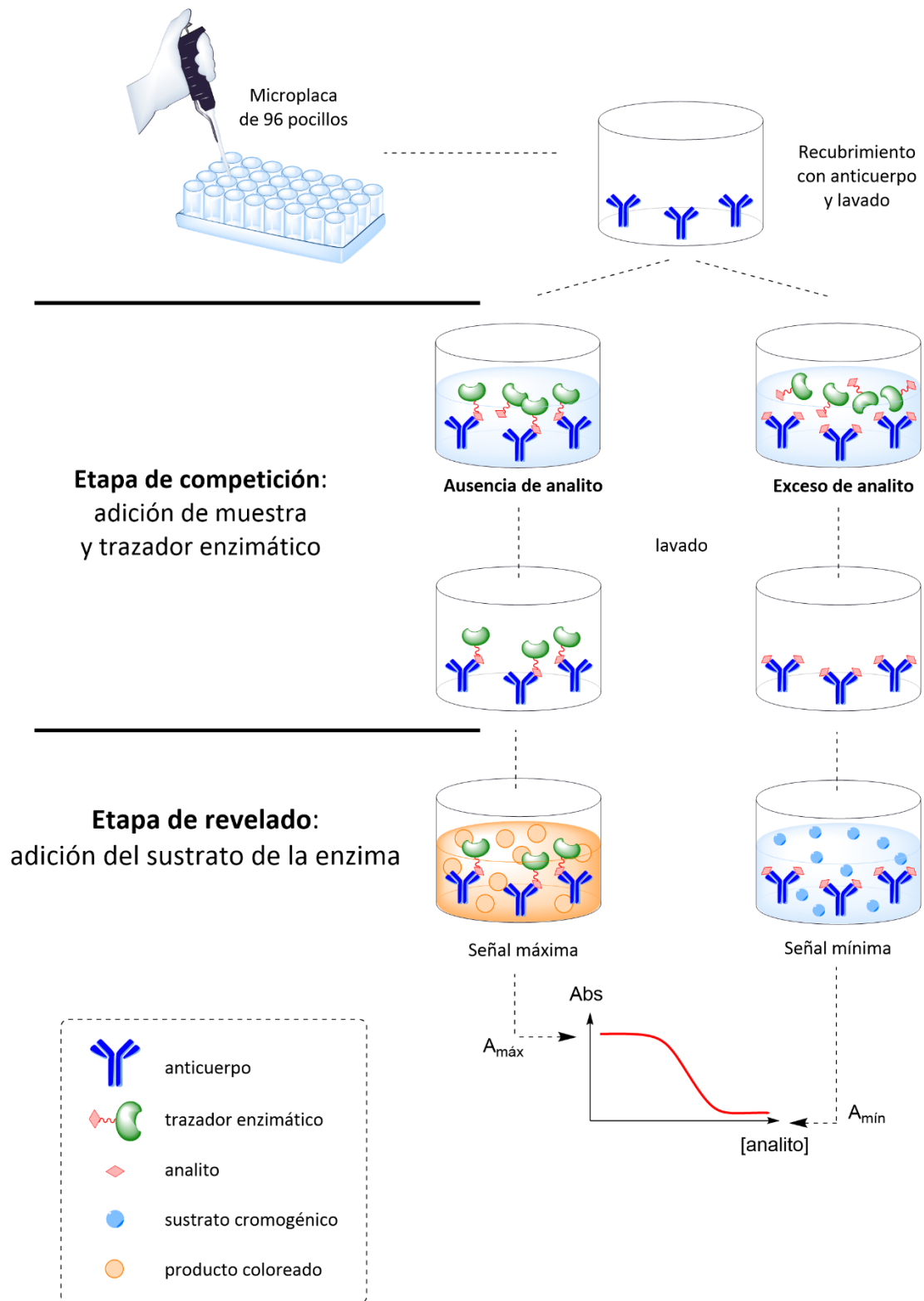


Figura 13. Representación esquemática de un ensayo ELISA competitivo de anticuerpo inmovilizado con detección directa.

1.4.2. Tiras inmunorreactivas

El ensayo por inmunocromatografía de flujo lateral (LFICA, del inglés *Lateral Flow ImmunoChromatography Assay*) representa otra variedad de métodos inmunoanalíticos de gran importancia en el campo del diagnóstico clínico y en seguridad alimentaria.⁹⁷ Este método inmunoquímico destaca por su simplicidad y rapidez, además de ser fácilmente aplicables al análisis de muestras *in situ*. No requiere etapas de lavado, lo que se traduce en mayor adaptabilidad que en el caso del ELISA, y por tanto se perfila como una técnica con gran potencial dentro del análisis de contaminantes de alimentos. Se trata de una técnica cualitativa o semicuantitativa, y puede llegar a determinar simultáneamente varios analitos.

A grandes rasgos, un dispositivo de flujo lateral se compone de cuatro elementos básicos: la almohadilla de muestra, la almohadilla de conjugado, la membrana y la almohadilla absorbente (Figura 14-A). Estos componentes se acoplan sobre un soporte plástico adhesivo para dar lugar a la tira inmunocromatográfica, que puede incluirse en el interior de un estuche de plástico, o casete, con dos aberturas destinadas a la adición de la muestra y a la visualización del resultado. Los ensayos de flujo lateral en casete suelen emplearse en posición horizontal para facilitar la migración de los inmunorreactivos por capilaridad. No obstante, la tira inmunorreactiva puede emplearse sin casete e incluso prescindiendo de la almohadilla de conjugado.⁹⁸ En este caso la cromatografía se desarrolla en vertical al introducir la tira en un vial con la muestra.

Del mismo modo que en el caso del ELISA con analitos de bajo peso molecular, los inmunoensayos de tipo LFICA también se tienen que realizar de manera competitiva. En el formato más habitual, el conjugado proteína–hapteno competidor se inmoviliza sobre la membrana, dando lugar a la línea test. La disolución que contiene la muestra con el analito junto con el anticuerpo monoclonal previamente marcado con una entidad que genera la señal – habitualmente nanopartículas coloreadas (conjugado NP–mAb) – se mueven a través de la tira por capilaridad hasta alcanzar la línea test, donde se producirá la etapa competitiva en condiciones cinéticas. La interacción del anticuerpo con el conjugado proteína–hapteno inmovilizado en la línea test dará lugar a una señal más o

menos intensa en función de la concentración de analito. En el caso de exceso de analito, el anticuerpo no podrá interactuar con el conjugado, ya que sus sitios de unión estarán bloqueados por el analito, por lo que habrá una reducción de la señal en esta zona. En caso contrario, la ausencia de analito en una muestra permitirá la unión del anticuerpo al conjugado proteína–hapteno, originando una línea coloreada. Adicionalmente, se incluye una línea control, normalmente constituida por un anticuerpo secundario capaz de reconocer al anticuerpo de ensayo. Esta línea tiene una doble función, por un lado, la de retener el conjugado NP–mAb que no haya interactuado con la línea test y, por otro lado, permite verificar que el ensayo ha funcionado correctamente. Esta configuración dará lugar a un patrón de bandas diferente en función de si la muestra contiene analito o no (Figura 14-B).

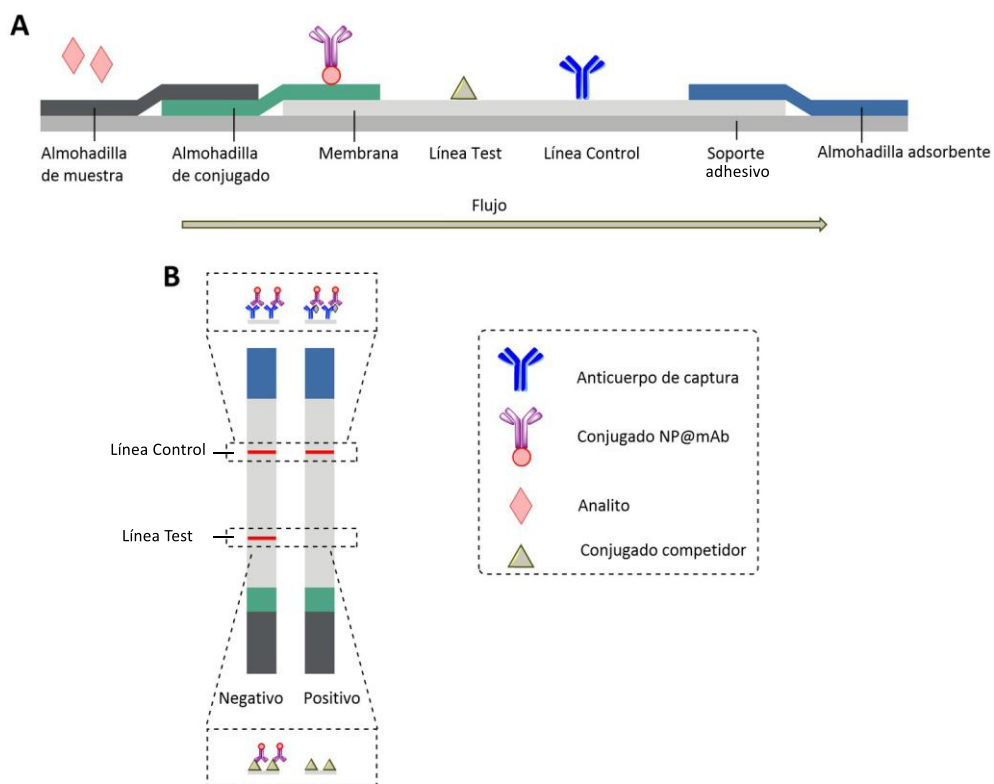


Figura 14. A) Representación esquemática transversal de los componentes de una tira inmunorreactiva. B) Representación del patrón de bandas que se puede obtener en un ensayo con una tira inmunorreactiva.

Existen distintos factores que influyen sobre la sensibilidad de este tipo de inmunoensayos, como la porosidad de la membrana, la naturaleza de la misma y el

tamaño de la nanopartícula empleada, además de la concentración del anticuerpo y su afinidad hacia el analito diana. El material seleccionado normalmente para la membrana por la que se desarrolla la cromatografía es la nitrocelulosa. Su porosidad condiciona la velocidad del flujo y por tanto en el tiempo de ensayo, de forma que un tamaño de poro mayor dará lugar a una migración de reactivos más rápida, mientras que un tamaño de poro menor dará lugar a un ensayo más lento. Al ser ensayos de carácter rápido, es necesario llegar a un triple compromiso entre el flujo, la señal y la sensibilidad. En el caso de un ensayo LFICA competitivo, una migración rápida suele resultar en una mayor sensibilidad en detrimento de la señal. Por el contrario, una migración más lenta supondrá tiempos de interacción más largos entre el conjugado NP-mAb y el conjugado proteína-hapteno presente en la línea test, lo que suele traducirse en un aumento de la señal y en un descenso de la sensibilidad. Además, existen estrategias para favorecer la interacción entre el analito y el anticuerpo, como por ejemplo el uso de una etapa de preincubación en el vial con la muestra y el conjugado NP-mAb antes de insertar la tira inmunorreactiva o la utilización de almohadillas de muestra y de conjugado con liberación lenta en el caso de utilizar casete.

Otro factor determinante en la sensibilidad de las tiras inmunorreactivas es el tamaño de la nanopartícula y el tipo de nanopartícula seleccionada para generar la señal. Por lo que respecta a su naturaleza, a lo largo de los años se han empleado una gran variedad de materiales. Algunos ejemplos de test comerciales emplean nanopartículas de oro coloidal o látex. En el ámbito de la investigación, se han utilizado de carbón, plata o selenio.⁹⁹ Otras alternativas incluyen el uso de *quantum dots*.

Las nanopartículas de oro coloidal destacan por ser las más empleadas debido a su estabilidad y variedad en cuanto a tamaño y facilidad de síntesis. Además, su color rojo intenso las hace fácilmente diferenciables, y por lo tanto detectables, del fondo blanco de nitrocelulosa. Estas nanopartículas permiten la inmovilización de biomoléculas fácilmente, fundamentalmente mediante adsorción pasiva o fisisorción. La elevada 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 grande. Además, de la misma forma que en el ELISA competitivo directo, la utilización de un anticuerpo secundario de captura permite la inmovilización

del anticuerpo de ensayo sin alterar su conformación. Un método alternativo para la unión de biomoléculas, aunque menos utilizado, es el uso de nanopartículas funcionalizadas con el fin de formar enlaces covalentes con residuos de aminoácidos del anticuerpo, en otras palabras, la quimisorción de biomoléculas.¹⁰⁰

Finalmente, la presencia o ausencia de señal en la línea test permite discernir entre una muestra negativa y otra positiva. Además, la intensidad de la línea control puede variar o no si el ensayo es dependiente o independiente de la cantidad de conjugado nanopartícula–mAb sobrante. Como resultado existen dos metodologías para la interpretación del patrón de señales obtenidos en un ensayo. La primera de ellas consiste en determinar exclusivamente el valor de la señal en la línea test (T),^{65,101} considerándose la estrategia más adecuada para lecturas visuales cuando el valor de la señal de la línea control (C) es constante. La segunda se basa en el uso de la relación entre las intensidades de T y C, es decir T/C ,¹⁰² mediante lectura instrumental. Esta aproximación es más recomendable cuando el valor de C es dependiente del valor de T, ya que posibilita un análisis más sensible y reproducible porque la señal de C aumenta significativamente con un pequeño descenso de la señal de T y porque tiene en cuenta la casuística de variaciones de señal de C entre diferentes tiras. Por último, los inmunoensayos de tipo LFICA competitivo permiten establecer un límite de detección visual (vLOD), definido como la concentración de analito mínima necesaria para que la señal T sea imperceptible al ojo humano.

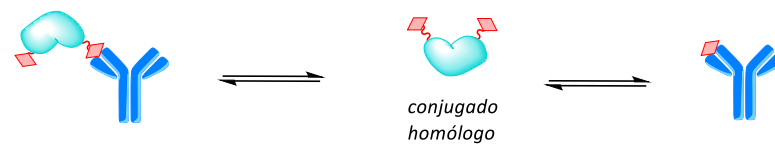
1.5. Optimización de la sensibilidad

Como se ha mencionado previamente, en un inmunoensayo competitivo el anticuerpo puede unirse a dos posibles ligandos: el analito y el conjugado. En estos ensayos el conjugado de tapizado (ELISA formato indirecto y LFICA) o el trazador enzimático (ELISA formato directo) suele estar compuesto por una proteína portadora y el mismo hapteno que forma parte del conjugado inmunizante (aquel que se inyecta al animal para obtener el anticuerpo). Dicho de otra forma, el hapteno de ensayo es el mismo con el que ha generado el anticuerpo.

Si queremos un inmunoensayo con mayor sensibilidad, se pueden modificar los equilibrios de reacción del analito con el anticuerpo y del conjugado con el anticuerpo mediante la modificación de parámetros como la concentración de inmunorreactivos, los tiempos y temperaturas de incubación de las diferentes etapas o variables fisicoquímicas como el pH y la fuerza iónica. No obstante, una de las estrategias con mayor éxito se basa en la modificación estructural del hapteno que forma parte del conjugado competidor con el fin de disminuir la afinidad del anticuerpo por el mismo. Esta estrategia se conoce con el nombre de heterología de hapteno.

Si el hapteno del conjugado es el mismo que se ha utilizado en la generación de los anticuerpos hablamos de un ensayo homólogo. Si por el contrario se emplea un conjugado con un hapteno diferente al de inmunización hablamos de un ensayo heterólogo. Dado que la afinidad del anticuerpo hacia el conjugado heterólogo es menor que hacia el homólogo, la interacción del anticuerpo con el analito se verá favorecida. De esta forma se consigue un aumento aparente de la afinidad del anticuerpo hacia el analito, lo que origina un incremento en la sensibilidad del inmunoensayo (Figura 15).

Ensayo homólogo



Ensayo heterólogo

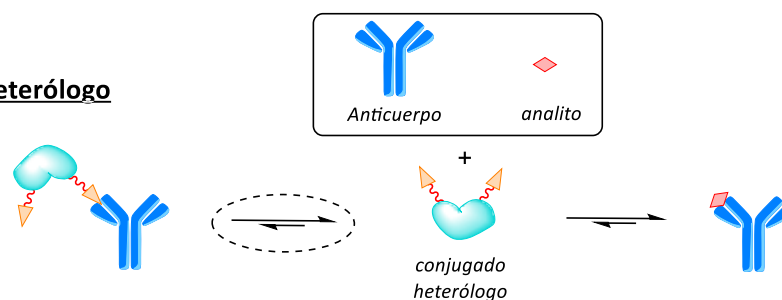


Figura 15. Desplazamiento de los equilibrios establecidos en un inmunoensayo mediante el uso de conjugados heterólogos.

El Principio de Landsteiner establece que el anticuerpo interacciona mejor y en mayor proporción con la parte del hapteno más alejada del brazo espaciador que lo une a la proteína portadora. En consecuencia, una alteración de la estructura del hapteno en la parte distal a la proteína debería afectar en gran medida a la interacción antígeno–

anticuerpo, mientras que modificaciones en posiciones más proximales deberían en principio tener una incidencia menor.

Existen diferentes tipos de heterología según el componente o sección de la estructura modificada. Estas pequeñas modificaciones pueden ser en el núcleo del hapteno que mimetiza al analito (heterología estructural), a la posición donde se incorpora el brazo espaciador (heterología de posición)¹⁰³ o en la naturaleza del brazo espaciador (heterología del brazo espaciador).¹⁰⁴ En cualquier caso, debe hacerse de forma que se reduzca la afinidad del anticuerpo por el hapteno sin llegar a perder la capacidad de interactuar con el conjugado, ya que se perdería la señal obtenida en ausencia de analito y por ende la posibilidad de llevar a cabo el inmunoensayo. A lo largo de los años, el empleo de la heterología ha demostrado poder igualar y mejorar los resultados obtenidos por los métodos cromatográficos e incluso algunos tests inmunoquímicos ya disponibles comercialmente.

1.6. Validación analítica del ensayo

Finalizado el desarrollo del inmunoensayo, el siguiente paso consiste en estudiar su aplicabilidad en muestras alimentarias (matrices) en las que potencialmente se pueda encontrar el analito. Dependiendo de la naturaleza de las muestras, frecuentemente se observan interferencias relacionadas con las mismas, lo que recibe el nombre de efecto matriz. Por ello es necesario realizar un pretratamiento de la muestra para reducir la distorsión inespecífica provocada. Para muestras líquidas e inmunoensayos con una gran sensibilidad, una dilución directa de la muestra en tampón de ensayo o agua suele ser suficiente para eliminar dichas interferencias y permitir una correcta determinación del analito. Sin embargo, si el efecto matriz de una muestra líquida es significativo, o la muestra es sólida/semisólida, se requiere un proceso de extracción, generalmente utilizando disolventes, además de una etapa de limpieza con algún agente adsorbente.

Una vez establecido el tratamiento de la muestra, es necesario determinar si los resultados obtenidos mediante el inmunoensayo desarrollado son de tipo cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo. Dicha validación se puede llevar a cabo mediante el análisis de muestras reales certificadas, en el caso de que existan. También se pueden

emplear muestras fortificadas con concentraciones conocidas del analito para determinar parámetros como la precisión, la exactitud y el límite de cuantificación, así como la concentración de cribado para los ensayos semicuantitativos. Otra alternativa es realizar una validación a través del análisis de muestras con una concentración de analito desconocida mediante inmunoensayo y mediante un método de referencia, generalmente un método cromatográfico (HPLC o GC), y la comparación estadística de los resultados obtenidos.

2. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como **objetivo principal** el estudio de estrategias de funcionalización alternativas de la micotoxina alternariol para el desarrollo de métodos inmunoquímicos que mejoren las prestaciones analíticas de los métodos previamente descritos para el análisis rápido de este contaminante en alimentos. Con esta finalidad, se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Diseño, síntesis, purificación y caracterización de haptenos inmunizantes que mantengan íntegramente la estructura y funcionalización característica de la micotoxina alternariol y que incorporen un brazo espaciador alifático carboxilado ubicado en posiciones complementarias y bien definidas de la molécula. Se pretende con ello conseguir una máxima exposición del esqueleto íntegro de alternariol al sistema inmunitario desde diferentes orientaciones.
2. Investigar la capacidad de estos nuevos inmunorreactivos para provocar una potente respuesta inmunitaria, que en última instancia permita generar una colección de anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, de alta afinidad y especificidad hacia alternariol.

3. Síntesis de una pequeña colección de haptenos heterólogos basados en la simplificación de los grupos químicos funcionales de los haptenos inmunizantes (heterología estructural).
4. Preparación de bioconjugados a través del acoplamiento covalente, vía formación de un enlace amida, de los haptenos preparados a proteínas portadoras, con o sin actividad enzimática, para uso como inmunógenos o para su aplicación en ensayo.
5. Caracterización de la afinidad y especificidad de los anticuerpos generados y evaluación de bioconjugados heterólogos para su implementación en distintos métodos inmunoquímicos.
6. Caracterización de inmunoensayos tipo ELISA competitivo y evaluación de la influencia de distintos factores fisicoquímicos sobre los parámetros de la curva de inhibición.
7. Desarrollo de tiras inmunocromatográficas empleando los anticuerpos monoclonales y los bioconjugados previamente generados.
8. Validación de los métodos inmunoanalíticos desarrollados para el análisis de alternariol en muestras de alimentos relevantes. Evaluación del efecto matriz, análisis de muestras contaminadas y comparación estadística de los resultados con un método analítico de referencia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis de haptenos

Con el fin de desarrollar un inmunoensayo para un analito de pequeño tamaño, como alternariol, es necesario la generación de anticuerpos que presenten un alto grado de afinidad y especificidad hacia el mismo. Cuando el analito no dispone de grupos funcionales adecuados para su conjugación directa a las proteínas portadoras,⁷⁶ o aún teniéndolos se quieren preservar por su potencial carácter inmunogénico, es fundamental el diseño y síntesis de análogos (haptenos) con características estructurales, estereoeléctricas y conformacionales lo más parecidas a las del analito objetivo. De este modo, lo que se persigue es presentar al sistema inmunitario del animal inmunizado un derivado funcionalizado lo más parecido posible al analito objetivo. En general, esta funcionalización viene condicionada por la introducción de un brazo espaciador en posiciones que alteren lo menos posible la integridad de la estructura y grupos funcionales del analito, lo que en muchas ocasiones implica la síntesis química total de estos análogos estructurales.

No es fácilmente predecible que posiciones del esqueleto molecular del analito son más adecuadas para la incorporación del brazo espaciador funcionalizado por el cual se lleva a cabo la conjugación a la proteína portadora, por lo que es muy habitual, a pesar del esfuerzo sintético que ello implica, la preparación de una batería de haptenos funcionalizados por distintas posiciones con variaciones no solo en la posición del brazo

espaciador sino también, en algunos casos, la modificación de la longitud y/o estructura del mismo. La experiencia demuestra que esta estrategia conduce generalmente a la generación de anticuerpos con mejores prestaciones inmunoanalíticas.^{105,106} Una ventaja adicional de la preparación de una colección de haptenos de este tipo es la posibilidad de utilizarlos como haptenos heterólogos competidores durante la optimización del inmunoensayo, lo que en muchas ocasiones ha permitido mejorar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo desarrollado.

Como se ha mencionado en la introducción, en el caso de alternariol hay descritas en la bibliografía diversas aproximaciones para la generación de anticuerpos anti-alternariol, tanto monoclonales como policlonales. En todos estos estudios, los inmunógenos utilizados para generar anticuerpos frente a alternariol se obtuvieron uniendo la micotoxina a la proteína portadora, generalmente de modo directo utilizando una reacción de condensación con formaldehído (reacción de Mannich) o, en algunos casos, por química mediada por carbodiimida tras la acilación o carboximetilación no selectiva de los grupos hidroxilo con anhídrido glutárico o un haluro alquílico carboxilado, respectivamente. Con ninguno de estos métodos puede controlarse la posición de anclaje del esqueleto molecular de alternariol a las proteínas portadoras, por lo que los anticuerpos en realidad se generaron a partir de una mezcla indefinida de haptenos funcionalizados. Más recientemente, Yao et al. publicaron un inmunoensayo para alternariol usando un hapteno carboximetilado para generar anticuerpos policlonales,⁶⁸ aunque en este trabajo no se proporcionaron detalles sintéticos ni datos espectrocópicos que permitan la caracterización del hapteno preparado.

3.1.1. Diseño y síntesis de haptenos para alternariol

Como se ha mencionado en el párrafo precedente, la generación de anticuerpos anti-alternariol se ha basado en la preparación de los inmunógenos necesarios a partir del propio alternariol, lo que no permite un control preciso sobre la posición específica de la estructura de la micotoxina en la que se introduce el brazo espaciador funcionalizado y finalmente su conjugación a la proteína portadora. En este trabajo, hemos sintetizado y caracterizado tres haptenos regioisoméricos de alternariol con un brazo espaciador funcionalizado localizado en posiciones específicas de la molécula. Nuestro objetivo era

investigar la capacidad de estos nuevos inmunorreactivos para provocar una potente respuesta inmunitaria, que en última instancia condujese a anticuerpos de elevada afinidad, así como estudiar la relación entre la posición de funcionalización en el hapteno y la especificidad de los anticuerpos resultantes.

Las estructuras de los tres haptenos inmunizantes para alternariol diseñados y sintetizados se recogen en la Figura 16. Dos de ellos, los hapteno ALa y ALb, incorporan un brazo espaciador alifático carboxilado de cinco átomos a través de los grupos hidroxilo en C-9 y C-3, respectivamente, vía la formación de un enlace C-O, mientras que el tercer hapteno, ALm, incorpora el mismo brazo espaciador a través del grupo metilo en C-1, vía un enlace C-C, lo que formalmente representa la sustitución de un enlace C-H del grupo metilo de alternariol por la cadena correspondiente al brazo espaciador.

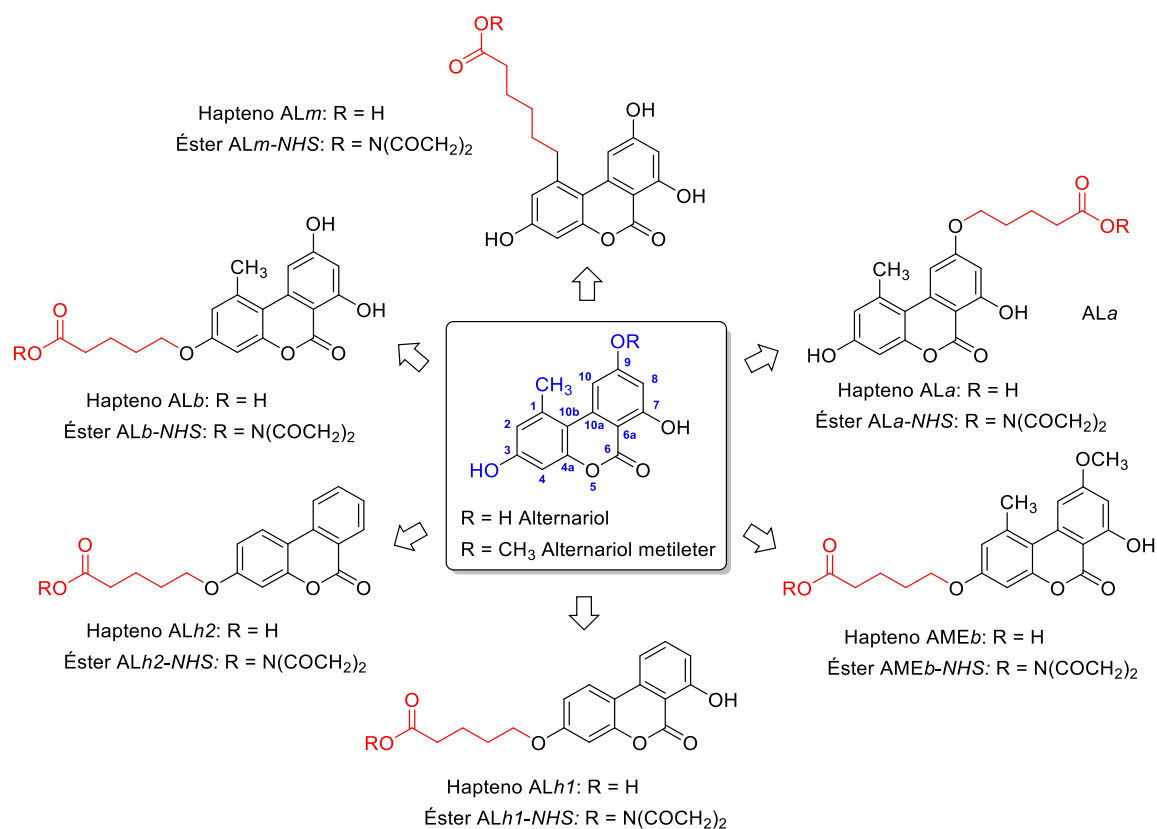


Figura 16. Estructuras de los haptenos inmunizantes y de ensayo para alternariol y los correspondientes ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo sintetizados.

Por otra parte, y de modo complementario, se ha llevado a cabo la preparación de otros tres haptenos utilizados como competidores heterólogos, los haptenos ALh1, ALh2

y AMEb (Figura 16). El diseño y preparación de estos haptenos se basa en el principio de heterología que, como se ha comentado en la introducción, permite en ocasiones mejorar la afinidad aparente de los anticuerpos generados, buscando a la vez simplificar el esfuerzo sintético que inevitablemente requiere la preparación de los haptenos inmunizantes. En este sentido, los tres haptenos de ensayo heterólogos, que solo se diferencian de los haptenos inmunizantes en el tipo de funcionalización del esqueleto de benzo[c]cumarina, se preparan fácilmente a partir de productos comerciales que ya tienen el característico sistema tricíclico de alternariol. Los haptenos ALh1 y ALh2, que pueden considerarse heterólogos estructurales del hapteno inmunizante ALb, incorporan el brazo espaciador carboxilado por el mismo grupo hidroxilo que este, *vg.* el OH en C-3, diferenciándose del mismo en la ausencia de metilación de la posición C-1 y de la hidroxilación de la posición C-9, en el caso de ALh1, y de las posiciones C-7 y C-9, en el caso de ALh2. El tercer hapteno heterólogo, AMEb, también puede considerarse un heterólogo de ALb, diferenciándose de este en la metilación del grupo hidroxilo en C-9. Se trata de un análogo de un hapteno previamente utilizado para la generación de anticuerpos para alternariol 9-metil éter.^{67,69,107}

Como se ha mencionado, todos los haptenos diseñados para alternariol tienen un brazo espaciador alifático con un grupo carboxílico en el extremo que se utiliza para conjugarlos a las proteínas y trazadores enzimáticos y preparar los bioconjugados requeridos para la producción de anticuerpos y desarrollo de los inmunoensayos. Esta conjugación se lleva a cabo vía la formación de un enlace amida del grupo carboxilo de los haptenos con los grupos amino libres de las proteínas, lo que necesariamente requiere la activación previa del grupo carboxílico, generalmente a través de su derivatización al correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo u otro tipo de éster activo.¹⁰⁸ Por lo tanto, el objetivo sintético final de este trabajo no es solo la preparación de los diferentes haptenos de alternariol mencionados en los párrafos precedentes, sino también de los correspondientes ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo (ver Figura 16). Hay que señalar que la preparación y caracterización espectroscópica de los ésteres activos, algo que no es muy habitual en el contexto de la inmunoanalítica relacionado con la preparación de bioconjugados de moléculas de pequeño tamaño, es importante desde

el punto de vista práctico ya que permite la preparación de bioconjugados con composiciones (relaciones hapteno-proteína) bien definidas.

3.1.1.1. Síntesis del hapteno ALa y el éster de N-hidroxisuccinimidilo ALa-NHS

La preparación del hapteno ALa se ha llevado a cabo por síntesis total, ya que, como habíamos comprobado previamente, la obtención del mismo a partir de alternariol por incorporación de brazo carboxilado a través de una reacción de *O*-alquilación con un haluro de alquilo conduce a una mezcla compleja de productos, una mezcla de productos de mono- y di-*O*-alquilación no selectiva de las diversas posiciones hidroxiladas junto con alternariol sin reaccionar.

La estrategia de síntesis seguida para la preparación del hapteno ALa se basa en una estrategia convergente empleada previamente por varios grupos de investigación para la preparación del esqueleto de benzo[*c*]cumarina de alternariol y otras moléculas estructuralmente relacionadas.^{13,109,24} Tal como se esquematiza en el esquema retrosintético (Figura 17), la etapa clave de la síntesis es una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por Pd(0), reacción de Suzuki-Miyaura, entre el ácido borónico **ii**, preparado a partir del 1,3-di(metoximetil)éter derivado de orcinol (**i**), y el triflato arílico **v**, preparado a partir del fenol **iv**, a su vez fácilmente obtenido a partir de la previamente descrita 1,3-benzodioxinona **iii**^{110,111} vía una reacción de *O*-alquilación con 5-bromoalcanoato de metilo (reacción de Wilkinson).

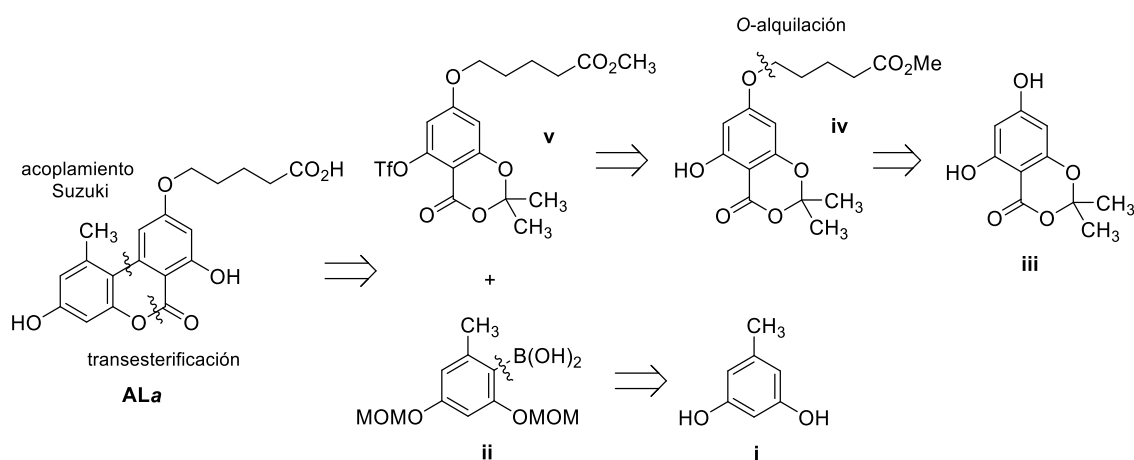
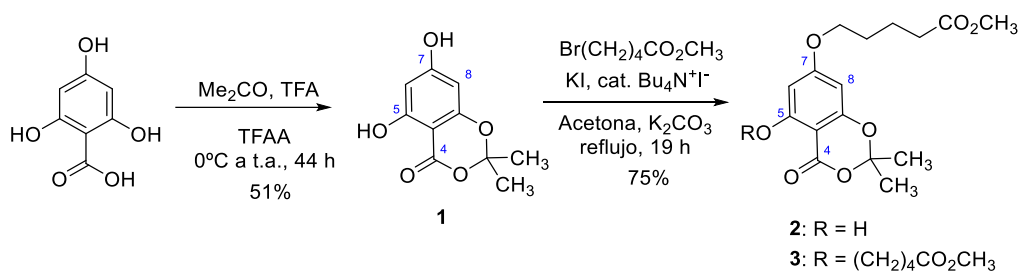


Figura 17. Análisis retrosintético del hapteno ALa.

En la práctica, la síntesis del hapteno ALa se inicia con la preparación de la 1,3-benzodioxinona **1** por condensación del ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico con acetona en presencia de ácido trifluoroacético (TFA) y anhídrido trifluoroacético (TFAA), reacción que conduce a **1**, con un rendimiento del 51% tras su purificación por cromatografía de columna (Esquema 3-1), y cuyos datos espectroscópicos son plenamente coincidentes con los descritos previamente en la bibliografía.¹¹²

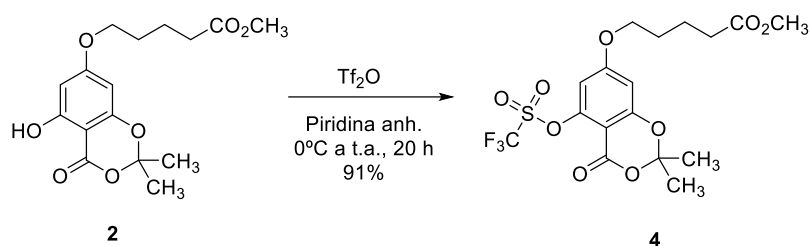


Esquema 3-1. Síntesis del fenol-éster **2**.

La incorporación del brazo espaciador por la posición hidroxilada en C-7 se realizó a través de una reacción *O*-alquilación con un ligero exceso de 5-bromovalerato de metilo en acetona a reflujo, utilizando ioduro de potasio para intercambio *in situ* de bromo por yodo, bromuro de tetrabutilamonio como catalizador y K₂CO₃ como base (Esquema 3-1). La reacción condujo a dos productos de alquilación que fueron separados por cromatografía de columna e identificados como el producto de monoalquilación por C-7, compuesto **2**, obtenido con un rendimiento del 75%, y el producto dialquilado **3**, obtenido con un rendimiento aproximado del 12%. Como resultado de la formación del producto dialquilado y dado que el agente alquilante se utilizó en solo un ligero exceso, también se aisló un pequeño porcentaje del material de partida sin reaccionar (aproximadamente 30 mg). La alquilación preferente del grupo hidroxilo menos impedido estéricamente en C-7 de **1** para dar el producto monoalquilado **2** resulta evidente del análisis de los datos espectroscópicos de este último, particularmente de RMN de ¹H y ¹³C, en los que se observa como el desplazamiento químico de los protones y carbonos del entorno de la posición alquilada C-7 experimentan un cambio mucho más significativo que los correspondientes a otras posiciones del sistema bicíclico. Especialmente significativo resulta la señal correspondiente al protón del grupo hidroxilo en C-5, que se observa fuertemente desapantallada a δ aproximadamente 10,45 ppm tanto en **1** como en **2**, y el desapantallamiento que se mantiene del carbono

carbonílico C-4 (δ aproximadamente 167 ppm en **1** y **2**) debido al puente de hidrógeno intramolecular con el grupo hidroxilo en C-5 que existe en ambos casos.

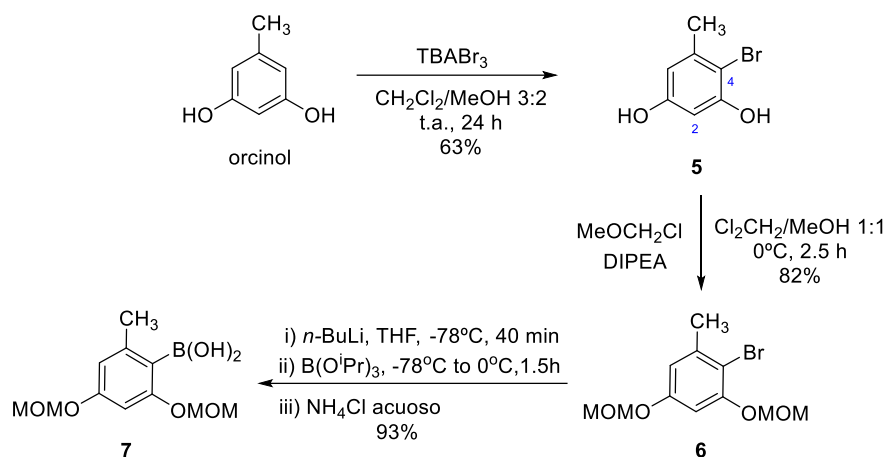
El producto de monoalquilación **2** obtenido en la etapa anterior se transformó en el triflato arílico **4**, por reacción con anhídrido triflico en piridina, inicialmente a 0 °C y luego a temperatura ambiente durante 20 h (Esquema 3-2). El rendimiento obtenido para el triflato **4** en esta reacción, después del procesado de la misma y la correspondiente purificación cromatográfica, fue del 91%.



*Esquema 3-2. Formación del triflato **4** a partir del compuesto fenólico **2**.*

La preparación del otro precursor necesario para la reacción de acoplamiento cruzado, el ácido borónico **7** (Esquema 3-3), se inicia con la reacción de bromación del orcinol monohidrato comercial. La bromación se llevó a cabo utilizando un ligero exceso de tribromuro de tetrabutilamonio (TBABr₃) como fuente de bromo en una mezcla de CH₂Cl₂ y metanol a temperatura ambiente. La reacción conduce mayoritariamente al producto de monobromación regioselectiva por la posición C-4, obteniéndose el bromuro arílico **5**, con un rendimiento del 63% una vez purificado por cromatografía, cuyas propiedades espectroscópicas coinciden plenamente con las descritas previamente para este compuesto.¹⁰⁹

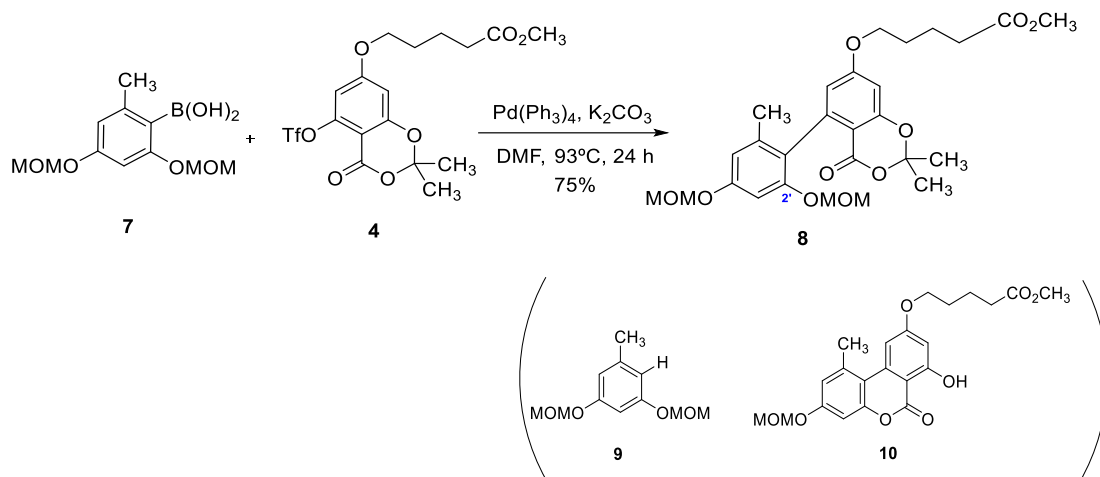
A continuación, se procedió a la protección de los grupos hidroxilo fenólicos de **5** como metoximetil éter (MOM), tratando una disolución del mismo en una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂ y CH₃CN a 0°C con un exceso de diisopropiletilamina (DIPEA) y cloruro de metoximetilo (MOMCl). De la reacción se aisló el di(metoximetil)éter **6**¹¹³ como producto mayoritario con un 82% de rendimiento (Esquema 3-3), además del producto de monoprotección del grupo hidroxilo en C-3 con un 18% de rendimiento, que pudo ser reciclado al diéter **6** por lo que el rendimiento de la reacción puede considerarse prácticamente cuantitativo.



Esquema 3-3. Preparación del ácido aril borónico **7**.

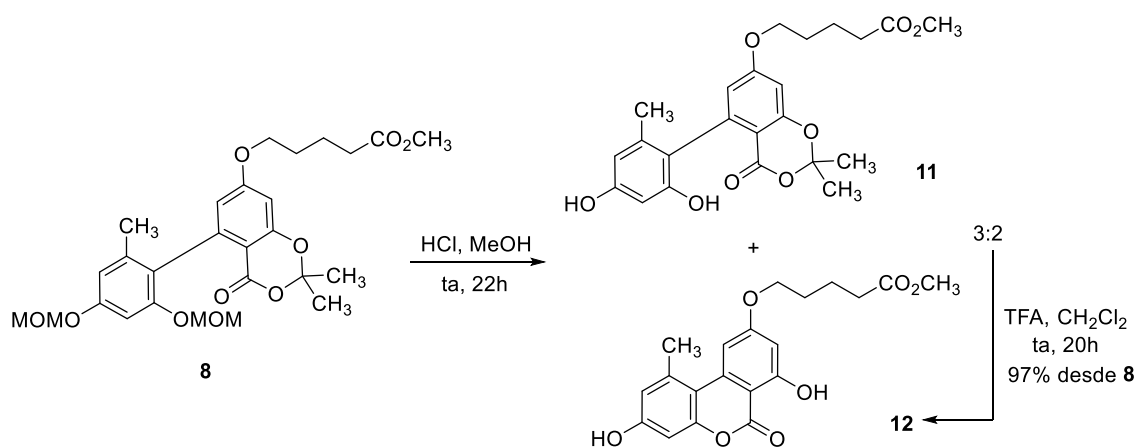
La síntesis del ácido aril borónico **7** se completó a partir del compuesto **6**, mediante un intercambio halógeno-metal, posterior reacción del organolítico intermedio con borato de triisopropilo y finalmente hidrólisis del éster borónico formado. Así pues, una disolución del bromuro de arilo **5** en THF anhidro se trató a -78°C con un equivalente de *n*-BuLi y tras 45 min se adicionó B(OiPr)_3 en exceso, dejando que la reacción alcanzase los 0°C . Tras la hidrólisis del éster borónico intermedio por tratamiento de la mezcla de reacción con una disolución saturada de cloruro amónico y posterior procesamiento de la misma, se obtuvo un crudo de reacción que analizado por RMN de ^1H mostró la elevada pureza del ácido aril borónico **7**. El rendimiento obtenido para el mismo fue del 93%. Hay que señalar que el ácido borónico se usó inmediatamente tras su preparación y sin purificación previa ya que es relativamente propenso a la protodeboronación.¹¹⁴

Una vez completada la preparación del ácido aril borónico **7** y el aril triflato **4** procedimos a su acoplamiento utilizando las condiciones de la reacción de Suzuki-Miyaura, en este caso con $\text{Pd(PPh}_3)_4$ como fuente de Pd(0), carbonato potásico como base y DMF como disolvente. La reacción procede suavemente durante 24 h a 93°C para proporcionar, tras la correspondiente purificación cromatográfica, el producto de acoplamiento cruzado, el biarilo **8**, con un rendimiento del 75%, y el producto de protodeboronación **9**, obtenido en un porcentaje variable pero siempre muy bajo, generalmente contaminado con trazas de lo que aparentemente podría ser la benzo[c]cumarina **10**, formada a partir del biarilo **8** por condensación de la función oxigenada en C-2' con la agrupación carboxilada próxima (Esquema 3-4).



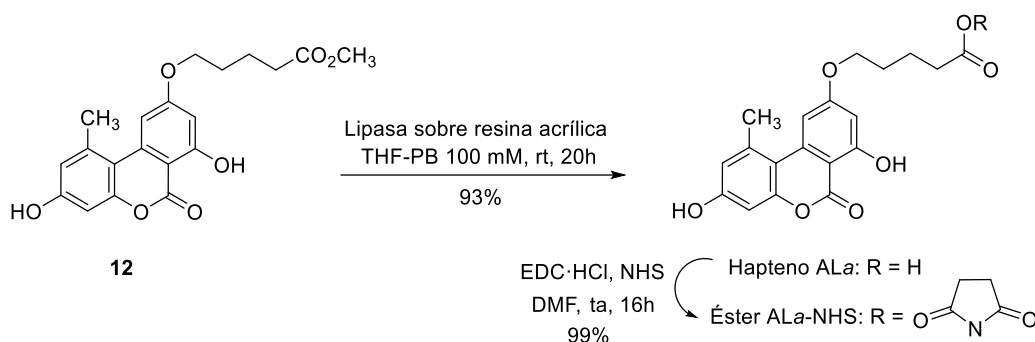
Esquema 3-4. Reacción de acoplamiento de Suzuki entre el ácido aril borónico **7** y el triflato **4**.

La finalización del esqueleto del hapteno AL α a partir del sistema de biarilo **8** se llevó a cabo con la desprotección previa de los grupos metoximetil éter, por tratamiento de este con cloruro de hidrógeno en metanol a temperatura ambiente. En estas condiciones se obtiene tras 22 h una mezcla 3:2 del derivado dihidroxilado **11** y el correspondiente producto de transesterificación intramolecular **12** (Esquema 3-5), que no fueron separados sino sometidos directamente a un posterior tratamiento ácido para completar el proceso de transesterificación, usando en este caso ácido trifluoroacético catalítico en diclorometano a temperatura ambiente. El conjunto de ambos tratamientos ácidos, que completan el esqueleto de benzo[c]cumarina se produce de forma muy eficaz para proporcionar el éster metílico del hapteno AL α con un rendimiento prácticamente cuantitativo.



Esquema 3-5. Formación del esqueleto de benzo[c]cumarina: síntesis del éster metílico del hapteno AL α .

Completar la síntesis del hapteno AL α a partir del éster metílico **12** solo requirió la hidrólisis de la agrupación metoxicarbonilo del mismo al correspondiente grupo carboxílico, hidrólisis que inicialmente se llevó a cabo en condiciones básicas suaves por tratamiento con LiOH en THF acuoso a 0 °C (Esquema 3-6). No obstante, en estas condiciones, el grupo lactónico central del núcleo de benzo[c]cumarina se abrió parcialmente (aproximadamente un 7%–10%), lo que requirió un tratamiento ácido posterior del crudo de reacción para reconstruir completamente el sistema de anillo tricíclico. Desde el punto de vista práctico, resultó más conveniente realizar esta transformación en condiciones de hidrólisis enzimática, lo que se llevó a cabo utilizando una lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en una resina acrílica en un medio acuoso tamponado a pH 7.4 con THF como codisolvente para facilitar la solubilidad del éster **12**. En estas condiciones enzimáticas, el hapteno AL α se obtuvo con una pureza muy elevada sin necesidad de purificación adicional y un rendimiento prácticamente cuantitativo. Los datos espectroscópicos del hapteno AL α abalaron inequívocamente la estructura del mismo, particularmente los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C que son completamente coincidentes con los de alternariol a excepción de los cambios esperados por la presencia de la cadena carboxilada en la posición oxigenada C–9.



Esquema 3-6. Finalización de la síntesis del hapteno AL α y su éster de *N*-hidroxisuccinimidilo.

Una vez completada la síntesis del hapteno AL α , el grupo carboxílico se activó formando el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo correspondiente, que se requería para generar los conjugados inmunogénicos y de ensayo (ver más adelante). Esta transformación se realizó en condiciones de activación convencionales, con la carbodiimida EDC y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) en DMF a temperatura ambiente, produciendo el éster de *N*-hidroxisuccinimidílico correspondiente, éster AL α -NHS, con

buen rendimiento. El éster de *N*-hidroxisuccinimido generado se caracterizó por RMN de ^1H y usó inmediatamente después de su preparación sin purificación ya que se encontró que era relativamente lábil.

3.1.1.2. Síntesis del hapteno ALb y el éster de *N*-hidroxisuccinimido ALb-NHS

El hapteno ALb se sintetizó siguiendo un procedimiento similar al del hapteno ALa, excepto que en este caso se construyó primero el núcleo tricíclico de benzo[*c*]cumarina con los grupos hidroxilo en C-7 y C-9 debidamente protegidos, intermedio **viii** (Figura 18), para poder controlar la posterior incorporación del brazo espaciador en la posición C-3 en las últimas etapas de la síntesis.

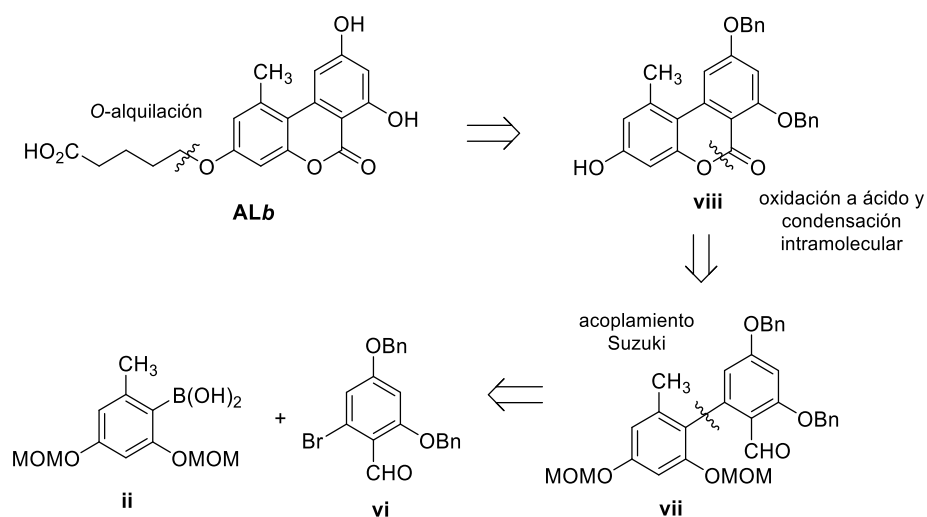
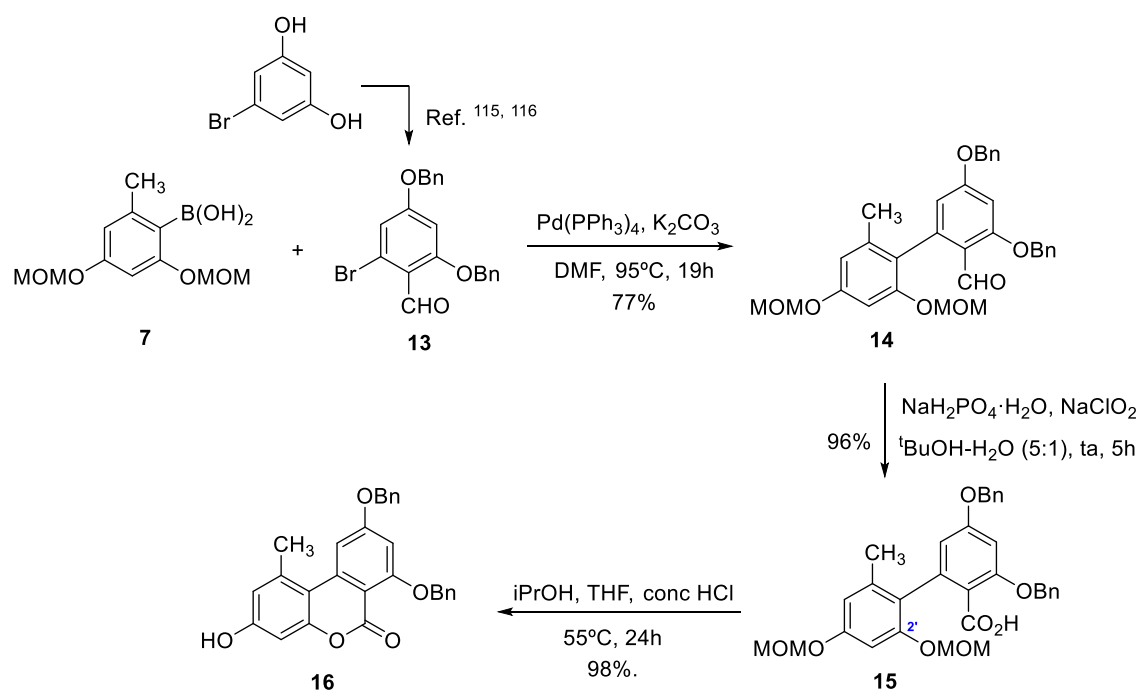


Figura 18. Análisis retrosintético del hapteno ALb.

Como se muestra en el Esquema 3-7, la síntesis del sistema tricíclico de benzo[*c*]cumarina del hapteno ALb comenzó con la reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio entre el ácido aril borónico utilizado en la síntesis del hapteno ALa, el ácido borónico **7**, y el previamente conocido bromobenzaldehído **13**.^{115,116} Este acoplamiento se realizó en condiciones similares a las empleadas anteriormente para transformar **7** y **4** en **8**, obteniéndose el bifeníl-2-carbaldehído **14** con un rendimiento del 77%, un rendimiento comparable al obtenido por Podlech y colaboradores en la reacción análoga utilizada por los mismos en la síntesis de alternariol.¹³ Hay que destacar que para que la reacción de acoplamiento se produzca con este rendimiento es necesario la utilización de un exceso del ácido aril borónico (2 equivalentes), ya que

con la utilización de cantidades más ajustadas del mismo se reduce sustancialmente el rendimiento del producto de acoplamiento.



Esquema 3-7. Síntesis del sistema tricíclico de benzo[c]cumarina del hapteno ALb.

Las siguientes etapas que permitieron completar el sistema tricíclico de benzo[c]cumarina implicaron la reacción de oxidación del grupo formilo a carboxilo, la hidrólisis de los grupos metoximetil éter y la condensación intramolecular entre el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo en C-2'. La primera de ellas se llevó a cabo utilizando una oxidación de Pinnick,¹¹⁷ mediante tratamiento del bifeníl-2-carbaldehído **14** con clorito sódico y $\text{NaH}_2\text{PO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, que genera unas condiciones ácidas suaves, en una mezcla 5:1 de $t\text{BuOH}$ y H_2O y en presencia de 2-metilbut-2-eno para atrapar el HOCl que se genera en el medio de reacción (Esquema 3-7). La reacción tiene lugar de forma bastante eficaz, tal como se comprobó por cromatografía de capa fina y por RMN de ^1H del crudo de reacción obtenido, que mostró que básicamente se trataba del ácido bifeníl-2-carboxílico esperado **15**, producto que por otro lado resultaba bastante difícil de purificar por cromatografía de columna dada su elevada polaridad. El rendimiento obtenido del ácido **15** fue del 96%.

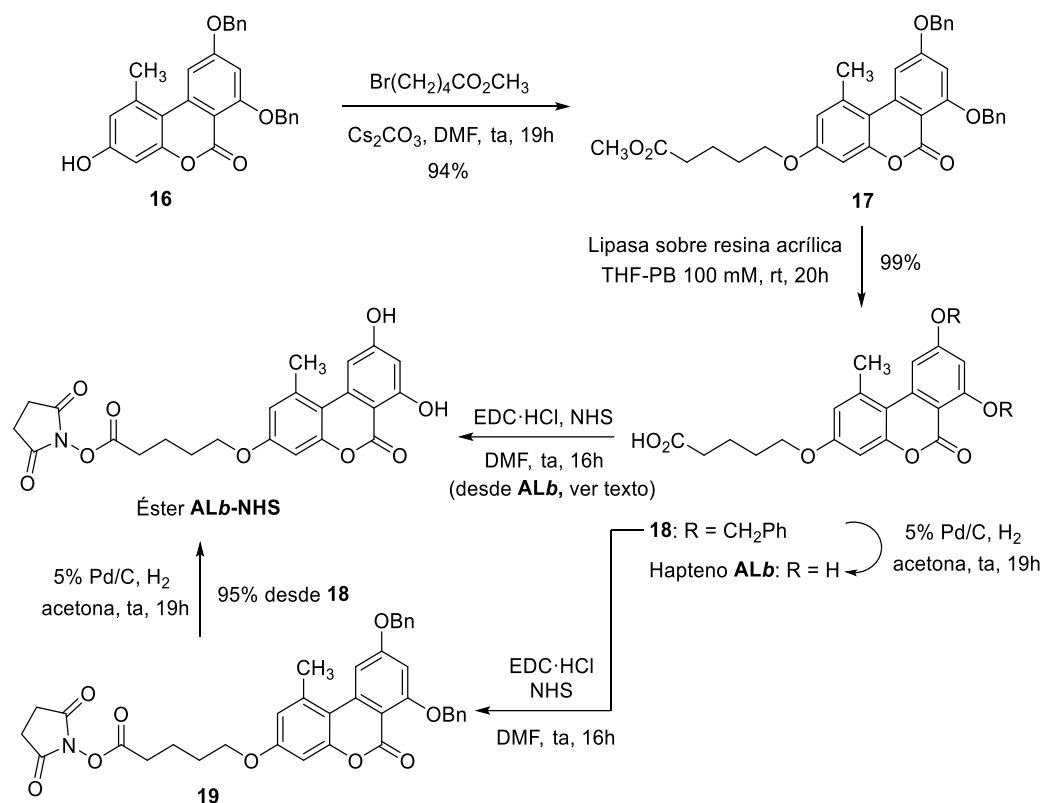
Para llevar a cabo la hidrólisis de los grupos metoximetil éter y la subsiguiente ciclación intramolecular fue necesario la utilización de condiciones algo más enérgicas

de las inicialmente previstas. Los primeros intentos de promover simultáneamente ambas reacciones se llevaron a cabo utilizando una combinación de diversas condiciones descritas en la bibliografía para promover este tipo de reacciones por separado,^{118,119,120} comprobándose finalmente que el tratamiento del ácido **15** con HCl concentrado en una mezcla de *i*PrOH y THF a 55°C durante 24 h promovía muy eficazmente tanto la hidrólisis de los grupos MOM como la posterior esterificación intramolecular, completando así la formación del sistema tricíclico. En estas condiciones se obtuvo la benzo[*c*]cumarina **16** con un rendimiento casi cuantitativo.

Una vez obtenido el sistema tricíclico de benzo[*c*]cumarina **16** se llevó a cabo la reacción de *O*-alquilación del grupo hidroxilo en C-3 con bromovalerato de metilo, incorporándose de este modo en esta posición el mismo brazo espaciador usado anteriormente en la síntesis del hapteno AL α . La reacción de *O*-alquilación se llevó a cabo en condiciones básicas relativamente suaves utilizando Cs₂CO₃ en DMF anhidra a temperatura ambiente para proporcionar el éter arílico **17** con un 94% de rendimiento (Esquema 3-8).

La síntesis del hapteno AL b se completó inicialmente en dos etapas a partir de **17**. En primer lugar, hidrólisis del éster metílico alifático presente en la cadena hidrocarbonada, usando también en este caso las condiciones enzimáticas previamente mencionadas para la hidrólisis análoga del éster metílico **12**,[†] que condujo con rendimiento prácticamente cuantitativo al correspondiente ácido carboxílico, el ácido **18** (Esquema 3-8). Seguidamente, se llevó a cabo la hidrogenólisis de los dos grupos benciloxilo de **18**, utilizando Pd al 5% sobre carbón activado como catalizador, lo que condujo al hapteno AL b , también con un rendimiento elevado.

[†] Al igual que en caso del hapteno AL α , la hidrólisis básica del éster metílico **17**, por tratamiento de este con LiOH en THF acuoso desde 0°C hasta temperatura ambiente, también promovió la apertura hidrolítica del anillo central del sistema de benzo[*c*]cumarina, aunque en este caso en un porcentaje mucho mayor (40%).



Esquema 3-8. Preparación del hapteno **ALb** y del éster **ALb-NHS** a partir de la 3-hidroxybenzo[*c*]cumarina **16**.

Una vez completada la síntesis del hapteno **ALb** se procedió a la activación del grupo carboxilo a través de la formación del correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo. Para ello, el hapteno **ALb** se trató con EDC y NHS en condiciones análogas a las utilizadas previamente para la activación del hapteno **AL α** . En principio, la reacción de activación procedió de la forma esperada, observándose por cromatografía de capa fina de la mezcla de reacción la presencia casi exclusivamente de un solo producto, correspondiente al esperado éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de **ALb**. Sin embargo, tras el procesado de la reacción y evaporación del disolvente utilizado para la extracción (CH_2Cl_2) se obtuvo un aceite incoloro, observándose en las paredes del matraz la aparición de una película transparente. La misma resultó insoluble en disolventes orgánicos, incluido DMSO, lo que nos hace suponer su naturaleza polimérica, posiblemente un poliéster formado por la reacción de esterificación intermolecular de los grupos éster activos de NHS de una molécula con los grupos hidroxilo fenólicos de otra.

En vista de los problemas observados en la reacción de activación del hapteno ALb, que reducían sensiblemente el rendimiento de esta etapa, decidimos invertir el orden de las dos últimas etapas, precediendo en primer lugar a la activación del grupo carboxilo de **18**, que mantiene los grupos hidroxilo protegidos como éteres bencílicos, para posteriormente llevar a cabo la desprotección de los mismos en condiciones neutras hidrogenolíticas. Así, en primer lugar, se procedió a la activación del grupo carboxilo de **18** con EDC y NHS en DMF, para posteriormente llevar a cabo la hidrogenólisis de los grupos benciloxilo del éster activo formado **19** utilizando las mismas condiciones utilizadas previamente para la reacción análoga de **18** (Esquema 3-8). Procediendo de esta forma se posibilita la liberación de los grupos hidroxilo fenólicos en presencia del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo en condiciones completamente neutras sin necesidad de un procesado acuoso de la reacción, simplemente se requiere una filtración para separar el catalizador sólido (5% Pd/C) y la posterior evaporación del disolvente (acetona). Al contrario de lo observado tras la activación directa del hapteno ALb, en este caso no se observó la formación de la película polimérica, obteniendo el éster ALb-NHS como un líquido incoloro con un rendimiento muy elevado. Una alícuota del mismo se separó para su caracterización espectroscópica (RMN de ^1H) y el resto se utilizó inmediatamente para la preparación de los correspondientes conjugados proteicos.

3.1.1.3. Síntesis del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo ALm-NHS

A la vista de los problemas observados en la activación directa del hapteno ALb, la síntesis del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno ALm, que incorpora un brazo espaciador carboxilado análogo al de los haptenos previamente descritos, pero a través de la posición C-1 del esqueleto de benzo[c]cumarina, se planteó desde el inicio sin pasar a través del propio hapteno, evitando realizar la activación del grupo carboxilo en presencia de los grupos hidroxilo fenólicos libres. Sobre esta base, la síntesis del éster ALm-NHS se basó la preparación inicial del esqueleto tricíclico de alternariol con las funciones hidroxílicas en C-3, C-7 y C-9 protegidas como éteres bencílicos y el grupo metilo en C-1 funcionalizado adecuadamente para posibilitar la incorporación del brazo espaciador, el intermedio **ii** (Figura 19).

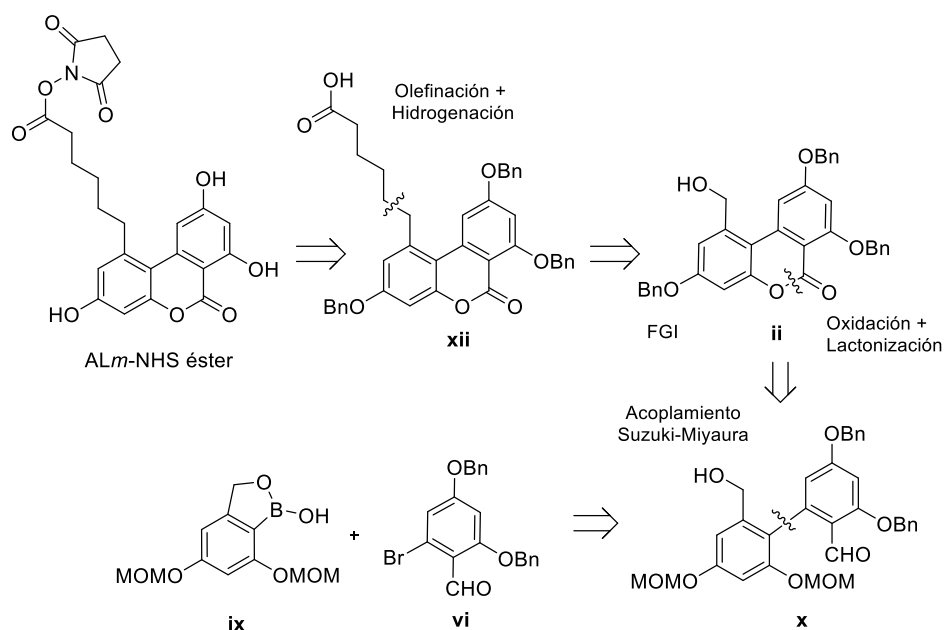
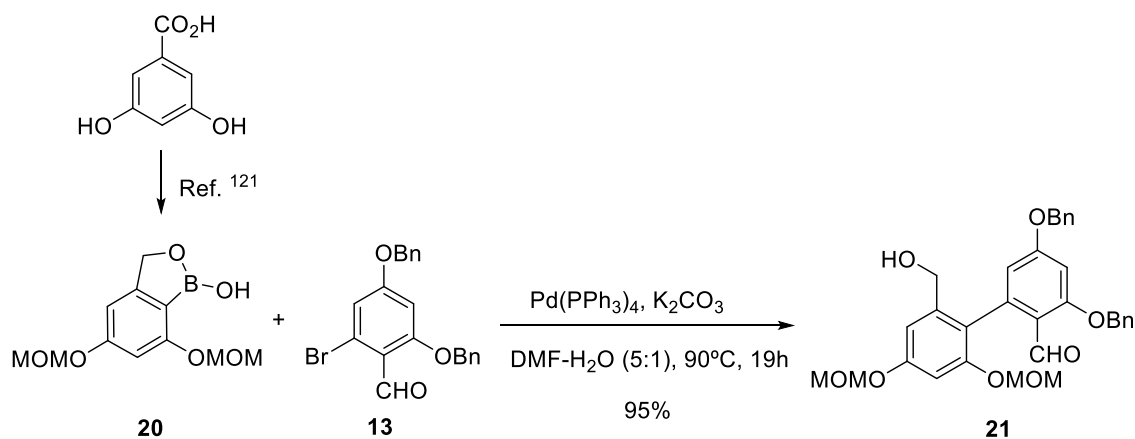


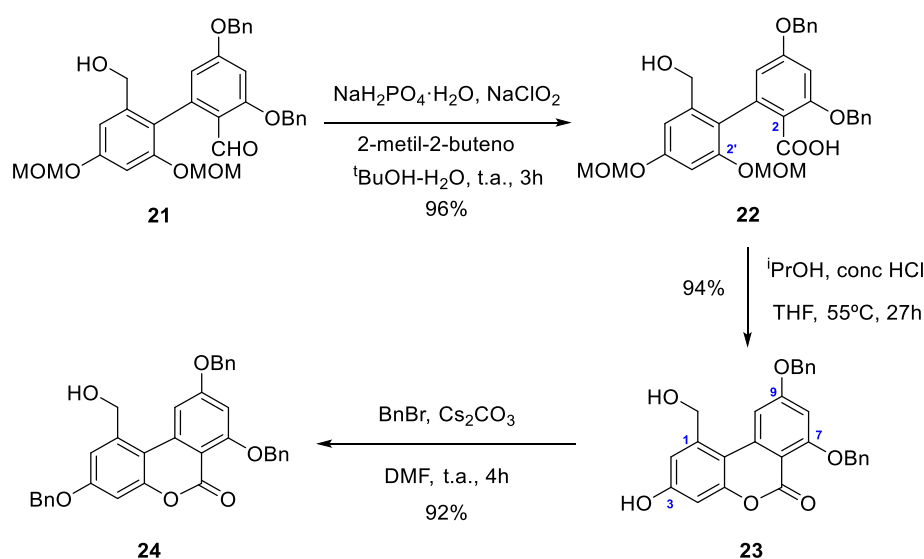
Figura 19. Análisis retrosintético del éster de N-hidroxisuccinimidilo del hapteno ALm.

A partir de mismo, que tendría bloqueados los tres grupos hidroxílicos como éteres bencílicos, se incorporaría el brazo espaciador carboxilado a través de una reacción de olefinación de Wittig, previa adecuada funcionalización de la posición de tipo bencílico, seguido de activación del grupo carboxilo y posterior hidrogenación del doble enlace generado en la reacción de olefinación con concomitante hidrogenólisis de los tres grupos benciloxilo. Como se recoge en el esquema retrosintético, el intermedio **ii** provendría del sistema biarílico **x**, obtenido a mediante una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura entre el bromuro **vi**, utilizado en la reacción análoga de la síntesis del hapteno ALb, y el previamente descrito ácido aril hemiborónico **ix**.



Esquema 3-9. Preparación del aldehído biarílico **21** vía acoplamiento de Suzuki-Miyaura.

Como se ha mencionado, la ruta sintética que conduce al éster ALm-NHS comienza con la reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki entre el bromuro arílico **13**, previamente utilizado en la síntesis del hapteno ALb, y el ácido aril hemiborónico **20**, preparado en cuatro etapas a partir del ácido comercial α -resorcílico (3,5-dihidroxibenzoico) siguiendo el procedimiento previamente descrito por Mori.¹²¹ Inicialmente, las condiciones utilizadas para esta reacción de acoplamiento fueron las mismas previamente utilizadas en las reacciones análogas de la síntesis de los haptenos ALa y ALb, Pd (0) catalítico en presencia de K_2CO_3 como base en DMF anhidra a $90^\circ C$ (Esquema 3-9). Sin embargo, el uso de estas condiciones daba como resultado un rendimiento del producto de acoplamiento, el biarilo **21**, significativamente más bajo que en los otros casos. El rendimiento del compuesto **21** mejoró notablemente cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de agua, en concreto en una mezcla 5:1 de DMF- H_2O , posiblemente debido a la hidrólisis *in situ* del ácido aril hemiborónico al correspondiente ácido aril borónico que facilita la etapa clave de transmetalación de la reacción de Suzuki. Con esta modificación, el producto de acoplamiento **21** se obtuvo con un rendimiento del 95% tras el correspondiente procesamiento de la mezcla de reacción y la purificación cromatográfica del crudo de reacción obtenido. Hay que señalar que el hidroxi-aldehído **21** existe en disolución, tal como muestran los espectros de RMN, como una mezcla aproximadamente 5:1 de las formas hidroxi-aldehídica y hemiacetálica.¹²²



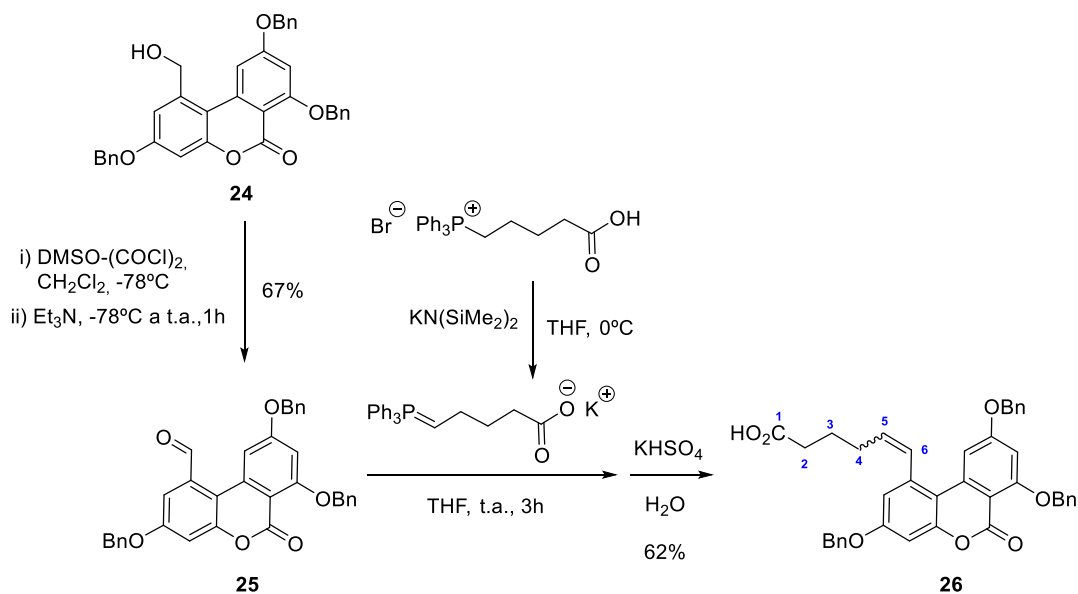
Esquema 3-10. Síntesis del esqueleto tricíclico de benzo[*c*]cumarina del hapteno ALm.

Una vez obtenido el sistema de biarilo **21**, las siguientes etapas para completar la estructura del intermedio clave de la síntesis del hapteno ALm, el compuesto **24**, implicaron reacciones conocidas, previamente utilizadas en la síntesis del hapteno ALb. En primer lugar, se procedió a la oxidación del grupo formilo en C-2 al correspondiente grupo carboxilo, seguido de una ciclación intramolecular, previa desprotección de los grupos MOM, y, por último, reprotención de la agrupación hidroxílica en C-3 como éter bencílico (Esquema 3-10).

Así, la oxidación del grupo formilo de **21** al correspondiente grupo carboxilo se llevó a cabo a mediante una reacción de Pinnick con clorito sódico y NaH₂PO₄ en una mezcla 5:1 de *t*-BuOH y H₂O en presencia de 2-metil-2-buteno. Tras el correspondiente procesado acuoso de la mezcla de reacción y la correspondiente purificación cromatográfica, se obtuvo el ácido biaril carboxílico **22** con un rendimiento del 96%. El tratamiento posterior del ácido **22** con una mezcla de ⁱPrOH/HCl en THF a 55°C durante 27 h promovió inicialmente la hidrólisis de los grupos MOMO y la subsiguiente esterificación intramolecular entre los grupos carboxilo en C-2 e hidroxilo en C-2', completando la formación del sistema bicíclico de benzo[c]cumarina para obtener, tras la correspondiente purificación cromatográfica, el compuesto **23** con un excelente rendimiento. El mismo se obtuvo como un sólido y mostró en cromatografía de capa fina las características propiedades fluorescentes del resto de compuesto obtenidos con esqueleto de benzo[c]cumarina.

Con vistas a la posterior incorporación del brazo espaciador carboxilado a partir de la agrupación hidroximetilénica en C-1, a continuación, se procedió a la protección de la función hidroxílica en C-3 como éter bencílico. La elección de este grupo como protector de este grupo hidroxilo no es casual, ya que de este modo se tendrían todos los grupos hidroxilo del sistema de benzo[c]cumarina protegidos del mismo modo y podrían ser liberados posteriormente en la última etapa de la síntesis en condiciones neutras mediante una reacción de hidrogenólisis. La reacción de derivatización del grupo hidroxilo en C-3 se llevó a cabo de modo quimiosselectivo mediante una reacción de sustitución nucleofílica con bromuro de bencilo en condiciones básicas, obteniéndose el derivado 3,7,9-tribencilado **24** con un excelente rendimiento.

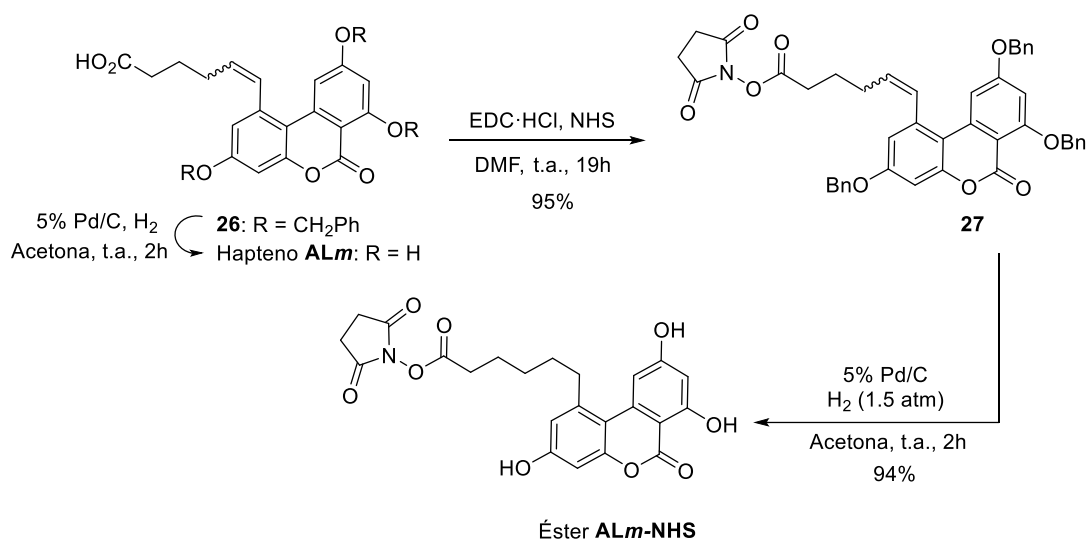
Una vez protegidos convenientemente todos los grupos hidroxilo de tipo fenólicos procedimos a la incorporación de la cadena carboxilada que constituye el brazo espaciador del hapteno ALm, para lo cual nos basamos en una reacción de olefinación de Wittig. Para ello, en primer lugar, se procedió a la oxidación de la agrupación hidroximetileno en C-1 al correspondiente grupo formilo, oxidación que se llevó a cabo en condiciones suaves mediante una reacción de oxidación de Swern (Esquema 3-11). Para ello, se activó inicialmente el DMSO con cloruro de oxalilo en CH₂Cl₂ a baja temperatura para generar el reactivo cloruro de cloro(dimetil)sulfonio que reacciona a baja temperatura con el grupo hidroxilo de **23** para originar el correspondiente catión alcoxisulfonio intermedio, que tras el posterior tratamiento con un exceso de base (Et₃N) descompone, vía un iluro, al deseado compuesto carbonílico.¹²³ El aldehído **25** se obtuvo de este modo, después de un simple proceso de purificación por columna cromatográfica, con un rendimiento del 67%.



Esquema 3-11. Introducción del brazo espaciador a través de una olefinación de Wittig.

Tal y como se ha comentado previamente, una vez disponible el aldehído **25** se podía abordar la incorporación del brazo espaciador por medio de una reacción de olefinación de Wittig. Esta reacción permite la transformación selectiva del grupo carbonilo aldehídico en un alqueno mediante la formación de un enlace C=C por medio de su reacción con un iluro de fósforo. Para ello, se requiere la generación *in situ* del iluro adecuado y su posterior reacción con el grupo carbonilo. Las condiciones utilizadas para

esta transformación se basaron en el trabajo previo de Hiroyuki *et al.*¹²⁴ que genera el iluro requerido por tratamiento del comercialmente disponible bromuro de (4-carboxibutil)trifenilfosfonio con 2 equivalentes de la base *bis*(trimetilsilil)amiduro potásico. La reacción del iluro generado de esta forma con el aldehído **25** transcurre suavemente a temperatura ambiente, proporcionando el alqueno **26**, como una mezcla aproximadamente 9:1 de los isómeros *cis* y *trans* del doble enlace, con un rendimiento después de la purificación cromatográfica de aproximadamente el 62%. La esperada formación mayoritaria del doble enlace *cis* en la reacción de Wittig se determina inequívocamente a partir de la integración de las señales correspondientes a los dos protones olefínicos, H-5 y H-6, de cada uno de los isómeros en el espectro de RMN de ¹H de **26**, que se observan a δ 6,84 (H-6, d, $J = 15,5$ Hz) y δ 6,08 (H-5, d, $J = 15,5$ y 6,9 Hz) para el isómero minoritario *trans* y δ 6,66 (H-6, dt, $J = 11,3$ Hz) y δ 5,71 (H-5, dt, $J = 11,3$ y 7,4 Hz) para el isómero mayoritario *cis*.



Esquema 3-12. Finalización de la síntesis del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno **ALm**

Llegados a este punto, la finalización de la síntesis del éster activo del hapteno **ALm** podría efectuarse vía hidrogenación del doble enlace e hidrogenólisis de los grupos benziloxilo de **26**, reacciones que, en principio podrían efectuarse en una única etapa, y posterior activación del grupo carboxilo. Sin embargo, y tal como se ha comentado al inicio de este apartado basándose en lo observado previamente en los intentos de activación directa del hapteno **ALb**, en primer lugar, se procedió a la activación del grupo carboxilo, dejando para la última etapa las reacciones de hidrogenación del doble enlace

y desprotección de los grupos hidroxilo. Con esta finalidad, se trató el ácido carboxílico **26** en las condiciones habituales de activación con EDC y NHS en DMF para obtener el correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, el compuesto **27**, con un 95% de rendimiento (Esquema 3-12). Finalmente, el éster activo **27**, sin necesidad de purificación cromatográfica, se trató con hidrógeno en acetona en presencia de Pd/C al 5% durante 2 h, condiciones en las que se produjo completamente tanto la hidrogenación del doble enlace como la hidrogenólisis de los tres grupos benciloxilo, completando de este modo la síntesis de éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno ALm con un excelente rendimiento global para las dos últimas transformaciones. El éster ALm-NHS, obtenido de este modo como un semisólido blanco, se caracterizó por RMN de ^1H y se utilizó inmediatamente para la preparación de los correspondientes conjugados.

3.1.1.4. Síntesis del hapteno heterólogo ALh1 y el éster ALh1-NHS

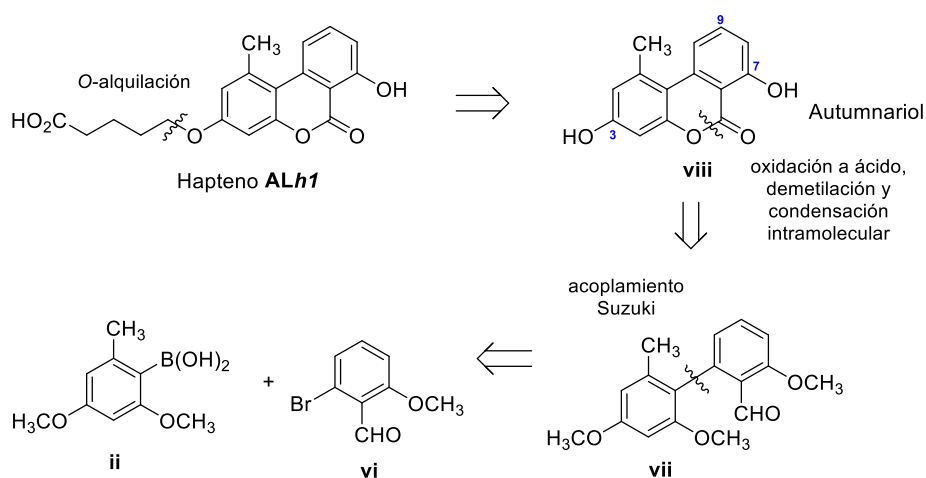


Figura 20. Análisis retrosintético para la preparación del hapteno heterólogo ALh1.

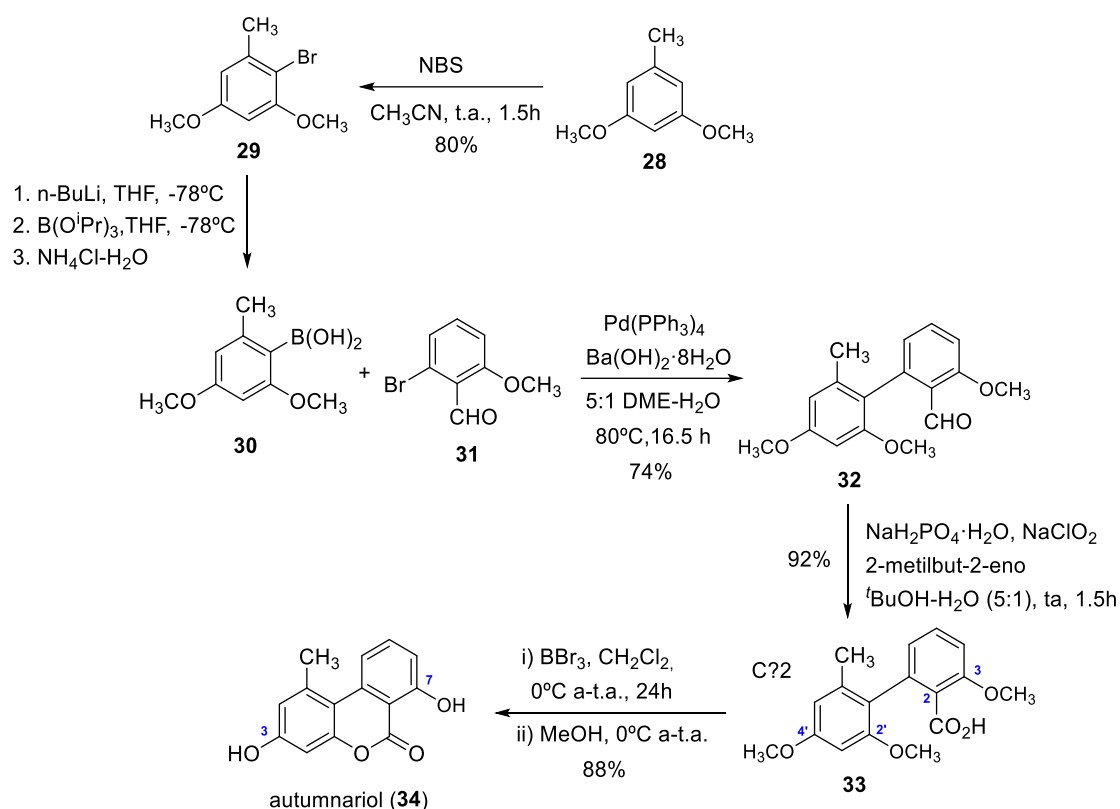
La estrategia sintética utilizada para la síntesis del hapteno heterólogo ALh1 se basa en la preparación inicial de autumnariol (viii), un producto natural análogo de alternariol del que se diferencia por la ausencia en el mismo de la agrupación hidroxílica en C-9 (Figura 20). A partir de este intermedio se puede incorporar fácilmente el brazo espaciador carboxilado requerido mediante una reacción de *O*-alquilación del grupo hidroxilo en C-3, de forma análoga a como se realiza en la síntesis del hapteno ALb. La

síntesis del propio autumnariol se basa en la síntesis total de alternariol de Koch previamente mencionada.¹³ Como en la síntesis de los haptenos previamente obtenidos, la etapa clave para la construcción del sistema tricíclico de benzo[c]cumarina es una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura, en este caso entre el conocido ácido borónico **ii** y bromo-benzaldehído **vi**. El resto de etapas para completar la síntesis de autumnariol a partir del sistema de biaril benzaldehído obtenido, **vii**, serían también análogas a las utilizadas en las síntesis de los haptenos previamente sintetizados

Así pues, la síntesis de ALh1 comenzó con la preparación del ácido borónico requerido para el acoplamiento cruzado, el ácido 2,4-dimetoxi-6-metilfenilborónico (**30**) (Esquema 3-13). El ácido borónico **30** se preparó en un proceso “one-pot” a partir del bromuro **29**, preparado a su vez por bromación regioselectiva del 3,5-dimetoxitolueno (**28**),^{125,126} mediante reacción de intercambio de bromo por litio con BuLi, reacción del organolitio intermedio con borato de triisopropilo [B(OⁱPr)₃] e hidrólisis del aril boronato de diisopropilo formado con cloruro amónico acuoso. El ácido borónico **30**, obtenido con un 76% de rendimiento tras el procesado de la reacción, se utilizó inmediatamente a su preparación en la siguiente etapa de acoplamiento cruzado. Una alícuota del mismo se utilizó para su caracterización mediante espectrometría de masas y espectroscopia de infrarrojo, en el que destacan las tres bandas características de ácido borónico: una banda ancha desdoblada a 3230 cm⁻¹ asociada a la tensión del enlace H–O; otra intensa a 1300 cm⁻¹ correspondiente a la tensión B–O; y finalmente una banda desdoblada a 807 cm⁻¹ de tensión de enlace B–C.

El ácido borónico **30** recién preparado se acopló covalentemente con 2-bromo-6-metoxibenzaldehído (**31**) mediante una reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura utilizando inicialmente *tetrakis*(trifenilfosfina)paladio(0) [Pd(PPh₃)₄] como catalizador, K₂CO₃ como base y DMF como disolvente a 90°C. En estas condiciones se obtuvo el esperado bifenil carbaldehído **32** con un rendimiento de solo el 25%, un rendimiento muy bajo que atribuimos al elevado porcentaje de producto de protodeboronación del ácido borónico formado, una reacción secundaria que es particularmente relevante en ácidos aril borónicos *orto*-sustituídos.¹²⁷ Dado el bajo rendimiento obtenido en estas condiciones para la reacción de acoplamiento cruzado, exploramos otras condiciones alternativas para esta reacción. Un detallado examen de la bibliografía mostró que el

mismo ácido borónico había sido empleado previamente con muy buenos resultados por Watanabe¹²⁸ y Bringmann²¹ en reacciones de acoplamiento cruzado con diversos bromuros arílicos, incluso con elevado impedimento estérico, utilizando Pd(PPh₃)₄ como catalizador y Ba(OH)₂·8H₂O como base en una mezcla 5:1 de 1,2-dimetoxietano y H₂O a 80°C. En estas condiciones y utilizando un exceso de ácido borónico respecto del bromuro arílico, la reacción de acoplamiento cruzado transcurrió con bastante eficacia, obteniéndose el bifenil carbaldehído **32** con un rendimiento del 74% tras la correspondiente purificación cromatográfica (Esquema 3-13). La estructura del sistema de biarilo formado se confirmó mediante un detallado estudio espectroscópico que incluyó RMN de ¹H y ¹³C así como HSQC y HBMC (ver parte experimental).



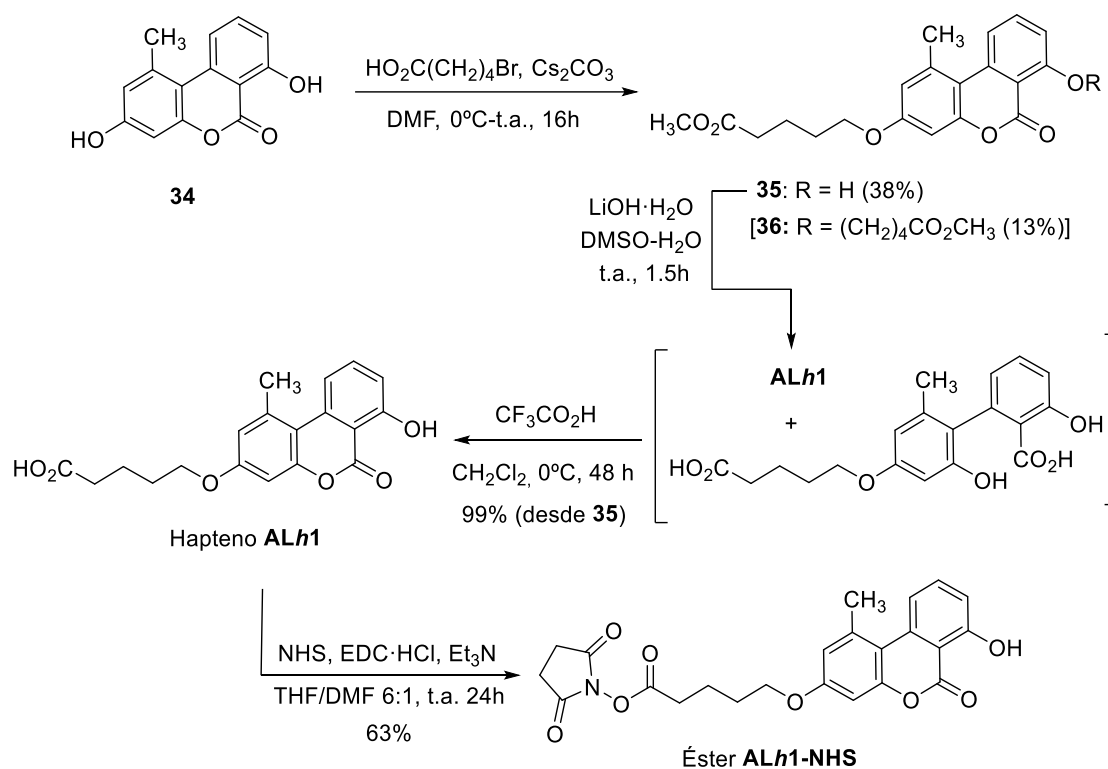
Esquema 3-13. Síntesis de autumnariol (**34**), intermedio clave de la síntesis del hapteno ALh1

Para completar la construcción del sistema tricíclico de benzo[*c*]cumarina se procedió inicialmente a la oxidación del grupo formilo a carboxilo, para lo que se emplearon las condiciones de oxidación de Pinnick previamente utilizadas en las reacciones análogas implicadas en la preparación de los otros haptenos.¹²⁹ Así, la oxidación de **32** con clorito sódico y NaH₂PO₄·H₂O en una mezcla 5:1 de *tert*-butanol-H₂O y 2-metil-2-buteno a temperatura ambiente condujo al ácido biarilcarboxílico **33**,

obtenido como un sólido cristalino incoloro con un rendimiento del 92%. Dada la gran polaridad del ácido **33** y la elevada pureza que mostraba por RMN de ^1H , el crudo de reacción obtenido no fue cromatografiado y se utilizó directamente en la siguiente etapa sintética. Esta se llevó a cabo mediante tratamiento del derivado trimetoxilado **33** con un exceso de una disolución 1M de BBr_3 en diclorometano a $0\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. En estas condiciones se produce inicialmente la desmetilación de las tres agrupaciones metoxiladas en C-3, C-2' y C-4', para a continuación producirse la esterificación intramolecular del grupo hidroxilo fenólico generado en C-2' con el grupo carboxilo próximo en C-2, posiblemente a través del anhídrido mixto carboxílico-bórico generado tras el tratamiento de la mezcla de reacción con metanol anhidro. La reacción conduce directamente a autumnariol (**34**) con un rendimiento del 88%, cuyo espectro de RMN de ^1H mostraba una elevada pureza, observándose exclusivamente como contaminantes trazas de autumnariol 3-*O*-monometilado y 3,7-*O*-dimetilado. Tanto el espectro de RMN de ^1H como el resto de propiedades espectroscópicas de **34** coinciden plenamente con las descritas previamente para el producto natural autumnariol.¹³⁰

Una vez completado el esqueleto tricíclico del hapteno *ALh1* se abordó la incorporación del brazo espaciador carboxilado por la posición hidroxilada en C-3. Para ello, se hizo reaccionar **34** con 5-bromovalorato de metilo en DMF y Cs_2CO_3 , un procedimiento de *O*-alquilación similar al utilizado en la síntesis del hapteno *ALb* (Esquema 3-14). En estas condiciones la reacción de *O*-alquilación condujo a una mezcla de los productos de mono- y dialquilación, los compuestos **35** y **36** respectivamente, fácilmente separados por cromatografía de columna y caracterizados espectroscópicamente. El producto *O*-alquilado mayoritario **35** se obtuvo con un rendimiento del 38%, mientras que el producto *O*-dialquilado **36** se obtuvo con un rendimiento del 13%. Al igual que lo observado en la mono-*O*-alquilación del difenol **1** (ver página 82), la alquilación preferente del grupo hidroxilo menos impedido estéricamente en C-3 de **34** resulta evidente del análisis de los datos espectroscópicos del producto mono-*O*-alquilado **35**, particularmente del espectro de RMN de ^1H en el que se mantiene la señal asociada al protón del grupo hidroxilo en C-7, que tanto en **34** como **35** aparece como un singlete fuertemente desapantallado por la formación de un

enlace por puente de hidrógeno intramolecular con el oxígeno carbonílico en C-6 (11.61 y 11.73 ppm en los espectros de **34** y **35**, respectivamente).



Esquema 3-14. Finalización de la síntesis del hapteno ALh1 y el éster de N-hidroxisuccinimidilo ALh1-NHS a partir de autumnariol

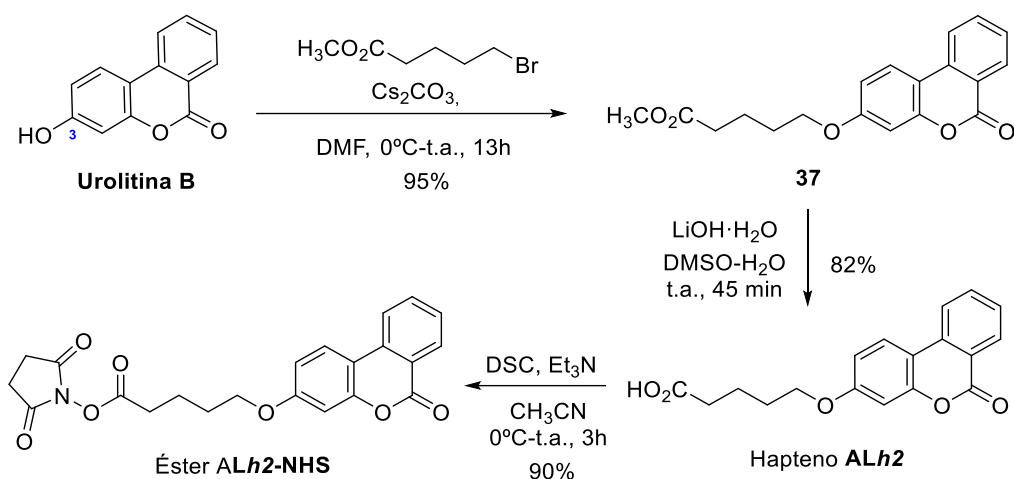
Para finalizar la síntesis del hapteno ALh1 con el grupo carboxílico se procedió a hidrolizar el éster metílico **35**. Se optó por una hidrólisis básica empleando LiOH·H₂O en una mezcla 2:1 de DMSO y agua. El uso de esta mezcla, en lugar de la más habitual de THF y agua, se debe a la baja solubilidad de reactivos y productos formados en esta última. En estas condiciones, tras 1.5 h de reacción a temperatura ambiente se observó la total hidrólisis del grupo metoxicarbonilo, pero también la apertura parcial (aproximadamente 80%) de la agrupación lactónica. No obstante, la apertura del sistema de benzo[*c*]cumarina se revertió completamente por tratamiento del crudo obtenido tras el procesamiento de la reacción de hidrólisis con ácido trifluoroacético en diclorometano a 0 °C durante 48 h, lo que condujo al hapteno ALh1, obtenido como blanco amorfo muy polar en cromatografía de capa fina y naturaleza fluorescente, con un rendimiento prácticamente cuantitativo desde el éster metílico **35**. A falta de optimizar alguna de las transformaciones implicadas, el hapteno ALh1 se obtuvo a partir de 3,5-dimetoxitolueno en siete etapas sintéticas con un rendimiento global del 14 %.

Una vez completada la preparación del hapteno ALh1 se procedió a la activación del grupo carboxilo a través de la formación del correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo. La misma se efectuó en este caso utilizando EDC y NHS en una mezcla 6:1 de THF y DMF, y en presencia de trietilamina. La reacción de activación se produce con un rendimiento moderado para proporcionar el éster ALh1-NHS que, al igual que el resto de ésteres activos preparados, se utilizó inmediatamente tras su obtención para preparación de los correspondientes conjugados.

3.1.1.5. Síntesis del hapteno ALh2 y el éster ALh2-NHS

La síntesis del hapteno ALh2 parte de un producto comercial con esqueleto de benzo[c]cumarina y un único grupo hidroxilo en la posición C-3, la urolitina B, por lo que solo se requiere la introducción del brazo espaciador carboxilado a través de una reacción de *O*-alquilación del único grupo hidroxilo (Esquema 3-15). La reacción de alquilación de la urolitina B con 5-bromovalerato de metilo, en condiciones análogas a las utilizadas previamente en este trabajo en la síntesis de otros haptenos (ver Esquema 3-15), transcurre de forma muy eficaz para proporcionar el producto *O*-alquilado **37** con un 95% de rendimiento y prácticamente puro tras el procesado de la mezcla de reacción. La síntesis del hapteno ALh2 se completó a partir del éster metílico **37** mediante hidrólisis básica con LiOH en una mezcla de DMSO y agua. En contraste con lo observado previamente en la hidrólisis básica de otros ésteres metílicos estructuralmente relacionados, en este caso no se produce apertura significativa de la agrupación lactónica, obteniéndose, tras 45 min a temperatura ambiente y procesado ácido de la mezcla de reacción, el hapteno ALh2 como un sólido amorfo con un rendimiento del 82%.

Una vez completada la preparación del hapteno ALh2 se procedió a su activación vía la formación del correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, una transformación que en este caso está facilitada por la ausencia de agrupaciones hidroxílicas adicionales a la propia del grupo carboxilo. En este caso, la formación del éster activo se llevó a cabo utilizando carbonato de *N,N*-disuccinimidilo (DSC) y Et₃N en acetonitrilo como disolvente, condiciones en las que se obtuvo el deseado éster de *N*-hidrosuccinimidilo ALh2-NHS con muy buen rendimiento.



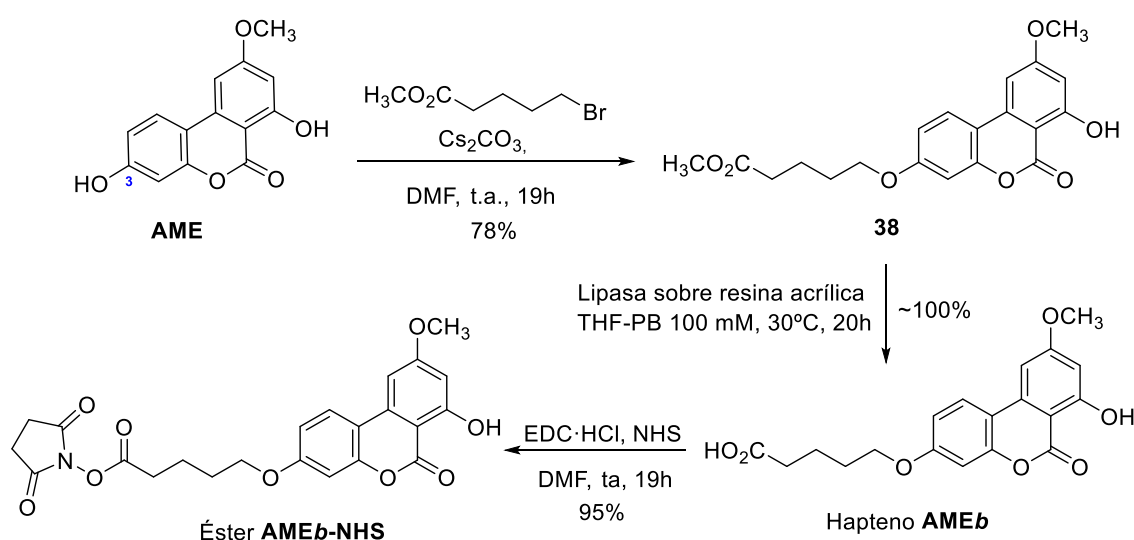
Esquema 3-15. Síntesis del hapteno heterólogo **ALh2** a partir de urolitina B.

3.1.1.6. Síntesis de hapteno AMEb y el éster AMEb-NHS

La síntesis del hapteno AMEb es análoga a la síntesis del hapteno ALh2, y como en este implica una reacción de O-alkilación de alternariol 9-metil éter con 5-bromovalerato de metilo y posterior hidrólisis del grupo éster (Esquema 3-16). La reacción de O-alkilación se produce mayoritariamente por la posición hidroxílica en C-3, aunque la formación de cierta cantidad del producto de alquilación por C-7 reduce sensiblemente el rendimiento del producto formado, el éster **38**, con respecto al obtenido en la reacción análoga de la síntesis del hapteno ALh2. Para realizar la hidrólisis del grupo metoxicarbonilo de **38** se optó por utilizar el mismo procedimiento enzimático previamente utilizado en la síntesis de los haptenos ALa y ALb. Así, el tratamiento del éster metílico **38** con lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en resina acrílica en una mezcla de tampón fosfato y THF a 30°C condujo de forma prácticamente cuantitativa al hapteno AMEb, cuyas propiedades espectroscópicas son coincidentes con las del hapteno análogo previamente preparado por Man,⁶⁹ a excepción de las pequeñas diferencias atribuibles a la diferente longitud del brazo espaciador utilizado en cada caso, un brazo espaciador de 5 átomos de carbono en el caso del hapteno AMEb frente al de 4 átomos de carbono del hapteno anteriormente preparado por Man. El rendimiento global de la síntesis del hapteno AMEb desde alternariol 9-metil éter a través de las dos etapas sintéticas es aproximadamente del 78%, muy superior al obtenido para el hapteno análogo previamente descrito (21%), fundamentalmente debido al muy bajo rendimiento obtenido en la hidrólisis básica del éster intermedio,

poniendo de nuevo de manifiesto la utilidad de las condiciones enzimáticas neutras para efectuar la hidrólisis quimioselectiva de ésteres en presencia de otras agrupaciones potencialmente hidrolizables en condiciones básicas.

Finalmente, una vez obtenido y caracterizado el hapteno AMEb, se procedió a la activación del grupo carboxilo, para lo que de nuevo se recurrió a las condiciones anteriormente utilizadas en la activación de la mayoría de los haptenos y derivados previamente activados. Así, el tratamiento del hapteno AMEb con EDC y NHS en DMF a temperatura ambiente proporcionó el correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, el éster AMEb-NHS, con un rendimiento del 95%. El mismo fue caracterizado por RMN de ^1H y directamente utilizado para la preparación de los conjugados de ensayo apropiados.



Esquema 3-16. Síntesis del hapteno heterólogo AMEb a partir de alternariol 9-metil éter.

3.2. Conjugación de haptenos activados a proteínas

Existen diferentes métodos de conjugación a proteínas. En nuestro caso se optó por el método del éster activo cuya preparación se comenta previamente en el apartado de síntesis. Una vez obtenidos los haptenos activados, se prepararon los conjugados de tres proteínas diferentes. Por un lado, se obtuvieron los conjugados destinados a la generación de anticuerpos. Por otro lado, se obtuvieron los conjugados destinados al desarrollo de los inmunoensayos, concretamente un tipo de conjugado para cada uno de los formatos ELISA competitivos propuestos. En cuanto a la conjugación, es habitual

que en el uso de esta estrategia se emplee directamente el éster activo sin purificar o incluso teniendo lugar mediante su generación *in situ* en presencia de la proteína. Sin embargo, esto puede implicar procesos no deseados como son la conjugación de especies diferentes al hapteno, el entrecruzamiento de varias moléculas de proteína, o la competición entre los grupos amino de la proteína y los grupos carboxilato del hapteno por reaccionar con la carbodiimida. Además, este tipo de estrategia requiere preparar los conjugados de inmunización y de ensayo mediante métodos de conjugación diferentes. En cambio, la purificación previa de los esteres activos permite, además de evitar todos los problemas anteriores, la reducción del gasto de hapteno, la mejora del rendimiento de conjugación, un mayor control de la densidad hapténica final del conjugado y la utilización de un solo procedimiento para la obtención de todos los conjugados, tanto de inmunización como de ensayo.

Para el conjugado de inmunización se eligió la seroalbumina bovina (BSA). En este conjugado es muy importante que la carga hapténica sea lo suficientemente elevada como para que el sistema inmunitario del animal lo reconozca con facilidad, pero evitando que sea demasiado elevada como para producir anticuerpos de baja afinidad. Adicionalmente el conjugado debe presentar una buena solubilidad en medio acuoso. La BSA es una proteína globular de cadena simple de 66 kDa, presente en el suero vacuno. En su estructura primaria está compuesta por un total de 59 residuos ionizables de lisina, siendo 35 de estos accesibles para su conjugación a moléculas de haptenos en condiciones de no desnaturalización.

Los ésteres activos de los haptenos preparados se hicieron reaccionar con BSA de manera que se obtuvieron los conjugados BSA–hapteno. Los haptenos activados se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) en lugar de DMF para mejorar la solubilidad. En lo que concierne al medio en el que se llevó a cabo la reacción de conjugación este varió en función del hapteno empleado. Si bien es cierto que un medio básico es idóneo para propiciar la desprotonación de los grupos aminos de los residuos de lisina, lo que supone una ganancia en la eficiencia de conjugación, se decidió no utilizar este medio para el resto de haptenos sintetizados ya que podría promover la desprotonación de los grupos hidroxilos más ácidos presentes en la molécula pudiendo acarrear problemas de solubilidad y/o polimerización intermolecular que pudiesen inactivar el hapteno. Así

pues, la reacción de conjugación se llevó a cabo a pH 9.6 en medio acuoso para el hapteno AL α mientras que los haptenos AL b y AL m se conjugaron a pH 7.4. Además, el número de equivalentes de hapteno necesarios para el marcaje eficaz de las proteínas estudiadas fue superior al habitual. Por lo general, en nuestro laboratorio se suele emplear un exceso molar de hapteno/proteína de 20 veces para BSA, una relación molar que, a priori, es suficiente para marcar alrededor de 15 residuos de lisina. Sin embargo, para estos conjugados fue necesario utilizar 40 equivalentes de hapteno. Adicionalmente a esto, se requería una adición extremadamente lenta del hapteno sobre la solución de proteína. Después de tener en cuenta las particularidades de cada hapteno en relación a las concentraciones y procedimientos necesarios, se lograron disponer de conjugados de inmunización correctamente marcados.

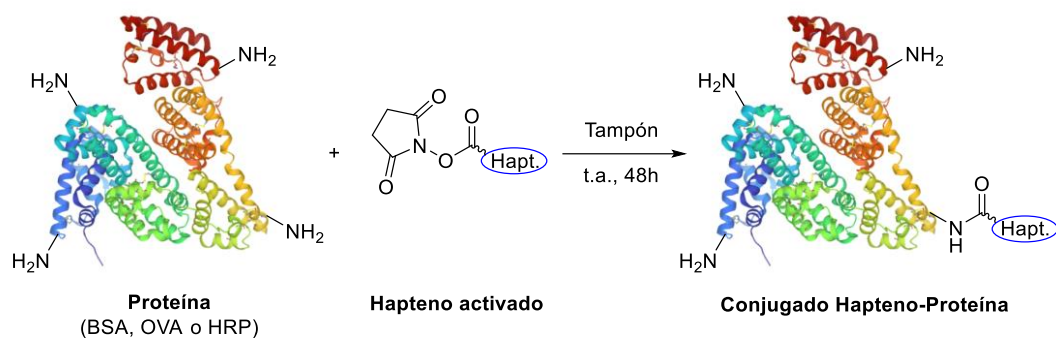


Figura 21. Formación de los conjugados hapteno-proteína a partir de los haptenos activados como ésteres de N-hidroxisuccinimidilo.

En el caso de los conjugados de ensayo destinados al ELISA en formato indirecto (conjugados de tapizado) la proteína elegida fue la ovoalbúmina (OVA). Se trata de una albúmina de cadena simple, de alrededor de 44.3 kDa, presente en la clara del huevo de gallina. Su cadena polipeptídica contiene 20 residuos de lisina, aunque lo ideal para este tipo de conjugados es que la carga hapténica sea baja, para así favorecer el reconocimiento del analito libre en la etapa de competición, pero lo suficientemente alta para que se obtenga una buena señal en ausencia de analito. Es importante también la utilización de una proteína distinta a la utilizada para los conjugados de inmunización, de lo contrario los anticuerpos, particularmente policlonales, podrían reconocer a la proteína en lugar del hapteno. Estos conjugados por su parte se prepararon de la misma

forma que los conjugados de inmunización a dos pH diferentes en función del hapteno conjugado, pero utilizando un exceso de alrededor de 10 veces de hapteno.

Por último, se prepararon los conjugados empleados en el ELISA en formato directo; estos conjugados también son conocidos como trazadores enzimáticos. Al igual que en el caso anterior es conveniente que estos presenten una carga hapténica baja. Además, para este tipo de conjugado es crucial que la actividad enzimática no se vea modificada. La enzima escogida fue la peroxidasa de rábano picante (HRP), una glicoproteína de aproximadamente 44 kDa procedente de *Armoracia rusticana* que contiene 6 residuos de lisina, de los cuales 2 son accesibles en condiciones suaves. Esta enzima se caracteriza por ser resistente, económica y presentar una elevada actividad específica que permite catalizar la oxidación de ciertos sustratos en presencia de H₂O₂. Por su parte, la correcta obtención de los trazadores enzimáticos implicó la preparación de distintos lotes de trazador a diferentes pH (7.4 y 9.6) junto a una variación de los equivalentes de hapteno (5, 10 y 15). De esta manera, aquellos en los que se empleó tampón a pH 9.6 y un mayor número de equivalentes de hapteno (15) fueron los que mejores resultados aportaron. Por lo tanto, estas últimas fueron las condiciones que se establecieron como válidas para estos conjugados. Cabe destacar que en todos los casos se requirieron adiciones extremadamente lentas del hapteno sobre la proteína o enzima.

Los bioconjugados obtenidos se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular, y la determinación de la relación molar hapteno/proteína (RM) obtenida se realizó por espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF/MS). Los valores de RM final se calcularon teniendo en cuenta el peso molecular del hapteno y el aumento de masa experimentado por el conjugado, utilizando como referencia la proteína sin modificar.

En la Tabla 3-1 se muestran los valores de RM de los conjugados preparados en condiciones óptimas y que fueron los que se emplearon para la inmunización de animales y el desarrollo de inmunoensayos. Todos los conjugados de BSA presentaron densidades de hapteno similares, con proporciones molares de hapteno a proteína de entre 15 y 21, lo que se considera óptimo para los conjugados destinados a la inmunización de los animales. Proporciones molares excesivas podrían conducir a una

baja solubilidad de la proteína, así como ser contraproducentes para la generación de anticuerpos de alta afinidad.

Tabla 3-1. Valores promedio de las relaciones molares hapteno/proteína de los conjugados preparados.^a

| Hapteno | Proteína de conjugación | | |
|-------------|-------------------------|----------|----------|
| | BSA | OVA | HRP |
| <i>ALa</i> | 15.2 (40) | 3.1 (8) | 2.0 (15) |
| <i>ALb</i> | 18.6 (40) | 3.3 (11) | 2.2 (15) |
| <i>ALm</i> | 16.5 (40) | 3.9 (10) | 1.8 (15) |
| <i>ALh1</i> | - ^b | 4.0 (12) | 1.8 (15) |
| <i>ALh2</i> | 21.3 (40) | 9.0 (12) | 2.8 (15) |
| <i>AMEb</i> | 17.3 (40) | 3.0 (11) | 2.4 (8) |

^a Los valores se determinaron mediante MALDI-TOF/MS. Entre paréntesis se incluyen los equivalentes de hapteno empleados. ^b No se preparó conjugado para esta combinación de proteína y hapteno.

Con respecto a los conjugados de OVA, las proporciones molares fueron más bajas que las de los conjugados de BSA, alrededor de una RM de 3 para los haptenos de *ALa*, *ALb* y *ALm*, ya que es deseable que los conjugados no compitan en exceso con el analito diana. Por otro lado, el conjugado de OVA del hapteno heterólogo *ALh2* presentó una RM más alta de lo esperable, probablemente debido a que no posee grupos OH libres. Sin embargo, esta densidad hapténica mayor seguramente sea adecuada, ya que se espera que este hapteno sea poco reconocido por los anticuerpos.

Finalmente, las densidades de hapteno de los trazadores enzimáticos se estimaron inferiores a 3, lo cual está dentro del rango esperado para los conjugados de HRP. Cabe destacar que la preparación de los trazadores enzimáticos resultó extremadamente compleja. En las condiciones inicialmente ensayadas, aquellas utilizadas para el resto de conjugados de BSA y OVA, se obtuvieron conjugados muy poco marcados. Se cree que el modo de conjugación pudo favorecer la formación de polímeros intermoleculares entre moléculas de hapteno inactivando y reduciendo la efectividad de la conjugación. Finalmente, las condiciones en las que se encontró un mejor marcaje de los trazadores son las descritas previamente mediante la disolución del hapteno en DMSO y en la reacción de conjugación a pH básico sin importar el trazador enzimático que se quiera preparar. La necesidad de adición lenta del hapteno sobre el conjugado parece ser crítica en estas condiciones.

En resumen, se han conseguido todos los conjugados necesarios para la generación de anticuerpos y el desarrollo de inmunoensayos atendiendo a las particularidades químicas y las condiciones de conjugación de cada hapteno.

3.3. Generación y evaluación de anticuerpos policlonales

3.3.1. Estudio de la inmunogenicidad de los conjugados

Una vez preparados los conjugados de BSA, se evaluó su capacidad para generar anticuerpos de elevada afinidad y con la especificidad deseada. Con este objetivo se inmunizaron conejos con cada uno de los conjugados BSA–hapteno diseñados y se obtuvieron sus antiseros. Como ya se ha comentado previamente en la introducción, la obtención de anticuerpos policlonales de conejos es sencilla y rápida, pero lo que más nos interesa de estos inmunorreactivos es que constituyen un reflejo directo de la respuesta inmunitaria del animal ante un determinado inmunógeno. Este hecho nos permite estudiar fácilmente la relación estructura–actividad del hapteno, es decir, la relación entre la estructura del hapteno, particularmente respecto a la posición óptima del brazo espaciador, y la inmunogenicidad de su conjugado, concretamente su capacidad para producir anticuerpos de alta afinidad y especificidad hacia alternariol. Nuestra hipótesis inicial preveía la obtención de anticuerpos policlonales con diferentes características según el hapteno del inmunógeno empleado en la misma. Cabe recordar que el hapteno AL α , el primero de los haptenos inmunizantes sintetizados, introduce el brazo espaciador, una cadena hidrocarbonada de cinco átomos de carbono, por el grupo OH presente en C–9. Por otra parte, el hapteno AL b estructuralmente cuenta con el mismo brazo espaciador, pero en una posición distal respecto a C–9, ya que se introduce la cadena hidrocarbonada por el OH presente en C–3, exponiendo la molécula desde un punto completamente opuesto al hapteno AL α . Por último, el hapteno AL m es totalmente novedoso; se funcionaliza el grupo metilo presente en alternariol, de este modo se orienta la molécula desde una posición alternativa y sin modificar grupos químicos antigénicos.

La inmunización comenzó con la inoculación de ocho hembras de conejo de raza New Zealand de pelo blanco, dos con cada uno de los conjugados BSA–hapteno preparados:

BSA-AL α (RM 15.2), BSA-AL b (RM 18.6) y BSA-AL m (RM 16.5). Al finalizar el proceso de inmunización los animales fueron exsanguinados, obteniéndose entre 50 y 100 mL de antisuero por centrifugación de las muestras de sangre. Las inmunoglobulinas presentes en el suero fueron parcialmente purificadas por fraccionamiento salino. En total se obtuvieron seis anticuerpos policlonales a los que se nombró con el nombre del hapteno y el número del conejo inmunizado. Datos recogidos en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2. Anticuerpos policlonales para alternariol obtenidos tras la inmunización de conejos con conjugados BSA-hapteno.

| Inmunógeno | Anticuerpos policlonales |
|-----------------|--------------------------------|
| BSA-AL α | AL α #1, AL α #2 |
| BSA-AL b | AL b #1, AL b #2 |
| BSA-AL m | AL m #1, AL m #2 |

3.3.2. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales

Para realizar una evaluación adecuada de la afinidad de los anticuerpos obtenidos fue necesario establecer las concentraciones óptimas para cada inmunorreactivo; es decir las concentraciones de anticuerpos, conjugados de tapizado o el trazador enzimático que aportan una señal cercana a 1.0 unidad de absorbancia. Como se desconocía estos valores, ya que no se había realizado ninguna titulación previa, se llevaron a cabo en paralelo ELISAs bidimensionales competitivos utilizando disoluciones patrón de alternariol.

Un ensayo bidimensional competitivo consiste en ensayar en una misma placa de 96 pocillos varias concentraciones de anticuerpo frente a varias concentraciones de conjugado. Estas combinaciones se evaluaron de dos formas diferentes. Por un lado, se ensayó el formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta, en el que es necesario que se introduzca un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente para que se genere una señal que pueda ser medida. Por otra parte, se probó el formato de anticuerpo inmovilizado asistido por un anticuerpo de captura, en el que el conjugado competidor está formado por una enzima, también conocido como formato directo. Estos ensayos se llevaron a cabo con el correspondiente conjugado homólogo, ya que éste arroja información más precisa sobre la afinidad de los anticuerpos ensayados. Para

obtener una adecuada estimación de la afinidad del anticuerpo utilizando este tipo de caracterización por ELISA es necesario que las concentraciones de anticuerpo y conjugado competidor sean limitantes. El resultado es una serie de curvas de inhibición con diferente señal máxima en ausencia de analito (A_{\max}). La afinidad se estimó mediante el valor de IC_{50} de aquella curva de inhibición que presentaba un valor de A_{\max} inmediatamente superior a 0.5. La evaluación de la afinidad de los anticuerpos mediante este tipo de ensayos nos dará una visión amplia sobre la idoneidad de nuestros haptenos.

3.3.2.1. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

Siguiendo la estrategia bidimensional expuesta en el apartado anterior se procedió a la caracterización mediante el formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta. Para este estudio se ensayaron los 6 anticuerpos policlonales a diferentes diluciones ($1/10^4$, $1/3 \cdot 10^4$ y $1/10^5$) frente al conjugado OVA–hapteno homólogo a tres concentraciones diferentes de tapizado, 10, 100 y 1000 ng/mL. Adicionalmente, se utilizó una serie de patrones de alternariol, en total 7 disoluciones patrón a diferentes concentraciones (preparados por dilución seriada de un stock de concentración 10 μ M, con un factor de dilución de 10) más un blanco. Las condiciones óptimas de los inmunorreactivos empleados y los valores de IC_{50} encontrados para cada par anticuerpo/conjugado frente a alternariol se recogen en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3. Caracterización de los anticuerpos policlonales mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos frente a alternariol.^a

| pAb ^b | [pAb] ^c | [OVA] ^d | IC ₅₀ ^e |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|
| ALa#1 | 30 | 100 | 6.29 |
| ALa#2 | 30 | 100 | 51.0 |
| Media | | | 28.65 |
| ALb#1 | 10 | 10 | 6.57 |
| ALb#2 | 30 | 10 | 24.6 |
| Media | | | 15.59 |
| ALm#1 | 30 | 100 | 3.50 |
| ALm#2 | 30 | 100 | 2.25 |
| Media | | | 2.86 |

^a Los valores de IC_{50} son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{\max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. ^b Anticuerpo policlonal. ^c Factor de dilución del anticuerpo $\times 10^{-3}$. ^d Concentración expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM.

En primer lugar, podemos destacar que todos los anticuerpos reconocieron a su conjugado homólogo y que, por tanto, los conjugados inmunizantes fueron capaces de generar respuesta inmunitaria. Las concentraciones óptimas de conjugado OVA-hapteno fueron de 100 ng/mL para los anticuerpos obtenidos con los conjugados de ALa y ALm, mientras que para los policlonales producidos a partir de los conjugados del hapteno ALb hubo que utilizar concentraciones de 10 ng/mL, indicando una muy elevada afinidad de estos anticuerpos por su conjugado homólogo. Además, observamos que la afinidad obtenida con los anticuerpos de ALm, resultó ser mejor que la de los anticuerpos obtenidos con ALa y ALb, llegando a valores de IC₅₀ próximos a 3 nM. Esta elevada afinidad de ALm#1 y #2 podría deberse principalmente a dos factores. Por un lado, la menor modificación electrónica que se produce en la estructura del analito al incorporar el brazo espaciador como una homologación del grupo metilo vía un enlace C(sp³)-C(sp³), y por otro lado, que este hapteno es el que mejor expone la estructura y grupos funcionales del analito, permitiendo generar paratopos en los que todos los grupos químicos tengan una mayor contribución y, en consecuencia, más afines hacia la micotoxina de interés. Este resultado se alinea con nuestra hipótesis inicial que planteaba la obtención de anticuerpos de mayor afinidad mediante el uso de haptenos funcionalizados a través del grupo metilo.

3.3.2.2. *Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa*

Este tipo de ensayo se realizó mediante el uso de un anticuerpo de captura para evitar la inmovilización directa sobre la superficie del pocillo de los anticuerpos policlonales anti-alternariol, ya que esto podría generar cambios conformacionales que resultarían en pérdida de actividad. Como anticuerpo de captura se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo (GAR, del inglés *goat anti-rabbit*), que se utilizó siempre a la misma concentración (1 µg/mL). Una vez realizado el tapizado homogéneo de la superficie de los pocillos, se probaron varias diluciones de los antisueros 1/10³, 1/3·10³ y 1/10⁴. A continuación, la etapa competitiva consistió en ensayar varias disoluciones a diferentes concentraciones de los conjugados enzimáticos HRP-hapteno (10, 30, 100 y 300 ng/mL), y una serie de 7 patrones de alternariol (preparados por dilución seriada de un stock de concentración 10 µM, con un factor de

dilución de 10) más un blanco. Cada antisuero se evaluó frente a su conjugado enzimático homólogo.

Las condiciones óptimas de los inmunorreactivos empleados y los valores de IC₅₀ encontrados para cada par anticuerpo/trazador frente a alternariol se detallan en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4. Caracterización de los anticuerpos policlonales mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura con trazadores homólogos frente a alternariol.^a

| pAb ^b | [pAb] ^c | [HRP] ^d | IC ₅₀ ^e |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|
| ALa#1 | 10 | 10 | 2.20 |
| ALa#2 | 10 | 10 | 7.61 |
| Media | | | 4.91 |
| ALb#1 | 10 | 10 | 1.19 |
| ALb#2 | 10 | 10 | 1.19 |
| Media | | | 1.19 |
| ALm#1 | 3 | 100 | 6.24 |
| ALm#2 | 3 | 100 | 8.95 |
| Media | | | 7.60 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. El anticuerpo de captura (GAR) se empleó a 1 µg/mL ^b Anticuerpo policlonal. ^c Factor de dilución del anticuerpo x10⁻³. ^d Concentración del trazador expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM.

Como se puede observar, todos los anticuerpos reconocieron a su trazador homólogo. Además, todos los anticuerpos presentaban una elevada afinidad hacia alternariol, con valores de IC₅₀ por debajo de 10 nM. Este resultado pone de manifiesto de nuevo que los tres haptenos son idóneos para la producción de anticuerpos anti-alternariol. Particularmente, los valores de IC₅₀ más bajos en este formato se observaron con los antisueros generados con el conjugado de ALb. En lo que concierne a los antisueros procedentes del nuevo conjugado BSA-ALm, se observó una afinidad hacia el analito ligeramente inferior. Para explicar este resultado, aparentemente contradictorio con nuestra hipótesis inicial, es necesario destacar la dificultad encontrada para obtener el trazador enzimático de ALm. Es posible que, debido a su preparación, la enzima presentase una actividad menor que la de sus análogos estructurales. Esta hipótesis se vería reforzada por el hecho de que la dilución óptima de los anticuerpos policlonales de tipo ALm sea menor, y a su vez que sea necesario usar

10 veces más de trazador del hapteno *ALm* que del resto (Tabla 3-4), lo que se traduciría en una afinidad aparente menor de los anticuerpos obtenidos inmunizando con el conjugado del hapteno *ALm*.

3.3.3. Determinación de la especificidad de los anticuerpos policlonales

Tras la evaluación de la afinidad de los anticuerpos producidos, el siguiente paso fue evaluar su especificidad. Cabe señalar que todos los anticuerpos anti-alternariol publicados por otros autores son capaces también de reconocer en mayor o menor medida a alternariol 9-metil éter. La especificidad de los anticuerpos obtenidos puede variar principalmente debido a la posición del brazo espaciador, así como por modificaciones conformacionales, estéricas o electrónicas de la molécula como consecuencia de la funcionalización. Desde un punto de vista analítico la falta de especificidad puede interpretarse como un inconveniente, ya que es importante comprobar que no interfiere en el reconocimiento del analito principal, o como una ventaja si queremos determinar los dos analitos, alternariol y alternariol 9-metil éter, simultáneamente. La especificidad se determinó calculando lo que se denomina reactividad cruzada (RC), es decir el cociente entre la IC_{50} de alternariol y la IC_{50} de alternariol 9-metil éter, y suele expresarse en porcentaje. Cuanto mayor sea la afinidad del anticuerpo hacia alternariol 9-metil éter, menor es su valor de IC_{50} , dando lugar a un mayor valor de RC. Se considera que un anticuerpo posee una elevada especificidad cuando el valor de RC hacia otros compuestos relevantes no supera el 1%.

La evaluación de la especificidad de los anticuerpos generados se realizó en el formato indirecto y directo, ambos con sus conjugados o trazadores homólogos. Los datos de RC obtenidos vienen recogidos en la Tabla 3-5. La especificidad de los policlonales guarda ciertas similitudes, aunque también algunas diferencias, en los valores de RC encontrados en ambos formatos. Por lo que respecta al formato indirecto, vemos como los anticuerpos de tipo *ALa* son mucho menos específicos, arrojando valores de RC muy por encima del 100%, reconociendo hasta 7 veces mejor a alternariol 9-metil éter. En el caso de los de *ALb*, la especificidad hacia alternariol es buena, si bien la RC media con alternariol 9-metil éter es sobre el 4%. Por su parte, los anticuerpos de *ALm* se perfilan como anticuerpos altamente específicos en este formato de ensayo, con

valores de RC inferiores a 0.5%. Los resultados obtenidos para los policlonales de tipo AL α no sorprenden, ya que, si se analizan desde un punto de vista estructural, sigue un patrón lógico de mejor reconocimiento de la molécula metilada en la posición donde se encuentra el brazo espaciador en el conjugado BSA–hapteno que se ha utilizado para inmunizar (AL α). Por otro lado, cabe señalar la superior especificidad observada de los anticuerpos policlonales de tipo AL m . Este resultado se podría explicar por la posición del brazo espaciador de los conjugados con los que se obtuvieron estos anticuerpos.

Tabla 3-5. Especificidad de los anticuerpos policlonales.^a

| pAb ^b | Formato indirecto | | | Formato directo | | |
|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------|
| | IC ₅₀ AOH ^c | IC ₅₀ AME ^d | RC (%) | IC ₅₀ AOH | IC ₅₀ AME | RC (%) |
| AL α #1 | 6.28 | 3.08 | 204 | 2.20 | 2.20 | 100 |
| AL α #2 | 36.2 | 8.18 | 442 | 7.61 | 3.83 | 199 |
| Media | | | 323 | | | 150 |
| AL b #1 | 6.23 | 402 | 1.6 | 1.19 | 170 | 0.7 |
| AL b #2 | 27.5 | 403 | 6.8 | 1.19 | 218 | 0.6 |
| Media | | | 4.2 | | | 0.7 |
| AL m #1 | 3.50 | >1000 | <0.3 | 6.24 | 17.7 | 35 |
| AL m #2 | 2.25 | >1000 | <0.2 | 8.95 | 27.8 | 32 |
| Media | | | <0.3 | | | 34 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. ^b Anticuerpo policlonal. ^c Valores expresados en nM para alternariol. ^d Valores expresados en nM para alternariol 9-metil éter.

En el formato directo, al igual que en el formato anterior, pudimos observar también la importancia de la posición del brazo espaciador del hapteno inmunizante, y su influencia en la especificidad de los anticuerpos generados. Los anticuerpos de tipo AL α presentaron una reactividad cruzada elevada hacia alternariol 9-metil éter, lo que significa un reconocimiento de ambos analitos, como se observó en el anterior formato ELISA. Es más, el anticuerpo AL α #1 presentó un valor de RC del 100%, por lo que podría utilizarse para el desarrollo de un ensayo de doble reconocimiento, es decir un ensayo genérico para ambos analitos. Sin embargo, cuando el brazo espaciador del inmunógeno se encuentra en el anillo distal como es el caso del hapteno AL b , los dos anticuerpos obtenidos son totalmente específicos, un hecho que no resulta anómalo dado que la posición de conjugación es diametralmente opuesta y, como resultado el grupo OH en

posición C-9, metilado en el caso de alternariol 9-metil éter, está mayoritariamente expuesto. La RC observada en este formato es menor (por debajo del 1%) que la obtenida con el formato anterior. Finalmente, cabría esperar que los antisueros de AL m tuvieran una RC hacia alternariol 9-metil éter baja, como ya se mostraba en el formato indirecto. Sin embargo, la RC media fue cercana al 35%. No hay que perder de vista que la preparación del trazador de AL m resultó bastante difícil, por este motivo los valores de RC en este formato pueden verse afectados.

3.3.4. Uso de conjugados heterólogos

3.3.4.1. Evaluación de la sensibilidad de ensayo

Para todos los pares de inmunorreactivos se obtuvo reconocimiento de los conjugados heterólogos ensayados (AL a , AL b y AL m), dando lugar a una serie de combinaciones potencialmente interesantes desde el punto de vista de mejora de la sensibilidad de los inmunoensayos. Como es usual en las combinaciones heterólogas hizo falta reducir la dilución del anticuerpo. Dicho de otra forma, hace falta forzar las condiciones de ensayo, para lo cual se utilizó tres veces más cantidad de anticuerpo y en algunos casos aumentar la concentración de conjugado con respecto al homólogo. Cabe mencionar que la sensibilidad de ensayo no se evaluó con los conjugados de los haptenos heterólogos no inmunizantes (aquellos procedentes de los haptenos AL $h1$, AL $h2$ y AME b) ya que no habían sido sintetizados todavía.

3.3.4.1.1. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

En relación a los antisueros de tipo AL a , cuando se enfrentaron al conjugado heterólogo OVA-AL b , se observó una mejora de los valores de IC₅₀ hacia alternariol (Tabla 3-6). En cambio, cuando se hizo competir estos anticuerpos con el conjugado de AL m en este formato observamos que el valor de IC₅₀ se mantuvo con el anticuerpo AL a #1 mientras que fue casi 9 veces menor que el obtenido con el conjugado de homólogo en el caso del anticuerpo AL a #2, pasando a valores en promedio cercanos a 5 nM.

Los anticuerpos policlonales de tipo *ALb* por su parte, cuando se enfrentaron al conjugado heterólogo OVA-*AL α* se obtuvieron sensibilidades del doble a las obtenidas con el conjugado homólogo. En cambio, cuando se empleó el conjugado OVA-*ALm* el valor de IC_{50} se mantuvo con el anticuerpo *ALb*#1 mientras que se redujo a más de la mitad con el anticuerpo *ALb*#2.

En cuanto a los anticuerpos generados a partir del hapteno *ALm*, el empleo de los conjugados heterólogos no resultó en una mejora significativa de la sensibilidad de ensayo conseguida con el conjugado homólogo. Aun así, estos anticuerpos siguen siendo los mejores candidatos para un posible desarrollo de inmunoensayos para alternariol en el formato indirecto.

Tabla 3-6. Caracterización de los anticuerpos policlonales mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos frente a alternariol.^a

| pAb ^b | OVA- <i>ALα</i> | | | OVA- <i>ALb</i> | | | OVA- <i>ALm</i> | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------|------------|------------------|-----------------|------------|------------------|
| | [pAb] ^c | [OVA] ^d | IC_{50} ^e AOH | [pAb] | [OVA] | IC_{50} AOH | [pAb] | [OVA] | IC_{50} AOH |
| <i>ALα</i> #1 | 100 | 100 | 6.28 | 20 | 100 | 3.83 | 3 | 100 | 6.04 |
| <i>ALα</i> #2 | 100 | 10 | 36.2 | 10 | 100 | 11.2 | 3 | 100 | 4.73 |
| <i>ALb</i> #1 | 20 | 1000 | 3.32 | 100 | 100 | 6.23 | 3 | 100 | 6.99 |
| <i>ALb</i> #2 | 30 | 1000 | 13.4 | 300 | 100 | 27.5 | 10 | 100 | 10.3 |
| <i>ALm</i> #1 | 10 | 1000 | 2.58 | 10 | 100 | 2.95 | 30 | 100 | 3.50 |
| <i>ALm</i> #2 | 10 | 1000 | 1.85 | 30 | 1000 | 1.33 | 30 | 100 | 2.25 |

^a Los valores de IC_{50} son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Anticuerpo policlonal. ^c Factor de dilución del anticuerpo $\times 10^{-3}$. ^d Concentración del conjugado expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol.

3.3.4.1.2. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

Por lo que respecta a los trazadores heterólogos (Tabla 3-7), se encontró que los antiseros basados en el hapteno *AL α* fueron capaces de reconocer al trazador enzimático HRP-*ALb*, y los anticuerpos de *ALb* reconocieron el trazador de *AL α* , aunque teniendo que aumentar las concentraciones de inmunorreactivos significativamente para obtener una A_{max} que pueda ser considerada como aceptable, y obteniendo valores de IC_{50} mucho mayores. Desde un punto de vista estructural, es lógico el

empeoramiento del reconocimiento por parte de estos antisueros, ya que la posición del brazo espaciador es justo la opuesta en el anillo distal de la molécula, comparado con el homólogo. Ninguno de los anticuerpos procedentes de los inmunógenos BSA-AL α y BSA-AL β generó respuesta con el trazador HRP-AL m .

Tabla 3-7. Caracterización de los anticuerpos policlonales mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura con trazadores homólogos y heterólogos frente a alternariol.^a

| pAb ^b | HRP-AL α | | | HRP-AL β | | | HRP-AL m | | |
|------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------------|----------------|-----------|----------------------|------------|------------|----------------------|
| | [pAb] ^c | [HRP] ^d | IC ₅₀ ^e AOH | [pAb] | [HRP] | IC ₅₀ AOH | [pAb] | [HRP] | IC ₅₀ AOH |
| AL α #1 | 10 | 10 | 2.20 | 3 | 300 | 28.9 | | | |
| AL α #2 | 10 | 10 | 7.61 | 3 | 300 | 35.5 | | | |
| AL β #1 | 1 | 300 | 18.7 | 10 | 10 | 1.19 | | | |
| AL β #2 | 1 | 300 | 25.7 | 10 | 10 | 1.19 | | | |
| AL m #1 | 1 | 300 | 7.01 | 1 | 300 | 22.3 | 3 | 100 | 6.24 |
| AL m #2 | 1 | 300 | 5.13 | 1 | 300 | 14.6 | 3 | 100 | 8.95 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. Las celdas vacías indican que en esa combinación no se obtuvo señal. El anticuerpo de captura (GAR) se empleó a 1 μ g/mL. ^b Anticuerpo policlonal. ^c Factor de dilución del anticuerpo $\times 10^{-3}$. ^d Concentración del trazador expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol.

Los antisueros de AL m por su parte, presentaron poco reconocimiento de los trazadores heterólogos, y fue necesario aumentar la concentración de todos los inmunorreactivos. Particularmente, se puede destacar que cuando se les hizo competir con el trazador de HRP-AL α obtuvimos valores de IC₅₀ semejantes a los obtenidos con su respectivo conjugado homólogo. En cambio, la sensibilidad de los ensayos empeoró al utilizar el trazador de AL β . Así pues, el uso de trazadores heterólogos no supuso una mejora de la sensibilidad de los ensayos en este formato.

3.3.4.2. Influencia de la heterología sobre la reactividad cruzada

Ya hemos visto cómo mediante el uso de la estrategia de heterología podemos mejorar la sensibilidad del ensayo. De la misma forma, en este apartado se describe el uso de esta estrategia para modular la selectividad del inmunoensayo. En los antisueros de tipo AL α vemos cómo no supuso un cambio demasiado acusado para ninguna de las combinaciones probadas (Tabla 3-8). En todos los casos alternariol 9-metil éter fue

mejor reconocido por estos anticuerpos que alternariol. En los policlonales de ALb la selectividad de los ensayos hacia alternariol se mantuvo elevada, sin importar el conjugado utilizado. Finalmente, para las combinaciones heterólogas con los anticuerpos de ALm podemos decir que la selectividad hacia alternariol fue alta cuando se utilizó el conjugado de ALb. Por el contrario, no ocurre lo mismo cuando se emplea el conjugado de OVA-ALa, observándose un aumento muy importante de la RC con alternariol 9-metil éter. Este resultado se podría explicar porque OVA-ALa es el conjugado competidor que más se asemeja estructuralmente a alternariol 9-metil éter.

Tabla 3-8. Reactividad cruzada (%) con alternariol 9-metil éter de los policlonales en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.^a

| pAb ^b | OVA-ALa | OVA-ALb | OVA-ALm |
|------------------|------------|------------|----------------|
| ALa#1 | 204 | 482 | 197 |
| ALa#2 | 442 | 532 | 294 |
| ALb#1 | 0.6 | 1.6 | 1.2 |
| ALb#2 | 5.3 | 6.8 | 1.1 |
| ALm#1 | 34 | <0.2 | <0.3 |
| ALm#2 | 22 | 0.4 | <0.2 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Anticuerpo policlonal.

Por su parte, las combinaciones heterólogas tuvieron, resultados muy dispares en el formato directo (Tabla 3-9), aumentando significativamente la RC con alternariol 9-metil éter para el caso de los antisueros de tipo ALa combinados con el trazador de ALb. En este caso se observó un aumento más acusado de la IC₅₀ para el alternariol, aumentando la RC entre 4 y 7 veces. Cuando se emplearon los anticuerpos de ALb, en términos generales, los ensayos presentaron una mayor selectividad hacia alternariol. No obstante, con el trazador heterólogo de ALa la RC con alternariol 9-metil éter empeoró respecto a la combinación homóloga. De la misma forma, los antisueros ALm#1 y #2 experimentaron un aumento muy importante en los valores de RC hacia alternariol 9-metil éter al utilizar el trazador heterólogo de ALa, como ya se observó en el formato indirecto. Lo más interesante de este resultado es que pasan de ser ensayos poco interesantes desde un punto de vista de la selectividad, con RC alrededor del 33%, a ser ensayos genéricos que reconocen de manera semejante ambos analitos, particularmente con ALm#2. Los valores obtenidos para el par ALm vs HRP-ALb no han

podido ser calculado ya que no se observó reconocimiento de alternariol 9-metil éter al máximo valor de concentración ensayado 1000 nM.

Tabla 3-9. Reactividad cruzada (%) con alternariol 9-metil éter de los anticuerpos policlonales en formato directo asistido por anticuerpo de captura con trazadores homólogos y heterólogos.^a

| pAb ^b | HRP-AL α | HRP-AL b | HRP-AL m |
|------------------|-----------------|------------|------------|
| AL α #1 | 100 | 745 | |
| AL α #2 | 199 | 849 | |
| AL b #1 | 3.7 | 0.7 | |
| AL b #2 | 5.7 | 0.6 | |
| AL m #1 | 214 | <0.1 | 35 |
| AL m #2 | 93 | <0.1 | 32 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. El anticuerpo de captura (GAR) se empleó a 1 µg/mL. Las celdas vacías indican que en esa combinación no se obtuvo señal. ^b Anticuerpo policlonal.

En conclusión, tras la evaluación de todos los anticuerpos generados frente a todos los conjugados OVA-hapteno, así como los trazadores HRP-hapteno disponibles, podemos decir que ha sido posible la producción de anticuerpos policlonales de elevada afinidad hacia la micotoxina alternariol, llegando algunos de ellos a tener valores de afinidad cercanos a 1 nM en el formato directo. Además, se ha demostrado que el hapteno AL α es capaz de generar anticuerpos que reconocían tanto alternariol como alternariol 9-metil éter. En cambio, los anticuerpos obtenidos con los haptenos AL b y AL m son más específicos de alternariol, mostrando especificidades excelentes (RC<1%) en algunos formatos. Por lo tanto, sería posible desarrollar un ensayo de elevada sensibilidad y selectividad para alternariol utilizando anticuerpos policlonales. Sobre el uso de conjugados heterólogos en los diferentes formatos de ensayo probados, cabe decir que en el formato directo hubo más dificultades en cuanto a reconocimiento de los trazadores ensayados, muy posiblemente debido a la posición del brazo espaciador. Por el contrario, en el formato indirecto no se encontraron estos problemas. Finalmente, se observó en algunos casos una influencia importante de los haptenos heterólogos evaluados sobre la sensibilidad y selectividad de los inmunoensayos, de modo que sería posible desarrollar ensayos genéricos para alternariol y alternariol 9-metil éter utilizando, por ejemplo, el anticuerpo policlonal AL α #1 en formato indirecto o el anticuerpo AL m #2 en el directo.

3.3.5. Propuesta de inmunoensayo con policlonales para alternariol

Después de la caracterización completa de todos los anticuerpos policlonales en diferentes formatos de ELISA competitivo con conjugados homólogos y heterólogos, podemos proponer inmunoensayos para la determinación sensible y selectiva de alternariol, teniendo en cuenta las mejores condiciones encontradas en todas las combinaciones posibles en ambos formatos de ensayo para cada anticuerpo.

En la Tabla 3-10 se resumen las características más importantes de las mejores combinaciones de anticuerpo/conjugado en el formato indirecto con cada uno de los anticuerpos policlonales generados para alternariol. Las concentraciones de inmunorreactivos se fijaron para obtener valores de A_{max} en torno a la unidad. En la mayoría de los inmunoensayos seleccionados el valor de la pendiente de las curvas de inhibición se encuentra entre 0.8 y 1.2, valores que se sitúan en el intervalo más adecuado, siendo superiores a los normalmente encontrados en este tipo de anticuerpo. Todos ellos muestran sensibilidades hacia alternariol muy buenas, del orden de nanomolar. En este formato, destaca la combinación del anticuerpo policlonal ALm#2 con el conjugado heterólogo de ALb, que se presenta como el ensayo más sensible y selectivo, con un valor de IC_{50} hacia alternariol de 1.3 nM y con una RC con alternariol 9-metil éter de 0.4%.

Tabla 3-10. Concentraciones óptimas de inmunorreactivos y parámetros de curva de los mejores ensayos en formato directo e indirecto de cada anticuerpo policlonal.^a

| pAb ^b | Formato indirecto | | | | | | |
|------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|------------|
| | [pAb] ^c | Conjugado de tapizado | [OVA] ^d | Parámetros de curva | | | RC (%) |
| | | | | A_{max} | Pendiente | IC_{50} AOH ^e | |
| ALa#1 | 3 | OVA-ALm | 100 | 0.70 ± 0.18 | 0.91 ± 0.24 | 6.04 | 197 |
| ALa#2 | 3 | OVA-ALm | 100 | 0.78 ± 0.16 | 1.00 ± 0.17 | 4.73 | 294 |
| ALb#1 | 3 | OVA-ALm | 100 | 0.90 ± 0.03 | 1.10 ± 0.17 | 6.99 | 1.2 |
| ALb#2 | 10 | OVA-ALm | 100 | 0.65 ± 0.02 | 1.17 ± 0.07 | 10.3 | 1.1 |
| ALm#1 | 10 | OVA-ALb | 100 | 0.78 ± 0.06 | 0.99 ± 0.16 | 2.95 | 0.2 |
| ALm#2 | 30 | OVA-ALb | 1000 | 1.08 ± 0.11 | 0.80 ± 0.12 | 1.33 | 0.4 |

^a Los valores son la media de tres determinaciones independientes. En negrita se destaca el ensayo más sensible. ^b Anticuerpo policlonal. ^c Factor de dilución del anticuerpo $\times 10^{-3}$. ^d Concentración expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol.

Análogamente a lo descrito para el formato indirecto, en la Tabla 3-11 se recogen las características más importantes, así como los valores promedio de las curvas de inhibición obtenidas con cada uno de los anticuerpos en el formato directo. A diferencia de lo observado en el formato indirecto, los inmunoensayos más sensibles en este formato de ensayo los encontramos con sus respectivos trazadores homólogos. Todas las combinaciones propuestas presentan sensibilidades bastante elevadas, particularmente los inmunoensayos que utilizan anticuerpos derivados del hapteno ALb. Sin embargo, las pendientes de la curva de inhibición de todos ellos están entre 0.6 y 0.8, valores bajos, aunque típicos para anticuerpos policlonales. El mejor candidato para el desarrollo de un inmunoensayo en el formato directo sería el policlonal ALb#2 con su trazador homólogo, que presenta un valor de IC₅₀ para alternariol de 1.2 nM y una RC con alternariol 9-metil éter de 0.6%.

Tabla 3-11. Concentraciones óptimas de inmunoreactivos y parámetros de curva de los mejores ensayos en formato directo e indirecto de cada anticuerpo policlonal.^a

| pAb ^b | Formato directo | | | | | | |
|------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-----------------------------------|------------|
| | [pAb] ^c | Trazador enzimático | [HRP] ^d | Parámetros de curva | | | |
| | | | | A _{max} | Pendiente | IC ₅₀ AOH ^e | RC (%) |
| ALa#1 | 10 | HRP-ALa | 10 | 1.15 ± 0.10 | 0.68 ± 0.03 | 2.20 | 100 |
| ALa#2 | 10 | HRP-ALa | 10 | 1.10 ± 0.17 | 0.50 ± 0.05 | 7.61 | 199 |
| ALb#1 | 10 | HRP-ALb | 10 | 0.92 ± 0.10 | 0.68 ± 0.06 | 1.19 | 0.7 |
| ALb#2 | 10 | HRP-ALb | 10 | 1.19 ± 0.18 | 0.57 ± 0.15 | 1.19 | 0.6 |
| ALm#1 | 3 | HRP-ALm | 100 | 1.22 ± 0.07 | 0.63 ± 0.11 | 6.24 | 35 |
| ALm#2 | 3 | HRP-ALm | 100 | 1.24 ± 0.16 | 0.64 ± 0.31 | 8.95 | 32 |

^a Los valores son la media de tres determinaciones independientes. En negrita se destaca el ensayo más sensible.

^b Anticuerpo policlonal. ^c Factor de dilución del anticuerpo x10⁻³. ^d Concentración expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol.

3.4. Generación y evaluación de anticuerpos monoclonales

3.4.1. **Obtención, cuantificación e isotipación de anticuerpos**

Los anticuerpos monoclonales se obtienen haciendo uso de la tecnología de hibridomas a partir de linfocitos B obtenidos en respuesta a la inmunización de sistemas animales como pueden ser los ratones. Esta tecnología consiste en la generación, selección y cultivo de distintas líneas celulares híbridas entre células de mieloma y

células productoras de anticuerpos. Para la generación de anticuerpos monoclonales se necesita una inversión de recursos bastante grande, tanto en tiempo como en dinero, sobre todo si se compara con la producción de anticuerpos policlonales. Por tanto, resulta crucial la correcta selección de los inmunógenos más adecuados para generar anticuerpos con las propiedades de unión a ligando deseadas. Esta respuesta la podemos obtener a partir de los resultados de la generación de anticuerpos policlonales que generalmente sirven de guía a la hora de decidir. En nuestro caso, el estudio previo con la producción de anticuerpos policlonales a partir de los tres haptenos inmunizantes sintetizados (*ALa*, *ALb* y *ALm*) dio como resultado la obtención de anticuerpos con distintas características, tanto de afinidad como de especificidad, interesantes en todos los casos para desarrollar diferentes tipos de inmunoensayo. Es por ello que se decidió continuar con la inmunización de ratones para la producción de anticuerpos monoclonales con los mismos tres haptenos diseñados para este fin.

La inmunización de ratones se llevó a cabo con un procedimiento análogo al utilizado previamente con conejos. Dicho procedimiento consistió en un total de cuatro inmunizaciones en las cuales se inoculó intraperitonealmente, cada 3 semanas, 100 µg del conjugado BSA–hapteno. Como es habitual, y a modo de control, a los 10 días de la tercera inmunización se obtuvieron muestras de sueros para verificar la respuesta inmunitaria. Los linfocitos B se obtuvieron del bazo de dos animales inmunizados con el mismo inmunógeno, y se fusionaron con células de mieloma usando una relación de cuatro linfocitos por cada célula de mieloma. Al cabo de 10 días se realizó un doble *screening* o cribado del sobrenadante de los cultivos celulares resultantes de la fusión, basado en un ELISA competitivo de conjugado inmovilizado con detección indirecta usando el conjugado homólogo como conjugado de tapizado. En una primera etapa se llevó a cabo un ELISA diferencial que permitió identificar a aquellos pocillos que contenían hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer al conjugado homólogo y, a su vez, presentar inhibición de la señal en presencia del analito. A continuación, aquellos pocillos que dieron resultados positivos (reconocimiento del conjugado) y competitivos (reconocimiento del analito) se reevaluaron en un segundo ELISA competitivo más detallado, permitiendo seleccionar los pocillos más interesantes en función de la afinidad del anticuerpo que contenían. Para este segundo análisis se

prepararon 4 diluciones de cada sobrenadante (1/8, 1/32, 1/128 y 1/516) y se tapizó a 100 ng/mL con el conjugado homólogo utilizando como competidor alternariol a 10 y 100 nM, más un blanco.

En términos generales, la eficiencia de las fusiones fue moderada o alta, y de prácticamente todas las fusiones se pudieron aislar hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer al alternariol; es decir, anticuerpos que presentaron un comportamiento competitivo en presencia del analito. Tras la evaluación de los pocillos positivos y competitivos se logró aislar un total de 28 hibridomas capaces de generar anticuerpos que reconocían al alternariol, de los cuales 6 proceden del inmunógeno BSA-AL α , mientras que de los ratones inmunizados con los conjugados BSA-AL b y BSA-AL m se estabilizaron 10 y 12 hibridomas, respectivamente. Los resultados obtenidos de eficiencia de las fusiones, así como los resultados de los hibridomas aislados vienen recogidos en la Tabla 3-12.

Tabla 3-12. Fusiones celulares realizadas a partir de ratones inmunizados con conjugados BSA-hapteno y resumen de los resultados obtenidos.

| Inmunógeno | Fusión nº | Eficiencia fusión (%) ^a | Resultados (número de pocillos) | | | Hibridomas aislados ^d |
|-----------------|-----------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| | | | Cultivados | Positivos ^b | Competitivos ^c | |
| BSA-AL α | 1 | 64 | 1552 | 8 | 8 | 3 |
| | 2 | 58 | 1552 | 8 | 2 | 1 |
| | 3 | - ^e | - ^e | 15 | 5 | 2 |
| BSA-AL b | 1 | 98 | 1344 | 34 | 10 | 6 |
| | 2 | 95 | 1536 | 5 | 5 | 4 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BSA-AL m | 1 | 58 | 960 | 31 | 10 | 8 |
| | 2 | 49 | 864 | 15 | 3 | 2 |
| | 3 | 56 | 1632 | 8 | 7 | 2 |

^a Porcentaje de pocillos que presentaron al menos un clon claramente visible al microscopio 10–12 días después de la fusión celular. ^b Número de pocillos que proporcionaron una señal superior a 0.5 en ausencia de analito obtenida mediante ELISA competitivo. ^c Número de pocillos en los que la presencia de analito indujo una reducción de la señal igual o superior al 80% respecto al correspondiente pocillo sin analito obtenida mediante ELISA competitivo. ^d Número de hibridomas productores de anticuerpos de elevada afinidad hacia su analito seleccionados entre todos los presentes en los pocillos con resultado competitivo. ^e No determinado.

Los anticuerpos producidos se purificaron mediante precipitación salina y cromatografía de afinidad. Una vez purificados se determinó su concentración de manera espectrofométrica y se determinó su isotipo mediante ensayo ELISA. La concentración del anticuerpo monoclonal en el sobrenadante de cultivo se conoce como productividad estándar del hibridoma, expresada como la cantidad de anticuerpo que

puede producir un determinado hibridoma por cada 100 mL de sobrenadante. En nuestro caso, la productividad varió mucho en función del anticuerpo producido con valores muy dispares. Los hibridomas productores de los anticuerpos ALa#22, ALm#12 y ALm#120 destacan por tener una productividad más baja en comparación con el resto de hibridomas. La mayoría presentó una productividad normal, de alrededor de 6 mg, sobrepasando los 9 mg en el caso del hibridoma productor de ALa#11. Los resultados obtenidos de productividad estándar de los hibridomas y los isotipos de los anticuerpos monoclonales se pueden observar en la Tabla 3-13.

Tabla 3-13. Anticuerpos monoclonales para alternariol obtenidos a partir de los hibridomas aislados y tipos de cadenas pesadas (H) y ligeras (L) que los componen.

| Inmunógeno | Anticuerpo | [mAb] ^a | Productividad (mg) | Cadena H | Cadena L | Isotipo |
|------------|------------|--------------------|--------------------|-----------------|----------------------|-----------------------|
| BSA-ALa | ALa#11 | 93.2 | 9.3 | γ _{2a} | K | IgG _{2a} (K) |
| | ALa#16 | 25.7 | 2.6 | γ _{2a} | K | IgG _{2a} (K) |
| | ALa#17 | 65.3 | 6.4 | γ _{2b} | K | IgG _{2b} (K) |
| | ALa#22 | 16.6 | 1.7 | γ _{2b} | K | IgG _{2b} (K) |
| | ALa#31 | 22.6 | 2.3 | γ _{2b} | K | IgG _{2b} (K) |
| | ALa#35 | 33.3 | 3.3 | γ _{2b} | K | IgG _{2b} (K) |
| BSA-ALb | ALb#11 | 57.4 | 5.7 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALb#16 | 59.4 | 5.9 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALb#19 | 53.0 | 5.3 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALb#21 | 62.8 | 6.3 | γ ₁ | λ | IgG ₁ (λ) |
| | ALb#22 | 75.9 | 7.6 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALb#24 | 63.6 | 6.4 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALb#25 | 68.2 | 6.8 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALb#119 | 52.2 | 5.2 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALb#121 | 43.5 | 4.3 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| ALb#122 | 45.8 | 4.6 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) | |
| BSA-ALm | ALm#11 | 27.9 | 2.8 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALm#12 | 15.4 | 1.5 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALm#16 | 41.5 | 4.2 | γ _{2a} | K | IgG _{2a} (K) |
| | ALm#18 | 34.5 | 3.4 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALm#19 | 56.9 | 5.7 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALm#21 | 36.9 | 3.7 | γ _{2a} | K | IgG _{2a} (K) |
| | ALm#27 | 23.8 | 2.4 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) |
| | ALm#120 | 7.1 | 0.7 | γ _{2a} | K | IgG _{2a} (K) |
| | ALm#121 | 44.3 | 4.4 | γ _{2a} | K | IgG _{2a} (K) |
| ALm#124 | 51.3 | 5.1 | γ ₁ | K | IgG ₁ (K) | |

^a Concentración de anticuerpo monoclonal en el sobrenadante de cultivo expresada en µg/mL.

Por lo que respecta a los isotipos de los anticuerpos generados, todos son inmunoglobulinas del tipo G. Curiosamente, todos los monoclonales de AL α presentan cadenas pesadas de tipo 2a o 2b, los de AL β son todos de tipo 1, mientras que los de AL m son de los tipos 1 o 2a. La cadena ligera de estas inmunoglobulinas se identifica en la mayoría de casos como κ , con la excepción del anticuerpo AL β #21 que es λ .

3.4.2. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales

De la misma forma que se realizó la evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales, se emplearon ELISAs competitivos (tanto en el formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta como con el de anticuerpo inmovilizado con detección directa) utilizando los correspondientes conjugados homólogos para evaluar la afinidad de estos anticuerpos. Para ello, se determinó el valor de IC₅₀ como una estimación del parámetro de afinidad hacia el analito.

3.4.2.1. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

La evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales producidos se realizó inicialmente utilizando el formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta. En primer lugar, se tapizó con el conjugado homólogo OVA–hapteno a 10, 100 y 1000 ng/mL, y la competición se llevó a cabo frente a una serie de 7 patrones de alternariol más un blanco. El anticuerpo por su parte se empleó a cuatro concentraciones (10, 30, 100 y 300 ng/mL). Dada la gran cantidad de anticuerpos producidos se decidió en estudios preliminares descartar 4 de los monoclonales producidos con el inmunógeno BSA–AL α y 2 de los de la familia de AL m , debido a su baja afinidad hacia el analito. Seguidamente, se procedió a la evaluación de un total de 22 anticuerpos.

La primera conclusión que se puede extraer es que todos los anticuerpos fueron capaces de reconocer a su conjugado homólogo, un hecho a priori esperable dado que la selección y aislamiento de los hibridomas obtenidos se realizó en función de su capacidad de reconocer al conjugado homólogo. La afinidad de los anticuerpos ensayados es excelente, independientemente del hapteno del que provienen, dado que en todos los casos encontramos valores de IC₅₀ hacia alternariol del orden de nanomolar – en más del 60% incluso por debajo de 0.5 nM – (Tabla 3-14). En cuanto a las

concentraciones óptimas de inmunorreactivos podemos decir que son condiciones habitualmente utilizadas para este tipo de anticuerpo, siendo en casi todos los casos de 100 ng/mL de conjugado de tapizado (con la excepción de ALm#12, ALm#16 y ALm#18 para los que hubo que emplear 1000 ng/mL), mientras que la concentración óptima de anticuerpo osciló entre 30 y 300 ng/mL. En principio existen buenos candidatos en cualquiera de las tres familias (ALa, ALb y ALm) para el desarrollo de un inmunoensayo desde el punto de vista de afinidad hacia alternariol.

Tabla 3-14. Caracterización de los anticuerpos monoclonales frente a alternariol mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos.^a

| mAb ^b | [mAb] ^c | [OVA] ^d | IC ₅₀ ^e |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|
| ALa#31 | 100 | 100 | 0.31 |
| ALa#35 | 100 | 100 | 0.24 |
| ALb#11 | 100 | 100 | 0.42 |
| ALb#16 | 100 | 100 | 1.67 |
| ALb#19 | 100 | 100 | 0.29 |
| ALb#21 | 100 | 100 | 0.63 |
| ALb#22 | 100 | 100 | 0.37 |
| ALb#24 | 100 | 100 | 0.43 |
| ALb#25 | 100 | 100 | 0.38 |
| ALb#119 | 100 | 100 | 0.42 |
| ALb#121 | 300 | 100 | 1.36 |
| ALb#122 | 300 | 100 | 0.50 |
| ALm#11 | 100 | 100 | 1.95 |
| ALm#12 | 100 | 1000 | 0.38 |
| ALm#16 | 100 | 1000 | 6.23 |
| ALm#18 | 30 | 1000 | 0.39 |
| ALm#19 | 30 | 100 | 1.92 |
| ALm#21 | 30 | 100 | 0.45 |
| ALm#27 | 30 | 100 | 1.07 |
| ALm#120 | 100 | 100 | 0.45 |
| ALm#121 | 30 | 100 | 0.36 |
| ALm#124 | 30 | 100 | 3.86 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración del anticuerpo expresada en ng/mL. ^d Concentración expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM.

3.4.2.2. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

Para este formato de ensayo se empleó un anticuerpo de captura, con el objetivo de evitar posibles cambios conformacionales al inmovilizar los anticuerpos monoclonales

directamente sobre la placa de poliestireno. Como anticuerpo de captura se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón (GAM, del inglés *goat anti-mouse*), que se empleó siempre a la misma concentración (1000 ng/mL). El monoclonal se ensayó a tres concentraciones diferentes de 100, 300 y 1000 ng/mL. La reacción de competición se realizó con concentraciones de trazador enzimático de 30, 100 y 300 ng/mL, junto a una serie de 7 patrones de alternariol más un blanco. Los valores de IC₅₀, así como las concentraciones de anticuerpos y trazador óptimas para cada combinación encontradas en este formato se detallan en la Tabla 3-15.

Tabla 3-15. Caracterización de los anticuerpos monoclonales frente a alternariol mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo con trazadores homólogos.^a

| mAb ^b | [mAb] ^c | [HRP] ^d | IC ₅₀ ^e |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|
| ALa#31 | 100 | 30 | 0.21 |
| ALa#35 | 100 | 30 | 0.22 |
| ALb#11 | 100 | 30 | 0.18 |
| ALb#16 | 100 | 10 | 0.47 |
| ALb#19 | 300 | 30 | 0.37 |
| ALb#21 | 300 | 10 | 0.36 |
| ALb#22 | 100 | 30 | 0.16 |
| ALb#24 | 1000 | 30 | 0.32 |
| ALb#25 | 300 | 30 | 0.23 |
| ALb#119 | 100 | 10 | 0.09 |
| ALb#121 | 300 | 30 | 0.23 |
| ALb#122 | 1000 | 30 | 0.31 |
| ALm#11 | 100 | 30 | 0.42 |
| ALm#12 | 1000 | 300 | 2.79 |
| ALm#16 | | | |
| ALm#18 | 100 | 100 | 0.47 |
| ALm#19 | 100 | 30 | 2.33 |
| ALm#21 | 100 | 100 | 0.55 |
| ALm#27 | 100 | 30 | 1.03 |
| ALm#120 | 100 | 100 | 1.11 |
| ALm#121 | 100 | 100 | 0.41 |
| ALm#124 | 100 | 10 | 0.98 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Las celdas vacías indican que no se obtuvo señal. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración del anticuerpo expresada en ng/mL. ^d Concentración de trazador expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM.

La evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales en este formato de ensayo se realizó a través de la competición con su trazador homólogo. En casi todos los

casos, los anticuerpos estudiados fueron capaces de reconocer a su trazador enzimático homólogo. Solo en el caso del anticuerpo ALm#16 no se obtuvo señal en las condiciones ensayadas. El primer resultado destacable es que en las tres familias encontramos anticuerpos con afinidades del orden de nanomolar, como ya hemos observado en el formato indirecto. En todos los casos (ALa, ALb y ALm) encontramos afinidades por debajo de 0.5 nM. Destaca especialmente el anticuerpo ALb#119 que cuando se ensayaba a 100 ng/mL frente a su trazador homólogo a 10 ng/mL mostraba una afinidad hacia alternariol por debajo de 0.1 nM. Este resultado destaca a este monoclonal como uno de los mejores anticuerpos obtenidos.

3.4.3. Especificidad de los anticuerpos monoclonales

Una vez estudiada la afinidad hacia alternariol de todos los anticuerpos monoclonales seleccionados, se procedió a evaluar su especificidad. Desde un punto de vista analítico es importante saber en qué grado los anticuerpos obtenidos son capaces de reconocer a otros analitos con similitudes estructurales y que puedan presentarse como una posible inferencia en la cuantificación de alternariol. Un metabolito secundario de los hongos del género *Alternaria* que está normalmente presente junto con alternariol, es alternariol 9-metil éter. Se trata de una molécula estructuralmente muy parecida, cuya única diferencia es el grupo metileter en C-9. Por este motivo, este estudio se centró en evaluar la especificidad de nuestros anticuerpos en relación a este segundo metabolito. Para ello, se determinó la RC calculada como el cociente de valores de IC₅₀ entre alternariol y alternariol 9-metil éter. Recordemos que este parámetro se interpreta en porcentaje, y que se considera que un anticuerpo es específico cuando la RC es inferior a un 1%. La especificidad se determinó mediante ELISA competitivo, tanto indirecto como directo, con su conjugado o trazador homólogo en las condiciones óptimas determinadas para cada pareja de anticuerpo/conjugado. Los valores de RC obtenidos en ensayo indirecto vienen recogidos en la Tabla 3-16.

A nivel cualitativo se observó que el comportamiento de los anticuerpos en términos de especificidad es variado, aunque la amplia mayoría resultaron ser específicos de alternariol. La tendencia general siguió el mismo patrón de reconocimiento que se observó con los policlonales. Concretamente los anticuerpos monoclonales generados

a partir de AL α mostraron valores de RC en torno al 50%, probablemente debido a la similitud estructural de este hapteno con alternariol 9-metil éter. En formato directo, la RC obtenida fue mayor, situándose alrededor del 150% para ambos anticuerpos monoclonales de tipo AL α . Esta diferencia se debe probablemente a las características del conjugado y del trazador del hapteno AL α . En el lado contrario encontramos los anticuerpos generados a partir de los haptenos AL b y AL m , siendo en la mayoría de los casos altamente específicos de alternariol. En ese sentido, de entre los 20 anticuerpos estudiados, obtenidos a partir de estos haptenos, solo AL m #11 tiene RC destacable, encontrándose alrededor del 4%. En el formato directo, no se observó RC hacia alternariol 9-metil éter con ninguno de estos monoclonales.

Tabla 3-16. Reactividad cruzada con alternariol 9-metil éter de los anticuerpos monoclonales determinada por ELISA competitivo indirecto.^a

| mAb ^b | IC ₅₀ ^c AME | RC (%) |
|------------------|-----------------------------------|--------|
| AL α #31 | 0.59 | 52.8 |
| AL α #35 | 0.48 | 50.2 |
| AL b #11 | ~1000 | 0.0 |
| AL b #16 | 320 | 0.5 |
| AL b #19 | ~1000 | 0.0 |
| AL b #21 | | 0.0 |
| AL b #22 | | 0.0 |
| AL b #24 | 138 | 0.3 |
| AL b #25 | 130 | 0.3 |
| AL b #119 | | 0.0 |
| AL b #121 | 138 | 1.0 |
| AL b #122 | ~1000 | 0.1 |
| AL m #11 | 48 | 4.1 |
| AL m #12 | 53 | 0.7 |
| AL m #16 | | 0.0 |
| AL m #18 | ~1000 | 0.0 |
| AL m #19 | | 0.0 |
| AL m #21 | 127 | 0.4 |
| AL m #27 | ~1000 | 0.1 |
| AL m #120 | ~1000 | 0.1 |
| AL m #121 | 117 | 0.3 |
| AL m #124 | | 0.0 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Valores expresados en nM para alternariol 9-metil éter. Las celdas vacías indican que no se obtuvo inhibición.

Desde el punto de vista del desarrollo de un inmunoensayo, un valor alto de RC puede aprovecharse como una ventaja, ya que es posible utilizar esta característica para desarrollar un ensayo capaz de reconocer a los dos analitos. Los resultados obtenidos con los anticuerpos AL α #31 y AL α #35 revelan su alto potencial para ser considerados como anticuerpos genéricos. Por otro lado, se ha generado una amplia colección de monoclonales de elevada afinidad y altamente específicos de alternariol para el desarrollo de inmunoensayos capaces de determinar de manera selectiva dicha micotoxina.

Tal y como se ha comentado anteriormente con los anticuerpos policlonales es posible establecer una relación entre la afinidad y especificidad de los anticuerpos y la estructura del hapteno utilizado en la inmunización. Por otro lado, es esperable que la inmunización con haptenos que ofrecen al sistema inmunitario partes muy distintas de la molécula genere anticuerpos de diferente especificidad. A pesar de que los monoclonales no constituyen un fiel reflejo de la respuesta global inmunitaria, sí que suelen seguir el mismo patrón observado con los anticuerpos policlonales. En este estudio ha quedado probado la idoneidad de los distintos haptenos a la hora de producir anticuerpos monoclonales de elevada afinidad. Además, los resultados obtenidos con monoclonales revelaron de nuevo la idoneidad del hapteno AL α para generar anticuerpos genéricos capaces de reconocer tanto alternariol como alternariol 9-metil éter, mientras que los anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de los haptenos AL b y AL m fueron fundamentalmente específicos de alternariol.

3.4.4. Uso de la heterología de hapteno

3.4.4.1. Evaluación de la sensibilidad de ensayo

Con el objetivo de desarrollar inmunoensayos para la determinación de alternariol en alimentos se ensayaron todos los anticuerpos monoclonales seleccionados frente a los conjugados heterólogos disponibles. Se realizaron ensayos utilizando tanto aquellos conjugados destinados a la inmunización de animales para la obtención de anticuerpos, funcionando principalmente como haptenos heterólogos de posición de brazo espaciador AL α , AL b y AL m (todos introducen poseen el mismo núcleo

del hapteno pero cada uno con el brazo espaciador por diferente posición de la molécula), como los no inmunizantes preparados *ex profeso* (ALh1, ALh2 y AMEb) con diferentes tipos de heterología destinados para su uso en la mejora de la sensibilidad de ensayo. Todos los resultados obtenidos para la evaluación de la sensibilidad de ensayo en ambos formatos, así como las condiciones óptimas para cada par anticuerpo/conjugado se detallan a continuación

3.4.4.1.1. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

De manera general, se puede decir que el reconocimiento de los conjugados heterólogos fue desigual, cosa que es habitual con anticuerpos monoclonales cuando, como en este caso, las heterologías son muy drásticas. Por una parte, los anticuerpos de AL α no reconocieron a los conjugados heterólogos que introducen el brazo espaciador en el anillo distal (OVA-ALb, OVA-AMeB, OVA-ALh1 y OVA-ALh2), y tan solo reconocieron al conjugado heterólogo OVA-ALm. Los resultados con estos anticuerpos se muestran en la Tabla 3-17.

Tabla 3-17. Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos con AL α mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.^a

| mAb ^b | OVA-AL α | | | OVA-ALm | | |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|---------|-------|------------------|
| | [mAb] ^c | [OVA] ^d | IC ₅₀ ^e | [mAb] | [OVA] | IC ₅₀ |
| AL α #31 | 100 | 100 | 0.31 | 100 | 100 | 0.46 |
| AL α #35 | 100 | 100 | 0.24 | 30 | 100 | 0.19 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración en ng/mL. ^d Concentración del conjugado expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol.

Por otro lado, ningún anticuerpo de tipo ALb reconoció al conjugado de OVA-AL α (Tabla 3-18), un resultado que se encuentra en consonancia con el comportamiento recíproco observado para los anticuerpos de AL α . Tampoco fue reconocido el conjugado de AMeB, con el grupo OH en posición C-9 metilado, estructuralmente más parecido a alternariol 9-metil éter. Este resultado no sorprende dada la afinidad y especificidad de estos anticuerpos frente a este analito. Por otro lado, casi todos los anticuerpos mostraron reconocimiento del conjugado heterólogo OVA-ALm que introduce el brazo espaciador desde una posición central en la molécula, lo que representa una heterología

menos drástica desde el punto de vista estructural. Adicionalmente, algunos de los anticuerpos respondieron frente a los conjugados OVA-ALh1 y OVA-ALh2, siendo este último reconocido por un mayor número de anticuerpos. Con respecto a la sensibilidad alcanzada, en algún caso se hallaron mejoras en los valores de IC₅₀ con respecto a los ensayos con el conjugado homólogo, alcanzando valores por debajo de 0.2 nM. De esta familia de anticuerpos, cabe destacar la elevada sensibilidad mostrada por los inmunoensayos en los que se emplearon los anticuerpos ALb#11, ALb#19 y ALb#25 con el conjugado del hapteno heterólogo ALm.

Tabla 3-18. Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos con ALb mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.^a

| mAb ^b | OVA-ALb | | | OVA-ALm | | | OVA-ALh1 | | | OVA-ALh2 | | |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|---------|-------|------------------|----------|-------|------------------|----------|-------|------------------|
| | [mAb] ^c | [OVA] ^d | IC ₅₀ ^e | [mAb] | [OVA] | IC ₅₀ | [mAb] | [OVA] | IC ₅₀ | [mAb] | [OVA] | IC ₅₀ |
| ALb#11 | 100 | 100 | 0.42 | 30 | 1000 | 0.17 | | | | | | |
| ALb#16 | 100 | 100 | 1.67 | 100 | 100 | 1.01 | 100 | 1000 | 0.29 | 30 | 1000 | 0.58 |
| ALb#19 | 100 | 100 | 0.29 | 30 | 1000 | 0.14 | | | | | | |
| ALb#21 | 100 | 100 | 0.63 | 30 | 1000 | 0.41 | 300 | 1000 | 0.70 | 300 | 1000 | 0.73 |
| ALb#22 | 100 | 100 | 0.37 | | | | | | | | | |
| ALb#24 | 100 | 100 | 0.43 | | | | | | | 100 | 1000 | 0.19 |
| ALb#25 | 100 | 100 | 0.38 | 30 | 1000 | 0.11 | | | | 300 | 1000 | 0.69 |
| ALb#119 | 100 | 100 | 0.42 | 100 | 100 | 0.28 | | | | | | |
| ALb#121 | 300 | 100 | 1.36 | | | | | | | 300 | 1000 | 0.79 |
| ALb#122 | 300 | 100 | 0.50 | | | | | | | | | |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración en ng/mL. ^d Concentración del conjugado expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol. Las celdas vacías indican que en esa combinación no se obtuvo señal.

En cuanto a los anticuerpos monoclonales de ALm, se observó un mayor reconocimiento de los conjugados heterólogos ensayados (Tabla 3-19), como era previsible debido a la posición intermedia del brazo espaciador en el hapteno inmunizante. Algunos anticuerpos incluso reconocieron al conjugado OVA-ALa, y muchos de ellos fueron capaces de unirse al conjugado de ALb. Finalmente, cabe destacar tres monoclonales que tan solo reconocieron al conjugado homólogo (ALm#12, ALm#16 y ALm#18). En cambio, se obtuvo señal con todos los conjugados heterólogos ensayados frente a dos anticuerpos, ALm#21 y ALm#121. Un buen número de estas

combinaciones permitieron aumentar la sensibilidad de los inmunoensayos en este formato, demostrando la idoneidad de los haptenos diseñados. Cuando el conjugado de OVA-AL α fue reconocido se observó una notable mejora, con valores de IC₅₀ por debajo de 0.2 nM. La utilización del conjugado de OVA-AL β fue el que menos incrementos aportó en la sensibilidad de los inmunoensayos con estos anticuerpos.

Tabla 3-19. Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos con AL m mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.^a

| mAb ^b | OVA-AL α | | | OVA-AL β | | | OVA-AL m | | |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|----------------|-------|------------------|------------|-------------|------------------|
| | [mAb] ^c | [OVA] ^d | IC ₅₀ ^e | [mAb] | [OVA] | IC ₅₀ | [mAb] | [OVA] | IC ₅₀ |
| AL m #11 | 100 | 1000 | 0.65 | | | | 100 | 100 | 1.95 |
| AL m #12 | | | | | | | 100 | 1000 | 0.38 |
| AL m #16 | | | | | | | 100 | 1000 | 6.23 |
| AL m #18 | | | | | | | 30 | 1000 | 0.39 |
| AL m #19 | | | | 100 | 100 | 1.23 | 30 | 100 | 1.92 |
| AL m #21 | 30 | 1000 | 0.16 | 30 | 1000 | 1.90 | 30 | 100 | 0.45 |
| AL m #27 | | | | 30 | 1000 | 0.85 | 30 | 100 | 1.07 |
| AL m #120 | | | | 100 | 1000 | 0.30 | 100 | 100 | 0.45 |
| AL m #121 | 30 | 1000 | 0.15 | 100 | 100 | 0.43 | 30 | 100 | 0.36 |
| AL m #124 | | | | 100 | 100 | 3.97 | 30 | 100 | 3.86 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración en ng/mL. ^d Concentración del conjugado expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol. Las celdas vacías indican que en esa combinación no se obtuvo señal.

Por otro lado, cabe notar que cuando se utilizan los conjugados OVA-AMe b , OVA-AL $h1$ y OVA-AL $h2$ como competidores el aumento de la sensibilidad es extraordinaria en todos los casos en que fueron reconocidos, ya que se llega a mejorar hasta un orden de magnitud los valores alcanzados con su respectivo conjugado homólogo. Este resultado es muy interesante desde el punto de vista del esfuerzo sintético, ya que particularmente los haptenos AL $h1$ y AL $h2$ se preparan en pocas etapas a partir de compuestos comerciales de bajo coste. Entre todos los anticuerpos monoclonales de la colección destacan los resultados obtenidos con el anticuerpo AL m #21 cuando se enfrenta a OVA-AL $h1$. Con esta combinación de inmunorreactivos la sensibilidad del inmunoensayo está en torno a 0.1 nM (Tabla 3-20).

Tabla 3-20. Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos con ALm mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con otros conjugados heterólogos.^a

| mAb ^b | OVA-AMEb | | | OVA-ALh1 | | | OVA-ALh2 | | |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|----------|-------|------------------|----------|-------|------------------|
| | [mAb] ^c | [OVA] ^d | IC ₅₀ ^e | [mAb] | [OVA] | IC ₅₀ | [mAb] | [OVA] | IC ₅₀ |
| ALm#11 | | | | | | | | | |
| ALm#12 | | | | | | | | | |
| ALm#16 | | | | | | | | | |
| ALm#18 | | | | | | | | | |
| ALm#19 | | | | | | | | | |
| ALm#21 | 30 | 1000 | 0.17 | 30 | 1000 | 0.09 | 30 | 1000 | 0.15 |
| ALm#27 | | | | | | | | | |
| ALm#120 | | | | | | | | | |
| ALm#121 | 30 | 1000 | 0.16 | 30 | 1000 | 0.13 | 30 | 1000 | 0.16 |
| ALm#124 | | | | 30 | 1000 | 0.44 | 300 | 1000 | 0.99 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración en ng/mL. ^d Concentración del conjugado expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol. Las celdas vacías indican que en esa combinación no se obtuvo señal.

3.4.4.1.2. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

En términos generales el reconocimiento de los trazadores heterólogos en todas las combinaciones probadas en este formato de ensayo fue escaso, como cabía esperar por el tipo de heterologías empleadas. En la mayoría de casos no se obtuvo una señal suficiente o directamente no había reconocimiento del trazador. No obstante, algunos anticuerpos fueron capaces de reconocer algunos de los trazadores preparados. Como es habitual en las combinaciones heterólogas se tuvo que aumentar las cantidades tanto de anticuerpo como de trazador empleadas para poder obtener suficiente señal.

Los dos anticuerpos de tipo AL α reconocieron al trazador heterólogo HRP-ALm (Tabla 3-21), pero no fueron capaces de reconocer a ningún otro trazador de los ensayados, como es el caso de los trazadores enzimáticos HRP-ALb, HRP-AMEb, HRP-ALh1 y HRP-ALh2, un hecho atribuible a las diferencias estructurales introducidas en los mismos al funcionalizar la posición hidroxílica más distal de la molécula. Con la única combinación heteróloga posible no se aumentó la sensibilidad conseguida con el trazador homólogo, pero tampoco la empeoró.

Tabla 3-21. Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-alternariol mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura con trazadores homólogos y heterólogos.^a

| mAb ^b | HRP-ALa | | | HRP-ALm | | |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|---------|-------|------------------|
| | [mAb] ^c | [HRP] ^d | IC ₅₀ ^e | [mAb] | [HRP] | IC ₅₀ |
| ALa#31 | 100 | 30 | 0.22 | 1000 | 30 | 0.18 |
| ALa#35 | 100 | 30 | 0.22 | 1000 | 30 | 0.19 |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. Las celdas vacías indican que en esa combinación no se obtuvo señal. El anticuerpo de captura (GAM) se empleó a 1 µg/mL. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración en ng/mL. ^d Concentración del trazador expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol.

En cuanto a los anticuerpos generados a partir del hapteno ALb cabe destacar el monoclonal ALb#16, con el que se obtuvo reconocimiento de los trazadores HRP-ALm, HRP-ALh1 y HRP-ALh2. Sin embargo, el aumento necesario de la concentración de inmunorreactivos para estas combinaciones conllevó una pérdida de hasta 3 órdenes de magnitud en sensibilidad (Tabla 3-22). De igual forma que ocurría en el caso anterior, los anticuerpos de la familia del hapteno ALb no reconocieron al trazador heterólogo de AMEb.

Tabla 3-22. Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-alternariol mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura con trazadores homólogos y heterólogos.^a

| mAb ^b | HRP-ALb | | | HRP-ALm | | | HRP-ALh1 | | | HRP-ALh2 | | |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|---------|-------|------------------|----------|-------|------------------|----------|-------|------------------|
| | [mAb] ^c | [HRP] ^d | IC ₅₀ ^e | [mAb] | [HRP] | IC ₅₀ | [mAb] | [HRP] | IC ₅₀ | [mAb] | [HRP] | IC ₅₀ |
| ALb#11 | 100 | 30 | 0.18 | | | | | | | | | |
| ALb#16 | 100 | 10 | 0.47 | 1000 | 30 | 0.69 | 1000 | 300 | 195 | 1000 | 30 | 2.34 |
| ALb#19 | 300 | 30 | 0.37 | | | | | | | | | |
| ALb#21 | 300 | 10 | 0.36 | | | | | | | | | |
| ALb#22 | 100 | 30 | 0.16 | | | | | | | | | |
| ALb#24 | 1000 | 30 | 0.32 | | | | | | | | | |
| ALb#25 | 300 | 30 | 0.23 | | | | | | | | | |
| ALb#119 | 100 | 10 | 0.09 | 1000 | 100 | 0.35 | | | | | | |
| ALb#121 | 300 | 30 | 0.23 | | | | | | | | | |
| ALb#122 | 1000 | 30 | 0.31 | | | | | | | | | |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. Las celdas vacías indican que en esa combinación no se obtuvo señal. El anticuerpo de captura (GAM) se empleó a 1 µg/mL. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración en ng/mL. ^d Concentración del trazador expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol.

Un resultado similar se obtuvo con los 3 anticuerpos monoclonales de la familia de ALm (ALm#11, ALm#120 y ALm#121), con los que se observó respuesta con los trazadores heterólogos HRP-AL α , HRP-ALh1 o HRP-ALh2. Por otra parte, y en concordancia con lo ya observado para los anticuerpos de tipo AL α y ALb, no se observó reconocimiento del trazador HRP-AMEb. Los resultados obtenidos y las concentraciones óptimas de inmunorreactivos se muestran en la Tabla 3-23.

Tabla 3-23. Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-alternariol mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura con trazadores homólogos y heterólogos.^a

| mAb ^b | HRP-AL α | | | HRP-ALm | | | HRP-ALh1 | | | HRP-ALh2 | | |
|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|-------------|------------|------------------|----------|-------|------------------|----------|-------|------------------|
| | [mAb] ^c | [HRP] _d | IC ₅₀ ^e | [mAb] | [HRP] | IC ₅₀ | [mAb] | [HRP] | IC ₅₀ | [mAb] | [HRP] | IC ₅₀ |
| ALm#11 | 1000 | 100 | 2.01 | 100 | 30 | 0.42 | | | | | | |
| ALm#12 | | | | 1000 | 300 | 2.79 | | | | | | |
| ALm#16 | | | | | | | | | | | | |
| ALm#18 | | | | 100 | 100 | 0.47 | | | | | | |
| ALm#19 | | | | 100 | 30 | 2.33 | | | | | | |
| ALm#21 | | | | 100 | 100 | 0.55 | 1000 | 300 | 145 | | | |
| ALm#27 | | | | 100 | 30 | 1.03 | | | | | | |
| ALm#120 | | | | 100 | 100 | 1.11 | | | | | | |
| ALm#121 | | | | 100 | 100 | 0.41 | 1000 | 300 | 60 | 100 | 30 | 0.6 |
| ALm#124 | | | | 100 | 10 | 0.98 | | | | | | |

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.5 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. Las celdas vacías indican que en esa combinación no se obtuvo señal. El anticuerpo de captura (GAM) se empleó a 1 μ g/mL. ^b Anticuerpo monoclonal. ^c Concentración en ng/mL. ^d Concentración del trazador expresada en ng/mL. ^e Valores expresados en nM para alternariol.

En contraste con los resultados observados en el formato indirecto, los trazadores heterólogos empleados en este estudio no aportaron mejoras significativas en el formato de ensayo directo, posiblemente influenciado por la naturaleza misma de los haptenos diseñados que incluían cambios muy drásticos en su estructura, como la posición del brazo espaciador o la eliminación de grupos químicos funcionales en posiciones distales.

3.4.4.1.3. Evaluación cinética de anticuerpos en formato directo

En este estudio se persigue un doble objetivo, por un lado, obtener la mayor información posible sobre la interacción antígeno/anticuerpo, y por otro, desde un punto de vista más práctico, el desarrollo de un inmunoensayo en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa aplicando tiempos de realización más cortos. Para ello se estudiaron tanto tiempos de preincubación (T_1) del anticuerpo con el analito como tiempos de competición (T_2) con los trazadores, y se observó su efecto sobre los parámetros analíticos de los ensayos.

Para ello, se eligieron dos anticuerpos de la colección de anticuerpos monoclonales generados que dieron lugar a los ensayos más sensibles y selectivos en el formato directo. De entre todos, como ya se ha comentado anteriormente, los anticuerpos que aportaron una mayor sensibilidad hacia alternariol en este formato de ensayo resultaron ser los de la familia de ALb, concretamente ALb#22 y ALb#119 frente a su respectivo trazador homólogo. Se procedió entonces a una evaluación biparamétrica, en la que se variaba tanto el tiempo de preincubación con el analito (5, 10 o 15 min como el tiempo de competición (5, 10, 15, 30, 45 y 60 min). Todo esto dio como resultado una serie de curvas de inhibición cuyos parámetros se detallan en la Figura 22.

La evolución de la señal máxima siguió un patrón lógico, aumentando al incrementar T_2 . La pendiente fue muy elevada a tiempos de incubación cortos, pasando a normalizarse al aumentar los tiempos de incubación. En términos generales, los valores de IC_{50} mejoraron significativamente cuando se preincubó alternariol en la placa tapizada. De todas las combinaciones evaluadas para el ensayo con el anticuerpo monoclonal ALb#22, la mayor sensibilidad se consiguió con 15 min de tiempo de preincubación (T_1) y 30 min de tiempo de competición (T_2), en el que hubo una reducción considerable del valor de IC_{50} hasta valores próximos a 0.1 nM y la consiguiente ganancia en tiempo.

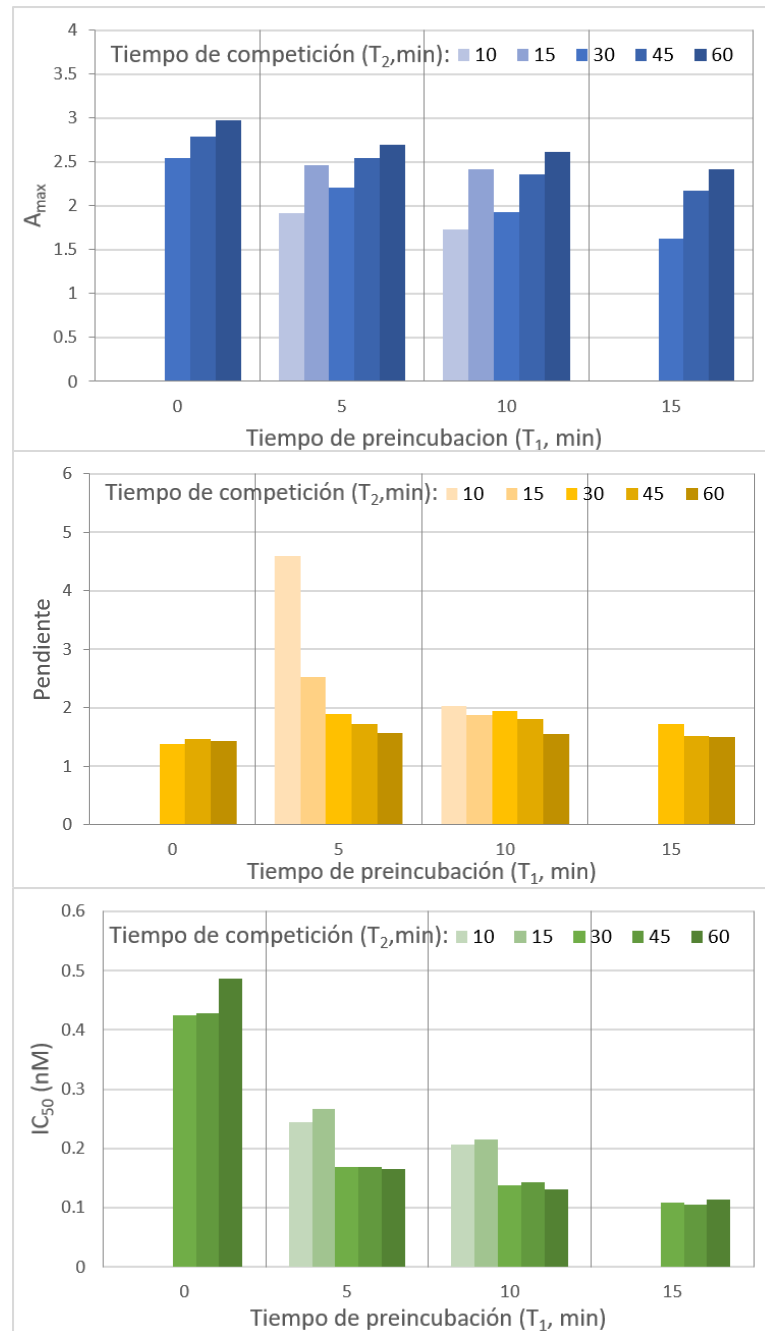


Figura 22. Optimización de tiempos de ensayo para el anticuerpo ALb#22. T_1 es el tiempo de preincubación con analito antes de añadir el trazador. T_2 es el tiempo de competición.

A continuación, se realizó el mismo estudio para el ensayo con el par de inmunorreactivos ALb#119/HRP-ALb en exactamente las mismas condiciones detalladas anteriormente. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 23. Como era de esperar a tiempos cortos la señal en ausencia de analito es escasa o nula, pero con tan solo 5 o 10 min de preincubación y tiempos de competición de 10 min, la A_{max} ya fue superior a 0.8. Otra conclusión que se puede extraer es que la pendiente de la curva de inhibición no se vio afectada con una preincubación corta, ni tampoco el valor de IC_{50} se

ve muy alterado, indicando la posibilidad de reducir los tiempos de incubación. Con valores de $T_1=5$ min y $T_2=10$ min, la A_{max} permaneció cercana a 1.0, la pendiente se mantuvo y, además, se obtuvo una ligera ganancia en términos de IC_{50} . En conclusión, el ensayo directo basado en la combinación ALb#119/HRP-ALb se perfiló como el mejor de los dos evaluados, siendo un buen candidato para su posterior caracterización y desarrollo como ensayo directo a tiempos cortos.

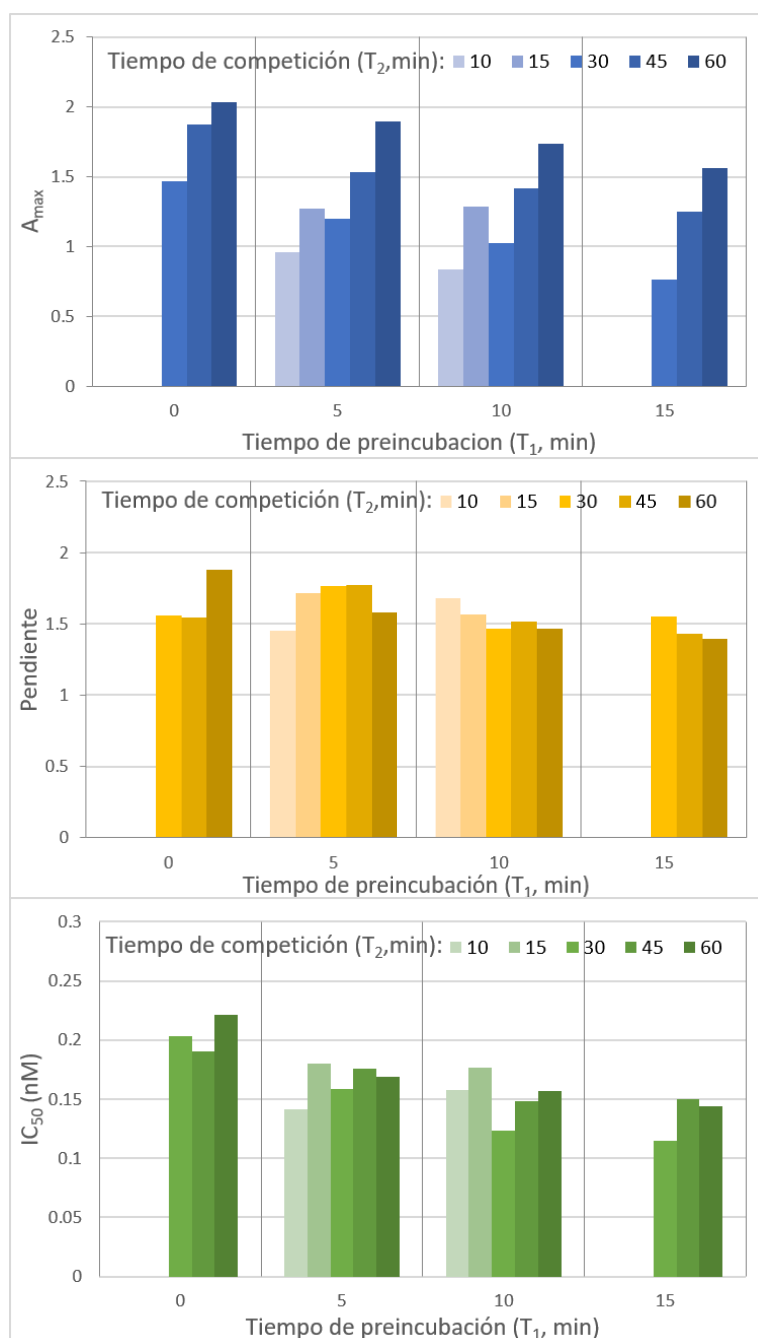


Figura 23. Optimización de tiempos de ensayos para el inmunoensayo con ALb#119/HRP-ALb.

3.5. Caracterización y desarrollo de inmunoensayos

El primer paso para el desarrollo de potenciales inmunoensayos de elevada sensibilidad y selectividad hacia alternariol es la evaluación de distintos parámetros fisicoquímicos que puedan de algún modo interferir sobre las interacciones anticuerpo/analito y anticuerpo/conjugado de ensayo. De esta manera, parámetros como el pH, la fuerza iónica o la presencia de ciertos disolventes orgánicos utilizados para la obtención de los extractos a analizar pueden tener un efecto directo en la sensibilidad (IC_{50}) o la señal (A_{max}) del ensayo. Este estudio también se puede entender como un proceso de optimización, en el que además de conocer los límites de funcionamiento del ensayo se puedan encontrar las mejores condiciones para el mismo. Esto podría conllevar a encontrar nuevas condiciones, más o menos alejadas de las fisiológicas, que dieran como resultado unos mejores parámetros analíticos.

3.5.1. Propuesta de inmunoensayos

Desde el punto de vista de su posterior aplicación y considerando la afinidad de monoclonales y policlonales, se consideró más conveniente la selección definitiva de los ensayos basados en anticuerpos monoclonales. Además, siempre que fuese necesario se podría generar homogénea e indefinidamente más cantidad de anticuerpo a partir de su correspondiente hibridoma. Por este motivo en este apartado trataremos exclusivamente el desarrollo de inmunoensayos con anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, los anticuerpos seleccionados deben ser específicos de alternariol. Por otra parte, se han de tener en cuenta las concentraciones de los inmunorreactivos utilizados en dichos ensayos, priorizando aquellos en los que se utilicen cantidades más bajas y que generen curvas de inhibición sin ruido de fondo y cuyas pendientes tengan valores en torno a la unidad para garantizar un buen compromiso entre la precisión de la medida y el rango de trabajo.

Teniendo en cuenta todas estas características se realizó una preselección de inmunoensayos con dos de los mejores anticuerpos para cada formato de ELISA competitivo evaluado. Tres de los cuatro ensayos se llevaron a cabo con tiempos de incubación de la etapa de competición de 1 h y revelando con OPD durante 15 min. En

cambio, el ensayo en formato directo con ALb#119/HRP-ALb se realizó con una etapa de preincubación (T_1) de 5 min, una etapa de competición de (T_2) de 10 min y revelando con TMB durante 15 min. Las características de los inmunoensayos preseleccionados se recogen en la Tabla 3-24. La señal máxima de los ensayos con revelado con OPD fue de 0.5, si bien puede ser mejorada cambiando el sustrato empleado en la etapa de revelado por 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). La sensibilidad que alcanzan cada uno de ellos es excelente a juzgar por sus valores de IC_{50} cercanos a 0.16 nM, e incluso por debajo de 0.1 nM con el anticuerpo ALb#119 y el trazador homólogo en el formato directo. Como suele observarse cuando se emplean anticuerpos monoclonales, la pendiente de las curvas de inhibición fueron algo elevadas, particularmente en el ensayo indirecto con el anticuerpo ALm#21 junto al conjugado OVA-ALa. Con todas estas características, cualquiera de los cuatro ensayos sería adecuado para su caracterización, desarrollo y posterior validación de acuerdo con los objetivos de esta Tesis Doctoral.

Tabla 3-24. Propiedades de los inmunoensayos específicos para alternariol preseleccionados.^a

| | Formato indirecto | | Formato directo | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Anticuerpo monoclonal | ALb#11 30 ng/mL | ALm#21 30 ng/mL | ALb#22 100 ng/mL | ALb#119 100 ng/mL |
| Conjugado de ensayo | OVA-ALm 1000 ng/mL | OVA-ALa 1000 ng/mL | HRP-ALb 30 ng/mL | HRP-ALb 10 ng/mL |
| $A_{m\acute{a}x}$ | 0.574 ± 0.112^b | 0.515 ± 0.057^b | 0.528 ± 0.035^b | 0.753 ± 0.310^c |
| IC_{50} (nM) | 0.167 ± 0.012 | 0.160 ± 0.003 | 0.163 ± 0.063 | 0.089 ± 0.025 |
| Pendiente | 1.329 ± 0.205 | 1.625 ± 0.191 | 1.260 ± 0.426 | 1.520 ± 0.618 |
| $A_{m\acute{i}n}$ | 0.012 ± 0.006 | 0.015 ± 0.011 | 0.044 ± 0.001 | 0.040 ± 0.008 |

^a Los valores son la media de tres determinaciones independientes. ^b Revelado con OPD 15 min. ^c Revelado con TMB 15 min

3.5.2. Influencia del pH y la fuerza iónica

Hasta el momento todos los ensayos habían sido llevados a cabo en tampón fosfato salino (PBS), es decir, condiciones fisiológicas de pH (7.4) y fuerza iónica (166 mM). No obstante, modificaciones en estos parámetros podrían cambiar la afinidad del anticuerpo hacia el conjugado y el propio alternariol, dando lugar a variaciones en la sensibilidad de los inmunoensayos. Con el objetivo de conocer la influencia de estos parámetros fisicoquímicos, se llevaron a cabo dos estudios paralelos en los que una de

estas variables se fijaba en su valor fisiológico a la vez que la segunda de ellas se evaluaba.

El estudio de la influencia del pH se llevó a cabo comparando los valores de A_{max} e IC_{50} de curvas de inhibición obtenidas a partir de la mezcla de una curva estándar de alternariol preparada en agua MilliQ con disoluciones del inmunorreactivo, anticuerpo en el formato indirecto y trazador en el formato directo, en tampones fosfato con distinto pH. El rango evaluado estuvo comprendido entre 6.0 y 8.5, y los tampones fueron preparados de manera que todos tuviesen la misma concentración de fosfato (20 mM) y manteniendo constante la fuerza iónica (332 mM). La Figura 24 muestra la variación relativa de los valores de A_{max} e IC_{50} de los cuatro inmunoensayos competitivos seleccionados respecto a los valores obtenidos en las condiciones iniciales, es decir, en PBS (pH 7.4).

Para los ensayos indirectos (*ALb#11/OVA-ALm* y *ALm#21/OVA-ALa*), prácticamente no hubo variaciones significativas de comportamiento en la A_{max} en el intervalo de pH desde 7.4 hasta 8.5, aunque se observó una tendencia inversa al aumentar el pH. Por otro lado, se observó una mejora en los valores de IC_{50} para ambos inmunoensayos a valores de pH mayores, obteniéndose los valores más bajos a pH 8.0 o superior.

En cuanto a los ensayos directos, se observaron resultados dispares en los dos ensayos evaluados. El valor de A_{max} resultó ser considerablemente dependiente del pH para el par *ALb#22/HRP-ALb*, disminuyendo drásticamente. Por su parte, la IC_{50} de este inmunoensayo experimentó un ligero empeoramiento (IC_{50} mas alta) conforme se aumentaba el pH. En este caso la relación más alta entre el valor de A_{max} y el de IC_{50} se obtuvo a pH 7.0. Por otro lado, para el ensayo *ALb#119/HRP-ALb* el valor de A_{max} se mantuvo estable en todo el rango de pH estudiado, mientras que el ensayo más sensible (con valores de IC_{50} más bajos) se obtuvo a pH 8.5. Nuevamente, un pH ácido parece ser contraproducente, observándose la misma tendencia que en los ensayos indirectos, es decir, un aumento del valor de IC_{50} .

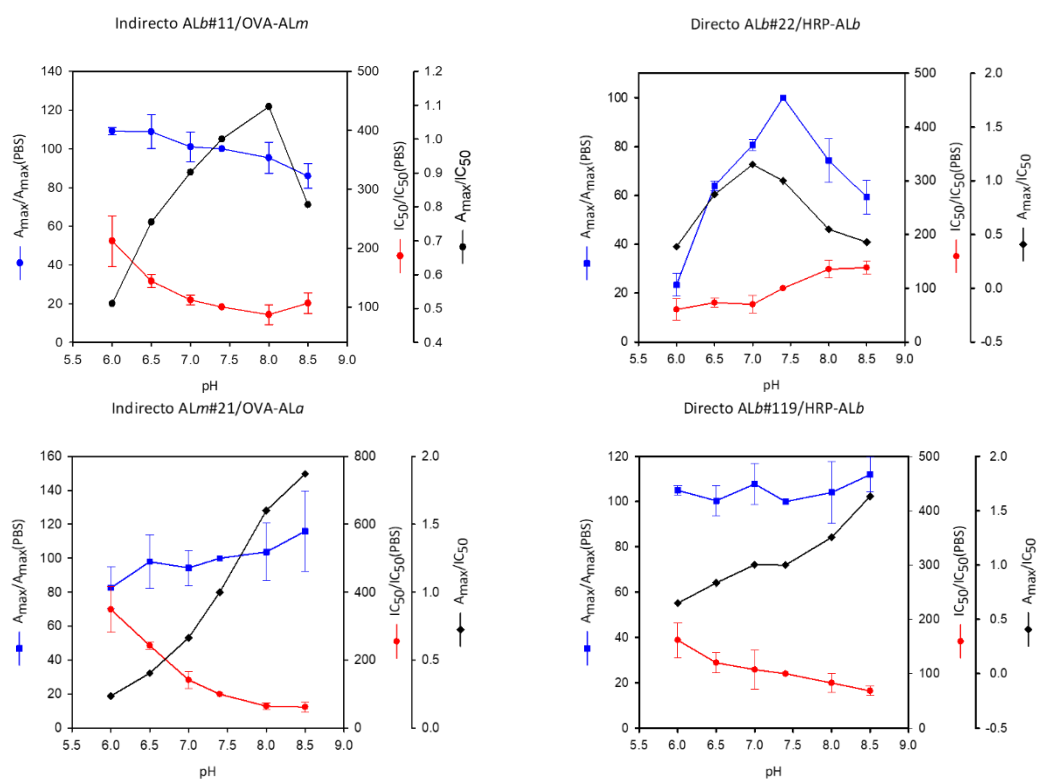


Figura 24. Influencia del pH en la etapa de competición sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} de los inmunoensayos competitivos seleccionados para alternariol. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres réplicas independientes.

Una vez evaluada la influencia del pH sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} de los inmunoensayos seleccionados, se llevó a cabo un estudio equivalente para determinar el efecto de la fuerza iónica. En este caso, el inmunorreactivo de competición se disolvió en tampones fosfato 20 mM con concentraciones variables de NaCl, preparados de tal manera que en todos los casos se mantuviesen constantes en el ensayo tanto el pH (7.4) como la concentración de fosfato. Se cubrió así un rango de valores de fuerza iónica en ensayo desde 50 hasta 280 mM. La influencia de esta variable sobre los inmunoensayos seleccionados se muestra gráficamente en la Figura 25 como la variación relativa de los valores de A_{max} e IC_{50} respecto al comportamiento observado en PBS ($I = 166$ mM).

Para el ensayo indirecto (ALb#11/OVA-ALm), el aumento de la fuerza iónica no indujo cambios importantes en los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} , aunque sí se observó una leve disminución o aumento de cada parámetro respectivamente cuando el ensayo se efectuó a fuerza iónica más baja. Por su parte, el otro ensayo indirecto (ALm#21/OVA-ALa) mostró una mayor dependencia con la fuerza iónica, especialmente en lo que respecta al valor de A_{max} , que aumentó casi un 50% cuando se llevó a cabo a bajos

valores de fuerza iónica (50 mM) y disminuyó alrededor de un 60% en el extremo opuesto del rango evaluado ($I = 276$ mM). La mayor relación A_{\max}/IC_{50} se obtuvo a valores de fuerza iónica entre 130 y 170 mM aproximadamente.

En cuanto a los ensayos directos, tanto ALb#22/HRP-ALb como ALb#119/HRP-ALb mostraron una elevada tolerancia a la variación de la fuerza iónica. En el primer caso, el valor de A_{\max} disminuyó ligeramente al bajar la concentración de NaCl, mientras que en el segundo se observó un comportamiento contrario. En ambos casos, la IC_{50} se mantuvo más o menos constante y no se observó un valor destacable del cociente A_{\max}/IC_{50} .

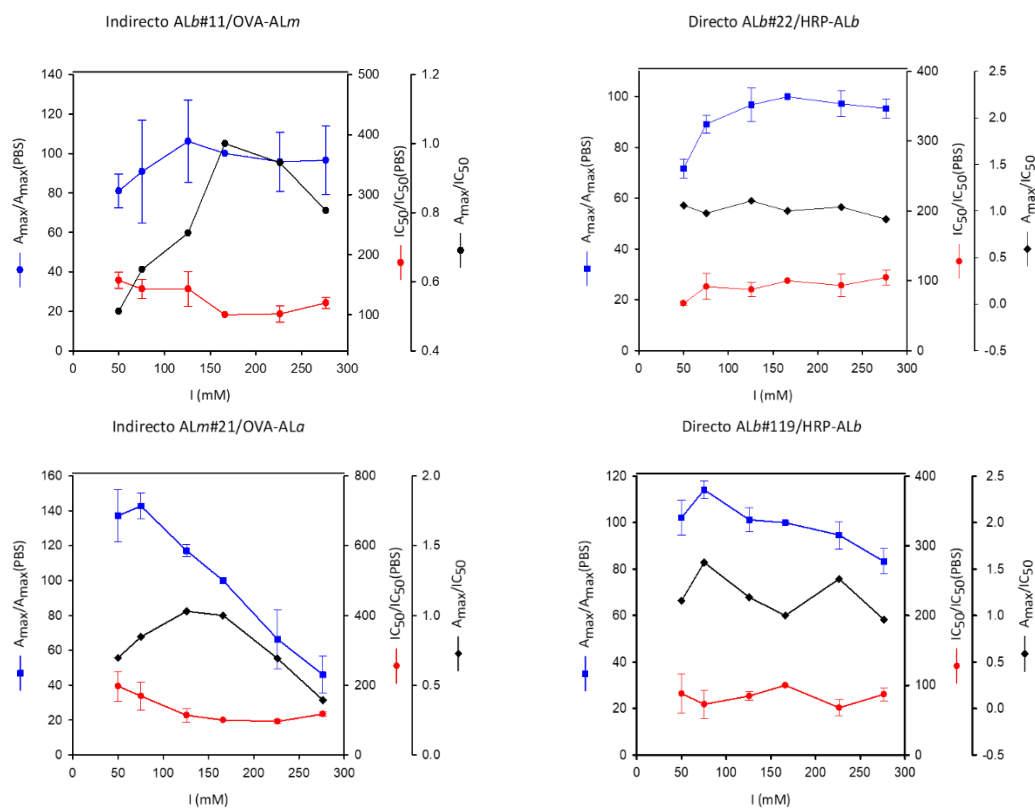


Figura 25. Influencia de la fuerza iónica en la etapa de competición sobre los valores de A_{\max} e IC_{50} de los inmunoensayos competitivos seleccionados para alternariol. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres réplicas independientes.

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios anteriores, puede concluirse que los inmunoensayos escogidos para la cuantificación de alternariol fueron tolerantes a cambios moderados de pH y fuerza iónica, si bien valores extremos de ambas variables experimentales indujeron en algunos casos cambios importantes en la sensibilidad y/o la señal máxima de los ensayos. Particularmente robustos se mostraron los ensayos directos a variaciones de fuerza iónica. Por otro lado, un resultado a destacar es la

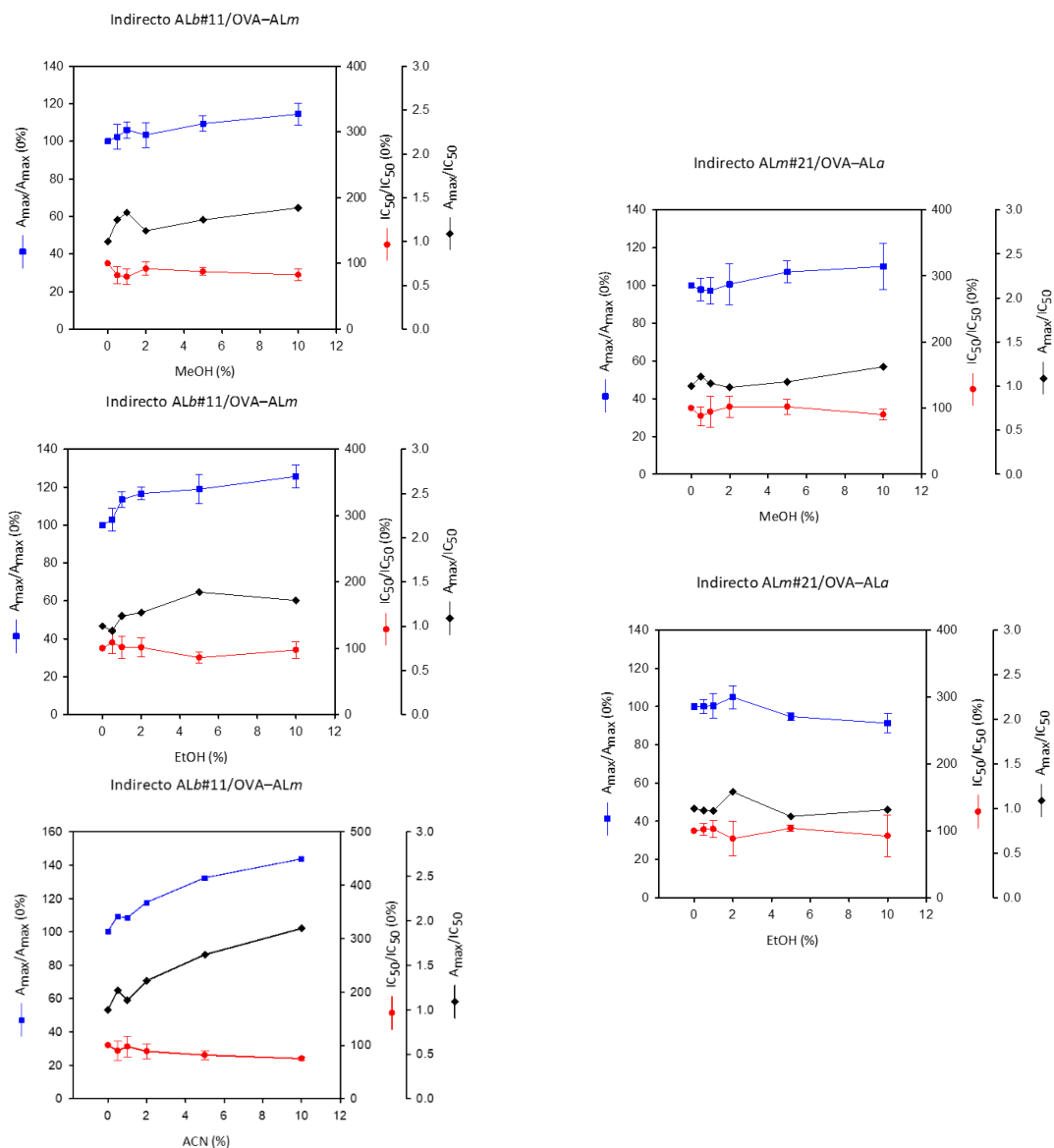
disminución del valor de IC_{50} de tres de los ensayos, excepto el directo con ALb#22, al aumentar el pH, por lo que cabría la posibilidad de modificar en este sentido las condiciones del ensayo para optimizar así la sensibilidad. Sin embargo, puesto que el valor de IC_{50} logrado con PBS ya era excelente, se consideró más oportuno mantener las condiciones iniciales, pH 7.4 y fuerza iónica 166 mM, con el fin de garantizar la compatibilidad de los inmunoensayos con todo tipo de muestras, independientemente de la modificación que pudieran ejercer sobre el pH o la fuerza iónica.

3.5.3. Influencia de la presencia de disolventes

Habitualmente, el primer paso para la determinación de contaminantes en muestras alimentarias consiste en su extracción mediante el uso de disolventes orgánicos. Normalmente para los inmunoensayos se utilizan disolventes miscibles en agua, de manera que los extractos orgánicos se puedan diluir en el tampón en el que se realiza la curva estándar para realizar la cuantificación. Así, la inmunorreacción tiene lugar en un medio acuoso con una baja proporción de disolvente. Sin embargo, la presencia incluso de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en la disolución a medir puede cambiar los parámetros analíticos del inmunoensayo. Por ello, se procedió a evaluar la influencia sobre los parámetros de los ensayos preseleccionados de diferentes disolventes orgánicos comúnmente empleados para la extracción, concretamente metanol, etanol y acetonitrilo. Para llevar a cabo el estudio se prepararon curvas estándar de los analitos en agua MilliQ conteniendo diferentes concentraciones del disolvente orgánico a evaluar, y se añadió el inmunorreactivo de competición disuelto en tampón fosfato con NaCl y Tween-20, de tal modo que la mezcla final en ensayo tuviese la composición del PBS-T. La influencia de los disolventes estudiados sobre los ensayos seleccionados en el formato indirecto para alternariol se muestra en la Figura 26.

En general, no se observaron grandes cambios en la señal y sensibilidad de los inmunoensayos en ninguna de las concentraciones estudiadas de metanol y etanol, incluso cuando se empleaba hasta un 10% (v/v), por lo que se puede afirmar que los ensayos indirectos ALb#11/OVA-ALm y ALm#21/OVA-ALa son bastante tolerantes a altas concentraciones de estos disolventes. Por su parte, la influencia del acetonitrilo

sobre el ensayo ALb#11/OVA-ALm parece más importante, ya que se observó que la A_{max} aumentaba conforme se aumentaba la concentración de este disolvente. En definitiva, en ningún caso la presencia de estos disolventes en el rango de concentración estudiado resulta negativo para ninguno de estos ensayos indirectos, aportando gran versatilidad a la hora de realizar análisis en una amplia variedad de muestras alimentarias independientemente del disolvente necesario para la extracción de los contaminantes.



El ensayo directo con ALb#22/HRP-ALb (Figura 27, gráficas de la izquierda) resultó ser tolerante a la presencia de metanol y acetonitrilo en el rango de concentración

estudiado, ya que la presencia de ellos no dio lugar a grandes cambios de señal y sensibilidad. En cambio, la A_{max} disminuyó significativamente al aumentar la concentración de etanol con una reducción de hasta un 30% de la señal al utilizar un 10% (v/v) de este disolvente. En cuanto al segundo ensayo directo (ALb#119/HRP-ALb) destaca especialmente la tolerancia hacia metanol y etanol en el rango estudiado, mientras que el acetonitrilo fue tolerado a bajas concentraciones, ya que si se supera el 5% (v/v) el valor de la IC_{50} aumenta hasta casi 3 veces. Sin embargo, la señal máxima no se ve afectada significativamente con ninguno de los tres disolventes en el rango de trabajo estudiado.

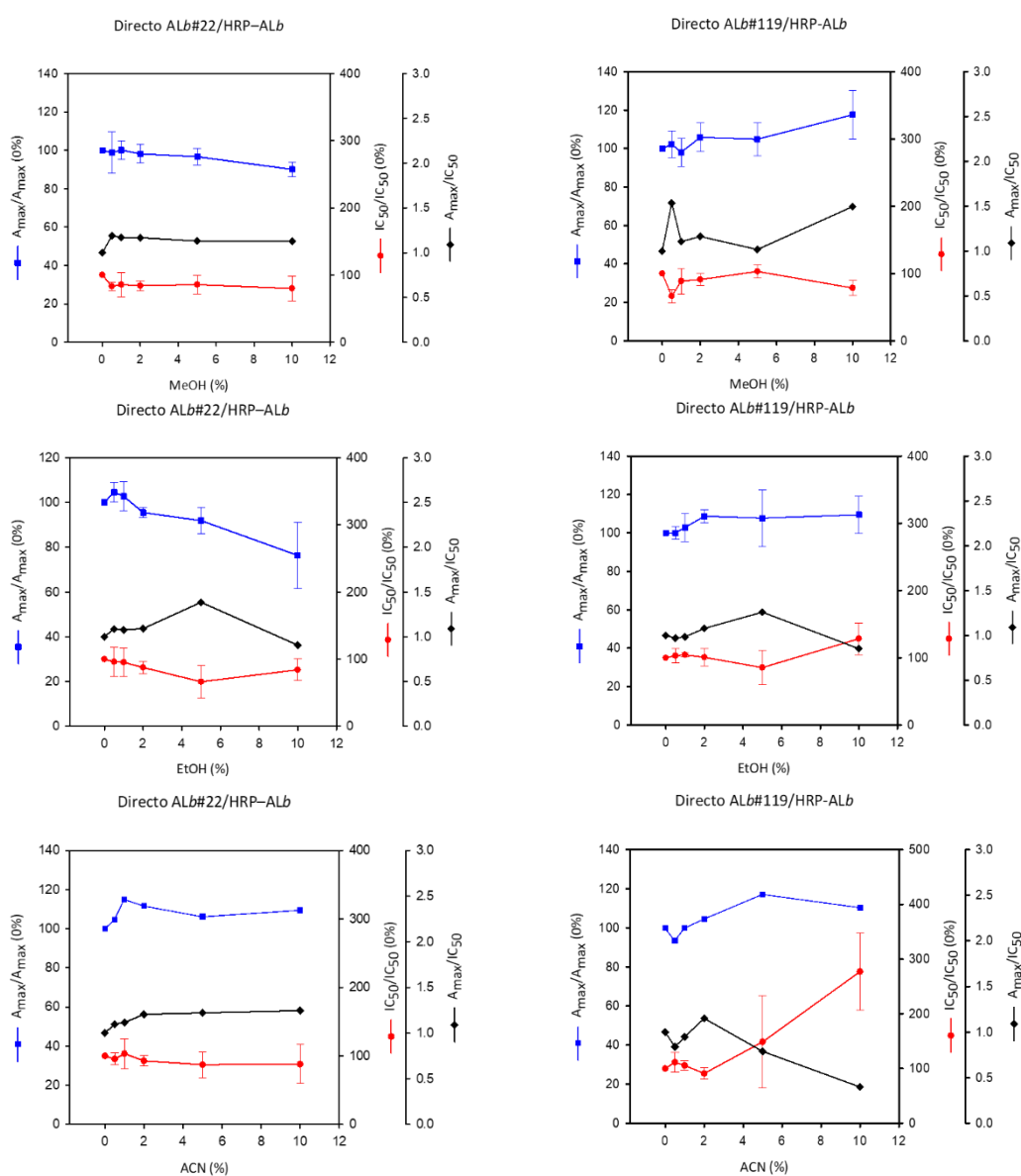


Figura 27. Tolerancia de los inmunoensayos en formato directo a la presencia de disolventes orgánicos. Los valores corresponden a las condiciones en ensayo y son la media de tres réplicas independientes.

A la vista de los resultados anteriores, se puede concluir que el disolvente que resultó globalmente mejor tolerado por todos los inmunoensayos seleccionados fue el metanol. En general, el acetonitrilo y el etanol también fueron tolerados por la mayoría de los ensayos, aunque ambos ejercieron una ligera influencia sobre la A_{\max} o la IC_{50} . Por lo tanto, cualquiera de estos disolventes sería adecuado para la obtención de extractos orgánicos destinados al análisis de alternariol mediante los inmunoensayos propuestos.

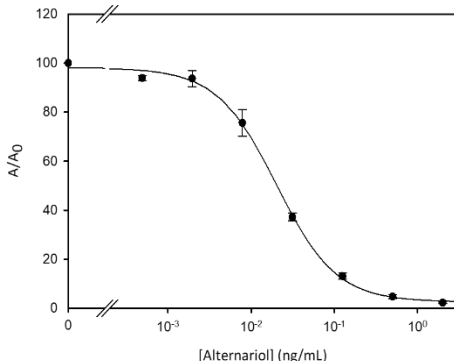
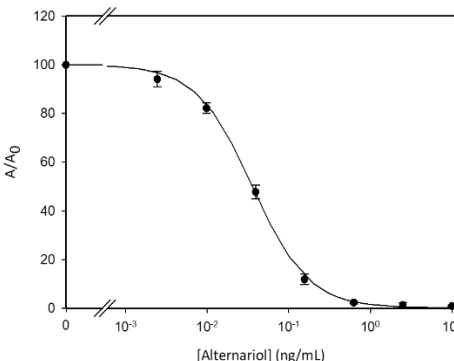
3.5.4. Características de los inmunoensayos seleccionados

La caracterización de los cuatro inmunoensayos propuestos se dio por completada. Con toda la información obtenida y desde un punto de vista práctico se decidió realizar una selección de dos ensayos para su aplicación en alimentos. Así, se eligió como ensayo directo el que utiliza el par de inmunorreactivos *ALb#119/HRP-ALb* por su elevada sensibilidad y rapidez de ensayo. En formato indirecto se continuó con el inmunoensayo constituido por *ALb#11/OVA-ALm*, ya que era ligeramente más tolerante a cambios de fuerza iónica, y la pendiente de la curva de inhibición era menor que el otro ensayo indirecto evaluado. En la Tabla 3-25 se detallan las principales características de los dos inmunoensayos seleccionados, incluyendo la representación gráfica y los parámetros de la curva de calibrado, las condiciones de ensayo y algunos parámetros analíticos de interés, como son el límite de detección (LOD), el rango de trabajo y la precisión observada dentro del mismo día y a lo largo de diferentes días para la señal máxima y el valor de IC_{50} .

El ensayo directo (*ALb#119/HRP-ALb*) se caracterizó por tener un valor de IC_{50} de 0.020 ng/mL, un LOD tan bajo como 0.004 ng/mL y por un intervalo de medida comprendido entre 0.071 y 0.007 ng/mL. Otra característica importante a destacar es el tiempo total de ensayo definido en 30 min, con un tiempo de competición ultrarrápido de 10 min. En cuanto al ensayo indirecto (*ALb#11/OVA-ALm*), la IC_{50} es 0.036 ng/mL, el LOD se situó en un excelente valor de 0.006 ng/mL, y el rango de trabajo fue desde 0.107 hasta 0.012 ng/mL, el tiempo total de ensayo es de 135 min. En ambos ensayos los rangos de trabajo abarcan aproximadamente un orden de magnitud. La medición de los valores de A_{\max} fue bastante precisa en el ensayo directo, mientras que los coeficientes de variación para la IC_{50} fueron ligeramente elevados. Por su parte, el ensayo indirecto

resultó ser altamente preciso en términos de sensibilidad, obteniéndose coeficientes de variación inter-día inferiores al 10%, aunque con variaciones en el valor del coeficiente de variación de A_{\max} inferiores al 20%.

Tabla 3-25. Curvas estándar normalizadas, condiciones de ensayo y parámetros analíticos de los inmunoensayos desarrollados para alternariol.^a

| | Formato directo | Formato indirecto |
|---|---|--|
| |  |  |
| Anticuerpo monoclonal | ALb#119 a 100 ng/mL | ALb#11 a 50 ng/mL |
| Conjugado de ensayo | HRP-ALb a 10 ng/mL | OVA-ALm a 1000 ng/mL |
| Tampón de ensayo^b | Fosfato 10 mM con 140 mM de NaCl y 0.025% Tween-20 (pH 7.4, I = 166 mM) | Fosfato 10 mM con 140 mM de NaCl y 0.025% Tween-20 (pH 7.4, I = 166 mM) |
| A_{\max} | 0.727 ± 0.097 | 1.207 ± 0.217 |
| IC₅₀ (ng/mL) | 0.020 ± 0.002 | 0.036 ± 0.003 |
| Pendiente | 1.235 ± 0.199 | 1.283 ± 0.073 |
| A_{\min} | 0.020 ± 0.006 | 0.004 ± 0.008 |
| LOD (ng/mL) | 0.004 ± 0.001 | 0.006 ± 0.001 |
| Rango de trabajo (ng/mL)^c | 0.007 ± 0.002 – 0.071 ± 0.011 | 0.012 ± 0.001 – 0.107 ± 0.013 |
| Tiempo (min) | 30 | 135 |
| Preincubación | 5 | - |
| Competición | 10 | 60 |
| Amplificación | - | 60 |
| Revelado | 15 | 15 |
| Sustrato | TMB | OPD |
| Reactividad cruzada (%)^d | < 0.01% | < 0.01% |
| CV inter-día (%)^e | | |
| A_{\max} | 9 | 18 |
| IC ₅₀ | 11 | 8 |

^a Los valores son la media de 12 réplicas independientes. ^b Parámetros fisicoquímicos óptimos del tampón de ensayo. ^c Rango de trabajo calculado como el intervalo IC₂₀-IC₈₀. ^d Reactividad cruzada con alternariol 9-metil éter. ^e Precisión inter-día calculada como el coeficiente de variación de 4 réplicas independientes.

3.6. Validación y aplicación de inmunoensayos tipo ELISA competitivo

Una vez completada la caracterización y desarrollo de los inmunoensayos seleccionados en diferentes formatos de ELISA competitivo, el siguiente paso fue demostrar su aplicabilidad como método analítico para determinar alternariol en muestras reales. Con este objetivo primero se evaluó el efecto matriz de alimentos relevantes, y seguidamente se determinó la exactitud y precisión de cada inmunoensayo mediante el análisis de diferentes matrices fortificadas. Por último, se llevó a cabo la validación por comparación estadística de los resultados obtenidos mediante ELISA competitivo frente a un método analítico de referencia utilizando muestras ciegas como las que se encontrarían en una situación real.

3.6.1. Preparación de las muestras y estudio del efecto matriz

Un aspecto importante a tener en cuenta dentro del análisis químico en muestras reales es el denominado efecto matriz, que no es otra cosa que la influencia que ejercen todos los componentes que forman parte de una muestra a analizar que no son el analito sobre los parámetros analíticos del método. Habitualmente, en el caso de los ELISA competitivos una correcta dilución de las muestras, o de los extractos de estas, suele ser suficiente para eliminar dicho efecto. Adicionalmente, se busca a la vez conseguir una concentración de analito comprendida en el intervalo de medida, superior al límite de detección. Este estudio consiste en evaluar distintas diluciones de las muestras o extractos con el fin de encontrar la dilución mínima a la que se corrige este efecto. Para ello, se prepararon diferentes disoluciones patrón de alternariol en presencia de diferentes proporciones de cada matriz estudiada, y se compararon con la curva estándar de alternariol en ausencia de matriz. Los patrones de analito se prepararon por dilución en PBS o matriz diluida (cada dilución se preparó en serie a partir de la más concentrada) en el momento de realizar el ensayo.

La selección de alimentos para el estudio de viabilidad de los inmunoensayos seleccionados se hizo en base al último informe de la EFSA sobre la exposición a alternariol a través de la dieta de los consumidores europeos.¹³¹ Según este documento,

en general, las frutas y derivados de frutas, particularmente las peras, fueron los contribuyentes más importantes a la exposición dietética a alternariol. Por otro lado, según este documento, los niveles medios más altos de alternariol se reportaron para algunos granos de cereales, en particular trigo sarraceno y avena (entre 30 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

La validación del ensayo en formato directo de tiempos cortos se realizó utilizando matrices líquidas (zumo de manzana y zumo de pera). Para ello se aplicó una dilución directa de las mismas en tampón. El efecto de matriz de los dos tipos de muestras estudiadas sobre el inmunoensayo en formato directo (ALb#119/HRP-ALb) se muestra gráficamente en la Figura 28. Dado que el zumo de pera presentaba turbidez, se decidió centrifugar ambos zumos para eliminar las partículas sólidas. Con los dos zumos se observó un cierto efecto matriz, si bien éste fue más acusado en el caso del zumo de manzana.

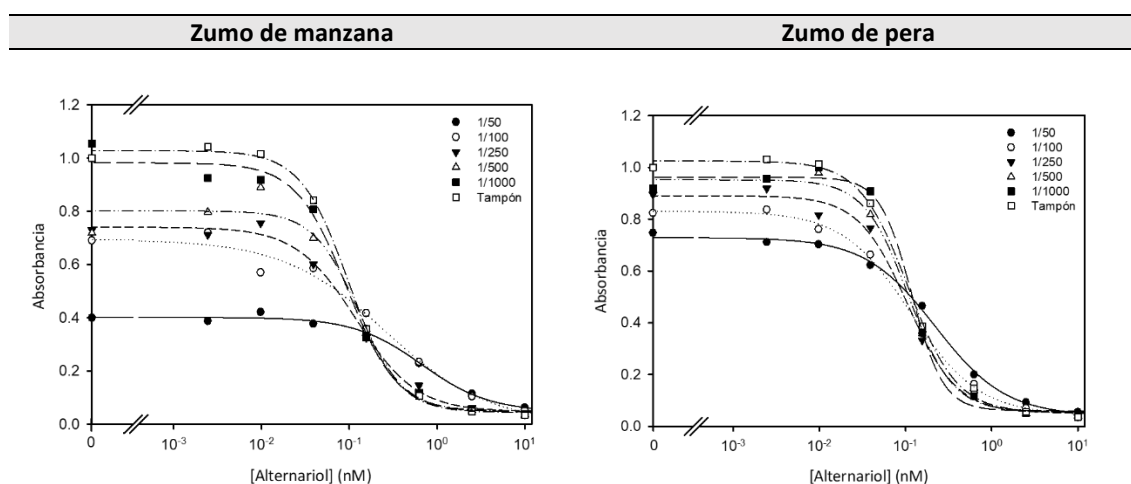


Figura 28. Efecto matriz sobre la curva de inhibición de alternariol en presencia de diferentes proporciones de zumo diluido para el ensayo directo con ALb#119 vs HRP-ALb.

Por otro lado, el ensayo en formato indirecto se validó para el análisis de alimentos sólidos, como las harinas de avena y trigo sarraceno y el triturado de pera. En este caso se llevó a cabo una extracción mediante la tecnología QuEChERS, y los correspondientes extractos se diluyeron en tampón.

QuEChERS, acrónimo en inglés de “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”, es un método de extracción de contaminantes químicos rápido y sencillo que se ha descrito ampliamente en la bibliografía para la extracción de alternariol en distintas matrices alimentarias.^{132,133} Este método combina dos etapas, una primera etapa de

extracción de la muestra con acetonitrilo conteniendo diferentes sales. Las sales que se emplean son el sulfato magnésico y el cloruro sódico. Cada sal tiene su función en la etapa de extracción; el sulfato magnésico se utiliza como desecante reteniendo agua y mejorando la recuperación del analito, mientras que el cloruro sódico ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación entre las fases orgánica y acuosa. Cabe destacar que el método QuEChERS originalmente descrito¹³⁴ no incluye el uso de tampones, aunque esta es una posibilidad si se quiere optimizar la extracción de analitos sensibles a los valores de pH.

En una segunda fase de dispersión en fase sólida se realiza una etapa de limpieza o “clean up” del extracto utilizando una fase adsorbente sólida. Este paso persigue la eliminación del agua residual presente en la matriz, así como otros compuestos que puedan provocar interferencias en el análisis. La resina adsorbente más habitual es la PSA (una mezcla de aminas primarias y secundarias), que es gel de sílice funcionalizado con etilendiamina. Esta funcionalización por interacción electrostática adsorbe diferentes compuestos como ácidos orgánicos, ácidos grasos o azúcares. Otro sorbente también utilizado habitualmente en QuEChERS es la resina C18, cuya función principal es la eliminación de interferencias no polares. Para este estudio se emplearon ambos sorbentes en paralelo y se comprobó experimentalmente que con el primero se obtenían extractos más limpios con mejores resultados en los análisis.

En la Figura 29 se puede ver la representación gráfica de las curvas de inhibición del inmunoensayo en formato indirecto obtenidas en presencia de un contenido creciente de extracto de matriz alimentaria. En el caso del ensayo indirecto (ALb#11/OVA-ALm) realizado en presencia de extractos QuEChERS de harina de avena no se observó efecto matriz con las diluciones ensayadas. Con respecto a la harina de trigo sarraceno, se obtuvieron curvas de inhibición equivalentes con los distintos niveles de dilución del extracto, si bien la diferencia de todas ellas con el control sin matriz fue evidente. Esta diferencia observada respecto a la curva sin matriz no tiene explicación lógica y probablemente se trate de un error experimental. Finalmente, el extracto de triturado de pera presentó un efecto matriz a las diluciones más bajas ensayadas que pudo eliminarse al diluir la muestra 100 veces en tampón.

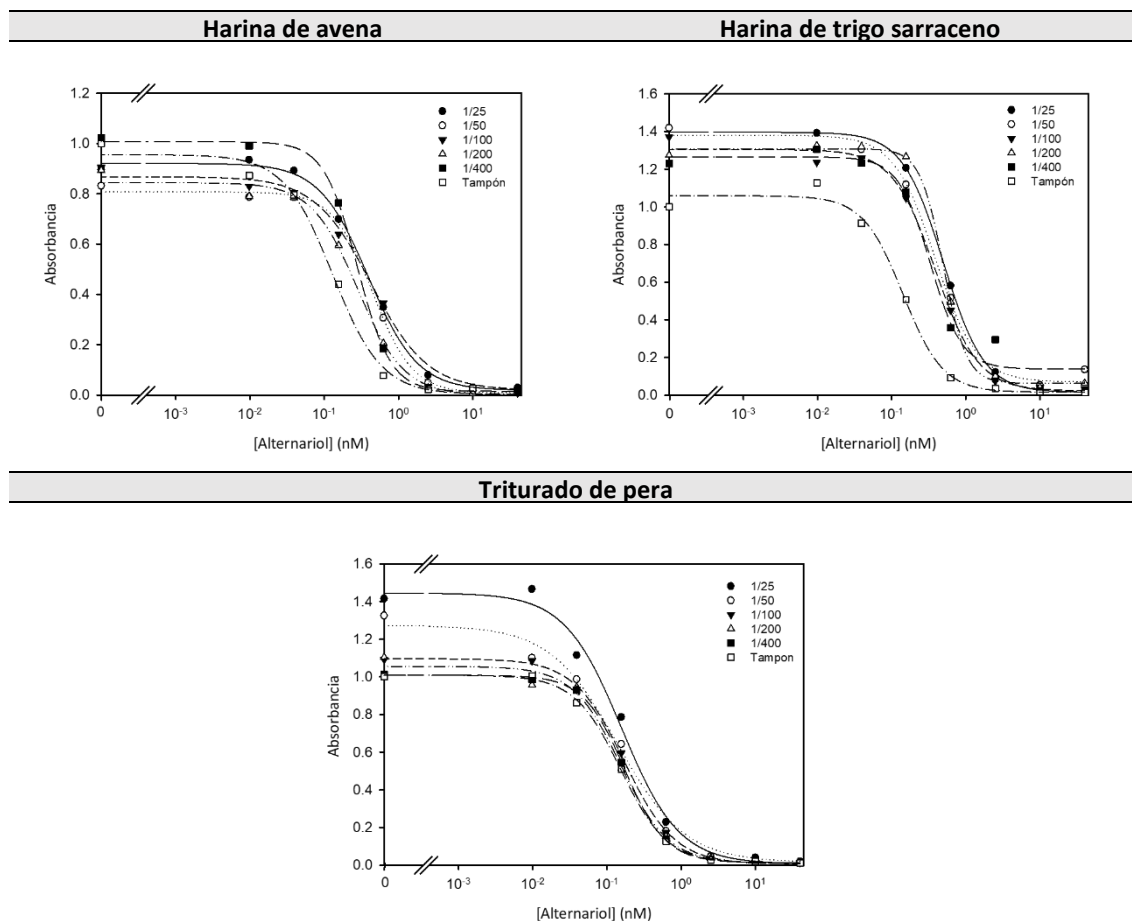


Figura 29. Efecto matriz sobre la curva de inhibición de alternariol en presencia de diferentes proporciones de extracto para el ensayo indirecto con ALb#11 vs OVA-ALm.

3.6.2. Análisis de muestras fortificadas

Concluidos los estudios de efecto matriz de las distintas muestras alimentarias – harinas (avena y trigo sarraceno), fruta (triturado de pera) y zumos de fruta (pera y manzana) – sobre los ensayos desarrollados, se llevó a cabo la caracterización analítica de los mismos. Para ello, se analizaron muestras dopadas con concentraciones conocidas de alternariol. Previamente a las fortificaciones de las matrices, como ya se ha comentado anteriormente, se realizó un extracto QuEChERS de las harinas y del triturado de pera y una centrifugación de los zumos de fruta. En todos los casos se procuró que los dopajes cubrieran casi dos órdenes de magnitud, ensayando concentraciones que van desde 0.5 hasta 300 ng/mL. Las muestras o extractos con alternariol se diluyeron en PBS y se analizaron mediante los inmunoensayos desarrollados. Las concentraciones halladas se compararon con las de dopaje mediante el cálculo de los coeficientes de recuperación (R). Se consideró como límite de

cuantificación la concentración de alternariol más baja ensayada con la que se obtuvo una recuperación en el intervalo entre 80% y 120%, y a su vez con un coeficiente de variación (CV) inferior al 20%.

Por su parte, el inmunoensayo en formato directo con tiempos de incubación cortos (ALb#119/HRP-ALb) se validó para el análisis de zumos de frutas (Tabla 3-26). El análisis de las muestras dopadas con alternariol proporcionó recuperaciones excelentes en el rango de fortificación estudiado a una dilución de 1/500 para el zumo de pera y de 1/1000 para el zumo de manzana. En este estudio se hizo evidente el mayor efecto matriz del zumo de manzana. Teniendo en cuenta la dependencia de los parámetros analíticos de estos ensayos con el pH, una causa probable para explicar las interferencias observadas en la cuantificación de alternariol a diluciones bajas podría ser la naturaleza moderadamente ácida de este tipo de muestras, aunque también podrían deberse a su elevado contenido en azúcares.

Tabla 3-26. Coeficientes de recuperación obtenidos mediante ELISA competitivo directo con zumos fortificados con alternariol.^a

| [AOH] ^b (ng/mL) | Zumo de manzana | | | Zumo de pera | | |
|----------------------------|-----------------|--------------------|--------|--------------|----------|--------|
| | f ^c | R (%) ^d | CV (%) | f | R (%) | CV (%) |
| 10 | 1000 | - ^e | | 500 | 115 ± 5 | 5 |
| 30 | 1000 | 93 ± 7 | 7 | 500 | 91 ± 7 | 8 |
| 50 | 1000 | 103 ± 4 | 4 | 500 | 104 ± 4 | 4 |
| 100 | 1000 | 113 ± 11 | 9 | 500 | 97 ± 8 | 8 |
| 200 | 1000 | 105 ± 14 | 13 | 500 | 104 ± 11 | 11 |
| 300 | 1000 | 98 ± 20 | 20 | 500 | 114 ± 17 | 15 |

^a Los valores corresponden a la media de cinco réplicas independientes. ^b Concentración de dopaje con alternariol.

^c Factor de dilución de la muestra. ^d Coeficiente de recuperación y desviación estándar. ^e Valor fuera de rango.

La presencia de alternariol en zumos de fruta adecuadamente diluidos se pudo cuantificar de forma exacta y precisa con el ensayo directo entre 30 y 300 ng/mL en el zumo de manzana y entre 10 y 300 ng/mL en el zumo de pera, con coeficientes de recuperación excelentes entre el 91% y el 115%, y coeficientes de variación inferiores al 20%. De esto modo, el límite de cuantificación experimental de alternariol en zumo de manzana y pera del ELISA competitivo en formato directo con tiempos de incubación cortos fue de 30 y 10 ng/mL, respectivamente.

La Tabla 3-27 recoge los resultados obtenidos a partir de los extractos de las harinas y del triturado de pera dopados con alternariol y analizados mediante ELISA competitivo

indirecto (ALb#11/OVA-ALm). A la vista de los resultados, este inmunoensayo mostró una elevada capacidad para cuantificar correctamente alternariol en las matrices estudiadas, con recuperaciones en el rango 72–127% y desviaciones estándar inferiores a 20% en la mayoría de los casos. La cuantificación de alternariol fue bastante exacta y precisa en extractos de harina de avena y trigo sarraceno dopados entre 1 y 10 ng/mL con una dilución 1/20 en tampón, mientras que con una dilución 1/500 el ensayo cuantificó adecuadamente alternariol para concentraciones de analito entre 20 y 300 ng/mL. Este inmunoensayo también mostró un muy buen comportamiento en el análisis de extractos de triturado de pera diluidos 500 veces para la determinación de alternariol a concentraciones entre 10 y 300 ng/mL. No obstante, con esta matriz, y siguiendo el tratamiento descrito, no fue posible cuantificar de manera exacta y precisa alternariol a concentraciones más bajas. De este modo, el límite de cuantificación determinado experimentalmente del ELISA competitivo indirecto en los extractos de harinas ensayados es tan bajo como 1 ng/mL, mientras que para el triturado de pera es de 10 ng/mL.

Tabla 3-27. Coeficientes de recuperación obtenidos mediante ELISA competitivo indirecto con extractos de QuEChERS fortificados con alternariol.^a

| [AOH] ^b (ng/mL) | Harina de avena | | | Trigo sarraceno | | | Triturado de pera | | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------|-----------------|----------|-----------|-------------------|----------------|-----------|
| | f ^c | R (%) ^d | CV (%) | f | R (%) | CV (%) | f | R (%) | CV (%) |
| 1 | 20 | 87 ± 4 | 5 | 20 | 82 ± 5 | 6 | 50 | - ^e | |
| 2 | 20 | 99 ± 11 | 9 | 20 | 72 ± 5 | 7 | 50 | - | |
| 3 | 20 | 100 ± 5 | 5 | 20 | 99 ± 12 | 12 | 50 | - | |
| 5 | 20 | 90 ± 11 | 12 | 20 | 97 ± 18 | 19 | 500 | - | |
| 10 | 20 | 85 ± 13 | 15 | 20 | 78 ± 6 | 8 | 500 | 119 ± 18 | 15 |
| 20 | 500 | 111 ± 22 | 20 | 500 | 95 ± 17 | 18 | 500 | 115 ± 6 | 5 |
| 50 | 500 | 123 ± 26 | 21 | 500 | 127 ± 9 | 7 | 500 | 99 ± 5 | 5 |
| 100 | 500 | 121 ± 19 | 16 | 500 | 120 ± 12 | 10 | 500 | 125 ± 12 | 10 |
| 200 | 500 | 113 ± 20 | 18 | 500 | 119 ± 12 | 10 | 500 | 117 ± 18 | 15 |
| 300 | 500 | 95 ± 22 | 23 | 500 | 100 ± 22 | 22 | 500 | 119 ± 12 | 10 |

^a Los valores corresponden a la media de cinco réplicas independientes. ^b Concentración de dopaje con alternariol.

^c Factor de dilución de la muestra. ^d Valor de recuperación y desviación estándar. ^e Valor fuera de rango.

En resumen, se ha desarrollado y validado dos inmunoensayos en formatos distintos de ELISA competitivo con características y procedimientos diferentes. Se puede afirmar que estos inmunoensayos son válidos para la cuantificación de alternariol a

concentraciones realmente bajas en un conjunto diverso de muestras de alimentos, siendo cada uno de ellos adecuado para distintos tipos de matriz.

3.6.3. Validación frente a un método analítico de referencia

La validación frente a un método cromatográfico de referencia se llevó a cabo mediante análisis por cromatografía líquida de ultra elevada eficacia o UHPLC (del inglés, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) con detección por fluorescencia. Como no se disponía de muestras comerciales contaminadas con alternariol se decidió infectar peras en el laboratorio con el hongo micotoxigénico *Alternaria alternata*. Esta fruta constituye una matriz alimentaria relevante para alternariol y sabemos que la cepa microbiana disponible en el laboratorio es capaz de infectar y crecer rápidamente en frutas. Adicionalmente, la inoculación del hongo productor en fruta era desde un punto de vista práctico lo más sencillo, ya que se contaba con los medios necesarios para dicho experimento. En consecuencia, la validación se realizó con el inmunoensayo indirecto (ALb#11/OVA-ALm) cuya capacidad para analizar extractos de triturado de pera se había demostrado.

3.6.3.1. Obtención de muestras contaminadas con alternariol

Actualmente, no existe regulación oficial sobre las cantidades máximas permitidas de alternariol, u otro metabolito producido por hongos del género *Alternaria*, en alimentos. Sin embargo, considerando las características del inmunoensayo desarrollado y los resultados obtenidos en los estudios con muestras fortificadas debería ser posible cuantificar alternariol por encima de 10 ng/mL en extractos de pera triturada.

Primeramente, se comprobó el crecimiento del hongo *in vitro*. Para ello, en una placa Petri se sembraron esporas de tres cepas disponibles del hongo productor (*A. alternata*), y al cabo de un periodo de 7 días de incubación se comprobó que la colonia crecía lo suficiente para el estudio. En la Figura 30 se puede observar el crecimiento de las tres cepas sembradas al cabo de 7 días. Las condiciones en las que se realizó este procedimiento se encuentra descritas más detalladamente en la sección experimental.

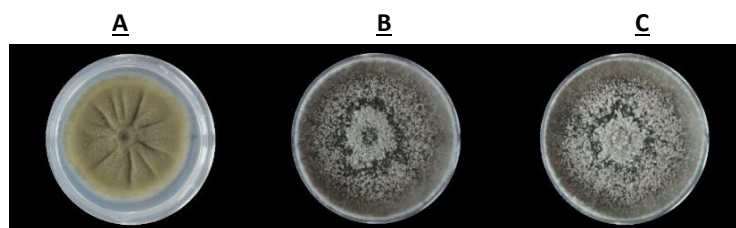


Figura 30. Imagen correspondiente a cultivos de las tres cepas del hongo *A. alternata* disponibles en el laboratorio y su crecimiento al cabo de 7 días. (A) AA-3 (CECT, *A. alternata* pimienta 20560). (B) AA-2 (*A. alternata* pv. *Citri* AF24401-3). (C) AA-1 (*A. alternata* pv. *Citri* AF2440-1).

Seguidamente, se confirmó su capacidad para producir alternariol. Tres muestras de cada cepa recogidas del interior, del centro y del exterior de la colonia se extrajeron con acetonitrilo y el extracto se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis. De las tres cepas cultivadas de *A. alternata*, se verificó que, en nuestras condiciones de ensayo, solo dos de ellas (AA-1 y AA-2) eran micotoxigénicas productoras de alternariol (Figura 31). Además, la presencia de otros picos en el cromatograma indicaba que también producían en estas mismas condiciones una pequeña cantidad de alternariol 9-metil éter y otros metabolitos no identificados, probablemente altenueno, altenusina, ácido tenuazónico o tentoxina.¹³⁵ Debido a la escasa disponibilidad comercial de algunos de estos metabolitos, así como su elevado coste, no se disponía de patrones analíticos para confirmar su presencia. Hasta el momento, se conocen más de 70 metabolitos secundarios producidos por especies del género *Alternaria*, algunos de ellos químicamente caracterizados y cuya actividad tóxica para humanos o animales ha sido reportada (EFSA en 2016).¹³¹

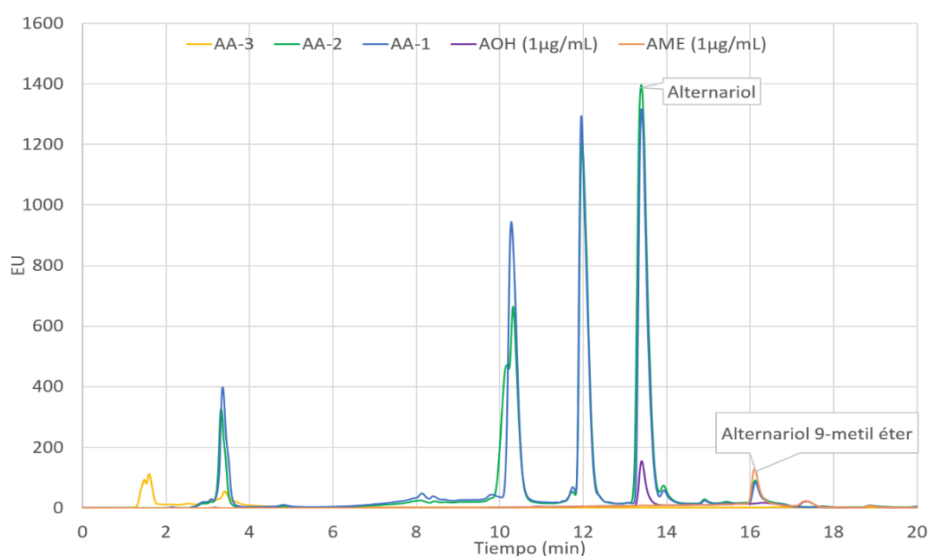


Figura 31. Análisis HPLC de los extractos procedentes de las tres cepas de *A. alternata* (AA-1, AA-2 y AA-3) y su comparación con estándares analíticos de alternariol y alternariol 9-metil éter.

A continuación, se llevó a cabo la inoculación de *A. alternata* en peras sanas sin desinfección previa. Se inocularon 5 peras por cada concentración de infección con cada cepa, y se realizaron 4 heridas por pera, una en cada cara, inoculando 10 μ L por herida. Todas las peras se incubaron durante 8 días. El cribado de heridas se hizo en función del diámetro de la herida. De esta forma se consideró un tamaño pequeño aquellas que tenían un diámetro en torno a 7 mm, un tamaño medio si eran de 14 mm y grande las de 28 mm. La extracción de tejido se realizó de manera estándar para todas las heridas con un sacabocados “grande” (diámetro interno 19 mm). En la Figura 32 se muestran, a modo de ejemplo, peras infectadas con *A. alternata* al cabo de 8 días de incubación con los tres diámetros de herida.



Figura 32. Peras infectadas con *Alternaria alternata* al cabo de 8 días de incubación.

3.6.3.2. Comparación estadística con un método de referencia

Como última etapa en el desarrollo del inmunoensayo seleccionado se llevó a cabo su validación frente a un método analítico de referencia. En nuestro caso el método de referencia escogido fue la cromatografía líquida de eficacia ultra elevada (UHPLC) con detección por fluorescencia. Las condiciones de análisis fueron las previamente descritas para alternariol por Wenderoth, y col.¹³⁵ Debido a la falta de muestras contaminadas comerciales se emplearon muestras de peras infectadas en el laboratorio con cepas de *A. alternata* micotoxigénicas. De estas muestras se obtuvieron extractos con diferentes grados de contaminación mediante extracción con el método QuEChERS como se ha descrito anteriormente a partir de muestras homogenizadas.

Primeramente, los extractos fueron analizados mediante UHPLC. Para ello, se preparó una recta de calibrado con 12 patrones de alternariol a 10, 30, 50, 100, 300, 500, 800, 1000, 1300, 1600, 1900 y 2100 ng/mL, más un blanco. Así, la recta de calibrado resultante para la cuantificación en UHPLC fue la que se muestra en la Figura 33.

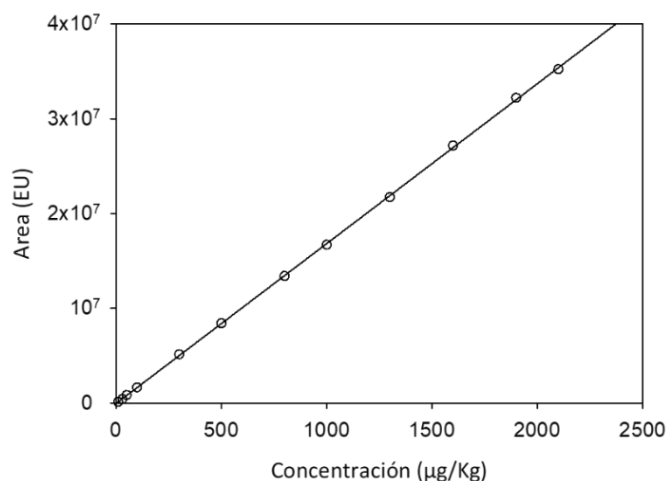


Figura 33. Recta de calibrado de UHPLC.

En paralelo, los extractos de pera contaminados fueron analizados mediante el inmunoensayo desarrollado en formato indirecto (*ALb#11/OVA-ALm*). Dado que las concentraciones de alternariol no eran conocidas se procedió a realizar diferentes diluciones de cada muestra (1/10, 1/20, 1/50 y 1/100) en tampón, de esta manera nos asegurábamos estar en el rango de medida. Las concentraciones halladas tanto por el método de referencia como por el inmunoensayo desarrollado se muestran con detalle en el apartado de Anexo de esta memoria.

Los resultados obtenidos por el inmunoensayo se compararon estadísticamente con los del método de referencia. Existen diferentes formas de comparación estadística entre métodos. Por una parte, se puede utilizar la diferencia en valor absoluto entre el inmunoensayo a validar y el método de referencia. Si tras un contraste de hipótesis el valor promedio obtenido es igual a cero, entonces se puede decir que los métodos son comparables. Una forma de representarlo gráficamente es el gráfico de dispersión de Bland-Altman, en el cual se representa la media aritmética de las concentraciones obtenidas por ambos métodos, considerando que son comparables si esta se mantiene próxima a cero y los puntos se distribuyen aleatoriamente.

Otra aproximación es la comparación de métodos analíticos mediante un test de regresión lineal. En principio, un ajuste matemático utilizando mínimos cuadrados simples podría parecer el método más sencillo, pero hay que tener en cuenta que este método no contempla posibles desviaciones del método de referencia. En nuestro caso en particular y partiendo de la base de que el método de referencia no es perfecto, la ecuación de la recta se calcula mediante un tipo de regresión que tenga en cuenta estas desviaciones. Para ello se hace uso de los gráficos de Deming. En dicho test se representan los valores del método a validar frente a los hallados con el método de referencia con sus desviaciones estándar, y se obtiene un ajuste a la ecuación de una recta calculando los intervalos de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen. Para que ambos métodos sean comparables el intervalo de confianza de la pendiente ha de incluir el valor 1.0, mientras que el de la ordenada ha de incluir el cero.

Al realizar la representación de los resultados de UHPLC y los del ensayo indirecto de alternariol (ALb#11/OVA-ALm) mediante regresión Deming se observó que la correlación no fue satisfactoria, ya que existía una ligera tendencia a sobreestimar la concentración de alternariol, reflejada en valores de 1.2173 y 3.190 para la pendiente y la ordenada de la recta calculada, respectivamente. Por tanto, se decidió aplicar un factor de corrección de 1.2173 generado al realizar el ajuste matemático.

En la Figura 34 se representan gráficamente las concentraciones halladas en las muestras analizadas por el inmunoensayo desarrollado y las encontradas mediante UHPLC usando tanto la gráfica de contraste de Bland-Altman como la regresión de Deming con un parámetro de confianza del 95% tras la aplicación del factor de corrección.

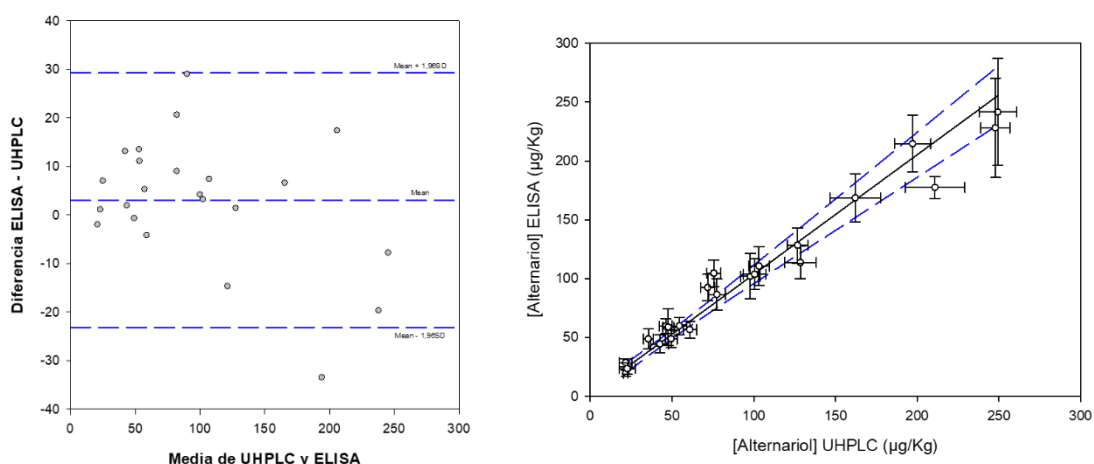


Figura 34. Izquierda: Gráfico de dispersión Bland–Altman obtenido a partir de los resultados del análisis de alternariol en muestras mediante inmunoensayo y el método cromatográfico de referencia. La línea discontinua central corresponde a la diferencia promedio, y las líneas discontinuas superior e inferior son los límites del intervalo $\pm 1.96 \times \text{sd}$. Derecha: Recta de regresión Deming (línea continua) obtenida en la comparación de los mismos resultados. Las líneas discontinuas muestran los límites del intervalo de confianza al 95%. Los valores obtenidos mediante ELISA corresponden a la media de tres determinaciones independientes, mientras que los hallados mediante el método de referencia son la media de cinco réplicas.

De este modo, el análisis por representación Bland-Altman de los datos reveló una buena correlación entre los resultados obtenidos con el inmunoensayo y el método a validar. La distribución aleatoria de los datos por encima y por debajo de la diferencia promedio entre métodos en un intervalo no excesivamente amplio y con un solo valor fuera de éste, y una diferencia promedio cercana a cero demuestran la validez del método desarrollado. Adicionalmente, la regresión Deming reveló una correlación excelente entre ambos métodos, con un coeficiente de determinación de 0.984. Además, el intervalo de confianza de la pendiente contiene el valor óptimo de 1, y la ordenada en el origen cumple el criterio de valor 0 (Tabla 3-28).

Tabla 3-28. Parámetros de la recta de regresión Deming para la validación del inmunoensayo desarrollado para alternariol con extractos de peras.^a

| R ² | Pendiente | | Ordenada ^b | |
|----------------|-----------|-----------------------------|-----------------------|-------------------|
| | Media | Int. Conf. 95% ^c | Media | Int. Conf. 95% |
| 0.9839 | 1.0168 | (0.8983, 1.1354) | 1.9258 | (-4.1441, 7.9957) |

^a Coeficientes de determinación (R²). ^b Valores expresados en µg/kg. ^c Intervalo de confianza para la media poblacional del parámetro con una probabilidad del 95%.

En resumen, el análisis de las muestras reales de triturado de pera contaminado naturalmente con alternariol mediante el inmunoensayo propuesto y su comparación con un método de referencia basado en UHPLC permitió demostrar la validez de dicho inmunoensayo. Así, alternariol podría ser cuantificado en muestras de triturado de pera mediante ELISA competitivo indirecto utilizando el anticuerpo ALb#11 y el conjugado heterólogo OVA-ALm.

3.7. Desarrollo de tiras inmunorreactivas

Las tiras inmunorreactivas constituyen un método de análisis rápido, semicuantitativo, alternativo y/o complementario a los ensayos ELISA. Ambos son ensayos en los que se produce un reconocimiento molecular de un antígeno por parte de un anticuerpo; aunque los términos en los que se produce dicha unión en las dos técnicas son diferentes. En el método ELISA los ensayos generalmente se desarrollan hasta alcanzar el equilibrio para que sean cuantitativos, por lo que se requiere más tiempo para las interacciones antígeno-anticuerpo, mientras que en los métodos inmunocromatográficos de flujo lateral su principio de interacción es cinético, por lo que son ensayos cualitativos o semicuantitativos mucho más rápidos.

En este capítulo abordaremos el desarrollo de un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral (LFICA, del inglés *Lateral Flow ImmunoChromatography Assay*) en el formato de tiras inmunorreactivas con el conjugado competidor inmovilizado en la membrana, siguiendo esquemas muy parecidos a los seguidos en el desarrollo de un inmunoensayo de tipo ELISA competitivo. En primer lugar, se llevó a cabo una caracterización de los anticuerpos frente a los diversos conjugados competidores disponibles, para pasar a continuación a optimizar las condiciones de los distintos inmunorreactivos, realizar una evaluación de la influencia del pH y fuerza iónica, así como un estudio del efecto matriz y, por último, la validación de nuestro inmunoensayo mediante el uso de muestras fortificadas.

El principio básico de esta técnica consiste en la inmovilización del conjugado sobre una membrana por la que fluye la muestra y el anticuerpo monoclonal marcado con nanopartículas, en nuestro caso de oro coloidal. El objetivo es que se produzca una señal

al reaccionar el anticuerpo con el conjugado, y esto ocurre porque las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo, que son coloreadas, se quedan retenidas y se acumulan en el lugar de la membrana donde se inmovilizó el conjugado (línea test). Las nanopartículas de oro presentan un color rojo intenso fácilmente distinguible del fondo blanco de la membrana, y tienen un tamaño por lo general entre 20 y 40 nm. Para facilitar el marcaje y asegurar un recubrimiento uniforme con el anticuerpo monoclonal, en esta tesis se han empleado nanopartículas comerciales modificadas previamente con un anticuerpo de captura anti-inmunoglobulina de ratón. Por otro lado, sobre la membrana también se inmoviliza un anticuerpo de captura para formar la línea control de modo que las nanopartículas que no son retenidas en la línea test con el conjugado, son retenidas en esta segunda barrera. La membrana utilizada es de nitrocelulosa con un elevado potencial de fijación de proteínas y con un tamaño de poro de 15 μm . El formato de tiras utilizado no incluye la almohadilla de conjugado donde habitualmente se encuentran absorbidas las nanopartículas funcionalizadas, pero sí una almohadilla de muestra. De esta forma, la parte de la tira con la almohadilla se introduce en un pocillo que contiene una mezcla acuosa de muestra y nanopartículas funcionalizadas.^{136,137} Tras 10 min desde la introducción de la tira, el flujo se para mediante la extracción de la almohadilla de muestra. A continuación, las tiras se secan con un flujo de aire frío y la cuantificación de la señal de las bandas se realiza mediante un escáner convencional. La representación de la señal registrada frente a la concentración de alternariol en escala semilogarítmica permite obtener los parámetros analíticos de las curvas de inhibición, de forma similar al ELISA. En principio, este tipo de inmunoensayo da lugar a dos curvas de inhibición en función de cómo se procesen los datos; la primera de estas curvas estaría basada en la variación de la señal de la línea test (T), si bien se alcanza mayor sensibilidad con la segunda de ellas que consiste en la relación de la señal entre ambas líneas (T/C).

3.7.1. Selección de anticuerpos

El primer paso en el desarrollo de la tira inmunocromatográfica consta de un proceso de preselección de anticuerpos y de los conjugados competidores. Con este objetivo se probaron los anticuerpos monoclonales generados a partir de los haptenos ALb y ALm

que menores valores de IC_{50} demostraron en su caracterización, así como una reactividad cruzada frente a alternariol 9-metil éter inferior al 1%. Los anticuerpos generados a partir del hapteno AL α no se ensayaron debido a que no cumplían con el requisito de especificidad. En total se ensayaron 11 anticuerpos, 5 de la familia de ALb (ALb#11, ALb#19, ALb#22, ALb#25, ALb#119) y 6 de ALm (ALm#11, ALm#12, ALm#18, ALm#21, ALm#120, ALm#121), en principio frente a sus respectivos conjugados homólogos de BSA para evaluar la señal máxima obtenida en ausencia de analito y la inhibición de dicha señal a dos concentraciones de alternariol. La elección de los conjugados en BSA en lugar de los de OVA estuvo motivado por densidades hapténicas más elevadas de los primeros, lo que conduce a una mayor señal. Como requisito indispensable se estableció que los valores de T (señal de la línea test) y de C (señal de la línea control) obtenidos en ausencia de analito deben ser visualmente apreciables. Por un lado, un valor de T débil indicaría un reconocimiento muy pobre del conjugado por los anticuerpos que en ausencia de analito debería dar lugar a la señal máxima. Por otro lado, la señal C indica que el ensayo se ha realizado correctamente, ya que el objetivo de la línea control es captar todo el anticuerpo que no ha sido reconocido en la línea test.

En una primera aproximación se evaluó de forma visual los valores máximos de T obtenidos para cada pareja de anticuerpo y conjugado en ausencia de analito, y la inhibición con alternariol a 1 y 3 ng/mL. Para este estudio, la cantidad de conjugado BSA–hapteno se fijó en 200 ng por tira y se empleó 25 μ L de suspensión del conjugado NP–mAb (OD = 1) en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, con 0.05% (v/v) Tween-20. El ensayo se llevó a cabo con un volumen total de 100 μ L mezclando las nanopartículas con la disolución del analito en tampón Tris-HCl 75 mM, pH 7.4, con 0.05% (v/v) Tween-20.

De manera general, la gran mayoría de anticuerpos ensayados fueron descartados por problemas de falta de señal en la línea test. El anticuerpo ALm#121 mostró un comportamiento anómalo al no mostrar señal ni en la línea test ni en la línea control, posiblemente debido al poco tiempo de interacción que tiene lugar en este tipo de ensayo y a las características específicas de este anticuerpo. De entre toda la batería de anticuerpos monoclonales ensayada, ALb#19, ALb#25 y ALb#119 cumplían con los requisitos básicos para el desarrollo de un inmunoensayo en tiras cromatográficas, y

presentaban las señales más elevadas en ausencia de analito y la mayor inhibición con alternariol. En la Figura 35 se pueden observar los resultados con estos tres anticuerpos. Con ALb#19 se observó inhibición a 1 y a 3 ng/mL, si bien no fue total. Con ALb#25 la inhibición era completa a las dos concentraciones de alternariol ensayadas, mientras que con ALb#119 se obtuvo una inhibición visual casi completa cuando se emplearon 3 ng/mL de alternariol. Por lo tanto, se seleccionó el anticuerpo ALb#25 para seguir con el desarrollo del ensayo.

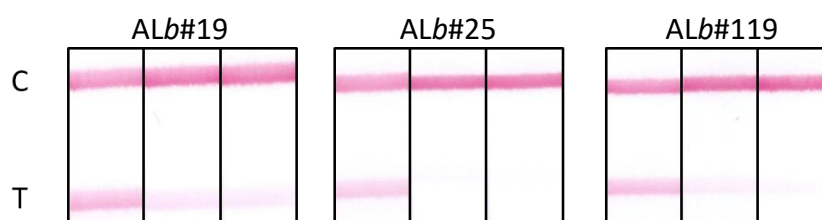


Figura 35. Imagen de las tiras inmunorreactivas con los anticuerpos ALb#19, ALb#25 y ALb#119 utilizando conjugados homólogos y muestras con alternariol a (de izquierda a derecha) 0, 1 y 3 ng/mL.

3.7.2. Selección del conjugado competidor

Tras la selección del anticuerpo ALb#25, el siguiente paso fue la selección del conjugado competidor que se utilizaría en el inmunoensayo. Para ello, se ensayó en paralelo el conjugado homólogo y los conjugados heterólogos reconocidos por este anticuerpo (BSA-ALm y BSA-ALh2). En la Figura 36 se muestran las imágenes de las tiras cuando se ensayaron disoluciones patrón de alternariol a diferentes concentraciones y las curvas obtenidas.

Con los tres conjugados competidores se obtuvieron valores excelentes de IC_{50} , estimados en torno a 0.3 ng/mL. En cuanto al valor de C se observó una independencia casi completa respecto al valor de T con el conjugado homólogo BSA-ALb y una ligera dependencia con el conjugado heterólogo BSA-ALm. En cambio, cuando se empleó el conjugado heterólogo BSA-ALh2 se observó una dependencia del valor de C respecto a T mucho mayor, particularmente si la lectura es visual. Si el ensayo que se quiere desarrollar es estrictamente cualitativo, el empleo de los conjugados BSA-ALb y BSA-ALm, resultaría una buena opción. Sin embargo, desde un punto de vista del desarrollo de un inmunoensayo semicuantitativo, el conjugado BSA-ALh2 se perfila como el idóneo, ya que la elevada dependencia de C respecto a T permite estimar de manera

más precisa el grado de contaminación de una muestra si se utiliza un lector y se calcula el cociente T/C. Además, la preparación del hapteno ALh2 es rápida, económica y sencilla por lo que se decidió continuar con el desarrollo del inmunoensayo con este último.

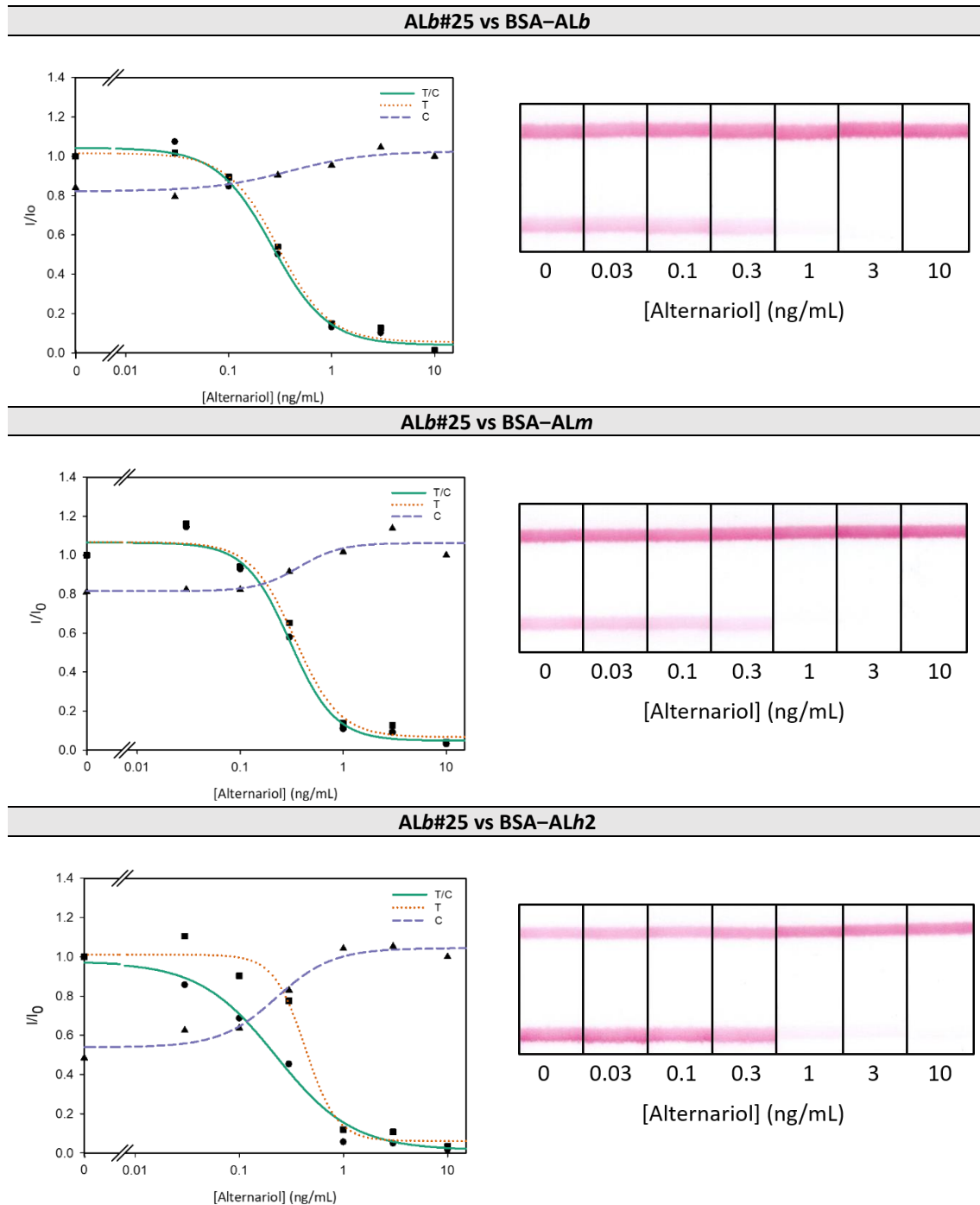


Figura 36. Representación gráfica de la variación de los valores de T, C y el cociente T/C (I) normalizado con respecto a T_0/C_0 (I_0), e imagen de las tiras obtenidas con el anticuerpo ALb#25 y los conjugados (de arriba a abajo) BSA-ALb, BSA-ALm y BSA-ALh2 a concentraciones crecientes de alternariol en el rango de 0 a 10 ng/mL.

3.7.3. Caracterización del conjugado con nanopartículas

El proceso de desarrollo de este tipo de inmunoensayo implica la caracterización de diferentes variables. La primera de ellas fue la cantidad del bioconjugado de oro coloidal con el monoclonal (NP-mAb) utilizado en el mismo. Con este objetivo, se evaluó cómo afectaba la variación de la cantidad de nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo a la señal máxima y la sensibilidad. Así, se emplearon diversos volúmenes de suspensión del conjugado de oro coloidal (15, 20, 25 y 30 μL) en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, con 0.05% (v/v) de Tween-20, junto con un volumen de muestra de 85, 80, 75 y 70 μL para cada caso respectivamente, en tampón Tris-HCl 75 mM, pH 7.4, con 0.05% (v/v) de Tween-20. El volumen total en todos los casos fue siempre de 100 μL . En la Figura 37 se recogen gráficamente los resultados de este estudio obtenidos en las condiciones descritas.

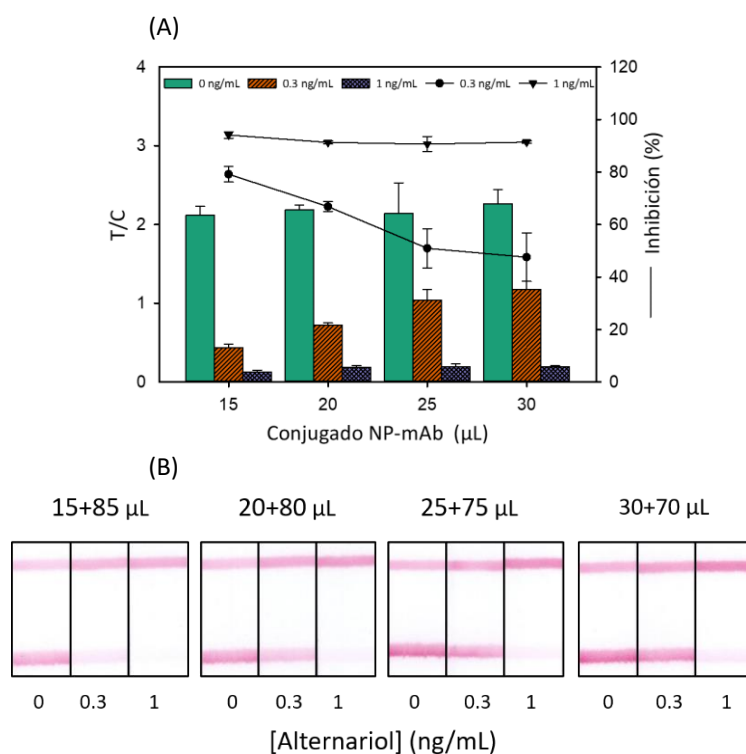


Figura 37. (A) Variación del cociente T/C y porcentaje de inhibición observados empleando distintas cantidades de conjugado NP-mAb. (B) Imagen de las tiras inmunorreactivas con los distintos volúmenes ensayados.

De los resultados obtenidos, se observa que la inhibición es prácticamente completa a 1 ng/mL de alternariol independientemente de la cantidad de nanopartículas empleadas. Las diferencias más significativas se encontraron cuando se emplearon 0.3

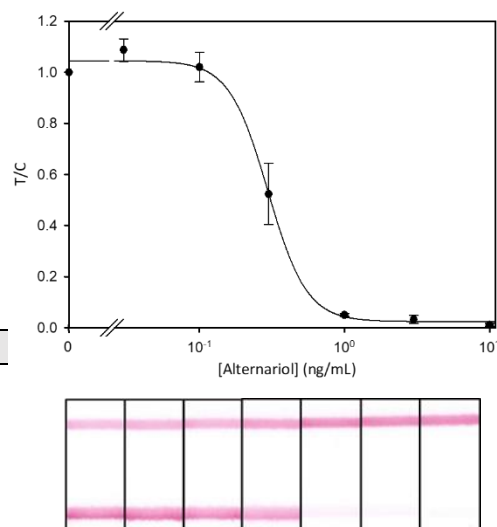
ng/mL de analito. Se puede observar cómo el valor de T/C a esta concentración aumenta con valores crecientes de conjugado de NP-mAb, modificando así la sensibilidad del ensayo sustancialmente. Lógicamente, la mayor inhibición se observó con la cantidad más pequeña ensayada de nanopartículas. No obstante, la señal obtenida con tan solo 15 μ L de suspensión de conjugado de oro se consideró insuficiente; por tanto, se pensó que era necesario el empleo de una mayor cantidad de conjugado. En consecuencia, sin llegar a emplear la cantidad máxima de nanopartículas ensayada, se optó por seleccionar un volumen de NP-mAb de 25 μ L, ya que arrojaba un valor de T/C elevado a la par que presentaba una inhibición cercana al 50%, suficiente para el desarrollo de un inmunoensayo de elevada sensibilidad. Como se puede observar en las fotografías, bajo estas condiciones el valor de C es ligeramente dependiente de T, de modo que a mayor concentración de analito aumenta el valor de C y disminuye el de T.

Llegados a este punto, ya se tenían las características básicas del ensayo inmunocromatográfico seleccionado por lo que se procedió a determinar la curva de calibrado y obtener los parámetros analíticos del ensayo. En la Tabla 3-29 se muestran la curva de inhibición obtenida. En cuanto a la sensibilidad obtenida, el valor de IC₅₀ fue excelente, con una pequeña desviación del valor obtenido para esta misma combinación en ELISA. Por su parte, el ensayo mostró una relativa uniformidad en la señal de las líneas pudiendo determinarse fácil y visualmente la cantidad de analito presente en la muestra.

Tabla 3-29. Características del ensayo inmunocromatográfico seleccionado.^a

| Tira inmunorreactiva | |
|-----------------------|--------------------|
| Línea control | 200 ng de GAM |
| Línea test | 200 ng de BSA-ALh2 |
| Anticuerpo monoclonal | 25 ng de ALb#25 |
| NP-mAb | 25 µL a OD 1.0 |
| Muestra | 75 µL |
| Tiempo | 15 min |
| Preincubación | 5 min |
| Cromatografía | 10 min |

| Curva inhibición ^b | |
|-------------------------------|---------------------------|
| (T/C) _{max} | 2.00 ± 0.46 |
| Pendiente | 1.56 ± 2.33 |
| IC ₅₀ (ng/mL) | 0.24 ± 0.05 |
| (T/C) _{min} | 0.04 ± 0.02 |
| LOD (ng/mL) | 0.11 ± 0.14 |
| R.T. (ng/mL) ^c | 0.14 ± 0.12 – 0.63 ± 0.27 |



^a Cantidades de inmunorreactivos empleadas por tira reactiva. ^b Los valores son la media de tres determinaciones independientes. ^c Rango de trabajo calculado como el intervalo IC₂₀-IC₈₀.

3.7.4. Influencia de pH y fuerza iónica

Al igual que en el método ELISA, el estudio de la influencia de distintos parámetros fisicoquímicos se realiza con un doble objetivo. Por un lado, es posible su interpretación desde el punto de vista del conocimiento sobre qué factores son los que más afectan a nuestro ensayo en vistas a su aplicación al análisis de muestras reales, y por otro, determinar qué condiciones son las más idóneas para obtener un incremento en la sensibilidad. En nuestro caso, estudiaremos la influencia de la modificación en los valores de pH y fuerza iónica. Para ello se probaron cuatro pH diferentes, comprendidos en un intervalo que va desde 7 a 8.5, y cinco valores de fuerza iónica alcanzados mediante la modificación de la concentración de NaCl adicionado al ensayo, que fue desde 0 a 200 mM. Ambos estudios se realizaron en el mismo tampón de ensayo (Tris-HCl 75 mM en presencia de una concentración constante de Tween-20).

Los ensayos competitivos se llevaron a cabo mezclando 75 µL de disolución estándar de alternariol preparada en los distintos tampones con 25 µL de suspensión de NP-

ALb#25 en Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, con 0.05% (v/v) Tween-20. La Figura 38 recoge los resultados obtenidos para el estudio del pH y fuerza iónica.

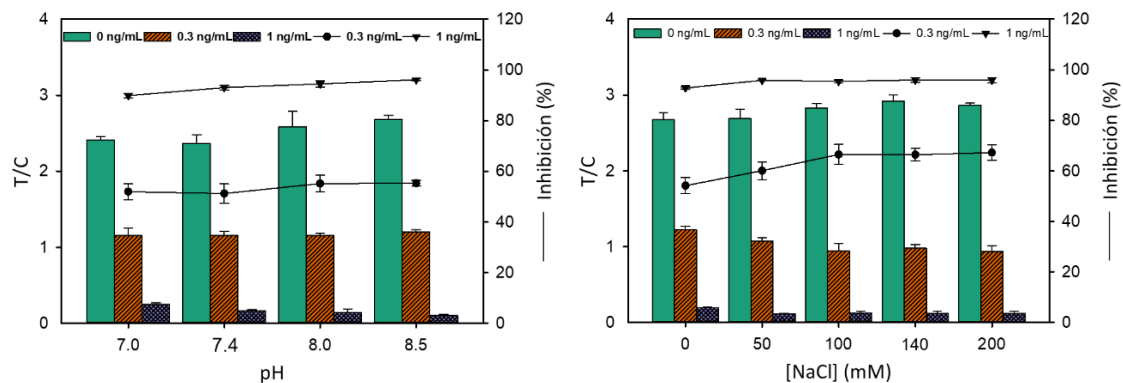


Figura 38. Estudio de la influencia del pH (izquierda) y de fuerza iónica (derecha) sobre la señal T/C de la tira inmunorreactiva ALb#25/BSA-ALh2 (n=3).

La primera conclusión que puede extraerse en lo que se refiere a la evaluación del pH es que las tiras presentaron una elevada tolerancia dentro del intervalo ensayado. Si bien la señal en ausencia de analito tiene una ligera tendencia a aumentar en este rango de pH, el incremento no fue sustancial, y la sensibilidad de ensayo, medida como la inhibición en presencia de analito a 0.3 ng/mL, no se diferenciaba de los valores obtenidos al pH de referencia (pH 7.4). Por ello, el tampón Tris-HCl 75 mM a pH 7.4 se considera como óptimo para este inmunoensayo.

Seguidamente se procedió a la evaluación de la influencia de la fuerza iónica empleando variaciones de concentración de NaCl (0, 50, 100, 140 y 200 mM). Una interpretación detallada arroja una ligera tendencia opuesta en presencia o ausencia de analito (Figura 38). En ausencia de analito el cociente T/C tiende a aumentar, mientras que en presencia de analito tiende a disminuir al incrementar la fuerza iónica. Por lo que se refiere a la inhibición a 0.3 ng/mL de alternariol, se observó que se mantenía constante a concentraciones de NaCl de 100 mM o superiores. A 1 ng/mL la inhibición se mantuvo prácticamente completa a cualquier concentración de NaCl ensayada. En términos generales no se observaron grandes modificaciones en cuanto a la señal e inhibición obtenidas y por tanto se decidió continuar con las condiciones estándar, las cuales se desarrollaban en ausencia de NaCl.

3.7.5. Validación de la tira inmunorreactiva

Debido a la incidencia cada vez más creciente de contaminantes alimentarios, así como la popularidad adquirida de las técnicas de screening o cribado para su eficaz detección, la Unión Europea en su reglamento 519/2014¹³⁸ detalla las directrices específicas para la validación de este tipo de técnicas semicuantitativas. Siguiendo estas recomendaciones se procedió a la validación del ensayo inmunocromatográfico en muestras de alimentos. Para ello, se determinó experimentalmente los parámetros analíticos del ensayo desarrollado.

En primer lugar, la normativa establece que los resultados del estudio se deben ajustar a un intervalo de confianza del 95%; es decir, el porcentaje de falsos negativos y de falsos sospechosos no debe superar el 5%. El principal objetivo de este estudio es determinar el umbral de corte (valor de *cut-off*) de la relación T/C; dicho de otro modo, el valor de T/C que permitirá distinguir entre muestras negativas y muestras sospechosas de contener alternariol por encima de una concentración determinada de analito denominada concentración de cribado, o STC (del inglés, *Screening Target Concentration*). Aquellas muestras que den un valor de T/C por debajo del umbral de corte, serán consideradas como posibles sospechosas de contener alternariol a concentraciones superiores al STC. Por el contrario, si el valor T/C es igual o superior al umbral de corte, la muestra se considerará negativa. 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. Las 20 determinaciones exigidas por la normativa se realizaron con 4 muestras de cada matriz que se analizaron durante 5 días consecutivos.

El análisis se llevó a cabo en tres matrices diferentes, dos zumos (pera y manzana) y un extracto QuEChERS de triturado de pera. Para el análisis de los zumos de pera y manzana dopados a 2 y 5 ng/mL, las muestras se diluyeron directamente 1/10 con tampón Tris-HCl 75 mM, pH 7.4, con 0.05% (v/v) de Tween-20, mientras que el extracto de triturado de pera se dopó con 1 y 2 ng/mL de alternariol y se diluyó en el mismo tampón. A continuación, se mezclaron 75 µL de dicha dilución con 25 µL de la preparación de conjugado NP-mAb. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 39

que representa los valores de T/C obtenidos para cada matriz sin analito y a los niveles de fortificación mencionados con alternariol, así como los umbrales de corte resultantes.

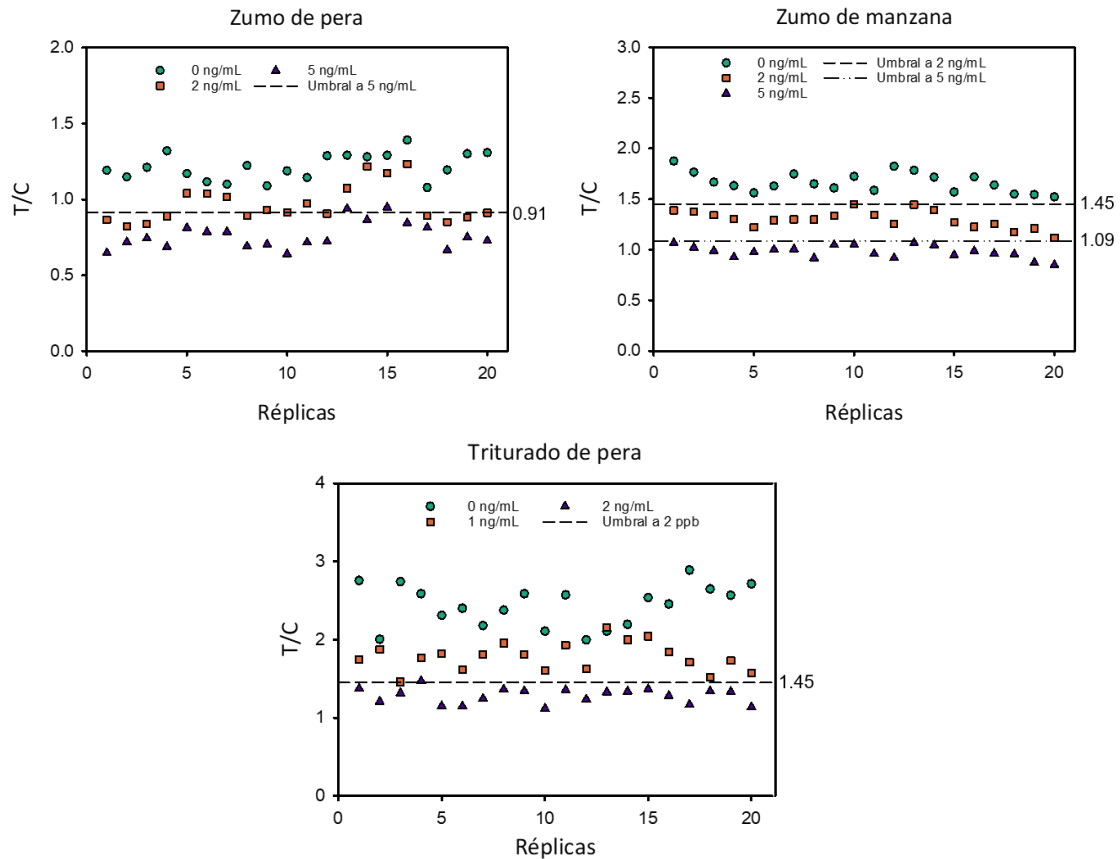


Figura 39. Valores de T/C para muestras de zumo de pera, zumo de manzana y extracto de pera sin dopar y dopadas con alternariol. Las líneas discontinuas muestran los umbrales de corte para cada matriz con un intervalo de confianza del 95%.

Tal y como se observa en la Figura 39 la variabilidad de las señales de las muestras sin dopar parece ser mayor en el triturado de pera que en los zumos. En todos los casos se observa una clara separación de los valores de T/C obtenidos con muestras fortificadas a la concentración más elevada ensayada de alternariol (5 ng/mL en zumos y 2 ng/mL en extracto de pera) respecto de los valores de las muestras que no se doparon. En el caso del zumo de pera, el umbral de corte, expresado como T/C, para diferenciar las muestras que contienen más de 5 ng/mL de alternariol se situó en 0.91 (asumiendo un 5% de falsos negativos). Con el zumo de manzana se obtuvo un resultado incluso mejor. En este zumo, la diferenciación de los valores de T/C de las muestras dopadas respecto de las no dopadas permitió bajar el valor de STC a 2 ng/mL y fijar el umbral de corte en 1.45, con una probabilidad del 5% de encontrar falsos negativos. En

cualquier caso, se podría establecer el mismo umbral de corte para el valor de T/C – alrededor de 0.9 – para ambos zumos, con una concentración de cribado de 5 ng/mL. Con el triturado de pera se pudo establecer, basado en el mismo principio estadístico, el valor de STC en 2 ng/mL con un umbral de corte de T/C en 1.45.

Además del umbral de corte, para una determinada STC es necesario, en cada caso, calcular la tasa de falsos sospechosos, cuyo valor indica 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. La probabilidad encontrada en cada matriz se encuentra recogida en la Tabla 3-30.

Tabla 3-30. Parámetros estadísticos para la determinación de alternariol mediante inmunocromatografía de flujo lateral en muestras alimentarias (n = 20).

| | Zum de pera | | | Zum de manzana | | | Triturado de pera | | |
|-------------------------------------|-------------|------------------|-------------|----------------|------------------|--------------|-------------------|------------------|-------------|
| | Blanco | STC ^a | 2.5×STC | Blanco | STC ^a | 2.5×STC | Blanco | STC ^b | 2×STC |
| Valor promedio de T/C | 1.21 | 0.97 | 0.76 | 1.67 | 1.3 | 0.98 | 2.43 | 1.78 | 1.28 |
| CV (%) | 7.3 | 12.9 | 11.6 | 6 | 6.7 | 6.4 | 11 | 10.2 | 7.7 |
| Umbral de corte de T/C ^c | - | 1.18 | 0.91 | - | 1.45 | 1.09 | - | 2.09 | 1.45 |
| Falsos sospechosos ^c (%) | - | 36.4 | 0.15 | - | 2.28 | 0.001 | - | 10.8 | 0.08 |

^a Concentración de cribado 2 ng/mL. ^b Concentración de cribado 1 ng/mL. ^c Valor obtenido para un intervalo de confianza del 95%.

En el caso del zumo de pera, para una concentración de cribado de 2 ng/mL, la probabilidad de encontrar un falso sospechoso se situó en un 36%, por lo que este umbral resulta inaceptable. Por el contrario, a una concentración de cribado de 5 ng/mL la probabilidad de obtener un falso sospechoso es de 0.15%. El zumo de manzana por su parte, arroja tasas de falsos sospechosos sobresalientes para ambas concentraciones de cribado analizadas. Con una concentración diana de 2 ng/mL la tasa de falsos sospechosos encontrada es de tan solo el 2.3%, cumpliendo el requisito del 95% de confianza. Como cabe esperar, para una STD mayor (5 ng/mL) se obtuvo una tasa de falsos sospechosos despreciable, del 0.001%. Finalmente, el análisis del extracto de triturado de pera dopado a 1 ng/mL aportó valores de T/C elevados, y por tanto la

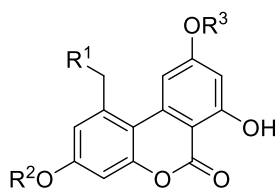
probabilidad de encontrar un falso sospechoso se situó alrededor de un 11%. Por otro lado, cuando se aumenta la concentración a 2 ng/mL la probabilidad de falsos sospechosos disminuye hasta el 0.08%.

En resumen, el ensayo desarrollado en tiras inmunocromatográficas (ALb#25/BSA-ALh2) cumple con criterios establecidos por la regulación de la Unión Europea para este tipo de métodos semicuantitativos o de cribado. Perfilándose como una alternativa rápida, sencilla y eficaz para la detección de alternariol a 5 ng/mL en zumo de pera y a 2 ng/mL en zumo de manzana y extracto de pera.

4. CONCLUSIONES

Conforme a lo expuesto en el apartado de resultados de esta memoria, se puede concluir que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral titulada “Estrategias de funcionalización alternativas de la micotoxina alternariol y desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis rápido de alimentos” se ha cumplido satisfactoriamente, ya que se han logrado desarrollar dos métodos inmunoquímicos para la detección de esta micotoxina con elevada sensibilidad y selectividad. A lo largo de este proceso se han alcanzados los siguientes objetivos particulares:

- ❖ Se han sintetizado *de novo* tres haptenos inmunizantes regioisoméricos para alternariol (ALa, ALb y ALm) y/o los correspondientes ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo (ALa-NHS, ALb-NHS y ALm-NHS). Los tres haptenos se caracterizan por mantener íntegro el esqueleto y funcionalización de alternariol e incorporar un brazo espaciador carboxilado por posiciones definidas y complementarias de la molécula.



Hapteno ALa: $R^1 = R^2 = H$; $R^3 = (CH_2)_4CO_2H$

Hapteno ALb: $R^1 = H$; $R^2 = (CH_2)_4CO_2H$; $R^3 = H$

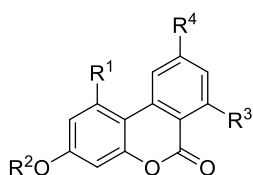
Hapteno ALm: $R^1 = (CH_2)_4CO_2H$; $R^2 = R^3 = H$

ALa-NHS éster: $R^1 = R^2 = H$; $R^3 = (CH_2)_4CO_2N(COCH_2)_2$

ALb-NHS éster: $R^1 = H$; $R^2 = (CH_2)_4CO_2N(COCH_2)_2$; $R^3 = H$

ALm-NHS éster: $R^1 = (CH_2)_4CO_2N(COCH_2)_2$; $R^2 = R^3 = H$

- ❖ A partir de estos haptenos se han preparado por primera vez bioconjugados con estructura y composición únicas que posibilitan la exposición de la estructura íntegra de alternariol al sistema inmunológico desde diferentes posiciones, y se ha evaluado la capacidad de estos nuevos inmunorreactivos para provocar una potente respuesta inmunitaria, que en última instancia conduce a la formación de anticuerpos de elevada afinidad hacia alternariol.
- ❖ A partir de los bioconjugados de los tres haptenos inmunizantes se han obtenido un total de 6 anticuerpos policlonales de conejo y 22 anticuerpos monoclonales de ratón, todos ellos de elevada afinidad hacia alternariol, con valores de IC_{50} en el rango nanomolar para policlonales y subnanomolar para monoclonales.
- ❖ Los bioconjugados preparados han permitido demostrar que la especificidad de los anticuerpos generados es dependiente de la posición del brazo espaciador. De este modo, con los conjugados de los haptenos *ALb* y *ALm* se han obtenido anticuerpos totalmente específicos de alternariol, mientras que utilizando el hapteno *AL α* se han obtenido anticuerpos genéricos que también reconocen alternariol 9-metil éter.
- ❖ Se ha llevado a cabo la síntesis de tres haptenos heterólogos (*ALh1*, *ALh2* y *AMEb*) con modificaciones estructurales de la molécula, y se ha explorado su utilidad para mejorar la sensibilidad de los inmunoensayos. Tanto en ELISA indirecto como en LFICA el empleo de conjugados heterólogos ha permitido mejorar la sensibilidad de los ensayos, lo que pone de manifiesto la importancia de disponer de este tipo de haptenos para la optimización de un inmunoensayo.



Hapteno *ALh1*: $R^1 = H$; $R^2 = (CH_2)_4CO_2H$; $R^3 = OH$; $R^4 = H$

Hapteno *ALh2*: $R^1 = H$; $R^2 = (CH_2)_4CO_2H$; $R^3 = R^4 = H$

Hapteno *AMEb*: $R^1 = CH_3$; $R^2 = (CH_2)_4CO_2H$; $R^3 = OH$; $R^4 = OCH_3$

ALh1-NHS éster: $R_1 = H$; $R_2 = (CH_2)_4CO_2N(COCH_2)_2$; $R_3 = OH$; $R_4 = H$

ALh2-NHS éster: $R_1 = H$; $R_2 = (CH_2)_4CO_2N(COCH_2)_2$; $R_3 = R_4 = H$

AMEb-NHS éster: $R_1 = CH_3$; $R_2 = (CH_2)_4CO_2N(COCH_2)_2$; $R_3 = OH$; $R_4 = OCH_3$

- ❖ Se ha desarrollado y validado un ELISA competitivo ultra-rápido en el formato de anticuerpo inmovilizado, basado en el anticuerpo monoclonal *ALb#119* en

combinación con su trazador homólogo (HRP-ALb). Este inmunoensayo se ha aplicado al análisis de muestras de zumos de pera y de manzana con excelentes resultados en términos de precisión y exactitud, permitiendo la cuantificación selectiva de alternariol a concentraciones de 10 y 30 ng/mL, respectivamente, con tiempos de competición de tan solo 15 min.

- ❖ Además, se ha desarrollado y validado un ELISA competitivo en formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta utilizando tiempos de competición estándar. Este inmunoensayo está basado en el anticuerpo monoclonal ALb#11 en combinación con el conjugado heterólogo OVA-ALm, y permite la cuantificación selectiva de alternariol en extractos de harinas de avena y trigo sarraceno a niveles tan bajos como 1 ng/mL, y en triturados de pera a 10 ng/mL.
- ❖ El inmunoensayo en formato indirecto se ha validado frente un método analítico de referencia (UHPLC) utilizando muestras de pera infectadas en el laboratorio con *Alternaria alternata*, mostrando después de la aplicación del correspondiente factor de corrección una correlación excelente entre los valores obtenidos mediante ambas técnicas.
- ❖ Se ha desarrollado un inmunoensayo de tipo LFICA competitivo, basado en el anticuerpo monoclonal ALb#25 en combinación con el conjugado heterólogo BSA-ALh2, con un límite de detección visual (vLOD) para alternariol de tan solo 0.3 ng/mL.
- ❖ La tira inmunorreactiva desarrollada se ha validado siguiendo las directrices del reglamento 519/2014 de la UE para métodos de análisis semicuantitativos. De este modo se ha demostrado su capacidad para discernir, en tan solo 10 min, entre muestras libres de alternariol y muestras contaminadas con esta micotoxina a concentraciones iguales o superiores a 5, 2 y 2 ng/mL en zumo de pera, zumo de manzana y triturado de pera, respectivamente.

5. EXPERIMENTAL SECTION

5.1. Reagents, instruments and techniques

5.1.1. **Synthesis of haptens**

All organic solvents required in anhydrous conditions were dried and distilled prior to use using standard techniques.¹³⁹ CH₂Cl₂ was distilled over CaH₂ under nitrogen and THF and toluene were distilled over Na and benzophenone. MeOH was dried and stored over molecular sieve (3Å). The remaining solvents were used as received without further purification.

Operations with air-and/or moisture-sensitive reagents were performed under an inert atmosphere of dry N₂ or Ar, using syringes and cannulas, oven-dried glass equipment (130 °C overnight) and freshly dried and distilled solvents according to the techniques described above. Hydrogenation reactions conducted a pressure above atmospheric pressure were carried out in a Tiny-Clave reactor of Buchi Labortechnik AG (Flawil, Switzerland). After introducing the initial reaction mixture and a magnetic stir bar, the reactor was sealed, filled with H₂ at a pressure of H₂ slightly higher than desired

and purged at least 5 times by cycles of pressure purging. Then, the pressure of H₂ was adjusted to the desired value, which remained constant until the end of the reaction.

The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on 0.25 mm Merck 60 F254 silica gel plates with fluorescent indicator. The visualization of the plates was done with ultraviolet light (UV) of 254 nm and also through the use of developers: I₂ or phosphomolybdic acid in ethanol. In these cases, the plate was introduced into the developer solution chosen and heated with an industrial dryer until adequate coloring was observed. Except for cases where the crude product showed sufficiently high purity (greater than 95% by ¹H NMR), the synthesized compounds were purified by flash column chromatography on silica gel Merck 60 (230–400 mesh). In each case, the specified solvent mixture was used as the eluent.

Melting points (Mp) of the solid products were determined in capillary tubes using a Buchi M-560 melting point apparatus. Infrared (IR) spectra were measured without prior preparation using the total attenuated reflectance (ATR) technique on a Thermo Scientific Nicolet i510 FTIR Spectrometer from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). The position of the signals is expressed as wavenumber (cm⁻¹) and their intensity as strong (s), medium (m) or weak (w). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at 25°C in the solvent indicated, at 300/75 MHz (Bruker Avance DPX300 spectrometer) or 500/126 MHz (Bruker Avance DRX500). In all cases, the chemical shifts are given in ppm (δ scale) relative to the residual solvent as the internal reference (¹H NMR: 7.26 ppm for CDCl₃, 2.05 ppm for acetone-d₆, 3.31 ppm for CD₃OD, 2.50 ppm for DMSO-d₆, 3.58 ppm for THF-d₈; ¹³C NMR: 77.16 ppm for CDCl₃, 29.84 for acetone-d₆, 49.00 for CD₃OD, 39.52 for DMSO-d₆, 25.37 ppm for THF-d₈). The ¹⁹F NMR chemical shifts are expressed in ppm relative to CFCl₃, the signal of which was used as an internal reference (0.00 ppm). Carbon substitution degrees were established by DEPT pulse sequences. The complete assignment of ¹H NMR and ¹³C NMR signals was performed using 2D NMR experiments (COSY, HSQC and HMBC). High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a premier Q-TOF mass spectrometer equipped with an electrospray source. The data obtained was expressed as mass/charge ratio (*m/z*, Da).

5.1.2. Buffers and solutions

All aqueous solutions and buffers used in this study were prepared in freshly generated MilliQ® ultrapure water using an equipment from Merck-Millipore (Billerica, MA, USA). The reagents used for preparing buffers and solutions were used without prior purification. The names and compositions are described below:

- Coating buffer: 50 mM Na₂HCO₃/NaH₂CO₃ buffer, pH 9.6.
- Washing solution: 150 mM NaCl with 0.05% (v/v) Tween-20.
- Substrate solution buffer: 25 mM citric acid with 62 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer, pH 5.4.
- Substrate solution:
 - 2 mg/mL OPD with 0.012% (v/v) H₂O₂ in substrate solution buffer.
 - 0.25 mL solution of 41 mM TMB with 8.1 mM tetrabutylammonium borohydride in dimethylacetamide was diluted in 10 mL of 205 mM citric acid buffer, pH 4.0. and 4 μL of H₂O₂.
- Stop solution: H₂SO₄ 1 M.
- SAS: saturated (NH₄)₂SO₄.
- PBS solution: 11 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer with 135 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.4.
- PBS-T: PBS solution with 0.05% (v/v) Tween-20.
- PBS2×-T: PBS solution with 0.1% (v/v) Tween-20
- PB20: 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer, pH 7.4.
- PB: 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer, pH 7.4.
- PBS-BSA-Thimerosal (PBT): 1% (m/v) BSA with 0.01% (m/v) thimerosal in PBS solution.
- CB: 50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer, pH 9.6
- Tris10-T: 10 mM Tris-HCl buffer with 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4
- Tris75-T: 75 mM Tris-HCl buffer with 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4.

5.1.3. Materials and equipment for conjugate preparation and characterization

Bovine serum albumin (BSA, fraction V, cat. no. 10735094001, MW 66.0 kDa) was purchased from Roche Applied Science (Mannheim, Germany). Ovalbumin (OVA, cat. no. A2512) was supplied by Sigma/Aldrich (Madrid, Spain) and horseradish peroxidase (HRP, cat. no. 31490, activity: 307 U/mg, MW 44.0 kDa) was from ThermoFisher Scientific (Madrid, Spain). Purification of the protein-hapten conjugates was performed by gel filtration chromatography (size-exclusion) on a ÄKTA Purifier Workstation equipped with UV detector, using serial Sephadex G-25 HiTrap Desalting columns of 5 mL each, all purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Three columns were used for BSA and OVA conjugates, and two columns for HRP conjugates. UV/vis absorption spectra of the purified conjugates were recorded with a BioTek Instruments PowerWave HT reader (Winooski, VT, USA) using PB as eluent in all cases. The dialysis of the conjugates was performed in Slide-A-Lyzer® mini-dialysis cassettes of 300 µL capacity equipped with membranes permeable to molecules with a molecular weight of less than 30 kDa, which were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Mass spectra of the protein-hapten conjugates were determined on an ABSciex (Framingham, MA, USA) TOF/TOF™ 5800 mass spectrometer by matrix-assisted laser desorption ionisation with time-of-flight detector (MALDI-TOF). The matrix was prepared from a solution of sinapinic acid (Bruker, Billerica, MA, USA) at 5 mg/mL and 0.1% (v/v) 2,2,2-trifluoroacetic acid (TFA) in CH₃CN/H₂O 7:3 (v/v). The TOF/TOF calibration mixture was also supplied by ABSciex.

5.1.4. Materials for antibody production and cell culture

Rabbits and mice used for antibody production were obtained from Granja San Bernardo (Navarra, Spain) and Envigo RMS (Sant Feliu de Codines, Spain), respectively. Both New Zealand female rabbits (NWZ) and BALB/c female mice (BALB/cOlaHsd) were stabled at the Animal Production Section of the Central Support Service for Experimental Research (SCSIE) of the University of Valencia. All injectables for immunizations were prepared in sterile conditions. The handling of the animals was carried out in compliance with the Spanish laws and guidelines (RD 1201/2005 and Law 32/2007)^{140,141} and in accordance with the European Directive 2010/63/EU¹⁴² on the protection of animals used for scientific purposes.

Freund's complete and incomplete adjuvants, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, high content of glucose), fetal bovine serum (FBS), L-alanyl-L-glutamine solution (L-Ala-L-Gln, 200 mM), non-essential amino acid solution (NEAA, 100×), Hybri-Max erythrocyte lysis buffer and polyethylene glycol (PEG 1500) were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid). Gentamicin (50 mg/mL), HT supplement (5 mM hypoxanthine and 0.8 mM thymidine) and HAT supplement (HT with 20 µM aminopterin) were all provided by Gibco BRL (Paisley, UK). Hybridoma fusion and cloning supplement (HFCS, 50×) was obtained from Roche Applied Science (Mannheim, Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was supplied by Scharlau (Barcelona, Spain).

Culture media were prepared under sterile conditions from commercially available media solutions and supplements. The employed media were as follows:

- Incomplete medium: DMEM supplemented with 2 mM L-Ala-L-Gln, 25 µg/mL NEAA and 25 µg/mL gentamicin.
- Complete medium: Incomplete médium supplemented with 10% 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.
- Post-fusion medium: Incomplete medium with 15% FBS (v/v).
- Cryopreservation medium: FBS with 10% DMSO (v/v).

The mouse plasmacytoma cell line P3-X63-Ag 8.653 was provided by the European Cell Culture Collection (ECACC, Salisbury, UK). Cell cultures were grown at 37 °C in a ThermoElectron incubator (Waltham, MA, USA), with an environment of 90% humidity and 5% CO₂. Sterile disposable plasticware supplied by Corning (Corning, NY, USA) was used to handle the cultures. Cell counting was carried out with Neubauer haematocytometers. Sterile EASYstrainer™ 70 µm pore diameter screens for culture medium filtration were purchased from Greiner Bio-One (Kremsmünster, Austria). Nunc cryotubes for the preservation of the cell lines in liquid N₂ were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

The monoclonal antibodies were purified by affinity chromatography on a ÄKTA Purifier workstation with UV detector, using a 5 mL HiTrap Protein G HP column preceded by a 5 mL Sephadex G-25 HiTrap Desalting column, all acquired from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Concentration of the purified monoclonal antibody solutions was performed in Merck-Millipore Amicon® Ultra-4 tubes (Billerica, MA, USA) with regenerated cellulose membranes permeable to molecules of molecular weight less than 30 kDa.

The isotyping of the heavy chains of the monoclonal antibodies was carried out with the Calbiochem® Hybridoma Subisotyping Kit from Merck-Millipore (Cat. No. 386445). For isotyping of light chains, a kit from Rockland Immunochemicals Inc (Limerick, PA, USA) were used. The assay was performed by non-competitive ELISA with indirect detection, following the kit manufacturer's instructions. On the one hand, six rabbit anti-mouse immunoglobulin heavy chain antibodies (RAM-antiH) capable of recognising γ 1 (IgG1), γ 2a (IgG2a), γ 2b (IgG2b), γ 3 (IgG3), μ (IgM) and α (IgA) heavy chains were used. In addition, two rabbit anti-mouse immunoglobulin light chain antibodies (RAM-antiL) were used for the recognition of κ - and λ -type light chains.

5.1.5. Materials for immunoassays

Alternariol (CAS no 641-38-3, Mw 258.2 Da) and alternariol 9-metil éter (CAS no 23452-05-3, Mw 272.2 Da) were obtained from Sigma-Aldrich. Primary-secondary amine (PSA) was also purchased from Sigma-Aldrich. Goat anti-rabbit immunoglobulins and goat anti-mouse immunoglobulins were provided by 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-labelled rabbit anti-mouse immunoglobulin antibody conjugate was purchased from Dako (Glostrup, Denmark, cat. no. P0002-2) and peroxidase-labelled goat anti-rabbit immunoglobulin antibody conjugate was obtained from Bio-Rad Laboratories (Madrid, Spain, cat. no. 170-6515). *o*-Phenylenediamine, Tween-20 and H₂O₂ 30% (v/v) were supplied by Sigma-Aldrich. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine was purchased from Zeulab SL (Zaragoza, Spain). Costar high-binding, flat-bottom 96-well polystyrene ELISA plates were acquired from Corning (Corning, NY, USA, cat. no. 3590). ELISA absorbance was determined by using a

PowerWave HT from BioTek Instruments (Winooski, VT, USA). Microplate wells were rinsed with an ELx405 microplate washer, also from BioTek Instruments.

The 40 nm GAM-modified gold nanoparticles (OD = 10) were purchased from BBI solutions (Crumlin, UK, cat. no. BA.GAM40). Nitrocellulose membranes (pore size: 15 μm) were supplied by MDI Membrane Technologies (Ambala, India, cat. no. 70CNPH-NSS40) and backing cards were obtained from Kenosha (Amstelveen, The Netherlands). The cellulose sample pad (Cat. No. CFSP173000) and absorbent pad were obtained from Merck-Millipore (Billerica, MA, USA) and Ahlstrom-Munksjö (Manchester, UK), respectively. A Biodot ZX1010 system (West Sussex, UK) was employed to dispense the immunoreagents onto the nitrocellulose membrane. Immunostrips were manually assembled with the help of a LM50000 lamination system, and they were cut into 4 mm strips using a CM5000 guillotine, both from Biodot. The Immunostrips were subsequently processed with an EPSON V39 scanner.

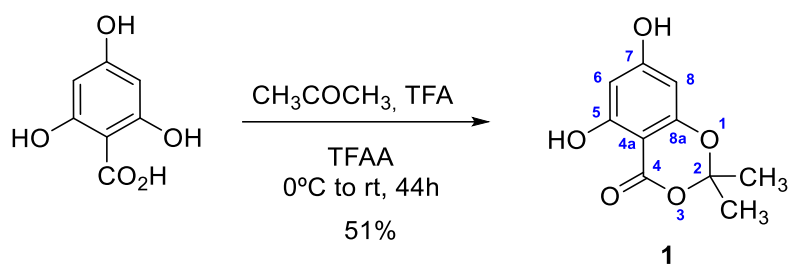
5.1.6. Materials for liquid chromatography

Alternariol was analysed by a previously described ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) method with minor modifications.¹²⁸ Alternariol detection and quantification were achieved by using an UHPLC system (ACQUITY Arc Sys Core 1–30 cm, Waters Co., Milford, CT, USA) equipped with a Waters temperature control module, a Waters 2475 fluorescence detector (excitation wavelength of 258 nm and emission wavelength of 440 nm), and a Luna C18 (2) column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA).

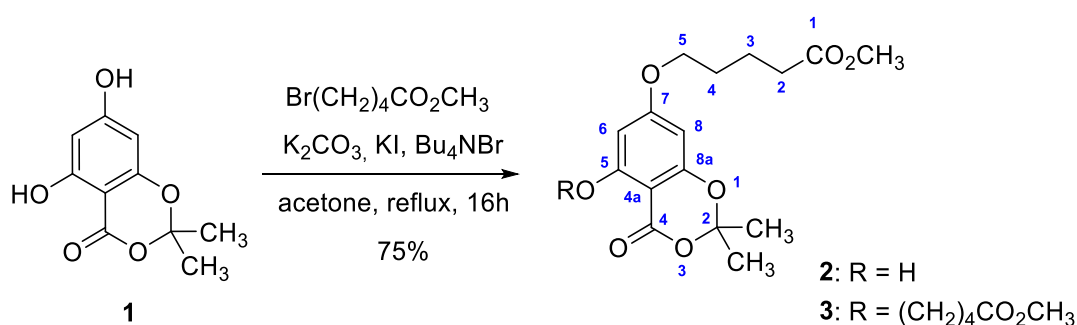
5.2. Preparation of hapten derivatives

5.2.1. Synthesis of immunizing haptens

5.2.1.1. *Synthesis of the N-hydroxysuccinimidyl ester of hapten ALa (ALa-NHS ester)*

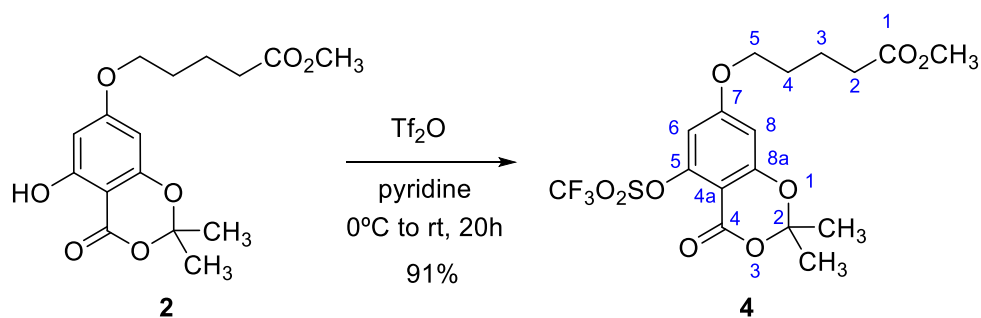


5,7-Dihydroxy-2,2-dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (1). A solution of trifluoroacetic anhydride (3.5 mL, 37.23 mmol, 7 equiv.) in anhydrous acetone (1.9 mL, 26.60 mmol, 5 equiv.) was dropwise added to a suspension of commercial 2,4,6-trihydroxybenzoic acid monohydrate (1.0 g, 5.32 mmol) in trifluoroacetic acid (7.7 mL, 101.06 mmol) at 0 °C under nitrogen. The mixture was slowly warmed to room temperature and then stirred for 44 h. The mixture was concentrated to leave an oily residue which was poured into a saturated NaHCO₃ solution and then extracted with Et₂O. The combined organic extracts were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and concentrated in vacuo. Finally, the crude obtained was purified by chromatography on silica gel, using CHCl₃ as eluent, to give **1** (419.0 mg, 51%) as a white solid.^{108,109} IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3176 (m), 1627 (s), 1601 (s), 1478 (s), 904 (s), 842 (s); ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆) δ 10.46 (s, 1H, OH), 9.71 (s, 1H, OH), 6.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.00 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-8), 1.72 (s, 6H, 2×CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆) δ 167.2 (C-4), 165.79 (C-7), 164.1 (C-8a), 158.2 (C-5), 107.7 (C-2), 98.0 (C-4a), 96.2 (C-6), 93.1 (C-8), 25.6 (2×CH₃); HRMS (TOF MS ES+) *m/z* calculated for C₁₀H₁₀O₅ [M+H]⁺ 211.0601, found 211.0594.



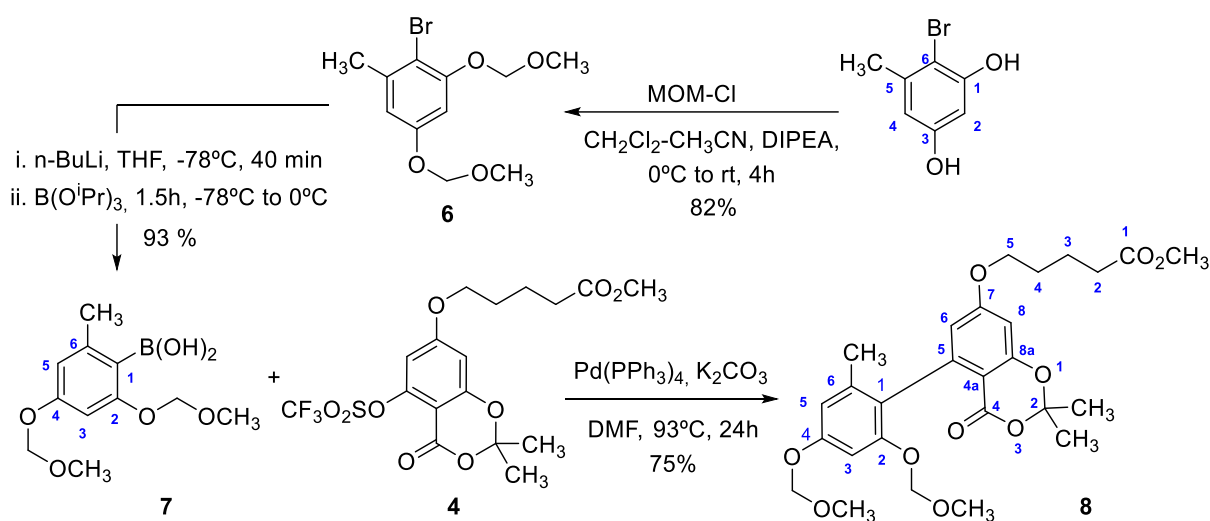
Methyl 5-((5-hydroxy-2,2-dimethyl-4-oxo-4H-benzo[d][1,3]dioxin-7-yl)oxy)pentanoate (2). Methyl 5-bromovalerate (186 μ L, 266 mg, 1.36 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of 1,3-benzodioxinone **1** (260 mg, 1.237 mmol), KI (83 mg, 0.500 mmol, 0.4 equiv), Bu₄NBr (0.5 mg, 1.6 μ mol) and K₂CO₃ (188 mg, 1.36 mmol, 1 equiv) in

dry acetone (9 mL) under nitrogen. After heating the mixture at reflux for 16 h, the acetone was eliminated at reduced pressure and the brownish residue obtained was diluted with water and extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum to give a crude product that was purified by chromatography on silica gel, using hexane-EtOAc mixtures from 9:1 to 7:3 as eluent, to afford, in order of elution, dialkylated derivative **3** (67.7 mg, 12.5%) and monoalkylated compound **2** (300 mg, 75%) as a white solid. Mp 97.3–98.2 °C (crystallized from hexane-EtOAc) IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹) 3017 (w), 1740 (s), 1672 (s), 1251 (s), 1159 (s), 840 (s), 794 (s); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.42 (s, 1H, OH), 6.11 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-6), 5.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-8), 3.98 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H₂-5), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.39 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₂-2), 1.81 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4), 1.72 (s, 6H, 2×CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173.8 (CO₂CH₃), 167.2 (C-4), 165.3 (C-7), 163.2 (C-8a), 156.9 (C-5), 107.0 (C-2), 96.3 (CH-6), 95.1 (CH-8), 93.1 (C-4a), 68.1 (CH₂-5), 51.7 (OCH₃), 33.7 (CH₂-2), 28.4 (CH₂-4), 25.8 (2×CH₃), 21.6 (CH₂-3); HRMS (TOF MS ES+) *m/z* calculated for C₁₆H₂₀O₇ [M+H]⁺ 325.1282, found 325.1283.



Methyl 5-((2,2-dimethyl-4-oxo-5-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)-4H-benzo[d][1,3]dioxin-7-yl)oxy)pentanoate (4). Triflic anhydride (230 μ L, 1.369 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of phenol **2** (296 mg, 0.913 mmol) in anhydrous pyridine (4.5 mL) at 0 °C under nitrogen. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 20 h, then cooled down to 0 °C and treated with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, stirred for a few minutes at room temperature and then extracted with Et₂O. The organic layers were washed with water, a 1% (w/v) aqueous solution of CuSO₄ and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated at reduced pressure. The residue obtained was chromatographed on silica gel, using hexane-EtOAc mixtures from 9:1 to 8:2 as eluent, to give aryl triflate **4** (378.8 mg, 91%) as a white

semisolid. IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹) 3114 (w), 1746 (s), 1733 (s), 1381 (s), 1228 (s), 1167 (s), 869 (s); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.51 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-6), 6.45 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-8), 4.02 (t, J = 5.8 Hz, 2H, H₂-5), 3.68 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.40 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H₂-2), 1.85 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4), 1.73 (s, 6H, 2×CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173.7 (CO₂CH₃), 165.0 (C-4), 158.9 (C-7), 157.2 (C-8a), 150.1 (C-5), 106.7 (C-2), 105.7 (CH-6), 101.6 (CH-8), 101.0 (C-4a), 68.9 (CH₂-5), 51.8 (OCH₃), 33.6 (CH₂-2), 28.3 (CH₂-4), 25.7 (2×CH₃), 21.5 (CH₂-3); ¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ 73.1 (s, CF₃); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for C₁₇H₂₃F₃NO₉S [M+NH₄]⁺ 474.1040, found 474.1027.



Methyl 5-((5-(2,4-bis(methoxymethoxy)-6-methylphenyl)-2,2-dimethyl-4-oxo-4H-benzo[d][1,3]dioxin-7-yl)oxy)pentanoate (8).

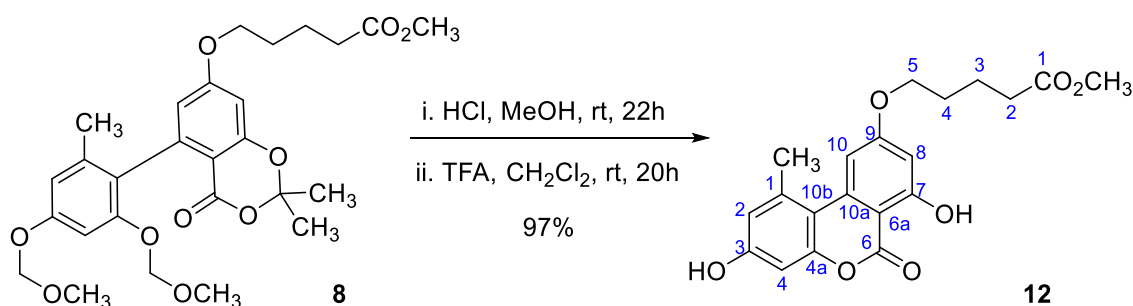
(i) **2-Bromo-1,5-bis(methoxymethoxy)-3-methylbenzene (6).** *N,N*-diisopropylethyl amine (790.0 μ L, 4.536 mmol, 6 equiv) and chloro(methoxy)methane (1.738 mmol, 2.3 equiv) were successively dropwise added to a solution of 4-bromo-5-methylbenzene-1,3-diol (153.4 mg, 0.756 mmol) in a 1:1 mixture of anhydrous CH₂Cl₂ and CH₃CN at 0 °C under nitrogen. The resulting light yellow solution was stirred for 2.5 h at 0 °C, then treated with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (2 mL) and stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was extracted with Et₂O, the combined organic extracts were washed with 5% aqueous NaHCO₃, brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated in vacuum. The obtained orange oil was purified by column chromatography on silica gel (packed with CHCl₃ and eluted with CHCl₃) to give bromide 6 (180.2 mg, 82%) as a colorless semi-solid.¹¹¹ IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹) 2953 (w), 2901 (w),

2827 (w), 1578 (m), 1464 (m), 1317 (m), 1146 (s), 1084 (m), 1039 (s), 1013 (m), 998 (m), 920 (m), 840 (m); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.71 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-4), 6.66 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-6), 5.22 and 5.13 (each s, 2H each, $2\times\text{OCH}_2\text{O}$), 3.52 (s, 3H, OCH_3), 3.47 (s, 3H, OCH_3), 2.39 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.7 (C-1), 154.5 (C-5), 140.1 (C-3), 111.7 (C-4), 107.8 (C-2), 102.8 (C-6), 95.3 and 94.7 ($2\times\text{OCH}_2\text{O}$), 56.5 (OCH_3), 56.2 (OCH_3), 23.7 (CH_3); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{BrO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 291.0226, found 291.0225.

(ii) *Preparation of boronic acid 7*. A solution of *n*-BuLi in hexane (1.3 M, 336 μL , 0.436 mmol, 1.05 equiv) was dropwise added to a solution of aryl bromide **6** (122.3 mg, 0.420 mmol) in anhydrous THF (2.5 mL) at -78 $^\circ\text{C}$ under nitrogen. The reaction mixture was stirred at this temperature for 40 min, $\text{B}(\text{O}^i\text{Pr})_3$ (322 μL , 1.386 mmol, 3.3 equiv) was then added and the mixture stirred for 1.5 h. After this time, the dry ice bath was replaced by an ice bath and the mixture treated with an aqueous saturated solution of NH_4Cl (0.7 mL), then diluted with water and extracted with Et_2O . The organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give boronic acid **7** (100.0 mg, 93 %) as a thick oil that was immediately used in the next reaction without further purification since it is relatively prone to hydrolysis. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.91 (s, 1H, BOH), 6.49 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-4), 6.47 (d, $J = 2.10$ Hz, 1H, H-6), 5.12 and 5.09 (each s, 2H each, $2\times\text{OCH}_2\text{O}$), 3.37 and 3.34 (each s, 3H each, $2\times\text{OCH}_3$), 2.20 (s, 3H, CH_3).

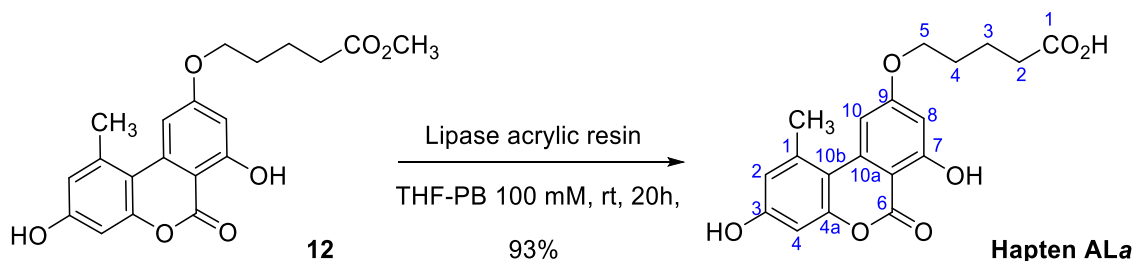
(iii) *Coupling reaction between aryl triflate 4 and boronic acid 7*. A mixture of the above obtained boronic acid **7** (47.4 mg, 0.185 mmol), aryl triflate **4** (41.6 mg, 0.091 mmol), powdered K_2CO_3 (43.2 mg, 0.312 mmol) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (11.4 mg, 9.9 μmol) under nitrogen was dissolved in anhydrous DMF (1.2 mL), previously degassed by three freeze-vacuum-thaw cycles. The mixture was heated at 93 $^\circ\text{C}$ and stirred at this temperature for 24 h. The mixture was cooled to room temperature, quenched with water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were successively washed with water, a 1.5% (w/v) aqueous solution of LiCl and brine and dried over anhydrous MgSO_4 . The residue obtained after evaporation of the solvent was chromatographed on silica gel, using hexane-EtOAc 8:2 as eluent, to afford biaryl compound **8** (35.2 mg, 75%) as a yellowish oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.71 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-6), 6.64 (d, $J = 2.3$ Hz,

¹H, H-8), 6.42 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-5), 6.40 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-3), 5.18 (AB system, *J* = 6.7 Hz, 2H, OCH₂O), 4.98 (AB system, *J* = 6.6 Hz 2H, OCH₂O), 3.99 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H₂-5), 3.67 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.50 and 3.29 (each s, 3H each, 2×OCH₃), 2.39 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₂-2), 2.04 (s, 3H, CH₃ Ph), 1.81 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4), 1.71 (s, 6H, 2×CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173.9 (CO₂CH₃), 164.1 (CO), 159.2 (C-7), 158.5 (C-8a), 157.4 (C-4), 154.8 (OC-2), 142.9 (C-6), 136.9 (C-5), 123.9 (C-1), 113.8 (CH-3), 110.6 (CH-8), 106.8 (C-2), 105.1 (CH-5), 101.2 (CH-6), 94.9 and 94.7 (2×OCH₂O), 68.1 (CH₂-5), 56.3 and 55.9 (2×OCH₃), 51.8 (CO₂CH₃), 33.7 (CH₂-2), 28.6 (CH₂-4), 26.3 and 25.2 (2×CH₃), 21.7 (CH₂-3), 20.7 (CH₃ Ph). HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₂₇H₃₄O₁₀ [M+H]⁺ 519.2225, found 519.2212.

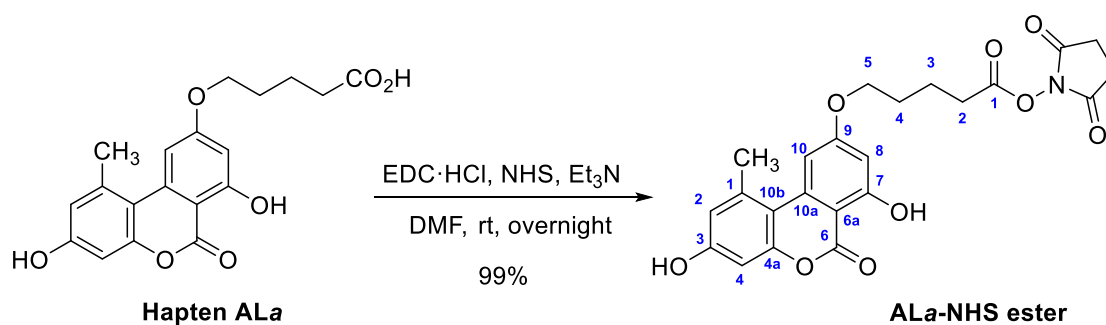


Methyl 5-((3,7-dihydroxy-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[*c*]chromen-9-yl)oxy)pentanoate (12). A 3 M solution of HCl in MeOH (150 μL, 0.450 mmol) was added to a solution of biaryl compound **8** (26.1 mg, 0.050 mmol) in anhydrous MeOH (1.5 mL) and the reaction mixture stirred at room temperature for 22 h. The mixture was concentrated under vacuum, the residue dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (4 mL) and treated with trifluoroacetic acid (430 μL). After 20 h of stirring at room temperature, TLC showed the formation of a single compound and all the volatiles were removed under vacuum, using CHCl₃ to co-evaporate the last traces of TFA. The residue obtained was purified by chromatography, using CHCl₃ as eluent, to give benzochromenone derivative **12** (18.1 mg, 97%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.79 and 10.33 (each s, 1H each, 2×OH), 7.13 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-10), 6.69 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-2), 6.61 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-4), 6.55 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-8), 4.11 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H₂-5), 3.59 (s, 3H, OCH₃), 2.68 (s, 3H, CH₃), 2.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₂-2), 1.85–1.56 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.2 (CO₂CH₃), 165.5 (CO), 164.6 (C-9), 164.1 (C-7), 158.5 (C-3), 152.6 (C-4a), 138.4 (C-1), 137.7 (C-10a), 117.5 (CH₂-2), 108.8 (C-10b), 103.6 (CH-

10), 101.6 (CH-4), 99.5 (CH-8), 98.3 (C-6a), 67.8 (CH₂-5), 51.2 (CO₂CH₃), 32.8 (CH₂-2), 27.8 (CH₂-4), 25.0 (CH₃), 21.1 (CH₂-3); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for C₂₀H₂₁O₇ [M+H]⁺ 373.1282, found 373.1278.

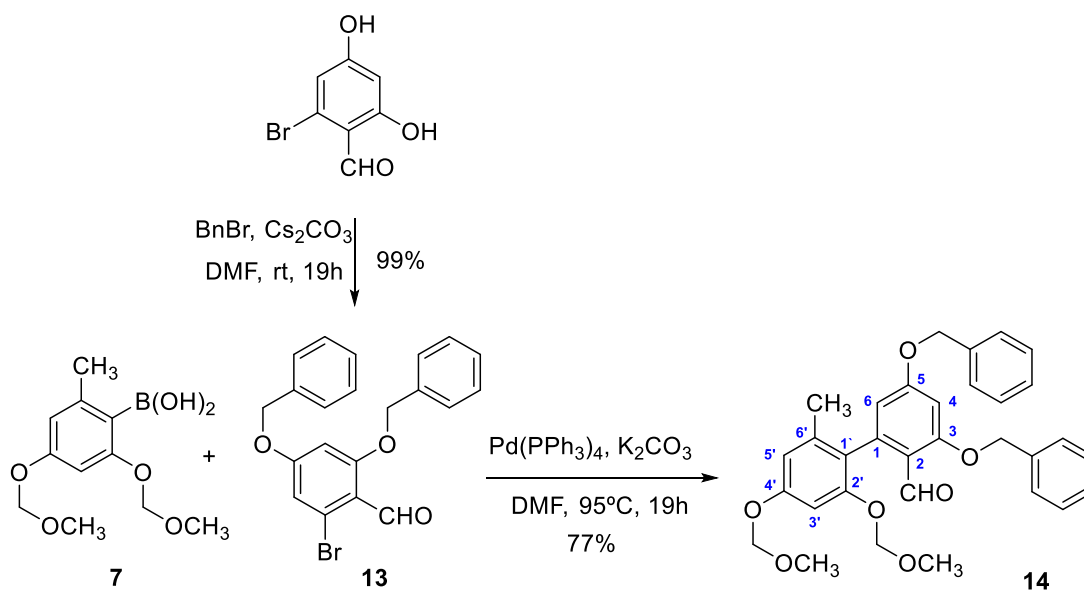


5-((3,7-Dihydroxy-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-9-yl)oxy)pentanoic acid (Hapten ALa). Lipase from *Candida antarctica* immobilized on acrylic resin (23 mg) was added to a solution of methyl ester **12** (16.6 mg, 0.0446 mmol) in a 4:1 mixture of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and THF (1.5 mL) at 30 °C. The resulting heterogeneous mixture was smoothly stirred for 24 h at room temperature and then filtered to separate the enzyme. The filtrate and washing (THF) phases were combined, diluted with EtOAc, washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and concentrated in vacuo to afford hapten ALa (14.9 mg, 93%) as a white amorphous solid. ¹H NMR (300 MHz, THF-*d*₈) δ 11.99 and 9.19 (each s, 1H each, 2×OH), 7.27 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-10), 6.67 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-2), 6.61 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-4), 6.56 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-8), 4.13 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, H₂-5), 2.78 (s, 3H, CH₃), 2.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₂-2), 1.91–1.77 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4); ¹³C NMR (126 MHz, THF-*d*₈) δ 174.5 (CO₂H), 167.1 (CO), 166.4 (C-9), 166.2 (C-7), 159.9 (C-3), 154.5 (C-4a), 139.5 (C-1), 139.2 (C-10a), 118.5 (CH-2), 110.7 (C-10b), 105.1 (CH-10), 102.8 (CH-4), 100.3 (CH-8), 100.0 (C-6a), 69.2 (CH₂-5), 34.0 (CH₂-2), 29.6 (CH₂-4), 25.0 (CH₃, overlapped with solvent signal), 22.6 (CH₂-3); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for C₁₉H₁₈O₇ [M+H]⁺ 359.1125, found 359.1122.



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 5-((3,7-dihydroxy-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-9-yl)oxy)pentanoate (AL α -NHS ester). A solution of hapten AL α (11.0 mg, 30.7 μ mol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (8.8 mg, 45.9 μ mol, 1.5 equiv) and *N*-hydroxysuccinimide (8.7 mg, 75.6 μ mol, 2.5 equiv) in anhydrous DMF (0.6 mL) was stirred at room temperature under nitrogen for 1 h. After this time, anhydrous Et₃N (8.6 μ L, 0.061 mmol) was added and the mixture was stirred overnight. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂, washed with water, a 1.5% (w/v) aqueous solution of LiCl and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten AL α , AL α -NHS ester, (13.8 mg, *ca.* 99% of crude product) as a slightly yellowish oil which was used immediately for the preparation of the corresponding protein bioconjugates. ¹H NMR (500 MHz, THF-*d*₃) δ 11.99 and 9.06 (each s, 1H each, 2 \times OH), 7.28 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-10), 6.66 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-2), 6.60 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-8), 4.17 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H₂-5), 2.78 (s, 3H, CH₃), 2.75 (br s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.72 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₂-2), 1.95 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4).

5.2.1.2. Synthesis of the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten ALb (ALb-NHS ester)

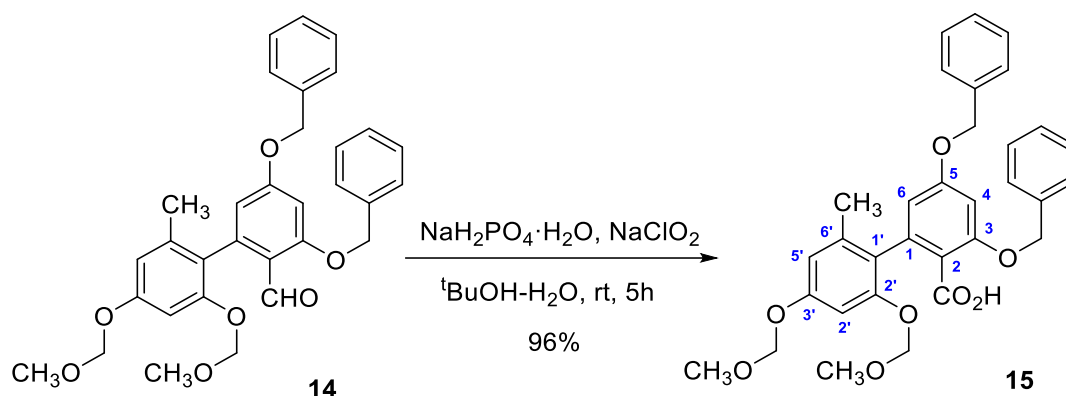


3,5-bis(benzyloxy)-2',4'-bis(methoxymethoxy)-6'-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carbaldehyde (14):

(i) **2,4-bis(Benzyloxy)-6-bromobenzaldehyde (13)**. Benzyl bromide (56.3 μL , 0.472 mmol, 2.05 equiv) was added to a stirred suspension of 2-bromo-4,6-dihydroxybenzaldehyde (50 mg, 0.230 mmol) and Cs_2CO_3 (95.4 mg, 0.690 mmol, 3 equiv) in anhydrous DMF (0.5 mL) at room temperature under nitrogen. After stirring overnight at room temperature, the reaction was poured into H_2O and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with 1.5% aqueous LiCl, brine, and dried over anhydrous MgSO_4 . Chromatographic purification of the residue left after evaporation of the solvent at reduced pressure, using 8:2 hexane-EtOAc as eluent, afforded compound benzaldehyde **13** (91.3 mg, 99%) as off-white semisolid.^{116,143} ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.39 (s, 1H, CHO), 7.47–7.33 (m, 10H, 2 \times Ph), 6.89 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), 6.57 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-3), 5.13 and 5.07 (each s, 2H each, 2 \times CH_2Ph). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 188.9 (CHO), 163.5 (C-4), 162.9 (C-2), 135.7 and 135.4 (2 \times C Ph), 129.0 (2 \times CH Ph), 128.9 (2 \times CH Ph), 128.7 and 128.4 (2 \times CH Ph), 127.8 (2 \times CH Ph), 127.2 (2 \times CH Ph), 126.7 (C-6), 117.7 (C-1), 113.1 (C-5), 100.4 (C-3), 71.0 and 70.8 (2 \times CH_2Ph); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 397.0434, found 397.0425.

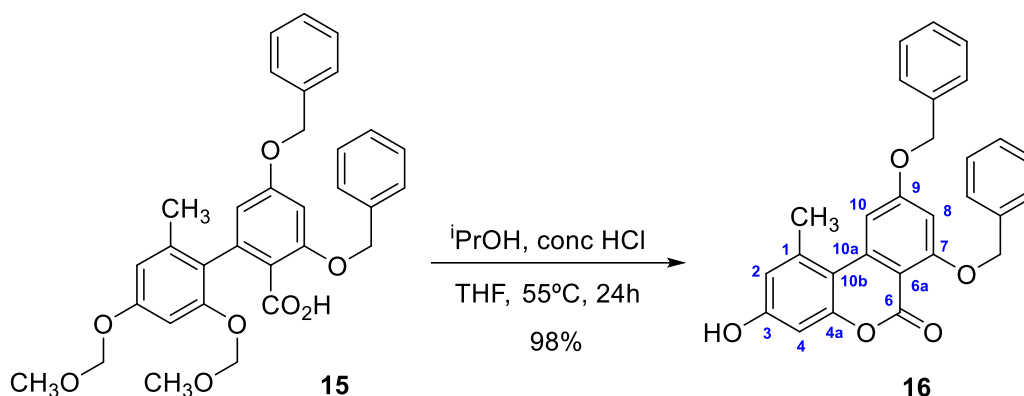
(ii) *Coupling reaction between benzaldehyde 13 and boronic acid 7*. An ampoule containing a mixture of freshly prepared boronic acid **7** (104.5 mg, 0.408 mmol, 2 equiv), 2,4-bis(benzyloxy)-6-bromobenzaldehyde **13**^{113,114} (80.9 mg, 0.204 mmol), K_2CO_3 (63.6 mg, 0.460 mmol, 2.2 equiv) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (26.6 mg, 0.023 mmol, 0.1 equiv) in anhydrous DMF (2.5 mL) was exhaustively degassed by freeze-thaw cycles. *The ampoule was closed under vacuum and heated at 95 °C for 19 h. After cooling, the ampoule was opened and the reaction mixture was poured onto water and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with water, a 1.5% (w/v) aqueous solution of LiCl and brine, dried under anhydrous MgSO_4 and concentrated under vacuum.* The crude of the reaction obtained was chromatographed on silica gel to give biaryl-2-carbaldehyde **14** (93.6 mg, 77%) as a viscous yellowish oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10.02 (s, 1H, CHO), 7.54–7.48 (m, 2H, 2 \times CH Ph), 7.44–7.36 (m, 6H, 6 \times CH Ph), 7.36–7.29 (m, 2H, 2 \times CH Ph), 6.72 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.65 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-4), 6.64 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-5'), 6.37 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 5.21–5.16 (m, two overlapped AB systems, 4H, OCH_2O and OCH_2Ph), 5.09 and 5.06 (AB system, J = 11.7 Hz, 1H each, OCH_2Ph), 5.08 and 4.97 (AB system, J = 6.7 Hz, 1H each, OCH_2O), 3.51 and 3.27 (each s, 3H each, 2 \times OCH_3), 1.96 (s,

3H, CH₃ Ph); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 189.6 (CHO), 163.5 (C-3), 162.1 (C-5), 157.6 (C-4'), 155.1 (C-2'), 144.8 (C-6'), 138.1 (C-1), 136.4 and 136.1 (2×C Ph), 128.9 (2×CH Ph), 128.8 (2×CH Ph), 128.4 (CH Ph), 128.1 CH Ph), 127.7 (2×CH Ph), 127.2 (2×CH Ph), 123.1 (C-1'), 118.6 (C-2), 110.7 (CH-5'), 109.6 (CH-3'), 101.2 (CH-6), 100.1 (CH-4), 94.7 and 94.6 (2×OCH₂O), 70.7 and 70.4 (2×OCH₂Ph), 56.3 and 56.1 (2×OCH₃), 20.6 (CH₃ Ph); HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₃₂H₃₃O₇ [M+H]⁺ 529.2221, found 529.2205.

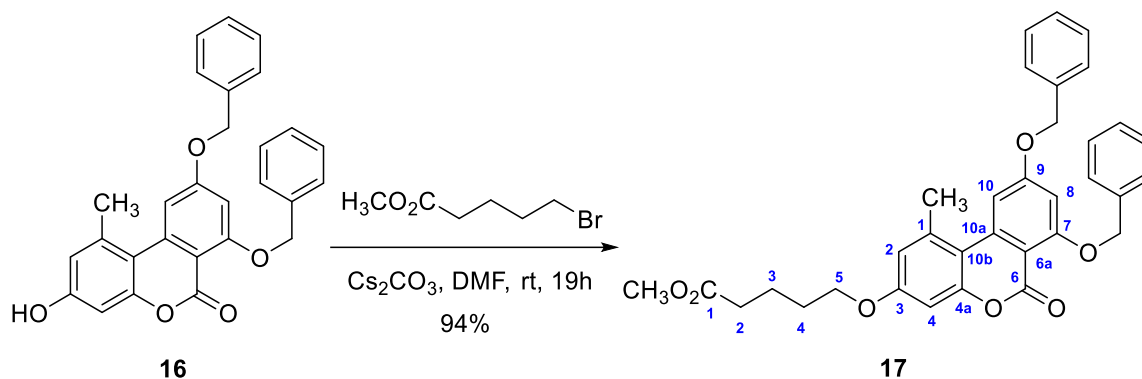


3,5-bis(Benzyloxy)-2',4'-bis(methoxymethoxy)-6'-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylic acid (15). NaH₂PO₄·H₂O (58.6 mg, 0.425 mmol, 2.8 equiv), 2-methylbut-2-ene (322.1 μL, 3.04 mmol, 20 equiv) and NaClO₂ (45.3 mg, 0.501 mmol, 3.3 equiv) were successively added to a solution of biaryl-2-carbaldehyde **14** (80.4 mg, 0.152 mmol) in *t*BuOH (3.2 mL) and milli-Q water (0.4 mL) at 0 °C. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 5 h, then diluted with an aqueous saturated solution of NH₄Cl and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried over anhydrous MgSO₄. Chromatography on silica gel of the residue left after evaporation of the solvent at reduced pressure, using 8:2 hexane-EtOAc as eluent, gave the biaryl-2-carboxylic acid **15** (79.5 mg, 96%) as a semi solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.32 (s, 1H, CO₂H), 7.61–7.32 (m, 10H, 10×CH Ph), 6.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H-6 and H-4), 6.65 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-5'), 6.44 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 5.21–5.14 (m, two overlapped AB systems, 4H, OCH₂O and OCH₂Ph), 5.07 and 5.04 (AB system, *J* = 11.7 Hz, 1H each, OCH₂Ph), 4.99 (br s, 2H, OCH₂O), 3.50 and 3.16 (each s, 3H each, 2×OCH₃), 2.01 (s, 3H, CH₃ Ph); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 165.7 (CO₂H), 161.1 (C-3), 157.8 (C-5), 157.6 (C-4'), 155.1 (C-2'), 141.3 (C-6'), 138.4 and 135.7 (2×C Ph), 128.9 (2×CH Ph), 128.8 (2×CH Ph), 128.6 (CH Ph), 128.4 (CH Ph), 127.7 (2×CH Ph), 127.6 (2×CH Ph), 125.1 (C-2), 115.9 (C-1'), 111.6 (CH-5'), 109.9 (CH-3'), 102.6 (CH-6), 100.3 (CH-4), 96.1 and 94.7 (2×OCH₂O),

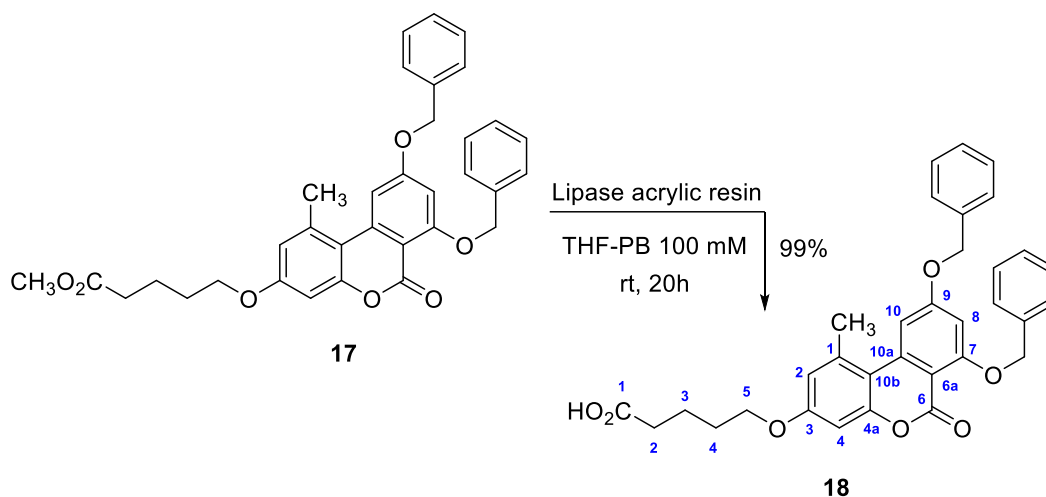
71.5 and 70.4 (2×OCH₂Ph), 56.3 and 56.1 (2×OCH₃), 20.5 (CH₃ Ph); HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₃₂H₃₃O₈ [M+H]⁺ 545.2170, found 545.2156.



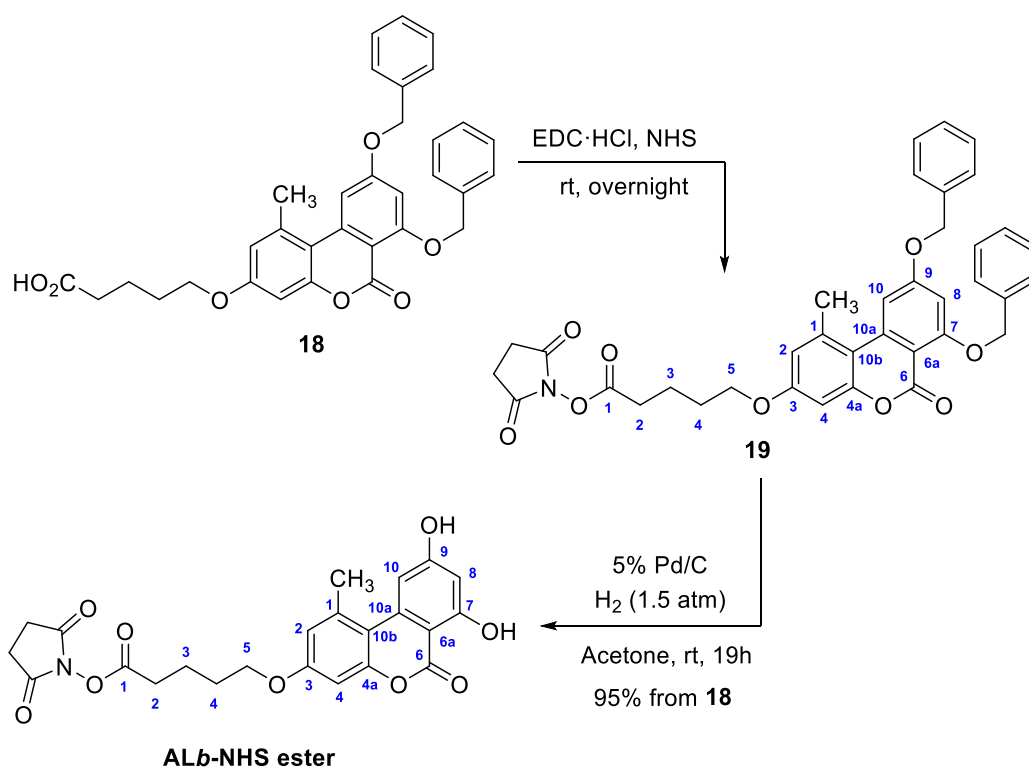
7,9-bis(Benzyloxy)-3-hydroxy-1-methyl-6H-benzo[c]chromen-6-one (16). A 50:1 (v/v) mixture of *i*PrOH and concentrated HCl (1.7 mL) was added to a solution of biaryl-2-carboxylic acid **15** (69.4 mg, 0.127 mmol) in THF (5.1 mL) at room temperature under nitrogen. The mixture was thermostated at 55 °C in an oil bath and stirred at this temperature for 24 h. After this time, the mixture was cooled to room temperature, diluted with a concentrated aqueous solution of NaHCO₃ and extracted with Et₂O. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum to give 7,9-bis(benzyloxy)alternariol **16** (54.7 mg, 98%) as an amorphous whitish solid. The crude reaction product thus obtained was sufficiently pure, as judged by its NMR spectroscopic data, to be used in the next step without further purification. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.58 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×CH Ph), 7.48 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 2×CH Ph), 7.44–7.31 (m, 6H, 6×CH Ph), 7.28 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-10), 6.90 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-8), 6.63 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-2), 6.53 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4), 5.31 and 5.29 (each s, 2H each, 2×OCH₂Ph), 2.63 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.6 (CO), 162.4 (C-9), 158.4 (C-7), 156.5 (C-3), 153.7 (C-4a), 140.0 (C-1), 138.0 (C-10a), 136.8 and 136.3 (2×CH Ph), 128.7 (2×CH Ph), 128.5 (2×CH Ph), 128.3 (CH Ph), 127.9 (2×CH Ph), 127.7 (CH Ph), 127.0 (2×CH Ph), 116.7 (CH-2), 109.1 (C-10b), 103.2 (C-6a), 102.8 (CH-10), 100.9 (CH-4), 99.8 (CH-8), 70.1 and 69.9 (2×OCH₂Ph), 25.0 (CH₃ Ph); HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₂₈H₂₃O₅ [M+H]⁺ 439.1540, found 439.1530.



Methyl 5-((7,9-bis(benzyloxy)-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-3-yl)oxy) pentanoate (17). Methyl 5-bromovalerate (29.5 mg, *ca.* 22 μ L, 0.151 mmol, 1.1 equiv) was added via syringe to a stirred suspension of Cs_2CO_3 (57.8 mg, 0.177 mmol, 1.3 equiv) and phenol **16** (60.1 mg, 0.137 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) at room temperature under nitrogen and the mixture was stirred for 19 h. The resulting pale yellowish reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed successively with water, a 1.5% (w/v) aqueous solution of LiCl and brine, dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified by chromatography on silica gel, using CHCl_3 as eluent, to afford the *O*-alkylated product **17** (71.4 mg, 94%) as a pale yellowish semi-solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (m, 2H, CH Ph), 7.43–7.34 (m, 8H, 8 \times CH Ph), 7.30 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-2), 6.67 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-10), 6.64 (d, J = 4.6 Hz, 2H, H-4), 6.64 (s, 1H, H-8), 5.28 and 5.16 (each s, 2H each, 2 \times OCH₂Ph), 4.00 (t, J = 5.5 Hz, 2H, H₂-5), 3.68 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.67 (s, 3H, CH₃), 2.41 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H₂-2), 1.84 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 173.9 (CO₂CH₃), 163.7 (CO), 162.9 (C-9), 159.5 (C-7), 157.8 (C-3), 154.3 (C-4a), 140.7 (C-1), 137.4 (C-10a), 136.5 and 135.9 (2 \times C Ph), 129.0 (2 \times CH Ph), 128.8 (2 \times CH Ph), 128.6 (CH Ph), 127.9 (CH Ph), 127.5 (2 \times CH Ph), 126.8 (2 \times CH Ph), 116.7 (CH-2), 111.0 (C-10b), 104.5 (C-6a), 103.9 (CH-10), 100.0 (CH-4), 99.9 (CH-8), 71.0 and 70.5 (each OCH₂Ph), 67.7 (CH₂-5), 51.7 (OCH₃), 33.8 (CH₂-2), 28.6 (CH₂-4), 25.6 (CH₃), 21.7 (CH₂-3); HRMS (TOF, ES⁺) m/z calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{O}_7$ [M+H]⁺ 553.2221, found 553.2112.



5-((7,9-bis(Benzyloxy)-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-3-yl)oxy)pentanoic acid (18). The hydrolysis of the methyl ester moiety of **17** was performed following the same procedure reported for the hydrolysis of ester **12** to hapten AL α , starting from methyl ester **17** (17.5 mg, 0.032 mmol), lipase from *Candida antarctica* immobilized on acrylic resin (16 mg) and a 4:1 mixture of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and THF (1.1 mL). Workup as described for the hydrolysis of **12** yielded acid **18** (17.0 mg, 99%) as a whitish semi-solid. ^1H NMR (500 MHz, THF- d_8) δ 7.68 (m, 2H, 2 \times CH Ph), 7.46 (m, 2H, 2 \times CH Ph), 7.40–7.30 (m, 6H, 4 \times CH Ph and H-2), 7.25 (br t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH Ph), 6.85 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-10), 6.71 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-4), 6.69 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-8), 5.26 (s, 4H, 2 \times OCH $_2$ Ph), 4.05 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H $_2$ -5), 2.71 (s, 3H, Ar-CH $_3$), 2.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H $_2$ -2), 1.78 (m, 4H, H $_2$ -3 and H $_2$ -4). ^{13}C NMR (126 MHz, THF- d_8) δ 174.5 (CO $_2$ H), 164.8 (CO), 163.9 (C-9), 160.9 (C-7), 156.7 (C-3), 155.7 (C-4a), 141.4 (C-1), 138.5 (C-10a), 138.3 and 137.9 (each C Ph), 129.5 (2 \times CH Ph), 129.2 (2 \times CH Ph), 129.0 (CH Ph), 128.5 (2 \times CH Ph), 128.2 (CH Ph), 127.6 (2 \times CH Ph), 117.2 (CH-2), 111.8 (C-10b), 105.4 (C-6a), 104.5 (CH-10), 100.7 (CH-4), 100.5 (CH-8), 71.4 and 71.1 (each OCH $_2$ Ph), 68.8 (CH $_2$ -5), 34.0 (CH $_2$ -2), 29.7 (CH $_2$ -4), 26.5 (CH $_3$), 22.6 (CH $_2$ -3); HRMS (TOF, ES $^+$) m/z calculated for C $_{33}$ H $_{31}$ O $_7$ [M+H] $^+$ 539.2064, found 539.2073.



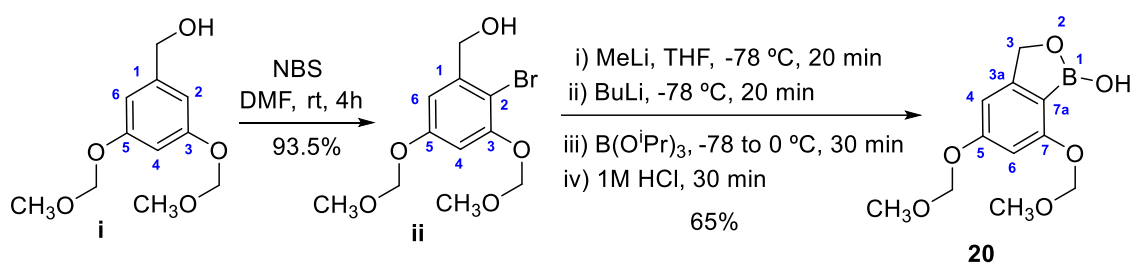
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 5-((7,9-dihydroxy-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-3-yl) oxy)pentanoate (Hapten ALb-NHS).

(i) The acid **18** obtained in the above step (15.1 mg, 28 μmol) was transformed into the corresponding *N*-hydroxysuccinimidyl ester **19** (17.2 mg) following the same procedure previously described for the transformation of hapten AL α into AL α -NHS ester, using EDC·HCl (6.4 mg, 33.4 μmol , 1.2 equiv) and NHS (4.2 mg, 36.5 μmol , 1.3 equiv) in anhydrous DMF (1 mL). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (m, 2H, 2 \times CH Ph), 7.45–7.32 (m, 8H, 8 \times CH Ph), 7.31 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-2), 6.69 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-10), 6.67 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.65 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-8), 5.29 and 5.17 (each s, 2H each, 2 \times OCH₂Ph), 4.04 (t, J = 5.6 Hz, 2H, H₂-5), 2.85 (br s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.72 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H₂-2), 2.68 (s, 3H, CH₃), 1.96 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4).

(ii) A suspension of 5% Pd/C (8 mg) and the crude *N*-hydroxysuccinimidyl ester **19** obtained above in acetone (3 mL) was degassed and purged with hydrogen (by several cycles of freeze-pump-thaw using a water aspirator pump). The hydrogen pressure was adjusted to 1.5 atm and the mixture was stirred vigorously overnight at room temperature. The reaction mixture was filtered through a disposable Teflon membrane filter (0.45 μm) and the filtrate and washing (THF) were combined and concentrated at

reduced pressure to give the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten ALb, ALb-NHS ester, (12.2 mg, 95 % of crude product from **18**) as a viscous colorless oil which was used immediately for the preparation of the corresponding protein bioconjugates. ^1H NMR (500 MHz, THF- d_8 /DMSO- d_6) δ 11.92 and 9.67 (each s, 1H each, 2 \times OH), 7.24 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-2), 6.83 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.82 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H-10), 6.36 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-8), 4.10 (t, J = 5.6 Hz, 1H, H₂-5), 2.79 (s, 3H, CH₃), 2.76 (br s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.71 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H₂-2), 1.93 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4).

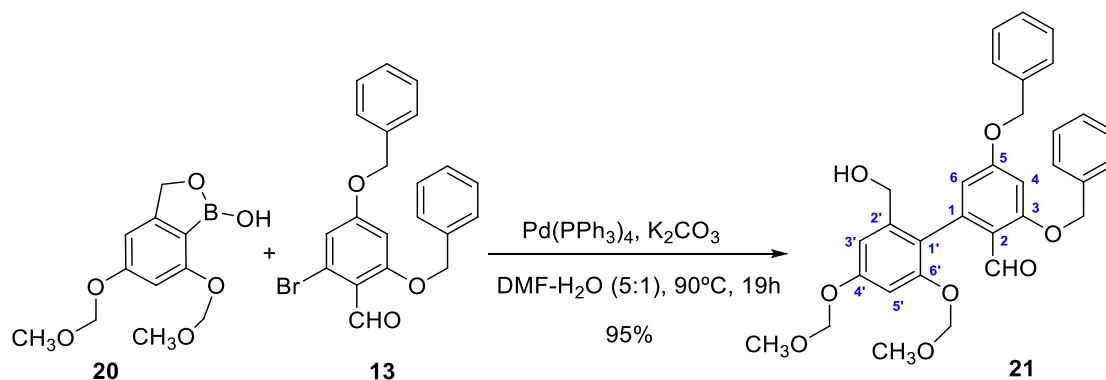
5.2.1.3. Synthesis of the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten ALm (ALm-NHS ester)



5,7-bis(Methoxymethoxy)benzo[*c*][1,2]oxaborol-1(3H)-ol (**20**).

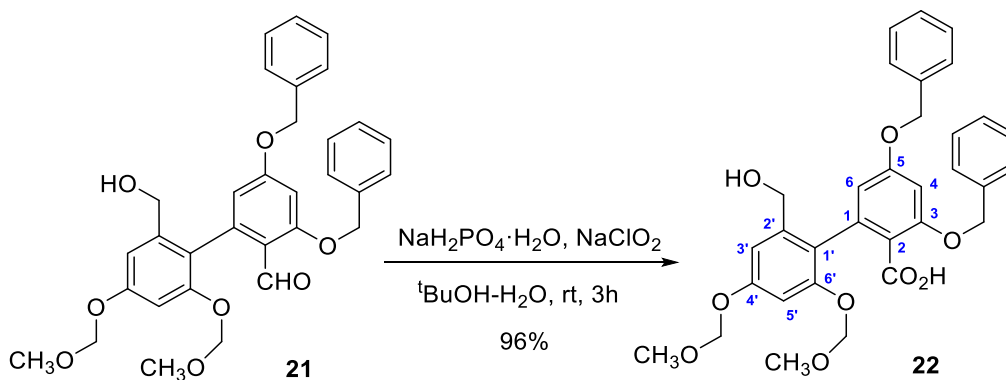
A solution of *N*-bromosuccinimide (0.75 g, 4.21 mmol, 1.05 equiv) in anhydrous DMF (3 mL) was dropwise added to a solution of benzyl alcohol **i** (0.916 g, 4.01 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) at room temperature under nitrogen. The resulting yellowish mixture was stirred for a few minutes, quenched by the addition of water (25 mL) and extracted with ether. The combined organic phases were washed with 1.5% aqueous LiCl, brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated at reduced pressure. Purification of the crude product obtained by chromatography, using CHCl₃ as eluent, gave bromide **ii** (1.15 g, 93.5%) as a white semi-solid.¹⁴⁴ ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.91 (dt, J = 2.8, 0.6 Hz, 1H, H-6), 6.81 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-4), 5.23 and 5.17 (each s, 3H each, 2 \times OCH₂O), 4.73 (dt, J = 6.5, 0.6 Hz, 2H, CH₂OH), 3.52 and 3.47 (each s, 3H each, 2 \times OCH₃), 2.04 (t, J = 6.5 Hz, 1H, OH); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 157.5 (C-3), 154.5 (C-5), 142.0 (C-1), 109.5 (C-6), 104.8 (C-2), 104.3 (C-4), 95.4 and 94.7 (2 \times OCH₂O), 65.4 (CH₂OH), 56.6 and 56.3 (2 \times OCH₃); HRMS (TOF, ES⁺) m/z calculated for C₁₁H₁₅BrO₅ [M+H]⁺ 307.0176, found 307.0166.

A 1.6M solution of MeLi in ether (578 μ L, 0.925 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of the above obtained bromide **ii** (258.3 mg, 0.841 mmol) in anhydrous THF (4.5 mL) at -78 $^{\circ}$ C under nitrogen. After stirring for 20 min, a 1.3 M solution of BuLi in hexane (776 μ L, 1.0 mmol, 1.2 equiv) was added and the mixture stirred at the same temperature for 40 min B(OⁱPr)₃ (427 μ L, 1.85 mmol, 2.2 equiv) was added and the reaction mixture was then warmed up to 0 $^{\circ}$ C, stirred for 30 min and then quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (1 mL) and 1M HCl (2.5 mL). The reaction mixture was extracted with ether and the combined organic extracts were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and concentrated in vacuo. The residue was purified by chromatography, using CHCl₃ as eluent, to afford aryl boronic acid **20** (138 mg, 65%) as a whitish solid.¹¹⁹ ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.72 (dt, J = 1.8, 0.8 Hz, 1H, H-4), 6.63 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-6), 5.23 and 5.19 (each s, 2H each 2 \times OCH₂O), 5.13 (m, 2H, H-3), 3.51 and 3.49 (each s, 3H each, 2 \times OCH₃); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 162.1 (C-7), 161.6 (C-5), 157.9 (C-3a), 101.5 (C-4), 100.9 (C-6), 94.5 and 94.2 (2 \times OCH₂O), 75.5 (C-3), 56.3 and 56.3 (2 \times OCH₃); HRMS (TOF, ES⁺) m/z calculated for C₁₂H₁₇BO₅ [M+H]⁺ 253.1242, found 253.1248.



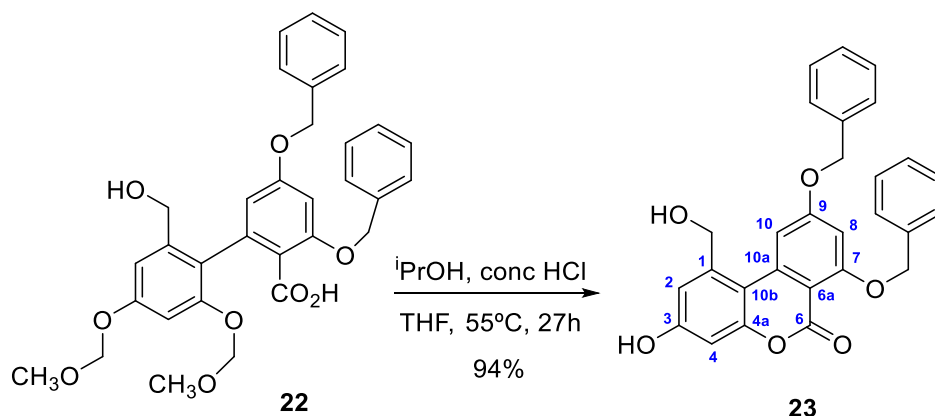
3,5-bis(Benzyloxy)-2'-(hydroxymethyl)-4',6'-bis(methoxymethoxy)-[1,1'-biphenyl]-2-carbaldehyde (21**)**. A mixture of boronic acid **20** (120.4 mg, 0.474 mmol, 1.34 equiv), bromoaldehyde **13** (140.5 mg, 0.354 mmol), K₂CO₃ (68.4 mg, 0.495 mmol, 1.4 equiv) and Pd(PPh₃)₄ (36.8 mg, 0.032 mmol, 0.09 equiv) in a 5:1 mixture of DMF and milli-Q water (1.3 mL), previously degassed by freeze-thaw cycles, was heated at 90 $^{\circ}$ C overnight under nitrogen. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water and extracted with Et₂O, the combined organic layers were washed with water, a 1.5% aqueous solution of LiCl and brine and dried under anhydrous MgSO₄. The

residue left after evaporation of the solvent at reduced pressure was purified by chromatography on silica gel, using 8:2 hexane-EtOAc as eluent, to give biarylcarbaldehyde **21** (183.5 mg, 95%) as a yellowish oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) (a mixture of the hydroxyl-aldehyde and lactol forms are observed in CDCl_3 solution,¹²⁰ only signals of the former are given) δ 10.18 (s, 1H, CHO), 7.48 (br d, $J = 7.7$ Hz, 2H, $2\times\text{CH Ph}$), 7.44–7.31 (m, 8H, $8\times\text{CH Ph}$), 6.91 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-3'), 6.80 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-5'), 6.67 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-4), 6.37 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-6), 5.23 and 5.20 (AB system, $J = 6.8$ Hz, 2H, OCH_2O), 5.20 and 5.17 (each s, 2H each, $2\times\text{OCH}_2\text{Ph}$), 5.00 and 4.96. (AB system, $J = 6.7$ Hz, 2H, OCH_2O), 4.31 (dd, $J = 12.2, 4.7$ Hz, 1H, CHOH), 4.25 (dd, $J = 12.5, 7.0$ Hz, 1H, $\text{CH}'\text{OH}$), 3.52 and 3.26 (each s, 3H each, $2\times\text{OCH}_3$), 1.82 (dd, $J = 7.0, 4.7$ Hz, OH); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3), only signals of the hydroxyl-aldehyde form are given, δ 190.3 (CHO), 163.4 (C-3), 162.8 (C-5), 158.1 (C-4'), 154.7 (C-6'), 141.8 (C-2'), 140.5 (C-1), 136.1 and 136.0 ($2\times\text{C Ph}$), 128.9 ($2\times\text{CH Ph}$), 128.8 ($2\times\text{CH Ph}$), 128.5 (CH Ph), 128.3 (CH Ph), 127.6 ($2\times\text{CH Ph}$), 127.4 ($2\times\text{CH Ph}$), 122.7 (C-1'), 119.0 (C-2), 110.0 (CH-6), 108.9 (CH-3'), 103.1 (CH-5'), 100.1 (CH-4), 94.8 and 94.7 ($2\times\text{OCH}_2\text{O}$), 70.8 and 70.4 ($2\times\text{OCH}_2\text{Ph}$), 63.5 (CH_2OH), 56.4 and 56.1 ($2\times\text{OCH}_3$).



3,5-bis(Benzyloxy)-2'-(hydroxymethyl)-4',6'-bis(methoxymethoxy)-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylic acid (22). $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (113.8 mg, 0.824 mmol, 2.8 equiv), 2-methylbut-2-ene (623 μL , 5.88 mmol, 20 equiv) and NaClO_2 (87.7 mg, 0.970 mmol, 3.3 equiv) were successively added to a solution of aldehyde **21** (160.4 mg, 0.294 mmol) in 5:1 mixture of $t\text{BuOH}$ -water (9.3 mL) at 0°C . The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h, then diluted with an aqueous saturated solution of NH_4Cl and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried over anhydrous MgSO_4 . Chromatographic purification of the crude product

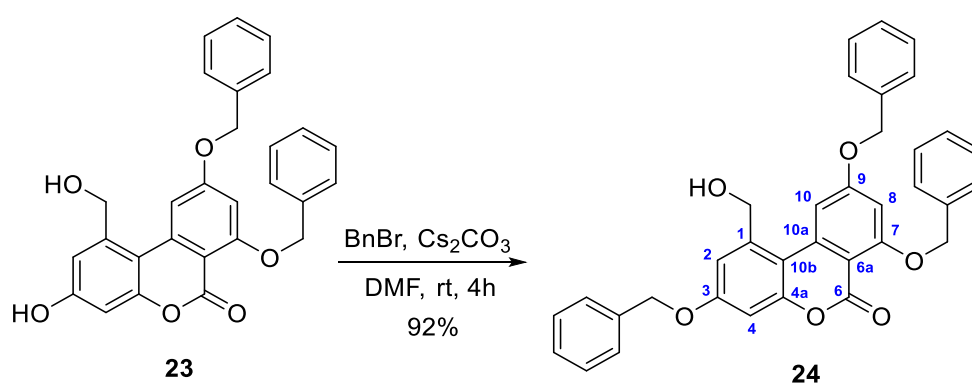
obtained, using CHCl_3 -MeOH from 97:3 to 95:5 as eluent, afforded biarylcarboxylic acid **22** (158 mg, 96%) as a viscous yellowish oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49–7.31 (m, 10H, 10 \times CH Ph), 6.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3'), 6.80 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-5'), 6.68 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 6.41 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-6), 5.21 and 5.16 (AB system, $J = 6.8$ Hz, 1H each, OCH_2O), 5.17-5.14 (AB system partially overlapped with signal at 5.16 ppm, 2H, OCH_2Ph), 5.05 (br s, 2H, OCH_2O), 4.99 (br s, 2H, OCH_2Ph), 4.41 and 4.24 (each d, $J = 11.7$ Hz, 1H each, CH_2OH), 3.50 and 3.23 (each s, 3H each, 2 \times OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.5 (CO_2H), 160.9 (C-3), 158.2 (C-5), 157.5 (C-4'), 155.2 (C-6'), 140.2 (C-2'), 139.1 (C-1), 136.2 and 135.8 (2 \times C Ph), 128.9 (2 \times CH Ph), 128.8 (2 \times CH Ph), 128.5 (CH Ph), 128.4 (CH Ph), 127.7 (2 \times CH Ph), 127.6 (2 \times CH Ph), 123.5 (C-1'), 114.1 (C-2), 110.2 (CH-3'), 109.4 (CH-6), 104.1 (CH-5'), 100.5 (CH-4), 95.4 and 94.7 (2 \times OCH_2O), 71.3 and 70.4 (2 \times OCH_2Ph), 63.7 (CH_2OH), 56.4 and 56.1 (2 \times OCH_3); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 561.2119, found 561.2105.



7,9-bis(Benzyloxy)-3-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-6H-benzo[c]chromen-6-one 23.

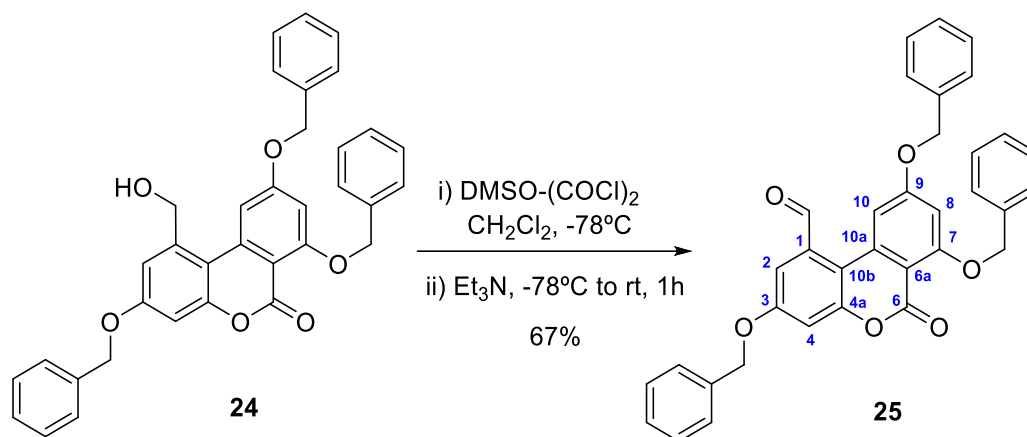
A 50:1 mixture of i PrOH and concentrated HCl (3.7 mL) was added to a solution of carboxylic acid **22** (150 mg, 0.268 mmol) in THF (11 mL) at room temperature under nitrogen. The mixture was stirred at 55 °C for 27 h, then cooled to room temperature, diluted with a concentrated aqueous solution of NaHCO_3 and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue obtained was chromatographed on silica gel, using CHCl_3 as eluent, to give **23** (111.9 mg, 94%) as an amorphous white solid. ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ 9.12 (s, 1H, PhOH), 7.83 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-10), 7.70 (br d, $J = 7.6$ Hz, 2H, 2 \times CH Ph), 7.54 (br d, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2 \times CH Ph), 7.44-7.38 (m, 4H, 4 \times CH Ph),

7.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH Ph), 7.31 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH Ph), 7.02 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-2), 6.91 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-8), 6.68 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 5.35 and 5.33 (each s, 2H each, 2×OCH₂Ph), 4.91 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH₂OH), 4.80 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, CH₂OH); ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆) δ 165.2 (CO), 163.4 (C-9), 159.6 (C-3), 157.1 (C-7), 155.0 (C-4a), 141.9 (C-1), 140.5 (C-10a), 138.1 and 137.5 (2×C Ph), 129.4 (2×CH Ph), 129.2 (2×CH Ph), 129.0 (CH Ph), 128.9 (2×CH Ph), 128.3 (CH Ph), 127.7 (2×CH Ph), 116.3 (CH-2), 111.3 (C-10b), 104.8 (CH-10), 104.6 (C-6a), 103.1 (CH-4), 101.1 (CH-8), 71.2 and 71.0 (2×OCH₂Ph), 64.7 (CH₂OH); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for C₂₈H₂₃O₆ [M+H]⁺ 455.1489, found 455.1484.

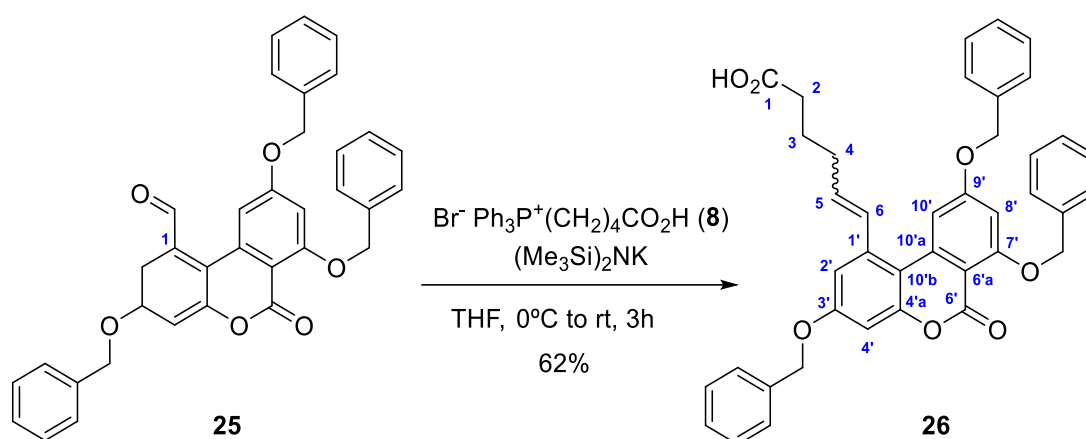


3,7,9-tris(Benzyloxy)-1-(hydroxymethyl)-6H-benzo[c]chromen-6-one (24). Benzyl bromide (45.5 μ L, 0.383 mmol, 1.5 equiv) was added to a suspension of compound **23** (116 mg, 0.255 mmol) and Cs₂CO₃ (124.7 mg, 0.383 mmol, 1.5 equiv) in anhydrous DMF (3 mL) under nitrogen. The resulting yellowish mixture was stirred at room temperature for 4 h, then diluted with water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with water and a 1.5% aqueous solution of LiCl, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum. The resulting residue was chromatographed on silica gel, using CHCl₃ as eluent, to afford the tribenzylated derivative **24** (127.3 mg, 92%) as a slightly yellowish oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.58 (br d, $J = 7.6$ Hz, 2H, 2×CH Ph), 7.54 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-10), 7.47-7.27 (m, 13H, 13×CH Ph), 7.01 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-2), 6.76 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-4), 6.63 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-8), 5.22, 5.19 and 5.06 (each s, 2H each, 3×OCH₂Ph), 4.83 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, CH₂OH), 2.15 (t, $J = 5.7$ Hz, CH₂OH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.3 (CO), 162.7 (C-9), 159.6 (C-7), 157.7 (C-3), 154.0 (C-4a), 139.4 (C-1), 139.1 (C-10a), 136.4 (C Ph), 136.2 (2×C Ph), 128.9 (4×CH Ph), 128.8 (2×CH Ph), 128.5 (CH Ph), 128.4 (CH Ph), 127.9 (CH Ph), 127.7 (2×CH Ph), 127.6 (2×CH Ph), 126.8

(2×CH Ph), 115.8 (CH-2), 111.5 (C-10b), 104.3 (C-6a), 103.6 (CH-10), 102.0 (CH-4), 100.9 (CH-8), 70.9, 70.4 and 70.3 (3×OCH₂Ph), 65.1 (CH₂OH); HRMS (TOF, ES⁺) *m/z* calculated for C₃₅H₂₉O₆ [M+H]⁺ 545.1959, found 545.1945.

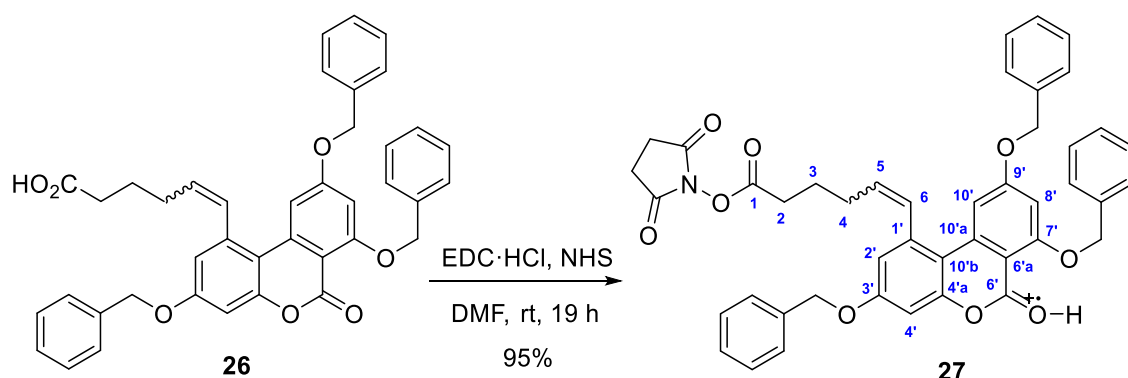


3,7,9-tris(Benzyloxy)-6-oxo-6H-benzo[c]chromene-1-carbaldehyde (25). DMSO (9.9 μ L, 0.139 mmol) was added dropwise to a solution of oxalyl chloride (5.9 μ L, 0.069 mmol, 1.5 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (140 μ L) at -78 °C under nitrogen. After stirring for 15 min, a solution of alcohol **24** (25 mg, 0.046 mmol) in CH₂Cl₂ (0.5 mL) was added and the mixture was stirred for an additional 30 min before the addition of Et₃N (38.5 μ L, 0.276 mmol, 6 equiv). The reaction mixture was stirred at -78 °C for 1 h and then allowed to slowly warm to rt, quenched by the addition of a saturated aqueous solution of Na₂CO₃, diluted with water and extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum to give an oily residue that was chromatographed on silica gel, using CH₂Cl₂ as eluent, to give aldehyde **7** (16.7 mg, 67%) as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.25 (s, 1H, CHO), 7.58 (br d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2×CH Ph), 7.46-7.31 (m, 13H, 13×CH Ph), 7.31 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.06 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.72 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.57 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-10), 5.29, 5.17 and 5.14 (each s, 2H each, 3×OCH₂Ph); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 190.9 (CHO), 164.2 (CO), 163.0 (C-9), 160.0 (C-7), 156.9 (C-3), 153.9 (C-4a), 137.1 (C-1), 136.4 (C-10a), 136.0 (C Ph), 135.7 (C Ph), 135.5 (C Ph), 129.0 (2×CH Ph), 128.9 (2×CH Ph), 128.8 (2×CH Ph), 128.7 (CH Ph), 128.6 (CH Ph), 128.1 (CH Ph), 127.7 (2×CH Ph), 127.6 (2×CH Ph), 126.8 (2×CH Ph), 113.0 (CH-2 and C-10b), 106.9 (CH-4), 105.3 (CH-10), 104.5 (C-6a), 71.1, 70.8 and 70.7 (3×OCH₂Ph); HRMS (TOF, ES⁺) *m/z* calculated for C₃₅H₂₇O₆ [M+H]⁺ 543.1802, found 543.1798.

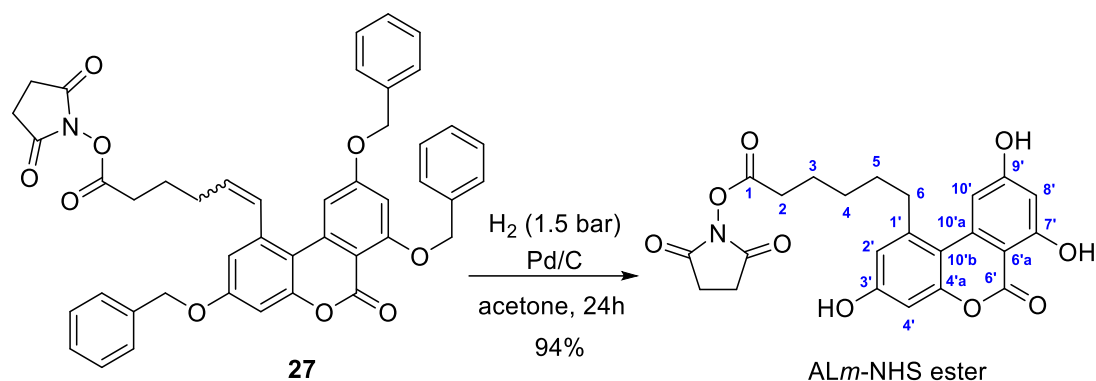


6-(3,7,9-tris(Benzyloxy)-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-1-yl)hex-5-enoic acid (26). A 0.5 M solution of potassium *bis*(trimethylsilyl)amide in toluene (158 μL , 79 μmol , 2.6 equiv) was dropwise added to a solution of (4-carboxybutyl)triphenylphosphonium bromide (17.5 mg, 39.5 μmol , 1.3 equiv) in anhydrous THF (0.5 mL) at 0 °C under nitrogen. The resulting mixture was stirred for 15 min at this temperature before a solution of aldehyde **25** (16.5 mg, 30.4 μmol) in THF (0.5 mL) was added dropwise. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h and then quenched with water, cooled to 0 °C, acidified with aqueous 1 M KHSO_4 , and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated under vacuum. Chromatographic purification, using CHCl_3 as eluent, afforded alkene **26** (11.8 mg, 62%) as a semisolid, a *ca.* 9:1 mixture of *cis*- and *trans*-isomers of the formed double bond. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), only signals of the major isomer are given, δ 7.71 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-10'), 7.58 (br d, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2 \times CH Ph), 7.46-7.27 (m, 13H, 13 \times CH Ph), 6.82 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-4'), 6.66 (br d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H-6), 6.63 (two overlapped d, $J = 2.7, 2.1$ Hz, 1H each, H-2' and H-8'), 5.71 (dt, $J = 11.3, 7.4$ Hz, 1H, H-5), 5.26 (s, 2H, OCH_2Ph), 5.10 (s, 4H, 2 \times OCH_2Ph), 2.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_2 -2), 2.15 (dtd, $J = 7.5, 7.5, 1.5$ Hz, 2H, H_2 -4), 1.68 (p, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_2 -3); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 178.0 (CO_2H), 163.8 (C-6'), 162.7 (C-9'), 159.2 (C-7'), 157.7 (C-3'), 154.1 (C-4'a), 140.3 (C-1'), 136.9 (C-10'a), 136.4 (C Ph), 136.3 (C Ph), 136.0 (C Ph), 131.9 (CH-6), 131.7 (CH-5), 128.9 (2 \times CH Ph), 128.9 (2 \times CH Ph), 128.8 (2 \times CH Ph), 128.5 (CH Ph), 128.4 (CH Ph), 127.9 (CH Ph), 127.6 (2 \times CH Ph), 127.4 (2 \times CH Ph), 126.8 (2 \times CH Ph), 115.6 (CH-2'), 110.4 (C-10'b), 104.2 (C-6'a), 103.4 (CH-10'), 101.5 (CH-4'), 100.7 (CH-8'), 70.9

(OCH₂Ph), 70.4 (2×OCH₂Ph), 33.4 (CH₂-2), 27.9 (CH₂-4), 24.5 (CH₂-3); HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₄₀H₃₅O₇ [M+H]⁺ 627.2377, found 627.2366.



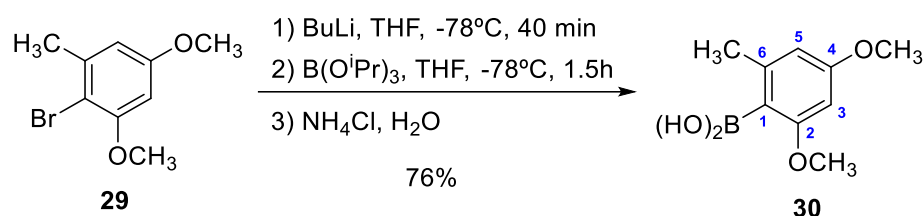
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 6-(3,7,9-tris(benzyloxy)-6-oxo-6H-benzo[*c*]chromen-1-yl)hex-5-enoate (27). A solution of acid **26** (11.0 mg, 17.6 μmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (5.1 mg, 26.6 μmol, 1.5 equiv) and *N*-hydroxysuccinimide (3.1 mg, 26.9 μmol, 1.5 equiv) in anhydrous DMF (0.6 mL) was stirred at room temperature overnight under nitrogen. The reaction mixture was diluted with EtOAc and successively washed with water, a 1.5% aqueous solution of LiCl and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the *N*-hydroxysuccinimidyl ester **27** (12 mg, 95%) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (d, *J* = 2.2 Hz, H-10'), 7.59 (br d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2×CH Ph), 7.45-7.29 (m, 13H, 13×CH Ph), 6.84 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4'), 6.71 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, H-6), 6.63 (two overlapped d, *J* = 2.7, 2.2 Hz, 1H each, H-2' and H-8'), 5.70 (dt, *J* = 11.3, 7.3 Hz, 1H, H-5), 5.27 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.12 (s, 4H, 2×OCH₂Ph), 2.74 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₂-2), 2.20 (dtd, *J* = 7.5, 7.5, 1.6 Hz, H₂-4), 1.78 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂-3); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 169.1 (2×CONO), 168.4 (C-1) 163.8 (C-6'), 162.7 (C-9'), 159.2 (C-7'), 157.7 (C-3'), 154.1 (C-4'a), 140.3 (C-1'), 136.8 (C-10'a), 136.4 (C Ph), 136.3 (C Ph), 136.1 (C Ph), 132.2 (CH-6), 131.2 (CH-5), 128.9 (2×CH Ph), 128.8 (2×CH Ph), 128.7 (2×CH Ph), 128.5 (CH Ph), 128.4 (CH Ph), 127.9 (CH Ph), 127.6 (2×CH Ph), 127.3 (2×CH Ph), 126.8 (2×CH Ph), 115.4 (CH-2'), 110.4 (C-10'b), 104.3 (C-6'a), 103.3 (CH-10'), 101.7 (CH-4'), 100.8 (CH-8'), 70.9, 70.3 and 70.4 (3×OCH₂Ph), 30.7 (CH₂-2), 27.7 (CH₂-4), 25.7 (COCH₂CH₂CO), 24.5 (CH₂-3). HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₄₄H₃₈NO₉ [M+H]⁺ 724.2541, found 724.2556.



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 6-(3,7,9-trihydroxy-6-oxo-6H-benzo[*c*]chromen-1-yl)hexanoate (ALm-NHS ester). A suspension of tribenzylated derivative **27** (10 mg, 13.8 μmol) and 5% Pd on carbon (5 mg, 2.3 μmol) in acetone (3 mL) was degassed by vacuum/hydrogen purging for three cycles. The hydrogen pressure was adjusted to 1.5 atm and the mixture was stirred at room temperature for 2 h and then filtered through a 0.45 μm syringe filter using THF for washing. Combined filtrate and washing were concentrated under reduced pressure to afford crude *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten ALm (5.9 mg, 94%) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, THF-*d*₈) δ 11.97, 9.63 and 9.12 (each s, 1H each, 3 \times OH), 7.09 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-10'), 6.70 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-2'), 6.59 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-4'), 6.34 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-8'), 3.12 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H₂-6), 2.75 (br s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.64 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂-2), 1.83-1.76 (m, 4H, H₂-3 and H₂-5), 1.62 (m, 2H, H₂-4).

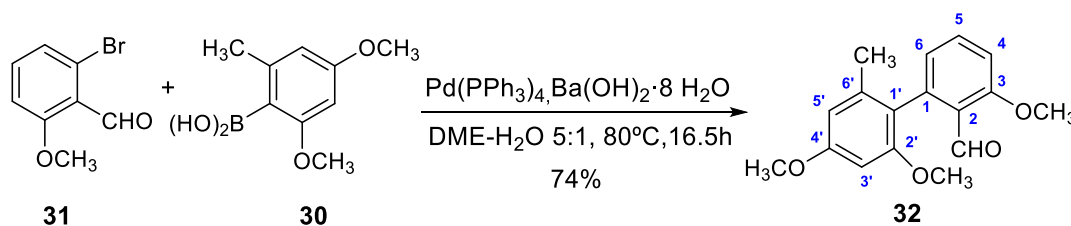
5.2.2. Synthesis of heterologous haptens

5.2.2.1. Synthesis of the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten ALh1 (ALh1-NHS ester)



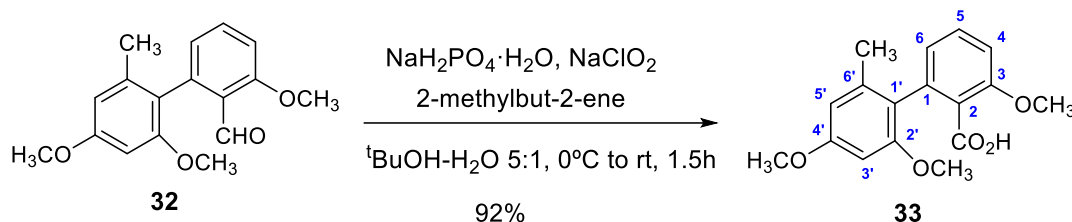
(2,4-Dimethoxy-6-methylphenyl)boronic acid (30). A 1.6 M solution of *n*-BuLi in hexane (420 μL , 0.672 mmol, 1.03 equiv) was added dropwise to a stirred solution of aryl bromide **29** (150 mg, 0.650 mmol) in anhydrous THF (3.6 mL) at -78 $^\circ\text{C}$ under

nitrogen. The mixture was stirred at this temperature for 40 min during which the development of a slight turbidity was observed. After this time, $B(O^iPr)_3$ (495 μ L, 2.145 mmol, 3.3 equiv) was added dropwise, producing the disappearance of the turbidity once the addition was completed. The resulting mixture was stirred at -78 $^{\circ}$ C for 1.5 h and then allowed to slowly warm to 0 $^{\circ}$ C. The reaction was quenched by the addition of a saturated aqueous solution of NH_4Cl (1 mL) and stirred for an additional 10 min. The mixture was diluted with water and extracted with Et_2O . The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and the solvent removed under reduced pressure to afford boronic acid **30** (96.9 mg, 76%) as an amorphous white solid. The boronic acid thus prepared was used immediately without further purification for the preparation of the corresponding bioconjugates. IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3229.3 (m), 3015.4 (w), 1597.2 (m), 1569.2 (m), 1302.7 (s), 807 (s, broad); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for $C_9H_{13}BO_4$ $[M+H]^+$ 197.0980, found 197.0973.

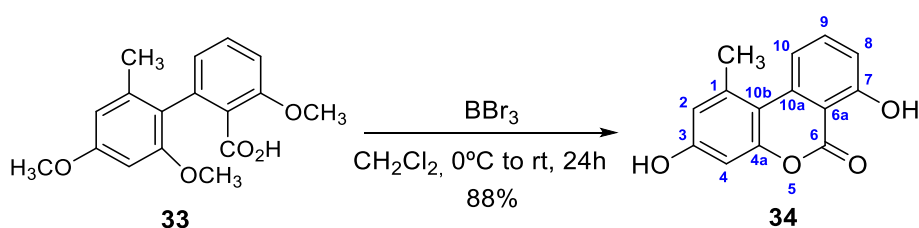


2',3,4'-Trimethoxy-6'-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carbaldehyde (32). A solution of freshly prepared boronic acid **30** (70.8 mg, 0.330 mmol, 1.0 equiv), aryl bromide **31** (71.7 mg, 0.333 mmol), $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$ (211.6 mg, 0.670 mmol, 2.0 equiv) and $Pd(PPh_3)_4$ (19.5 mg, 0.0168 mmol, 0.05 equiv) in a 5:1 mixture of DME- H_2O (4 mL) was stirred at 80 $^{\circ}$ C during 16.5 h under nitrogen. After the reaction was completed, the mixture was diluted with water and extracted with $EtOAc$. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude obtained was purified by chromatography, using 7:3 hexane- $EtOAc$ as eluent, to afford biaryl-2-carbaldehyde **32** (69.8 mg, 74%) as a yellowish viscous oil. IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 2939 (w), 2838 (w), 1687 (s), 1571 (w); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.99 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H, CHO), 7.53 (dd, $J = 8.4, 7.6$ Hz, 1H, H-5), 6.98 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 6.77 (dd, $J = 7.6, 1.0$ Hz, 1H, H-4), 6.43 (dd, $J = 2.4, 0.7$ Hz, 1H, H-5'), 6.36 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-3'), 3.95, 3.83 and 3.65 (each s, 3H each, OCH_3), 2.00 (d, $J = 0.5$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 191.7 (CHO), 160.5 (C-4'), 160.1 (C-2'), 157.7 (C-3), 142.7 (C-2), 138.1 (C-1'),

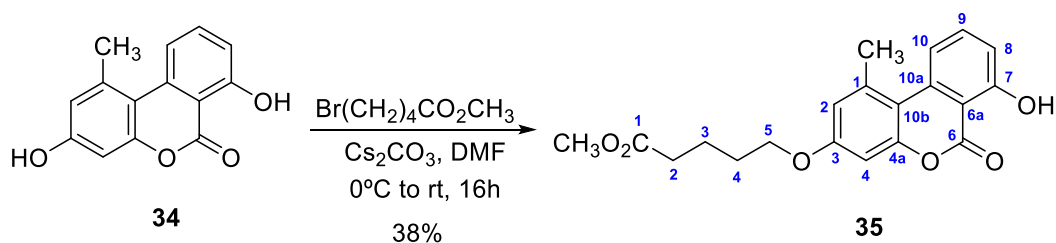
134.4 (CH-5), 124.1 (CH-4), 124.1 (C-6'), 110.6 (CH-6), 106.5 (CH-5'), 96.0 (CH-3'), 55.9, 55.7 and 55.4 (3×OCH₃), 20.7 (CH₃); HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₁₇H₈O₄ [M+H]⁺ 287.1278, found 287.1285.



2',3,4'-Trimethoxy-6'-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylic acid (33). Biphenyl-2-carbaldehyde **32** (61.7 mg, 0.215 mmol) was dissolved in a 5:1 mixture of ^tBuOH-H₂O (4.2 mL) and cooled to 0 °C. Then 2-methyl-2-butene (500 μL, 4.3 mmol, 20 equiv) was added, followed by a one portion addition of NaClO₂ (58.9 mg, 0.651 mmol, 3.0 equiv) and NaH₂PO₄-H₂O (90.4 mg, 0.655 mmol, 3.0 equiv). The reaction mixture was allowed to reach room temperature and the resulting solution was stirred for 1.5 h. After this time, the mixture was diluted in a saturated aqueous solution of NH₄Cl and water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtrated and concentrated at reduced pressure to give biphenyl-2-carboxylic acid **33** (59.5 mg, 92%) as a colorless solid which was used in the next step without further purification. Mp 177.5 °C (MeOH); IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 2998.6 (m), 2838.4 (m), 1738.8 (s), 1688.5 (s), 1200.2 (s); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 7.40 (dd, *J* = 8.4, 7.6 Hz, 1H, H-5), 6.92 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H-6), 6.77 (dd, *J* = 7.7, 0.9 Hz, 1H, H-4), 6.4 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, H-5'), 6.35 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 3.88, 3.82 and 3.59 (each s, 3H each, 3×OCH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.7 (CO₂H), 159.9 (C-4'), 157.8 (C-1'), 156.6 (C-3), 138.6 (C-1'), 137.8 (C-2), 135.3 (CH-5), 130.9 (C-1), 123.6 (CH-4), 121.3 (C-6'), 109.9 (CH-6), 106.3 (CH-5'), 96.3 (CH-3'), 56.0, 55.7 and 55.3 (3×OCH₃), 20.6 (CH₃); HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₁₇H₁₈O₅ [M+H]⁺ 303.1227, found 303.1232.

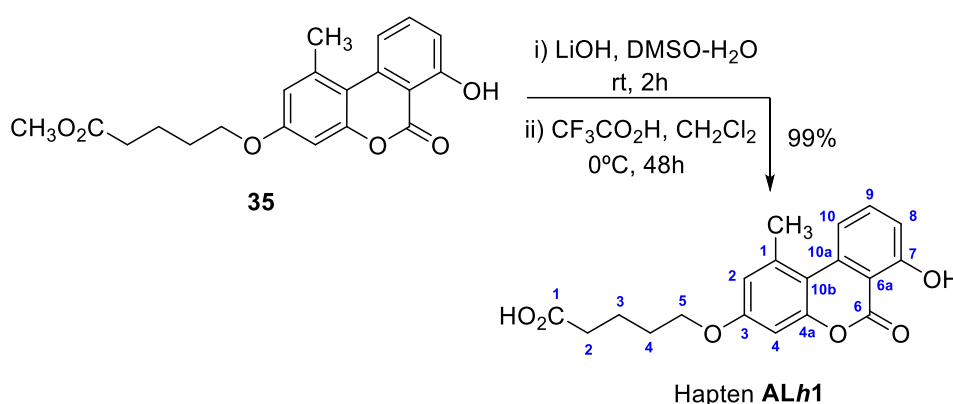


3,7-Dihydroxy-1-methyl-6H-benzo[*c*]chromen-6-one (autumnariol, **34).** A 1M solution of BBr_3 in CH_2Cl_2 (1.5 mL, 1.5 mmol, 7.6 equiv) was dropwise added to a solution of acid **33** (59.5 mg, 0.197 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (2.6 mL) at 0 °C under nitrogen. The resulting deep red solution was allowed to reach room temperature and stirred for 24 h. After this time, the mixture was cooled at 0 °C, anhydrous MeOH (1.8 mL) was added dropwise and the stirring was continued for 1 h. The mixture was extracted with EtOAc, the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to give autumnariol **34** (42.1 mg, 88.4%) as a brownish solid. Mp 205.9 °C (MeOH); IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3315.5 (m, broad), 1654.9 (m), 1604.6 (m), 1086.0 (s); ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.61 (s, 1H, OH); 10.37 (br s, 1 H, OH), 7.79 (dd, $J = 6.8, 6.5$ Hz, 1H, H-9), 7.77 (dd, $J = 6.5, 2.0$ Hz, 1 H, H-10), 7.02 (dd, $J = 6.8, 2.0$ Hz, 1 H, H-8), 6.75 (d, $J = 2.6$ Hz, 1 H, H-2), 6.68 (d, $J = 2.6$ Hz, 1 H, H-4), 2.74 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.9 (CO); 161.7 (C-7), 158.4 (C-3), 152.4 (C-4a), 138.2 (C-10b) 137.2 (CH-9), 136.6 (C-10a), 117.6 (CH-2), 115.9 (CH-10), 114.2 (CH-8), 108.9 (C-1), 104.7 (C-6a), 101.5 (CH-4), 25.2 (CH_3); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 243.0652, found 243.0642.



5-((7-Hidroxi-1-metil-6-oxo-6H-benzo[*c*]cromen-3-il)oxi)pentanoato de metilo (35**).** Methyl 5-bromovalerate (52.4 mg, 0.16 mmol, 1.04 equiv) was added to a solution of autumnariol **34** (37 mg, 0.153 mmol) and anhydrous Cs_2CO_3 (53.8 mg, 0.165 mmol, 1.07 equiv) in anhydrous DMF (1.6 mL) at 0 °C under nitrogen. The resulting yellowish solution was allowed to slowly warm to room temperature and stirred for 16 h. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc, the combined organic layers were washed with a 1.5% aqueous solution of LiCl, brine, dried over anhydrous MgSO_4 , filtering and concentrating under vacuum to give a residue that was purified by chromatography, using CHCl_3 as eluent, yielding methyl ester **35** (20.5 mg, 38%) as a white amorphous solid. IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3009.8 (w), 2958.1 (w), 1746.3 (s), 1682.9

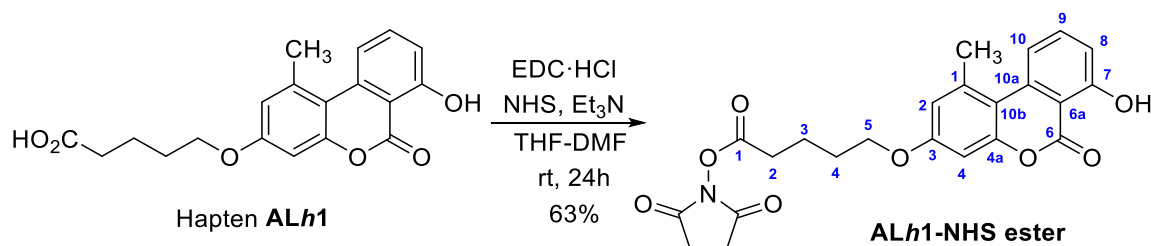
(w); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.73 (s, 1H, OH), 7.72 (dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz, 1H, H-10), 7.66 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-9), 7.02 (dd, $J = 8.2, 1.0$ Hz, 1H, H-8), 6.76 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-2), 6.74 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-4), 4.03 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, H₂-5), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 2.80 (s, 3H, CH₃), 2.42 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H₂-2), 1.91–1.78 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.8 (CO₂), 165.7 (CO), 162.8 (CH-7), 159.2 (C-3), 152.9 (C-4a), 138.1 (CH-9), 137.0 (C-10b), 136.9 (C-10a), 117.5 (CH-2), 116.0 (CH-10), 115.1 (CH-8), 111.0 (C-6a), 105.6 (C-1), 100.4 (CH-4), 67.7 (CH₂-5), 51.6 (OCH₃), 33.6 (CH₂-2), 28.5 (CH₂-4), 25.8 (CH₃), 21.6 (CH₂-3); HRMS (TOF, ES+) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 357.1333, found 357.1331.



5-((1-Methyl-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-3-yl)oxy)pentanoic acid (Hapten ALh1).

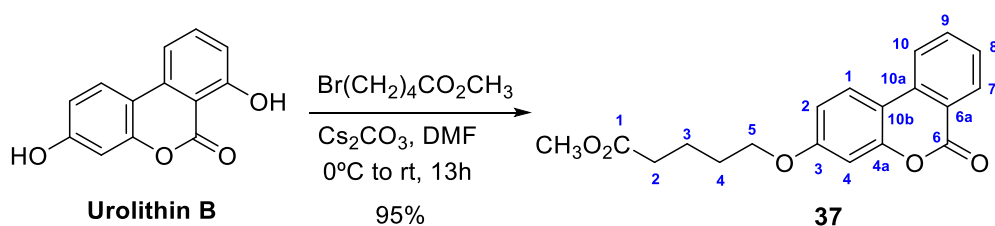
Solid LiOH-H₂O (24.8 mg, 0.59 mmol, 10.5 equiv) was added to a solution of methyl ester **35** (20.1 mg, 0.056 mmol) in a 2:1 mixture of DMSO-H₂O (5 mL). After 2 h of stirring at room temperature, the mixture was cooled in an ice-water bath and acidified with 1 M HCl and extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The crude obtained (25.5 mg, 0.070 mmol) was dissolved in a 0.13 M solution of trifluoroacetic acid (150 μL , 1.96 mmol, 28 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL) and left with stirring at 0 °C for 48 h. After this time, the mixture was concentrated by solvent evaporation and dried by co-evaporation with benzene at low pressure to afford hapten ALh1 (24 mg, 99%) as an amorphous white solid which was used in the next step without further purification. IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3235.5 (m, broad), 2924.1 (m), 1716.4 (m), 1653.1 (m); ^1H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆) δ 11.75 (s, 1H, OH), 7.87 (dd, $J = 8.3, 0.8$ Hz, 1H, H-10), 7.79 (dd, $J = 8.2, 8.2$ Hz, 1H, H-9), 7.02 (dd, $J = 8.1, 1.0$ Hz, 1H, H-8), 6.90 (dd, $J = 2.8, 0.8$ Hz, 1H, H-2), 6.85 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-4), 4.16 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, H₂-5), 2.84 (s, 3 H, CH₃), 2.42 (t, $J =$

7.1 Hz, 2H, H₂-2), 1.75–1.94 (m, 4 H, H₂-3 and H₂-4); ¹³C NMR (125 MHz, acetone-*d*₆) δ 174.5 (CO₂); 166.4 (CO), 163.5 (CH-7), 160.6 (C-3) 154.0 (C-4a), 138.1 (CH-9), 137.9 (C-10a), 118.3 (CH-2) 117.3 (CH-10), 115.6 (CH-8), 111.6 (C-6a), 106.3 (C-1), 101.3 (CH-4), 68.9 (CH₂-5), 33.8 (CH₂-2), 29.3 (CH₂-4), 25.8 (CH₃), 22.3 (CH₂-3); HRMS (TOF, ES⁺) *m/z* calculated for C₁₉H₁₉O₆ [M+H]⁺ 343.1176, found 343.1180.

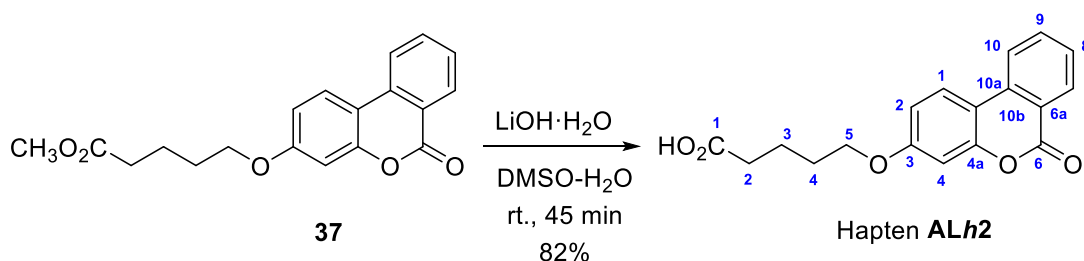


2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 5-((1-methyl-6-oxo-6H-benzo[*c*]chromen-3-yl)oxy)pentanoate (ALh1-NHS). A solution of hapten ALh1 (5.1 mg, 15 μmol), *N*-hydroxysuccinimide (2.6 mg, 22 μmol, 1.46 equiv) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (4.5 mg, 23 μmol, 1.53 equiv) in a 6:1 mixture of THF-DMF (0.4 mL) was stirred at room temperature under nitrogen for 1 h. Et₃N (6 μL, 43 μmol, 2.9 equiv) was added and stirring was continued for 24 h. The mixture was diluted with a small volume of water and extracted with EtOAc, the combined organic phases were washed with a 1.5% aqueous solution of LiCl, brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford NHS-ALh2 ester (4.2 mg, 63%) as a white amorphous solid. ¹H NMR (500 MHz, THF-*d*₈) δ 11.77 (s, 1H, OH). 7.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-10), 7.70 (dd, *J* = 8.2, 8.2 Hz, 1H, H-9), 6.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-8) 6.88 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-2), 6.86 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-4), 4.12 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, H₂-5), 2.82 (s, 3H, CH₃), 2.71 (br s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.45 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₂-2), 1.93 (dd, *J* = 4.1, 2.7 Hz, 4H, H₂-3 and H₂-4).

5.2.2.2. Synthesis of the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten ALh2 (ALh2-NHS ester)

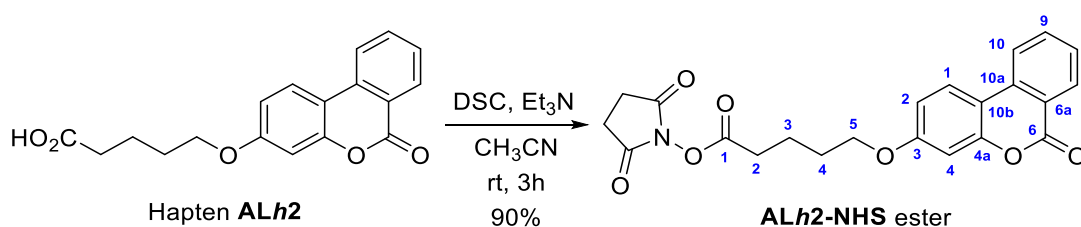


Methyl 5-((6-oxo-6H-benzo[*c*]chromen-3-yl)oxy)pentanoate (37). Commercially available **uroolithin B**, (49.4 mg, 0.232 mmol) and anhydrous Cs₂CO₃ (82.2 mg, 0.252 mmol, 1.08 equiv) were dissolved in anhydrous DMF (1 mL) under N₂ atmosphere. To the resulting orange suspension, methyl 5-bromovalerate (49 mg, *ca.* 36 μ L, 0.250 mmol, 1.1 equiv) was added and left with stirring at room temperature for 13 h. After this time, the mixture was diluted with water and extracted with EtOAc (3 \times). The combined organic layers were washed with 1.5% aqueous solution of LiCl (2 \times), brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum, methyl ester **37** (73.8 mg, 95%) was obtained as a yellowish-white amorphous solid which was used in the next step without further purification. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (ddd, *J* = 8.0, 1.0, 0.5 Hz, 1H, H-7), 8.00 (ddd, *J* = 8.1, 1.1, 0.5 Hz, 1H, H-10), 7.86 (d, *J* = 8.8 Hz, H-1), 7.73 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.0 Hz, 1H, H-9), 7.50 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.1 Hz, 1H, H-8), 6.90 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H-2), 6.85 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-4), 4.01-4.08 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H₂-5), 3.69 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.39-2.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₂-2), 1.82-1.91 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173.8 (CO₂CH₃), 161.5 and 160.8 (C-3 and C-4a), 152.5 (CO), 135.2 (C-6a), 134.8 (CH-9), 130.5 (CH-7), 127.7 (CH-8), 123.7 (CH-10), 121.1 (CH-1), 119.9 (C-10a), 112.7 (C-10b), 111.0 (CH-2), 102.1 (CH-4), 67.9 (CH₂-5), 51.6 (OCH₃), 33.8 (CH₂-2), 28.5 (CH₂-3), 21.6 (CH₂-4); IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3080 (w), 2950 (w), 1720 (s), 1618 (s, broad); HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculated for C₁₉H₁₉O₅ [M+H]⁺ 327.1227, found 327.1223.



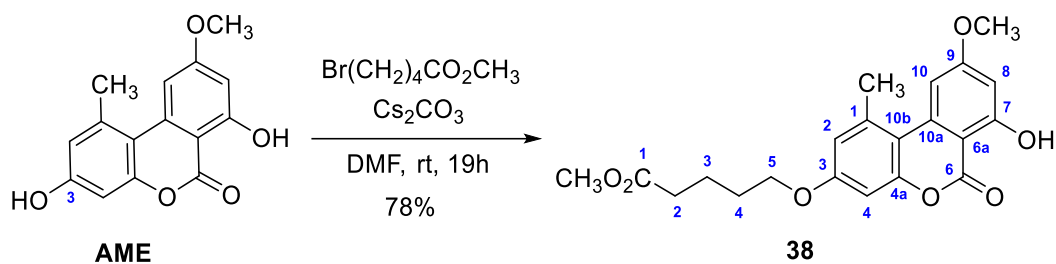
5-((6-Oxo-6H-benzo[*c*]chromen-3-yl)oxy)pentanoic acid (Hapten ALh2). A solution of methyl ester **37** (20.2 mg, 0.063 mmol) and LiOH·H₂O (27.5 mg, 0.655 mmol, 10.4 equiv) in a 2:1 mixture of DMSO-H₂O (4.5 mL) was stirred at room temperature for 45 min. After this time, the reaction mixture was cooled at 0 °C and quenched by the addition of 1 M HCl, diluted with water and extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford hapten ALh2 (19.7 mg, 82%) as an amorphous white

solid which was used in the next step without further purification. IR (ATR) ν_{max} (cm⁻¹) 3453 (w), 3015 (w), 2971 (w), 1739 (s); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.25 (dd, J = 8.0, 1.1 Hz, 1H, H-7), 8.15 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-10), 8.08 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-1), 7.84 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.4 Hz, 1H, H-9), 7.53 (ddd, J = 8.1, 7.4, 1.0 Hz, 1H, H-8), 6.95 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H-2), 6.87 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-4), 4.08 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H₂-5), 2.39 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H₂-5), 1.69-1.94 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 177.8 (CO₂H), 163.2 and 162.5 (C-3 and C-4a), 153.8 (CO), 136.7 (C-10a), 136.4 (CH-9), 131.0 (CH-7), 128.9 (CH-8), 125.4 (CH-1), 122.6 (CH-10), 113.9 (CH-2), 112.2 (C-10b), 103.0 (CH-4), 69.3 (CH₂-5), 34.9 (CH₂-2), 29.7 (CH₂-4), 22.9 (CH₂-3); HRMS (TOF, ES⁺) m/z calculated for C₁₈H₁₇O₅ [M+H]⁺ 313.1071, found 313.1066.

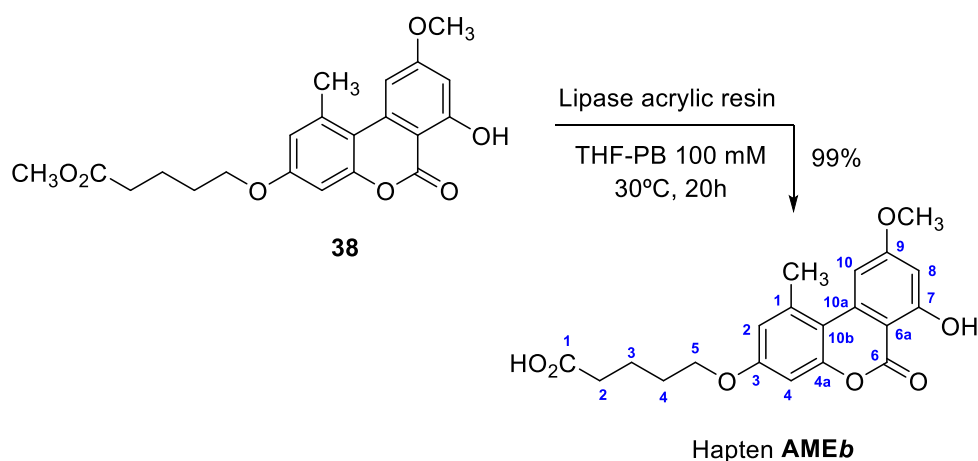


5-((6-Oxo-6H-benzo[c]cromen-3-yl)oxi)pentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (ALh2-NHS ester). Et₃N (*ca.* 12 μ L, 86 μ mol, 3.3 equiv) was added to a suspension of hapten ALh2 (4.8 mg, 25.6 μ mol) and disuccinimidyl carbonate (DSC, 9.9 mg, 38 μ mol, 1.5 equiv) in anhydrous CH₃CN (300 μ L) at 0 °C under nitrogen. The stirred reaction mixture was allowed to slowly warm up to room temperature for 3 h, diluted with water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum to give NHS-ALh2 ester (9.5 mg, 90%) as a white amorphous solid. ¹H NMR (500 MHz, THF-*d*₈) δ 8.26 (dd, J = 1.4, 7.9 Hz, 1H, H-7), 8.15 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-10), 8.08 (dd, J = 1.3, 8.1 Hz, 1H, H-1), 7.79 (ddd, J = 1.5, 7.3, 8.3 Hz, 1H, H-9), 7.45-7.57 (ddd, J = 1.0, 7.3, 8.0 Hz, 1H, H-8), 6.95 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H-4), 6.93 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H-2), 4.12 (t, J = 5.8 Hz, H₂-5), 2.74-2.77 (br s, 4 H, COCH₂CH₂CO), 2.72 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H₂-2), 1.86-2.09 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4).

5.2.2.3. Synthesis of the N-hydroxysuccinimidyl ester of hapten AMEb (AMEb-NHS ester)

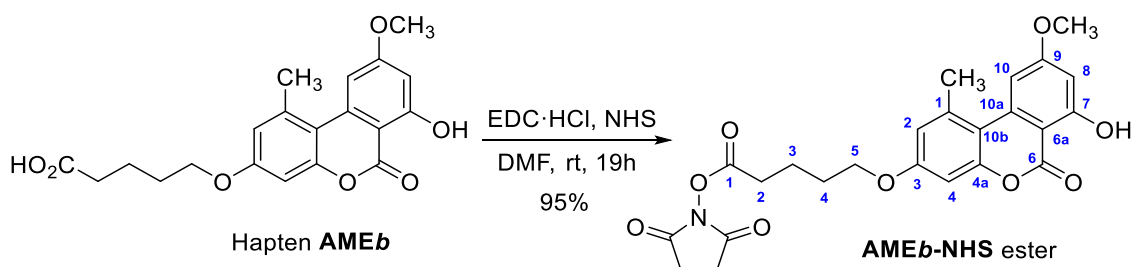


Methyl 5-((7-hydroxy-9-methoxy-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-3-yl)oxy)pentanoate (38). Methyl ester **38** was synthesized using the condition described above for the related transformation of **16** into **17** using alternariol 9-methyl ether (10 mg, 39 μmol), methyl 5-bromovalerate (8.4 mg, *ca.* 6.3 μL , 43 μmol , 1.1 equiv) and Cs_2CO_3 (16.7 mg, 51 μmol , 1.3 equiv) and in anhydrous DMF (0.6 mL). The crude product obtained after work-up of the reaction mixture was chromatographed on silica gel, using 5:5 CHCl_3 - CH_2Cl_2 as eluent, to afford **38** (11.2 mg, 78%) as pale yellowish semi-solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.95 (s, 1H, OH), 7.25 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-10), 6.73 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-2), 6.72 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-4), 6.54 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-8), 4.08–4.00 (m, 2H, H₂-5), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.79 (s, 3H, CH_3), 2.45–2.37 (m, 2H, H₂-2), 1.85 (dt, $J = 7.8, 3.2$ Hz, 4H, H₂-3 and H₂-4); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 173.9 (CO_2CH_3), 166.6 (CO), 165.6 (C-9), 165.3 (C-7), 159.5 (C-3), 153.3 (C-4a), 138.3 (C-10a), 138.1 (C-1), 117.4 (CH-2), 111.0 (CH-4), 104.6 (CH-10), 100.6 (C-10b), 99.5 (C-6a), 99.1 (CH-8), 67.9 (CH₂-5), 55.8 (OCH_3), 51.8 (CO_2CH_3), 33.8 (CH₂-2), 28.6 (CH₂-4), 25.8 (CH_3), 21.7 (CH₂-3).



5-((7-Hydroxy-9-methoxy-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-3-yl)oxy)pentanoic acid (Hapten AMEb). The hydrolysis of the methyl ester moiety of **38** was performed following the same procedure described above for the hydrolysis of methyl ester **8** to

hapten **AL α** , starting from methyl ester **38** (11 mg, 28.5 μ mol), lipase from *Candida antarctica* immobilized on acrylic resin (12 mg) and a 4:1 mixture of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and THF (1.3 mL). Workup as described for the hydrolysis of **8** afforded hapten AMEb (10.8 mg, 99%) as a whitish semi-solid. ^1H NMR (500 MHz, THF- d_8) δ 11.98 (s, 1H, OH), 7.28 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-10), 6.81 (m, 2H, H-2 and H-4), 6.57 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-8), 4.07 (t, J = 6.2 Hz, 2H, H₂-5), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 2.79 (s, 3H, CH₃), 2.32 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H₂-2), 1.84 (m, 2H, H₂-3), 1.81–1.73 (m, 2H, H₂-4). ^{13}C NMR (126 MHz, THF- d_8) δ 174.5 (CO₂CH₃), 167.7 (CO), 166.4 (C-9), 166.1 (C-7), 160.9 (C-3), 154.5 (C-4a), 139.3 (C-10a), 139.0 (C-1), 118.2 (CH-2), 111.6 (CH-4), 105.0 (CH-10), 101.3 (C-10b), 100.3 (C-6a), 100.0 (CH-8), 68.9 (CH₂-5), 56.2 (OCH₃), 34.0 (CH₂-2), 29.6 (CH₂-4), 25.8 (CH₃), 22.6 (CH₂-3).



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 5-((7-hydroxy-9-methoxy-6-oxo-6H-benzo[c]chromen-3-yl)oxy)pentanoate (AMEb-NHS ester). The hapten AMEb obtained in the above step (10 mg, 29.5 μ mol) was transformed into the corresponding AMEb-NHS ester (13 mg) following the same procedure previously described for the transformation of hapten AL α into AL α -NHS ester, using EDC·HCl (6.8 mg, 35.4 μ mol, 1.2 equiv) and NHS (4.5 mg, 38.4 μ mol, 1.3 equiv) in anhydrous DMF (1 mL). ^1H NMR (500 MHz, THF- d_8) δ 11.99 (s, 1H, OH), 7.30 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-10), 6.8 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H-2), 6.8 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-4), 6.59 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-8), 4.15–4.08 (m, 2H, H₂-5), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 2.81 (s, 3H, CH₃), 2.77–2.75 (m, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.73–2.70 (m, 2H, H₂-2), 1.99–1.90 (m, 4H, H₂-3 and H₂-4).

5.3. Preparation of protein–hapten conjugates

All of the prepared haptens were conjugated to BSA, OVA and HRP, except hapten ALh1 which as only conjugated to OVA and HRP. Once hapten activation was achieved,

protein coupling was performed by dropwise addition of a 50 mM solution of the active ester in dimethyl sulfoxide to a 15 mg/mL solution of BSA or OVA in PB, and the mixture was stirred overnight at room temperature. BSA–hapten immunising conjugates were prepared using a 40:1 molar ratio of activated hapten per mol of protein, whereas for the OVA–hapten conjugates, 8 to 12 mol of activated hapten per mol of protein was used. Finally, 15 equivalents of activated hapten were used for the HRP–hapten conjugate in CB at room temperature for 48 h. The addition of the hapten to the protein was carried out dropwisely within a day. The conjugates were purified by size exclusion chromatography using three 5-mL Sephadex G-25 HiTrap desalting columns serially connected and using PB as eluent. Elution was carried out at 5 mL/min, and 1 mL fractions were collected. The UV/Vis absorption spectrum of each conjugate was acquired. Finally, the obtained hapten-to-protein molar ratio (MR) was determined by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS).

BSA conjugates were sterilised using sterile 0.45 µm filters. Assuming no loss of protein during the conjugation and purification processes, the final concentration of the conjugate was adjusted to 1 mg/mL using sterile PB. The BSA solutions were stored at –20 °C. Concerning OVA conjugates, the final concentration of conjugate was adjusted to 1 mg/mL using PB, with 0.01% (m/v) thimerosal, assuming no protein losses. The OVA solutions were stored at –20 °C. The concentration of enzyme conjugates was calculated using the absorbance value at 400 nm, assuming that, at this wavelength, the contribution of the hapten was negligible and the molar extinction coefficient of the protein in PB is 65.38 mM/cm. The final tracer solution was diluted 2-fold with PBT and stored at 4 °C.

The analysis of hapten bioconjugates was conducted by mass spectrometry as follows. For sample setup, 100 µL of protein conjugate (0.5–1 mg/mL) was dialysed with MilliQ water and 0.8 µL was spotted onto the MALDI plate. After air-drying the droplet at room temperature, 0.8 µL of matrix (10 mg/mL sinapinic acid (Bruker) in 70% (v/v) MeCN, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid) was added and then left to air-dry at room temperature. The resulting mixtures were tested on a 5800 MALDI-TOF/TOF apparatus (ABSciex) in positive linear mode (1500 shots each position) in a mass range of 12000–

100000 m/z. Prior to this, the plate was calibrated with 1 μ L of TOF/TOF calibration mixture (ABSciex), in 13 positions. Each sample was calibrated by the "close external calibration" method using unmodified BSA, OVA and HRP standards measured at a close position. Analysis of the results was then carried out with the mMass software (<http://www.mmass.org/>).

From mass spectra, m/z values were determined for the conjugate of interest [(m/z)_C] and for the corresponding protein [(m/z)_P]. Thus, the expected m/z increment per hapten molecule [$\Delta(m/z)$] was calculated as the molecular weight of the hapten minus the molecular weight of the water molecule that is lost when the amide bond is formed. Based on these values, the RM was calculated by dividing the difference of observed m/z values by the expected increase per hapten molecule (Equation 5-1).

$$RM = \frac{(m/z)_C - (m/z)_P}{\Delta(m/z)} \quad \text{Equation 5-1}$$

5.4. Generation of polyclonal antibodies

Female New Zealand white rabbits, 2 per immunising hapten, were each dosed with 300 μ g of BSA–hapten conjugate in a 1 mL dose of a 1:1 emulsion of sterile PB and Freund's adjuvant (complete for the first dose and incomplete for subsequent boosters). A total of 4 injections were administered subcutaneously in the different parts of the dorsal area of the animals every 21 days. Evaluation of the immune response was conducted by testing antiserum samples obtained after the third immunisation. The rabbits were totally bled 10 days after the last injection. Blood samples were allowed to coagulate overnight at 4 °C, and the sera were separated by double centrifugation (3000 \times g, 20 min). Antisera were precipitated twice with 1 volume of SAS and stored at 4 °C. Aliquots of the obtained polyclonal antibodies were separated after homogenising the suspensions, and they were 5-fold diluted with PBT and stored at 4 °C.

5.5. Generation of monoclonal antibodies

5.5.1. Immunization procedure

Six two-month-old female balb/c mice were immunised by intraperitoneal injection with 100 µg of the selected BSA–hapten conjugate in 200 µL of a water-in-oil emulsion using Freund's adjuvant (complete for the first dose and incomplete for the second and third doses). These injections were given at 21-day intervals. Finally, 4 days prior to animal sacrifice, a fourth injection in sterile PBS was administered with the same amount of protein conjugate at least 21 days after the third inoculation. The immune response was evaluated by testing blood samples obtained by submandibular puncture 10 days after the third immunization. Samples were stored overnight at 4 °C to promote coagulation and the sera were collected by double centrifugation (9660×g, 15 min). Subsequently, the antisera were 1/4 diluted with PBT and stored at 4 °C. A similar method was also used for blood samples obtained by intracardiac puncture just after the sacrifice of animals.

5.5.2. Hybridoma generation

A modified protocol from the original method developed by Köhler and Milstein enabled the generation of hybridomas by cell fusion between the myeloma cell line P3-X63-Ag8.635189 and B lymphocytes isolated from the spleens of 2 equally immunised mice.^{89,145} After the animals were sacrificed, blood samples were extracted by intracardiac puncture, which was followed by excision of the spleen. Physical pressure was used to squeeze the spleen cells out of the spleen capsule by using the piston of a sterile syringe. The extracted red cells were then osmotically shock lysed using 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. Cell fusion was performed by mixing myeloma cells cultured in complete medium with the extracted B-lymphocytes at a ratio of 4:1 lymphocytes/myeloma. The resulting mixture was washed 3 times with incomplete medium and collected by centrifugation, before 1 mL of PEG 1500 was added at 37 °C for 1 min. The cell mixture was then suspended in 50 mL of complete medium and incubated for 30 min. After centrifugation, cells were suspended in post-fusion medium and incubated in 96-well plates (100 µL per well, 1.5–2.0×10⁵ cells per well) at 37 °C (5% CO₂, 95% relative humidity). Twenty-four hours later, 100 µL per well of HAT

medium was added, and the plates were incubated again under the same ambient conditions for 10–12 days.

5.5.3. Hybridoma selection

The best hybridomas were selected by a double screening procedure. The hybridomas produced were initially screened by testing the culture supernatants using the differential competitive ELISA. Plates were coated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 μL per well) of the homologous OVA–hapten conjugate by overnight incubation at room temperature. Then, microwells were washed and 40 μL of each culture supernatant was added to 2 adjacent wells of the ELISA plate. The first well, which contained 50 μL of PBS (blank), enabled the recognition of the conjugate, and the second well, which contained 50 μL of a 200 nM solution of alternariol in PBS, was used to estimate the antibody affinity. The signal ratio from both wells was used to select the antibodies with the highest potential for the development of sensitive immunoassays. HFCS-supplemented HT culture medium (100 μL) was added to the selected wells and incubated for 24 h before reassessment by checkerboard competitive ELISA. This second assay was performed using plates coated with the homologous OVA–hapten conjugate at two concentrations (0.01 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), four dilutions of culture supernatant (1/10, 1/50, 1/250 and 1/1250) and analyte standards at three different concentrations (0, 10 and 100 nM).

5.6. Cloning and isolation of hybridomas

The cells from the selected culture wells were resuspended and diluted with HFCS-supplemented HT medium. Then, the cells were distributed in a 96-well plate (100 μL per well, 2 cells per well) and incubated for 7–10 days. Next, the microwells were examined microscopically to identify unique clones. Finally, 100 μL per well of complete medium was added, and the supernatants were retested by differential competitive ELISA. The cloning process was repeated at least twice using the cells from those wells with single clones, affording positive and competitive results, in order to ensure isolation of the cell line. Each selected hybridoma was then grown on a large scale in HFCS-supplemented HT culture medium. The preservation of the cell line was accomplished

by collecting the hybridoma cells by centrifugation and cryopreserving a suspension of the cells in preservation medium in sterile 1 mL microtubes using liquid nitrogen.

5.7. Production of monoclonal antibodies

Hybridoma cells were expanded in Petri dishes and incubated for 7–10 days in HFCS-supplemented HT medium. Cells were then centrifuged and the immunoglobulins were precipitated from the supernatants with 1 volume of SAS. Precipitates were centrifuged (3800×g, 20 min), dissolved in 8–10 mL of PB20, and then filtered through a nitrocellulose membrane (0.45 μm pore diameter). The resulting monoclonal antibodies were purified using Protein G affinity chromatography. The columns were conditioned with PB20 (3 mL/min), and 100 mM citric acid buffer pH 2.5 (3 mL/min) was used as eluting buffer. The collected fractions (850 μL) were neutralised with 150 μL of 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.5). Those fractions containing the antibody were pooled, and the final solution was concentrated by centrifugation while changing the buffer to PB20. The final antibody concentration was determined using the absorbance value at 280 nm and a molar extinction coefficient of 1.4 L/g×cm. Then, the purified antibodies were diluted to a known concentration with PB20 and precipitated with 1 volume of SAS, before being stored at 4 °C as precipitates. Working aliquots were prepared from the precipitate by diluting 2-fold with PBT, and the resulting solutions were also stored at 4 °C.

5.8. Preparation of lateral flow immunoassay components

5.8.1. **Gold nanoparticle–monoclonal antibody conjugates**

The selected monoclonal antibody was added to a 1/10 dilution in Tris10-T buffer of commercial 40 nm GAM-modified gold nanoparticle suspension (OD = 10), and the mixture was incubated for 1 h at room temperature. This conjugate was used without further purification.

5.8.2. **Immunostrip preparation**

BSA–hapten was used for the test line and GAM for the control line. Solutions of these immunoreagents in PB with 150 mM NaCl were dispensed onto a nitrocellulose membrane (300×25 mm) using a BioDot dispensing system at a flow rate of 0.5 µL/cm. The spacing between the test and control lines from the base of the membrane was 10 mm and 15 mm, respectively. After being dried for 1 h at room temperature, the different components of the strip were stuck using a BioDot manual lamination system. First, the the nitrocellulose membrane was fixed, 14 mm from the base, to the support card (300×78 mm). Then, a cellulose sample pad (300×17 mm) and an absorbent pad (300×43 mm) were fixed overlapping 3 mm and 4 mm, respectively, the membrane. Lastly, a Biodot guillotine was employed to cut the assembled components into 4×78 mm immunostrips.

5.9. Competitive immunoassays

5.9.1. **Competitive ELISA**

5.9.1.1. *Antibody-coated direct competitive ELISA*

Microtitre plates were coated by adding 100 µL per well of the antibody solution in coating buffer. If capture antibody (GAM for mAbs and GAR for pAbs) was used, a coating concentration of 1 µg/mL was employed. After overnight incubation at 4 °C, the plates were rinsed four times with washing solution. In the latter case, 100 µL per well of primary antibody solution in PBS-T was added, and after 1 h incubation at room temperature, plates were washed again. The competition was performed by adding 50 µL per well of the analyte standard solution in PBS and 50 µL per well of HRP tracer solution in PBS-T, and with an incubation time of 1 h at room temperature. After rinsing the plates as before, the signal was generated by adding 100 µL per well of the enzyme substrate solution. Plates were incubated for 10 min at room temperature. Finally, the reaction was stopped by adding 100 µL per well of stop solution, and the absorbance was immediately read.

5.9.1.2. *Conjugate-coated indirect competitive ELISA*

Microtitre plates were coated by adding 100 μL per well of the corresponding OVA-hapten conjugate solution in coating buffer. After overnight incubation at room temperature, the plates were rinsed four times with washing solution. Competition was performed by adding 50 μL per well of analyte standard solution in PBS and 50 μL per well of antibody solution in PBS-T, and the plates were incubated for 1 h at room temperature. Subsequent to rinsing the plates, 100 μL per well of enzyme-labelled secondary antibody (RAM-HRP (1/2000) for mAbs or GAR-HRP ((1/10000) + 10% (v/v) fetal bovine serum) for pAbs) in PBS-T was added to the plates and incubated at room temperature for a additional hour. The plates were rinsed again and the signal was generated by adding 100 μL per well of the enzyme substrate solution. After incubating for 10 min at room temperature, the reaction was stopped by adding 100 μL per well of stop solution, and the absorbance was measured immediately.

5.9.2. Competitive LFICA

To perform the test in dipstick mode, a mixture of 25 μL of colloidal gold conjugate in Tris10-T buffer and 75 μL of analyte standard solution in Tris75-T buffer was prepared in a 300 μL microwell, and incubated for 5 min at room temperature. The immunoreactive strip was then vertically inserted into the well for 10 min, and subsequently the sample pad was removed to stop the flow. Finally, the membrane was dried under a cold air current before scanning for signal processing.

5.10. Data processing

Signal treatment and graphical representation were carried out using SigmaPlot 14.0 from SPSS Inc (Chicago, IL, USA). The experimental values were then fitted to a four-parameter logistic (Equation 5-2), and the respective sigmoidal curve was plotted on a semi-logarithmic scale¹⁴⁶.

$$y = \frac{A-D}{1+\left(\frac{x}{C}\right)^B} + D \quad \text{Equation 5-2}$$

In this equation, x corresponds to the analyte concentration and y to the test signal. The maximum asymptote (A_{max}) of the sigmoidal curve is represented by parameter A ,

the slope at the inflection point is parameter B , the inhibition concentration at the inflection point corresponds to parameter C , and the minimum asymptote (A_{\min}) is defined by parameter D .

5.10.1. ELISA

After addition of stop solution, the absorbance read immediately at 492 nm (OPD) or 450 nm (TMB) using 650 nm as reference wavelength. The theoretical limit of detection (LOD) was defined as the concentration capable of producing a 10% loss of the maximal signal (IC_{10}). The working range was established employing IC_{20} and IC_{80} values (concentrations capable of reducing the maximal signal by 80% and 20%, respectively). Finally, when necessary, absorbance values (A_i) were normalised using the absorbance obtained in the absence of analyte (A_0) by Equation 5-3.

$$A_{norm,i} = \frac{A_i}{A_0} \quad \text{Equation 5-3}$$

5.10.2. Immunostrip

After drying the strip, the RGB signal was immediately measured with the aid of a scanner and data was processed using the free software ImageJ (version 1.52a). The resulting values were applied to the calculation of T/C ratios, which were then fitted to the previously described four-parameter logistic equation (Equation 5-2).

5.11. Immunoassay characterization

5.11.1. pH and ionic strength evaluation

In all cases, ionic strength was calculated assuming ideal solutions and using Equation 5-4. where c_i is the molar concentration of the ion in solution and z_i represents its formal charge.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad \text{Equation 5-4}$$

5.11.1.1. ELISA

The competitive step was performed by mixing 50 μL per well of alternariol standard solution prepared in MilliQ water with 50 μL per well of immunoreagent prepared in 20 mM phosphate buffer at the studied pH and ionic strength conditions (6.0–8.5 and 50–280 mM, respectively). The studied buffers were prepared by mixing 40 mM Na_2HPO_4 and 40 mM NaH_2PO_4 solutions. The ionic strength was adjusted by adding concentrated NaCl solution. Tween-20 was added to reach 0.05% (v/v). The final buffer concentrations were attained by adding MilliQ water. PBS conditions (pH 7.4 and $I = 166$ mM) were used as reference.

5.11.1.2. Immunostrip

Immunoassays were performed by mixing 75 μL of the standard alternariol solution prepared in 75 mM Tris-HCl buffer at different pH and ionic strength conditions with 25 μL of NP-ALb#25 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) suspension in 10 mM Tris-HCl buffer with 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4. Buffers were prepared by adjusting the pH of a 75 mM Tris-HCl solution with 10 M HCl. Then, the ionic strength was calculated and adjusted with solid NaCl.

5.11.2. Solvents

A study was carried out to evaluate the influence caused by several organic solvents on the analytical parameters of the selected immunoassays (A_{max} and IC_{50}). The solvents evaluated were ethanol, methanol and acetonitrile. Analyte standards were prepared in MilliQ water with different concentrations of the organic solvent under study. The percentages of solvents tested in the assay were 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10% (v/v). In addition, solvent-free standards were included as controls, also in MilliQ water. The competition was performed by mixing 50 μL per well of alternariol solution and 50 μL per well of the competition immunoreagent in PBS2 \times -T.

5.12. Validation of immunoassays

5.12.1. Sample preparation

Fruits, juices and flours used in this experiment were purchased from local supermarkets (Mercadona and Carrefour). Liquid samples (fruit juices) were directly diluted in PBS, whereas solid samples (oats flour, buckwheat flour and pear puree) were extracted by the QuEChERS procedure as follows. For the flours, 10 g of sample was transferred into 50 mL polypropylene tubes and 20 mL of HPLC-grade acetonitrile was added to the sample. In the case of pear puree, the extraction was performed by adding 10 mL of acetonitrile to 10 g of sample. Subsequently, the tubes were shaken vigorously for 3 min with the aid of a vortex shaker. After this, 10 g anhydrous MgSO_4 and 5 g NaCl were added and vortexed for 2 min. The tubes were then centrifuged at 4000 rpm for 10 min using a Hettich ROTOFIX 32A centrifuge (Tuttlingen, Germany). The supernatant was transferred to a second 50 mL tube, to which 25 mg/mL of PSA was added. Then, the tubes were vortexed again for 2 min and centrifuged as in the extraction step. The organic phase was separated and stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

5.12.2. ELISA

5.12.2.1. Matrix effects

The matrix effects of pear and apple juices, and the extracts of oats flour, buckwheat flour and pear puree were evaluated as described in Section 3.6. First, serial dilutions of each juice or the corresponding extracts were prepared in PBS and used for the preparation of alternariol standards. Juice samples were diluted 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 and 1/1000, whereas dilutions of 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 and 1/400 were used for the QuEChERS extracts. In all cases, alternariol standards were prepared in PBS as control. The competition step was performed by mixing 50 μL of standard solution in sample dilution and 50 μL of the corresponding immunoreagent in PBS-T in each well. The minimum dilution required for the elimination of matrix effects was determined by comparing the analytical parameters (A_{max} and IC_{50}) of the inhibition curves obtained in the diluted matrices with those of the control curve.

5.12.2.2. Recovery studies

The accuracy and precision of the developed microplate ELISA tests were assessed by analysing fortified samples of flour extracts, pear puree and fruit juices. In addition, undoped samples were included as controls, which were assayed and treated in the same way as the alternariol containing samples. The fortified matrix samples were prepared at concentration values from 1 to 300 ng/mL of alternariol. Then, the doped extracts were diluted 1/20, 1/50 and 1/500, whereas fruit juices were diluted 100 and 500 fold. Antibody and enzyme tracer solutions for the competitive step were prepared in PBS-T buffer. Each sample was analysed in triplicate in adjacent wells. The average absorbance value provided by the analysis of each sample was interpolated to an alternariol standard curve obtained from the analysis alternariol solutions prepared in PBS containing the corresponding amount of acetonitrile – that of the sample dilution – and included in triplicate wells on the same plate. Recovery values (%) were calculated with the following formula:

$$R = \frac{C_{\text{Alternariol(ELISA)}}}{C_{\text{Fort}}} \times 100 \quad \text{Equation 5-5}$$

5.12.2.3. Alternariol-contaminated blind samples

In vitro fungal growth was carried out by seeding a Petri dish with 5 µL of glycerol stock stored at –80 °C of the available strains of *A. Alternata* pv. *citri*, strains AF2440-1 (AA-1) and AF24401-3 (AA-2). Central-drop inoculated strains were grown on potato dextrose agar (PDA, Difco-BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) at 24 °C. After a 7-day incubation period, the colony was found to have grown sufficiently for the assay study. Three 6 mm plugs of PDA (collected from the inside, middle and outside of the colony) were homogenized with 500 µL of acetonitrile in tubes containing three 2.7 mm steel beads with the help of an Omni Bead Ruptor 24 (Omni International, Inc., Kennesaw, GE, USA). Samples were centrifuged and filtered, and acetonitrile extracts were stored at –80 °C until further analyses.

Inoculation of both strains on healthy pears was carried out without prior disinfection of the fruit. Spores were extracted with 5 mL of water from the colony surface with a sterile spatula. Spore counting was then carried out and dilutions were

prepared at a concentration of 10^5 , 5×10^5 and 10^6 conidia per millilitre. Five pears were inoculated for each infection concentration, and 4 wounds were made per pear. Aliquots of 10 μL of the conidial suspensions were inoculated on the pears that had been previously wounded with a needle at a 5 mm depth. All pears were incubated for 8 days in conditions of high relative humidity (90%) and at 20 °C.

The analysis procedure was completed by collecting wounds from pears (regardless of the inoculated strain) that presented similar size and were all extracted with a 19 mm internal diameter punch, frozen under liquid nitrogen, homogenized and subjected to a QuEChERS extraction procedure. Finally, they were analysed by quintuplicate in UHPLC and triplicate for ELISA. Data correlation was analysed by Demming regression and Bland-Altman plot using SigmaPlot software.

5.12.2.3.1. HPLC analysis

Acetonitrile extracts were filtered before injection of 20 μL of each extract. Working standard solutions were prepared by appropriately diluting the known volumes of the stock solution with acetonitrile, and they were used to obtain calibration curves in the chromatographic system. The mobile phase was acetonitrile/water with 0.1% (v/v) of formic acid, with gradient elution for 35 min at a flow rate of 0.5 mL/min. Separation was completed using acetonitrile as the strong mobile phase (A) and water with formic acid at 0.1% as the weak mobile phase (B). The gradient started with 10% of A (and 90% of B) at 0 min, which was linearly increased to 100% of A (0% of B) until minute 20.00. Subsequently, this proportion was maintained for 10 min. Then, the proportion was linearly decreased to 10% of A (and 90% of B) until minute 31.00. Finally, eluent B was kept constant at 90% until minute 35.00.

5.12.3. Immunochromatographic assays

The matrices selected to validate the lateral flow immunoassay for alternariol were fruit juices (apple and pear) and pear puree. The samples were fortified with alternariol at different concentrations. Before analysis, the samples were diluted 1/10 with 75 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.05% (v/v) Tween-20. Finally, 75 μL of diluted sample

was mixed, in a microwell of a polystyrene microplate, with 25 μL of NP-mAb bioconjugate suspension prepared as described in Section 3.7 were added.

Four samples were tested daily for 5 consecutive days in order to obtain 20 independent readings for the same sample type. Immunochromatography was performed in vertical position for 10 min at room temperature, and the flow was stopped by removing the sample pad. The signal of the test and control line, T and C respectively, was measured as described in Section 3.7. The threshold (cut-off) value of the signal to distinguish between positive and negative samples was determined following the Commission Regulation (EU) No 519/2014.167 for the validation of semi-quantitative screening methods with inverse proportional response for the analysis of small organic molecules.¹²⁹

$$\text{Cut-off} = R_{\text{STC}} + t\text{-value}_{0.05} \times \text{SD}_{\text{STC}} \quad \text{Equation 5-6}$$

where R_{STC} is the mean of the T/C values of the samples containing the analyte at a given Screening Target Concentration (STC), t -value is the value of a one-tailed Student's t -test for a 5% false negative rate with 19 degrees of freedom, and SD_{STC} is the standard deviation of R_{STC} .

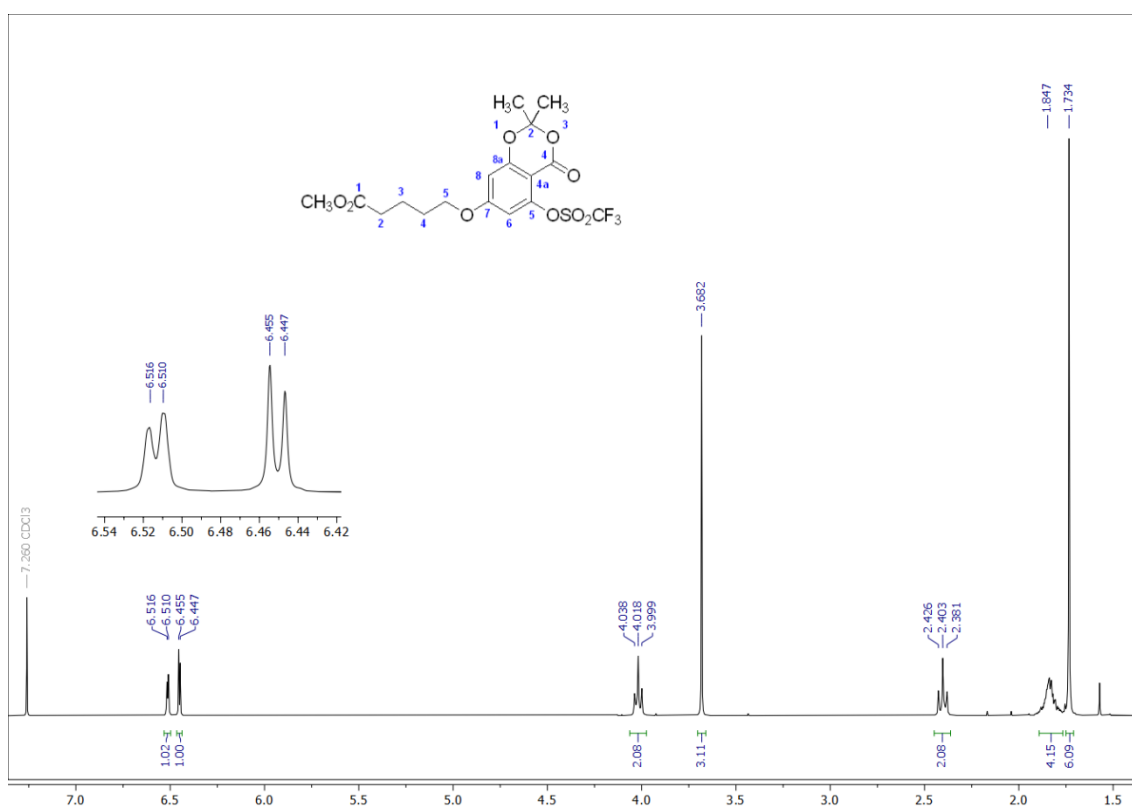
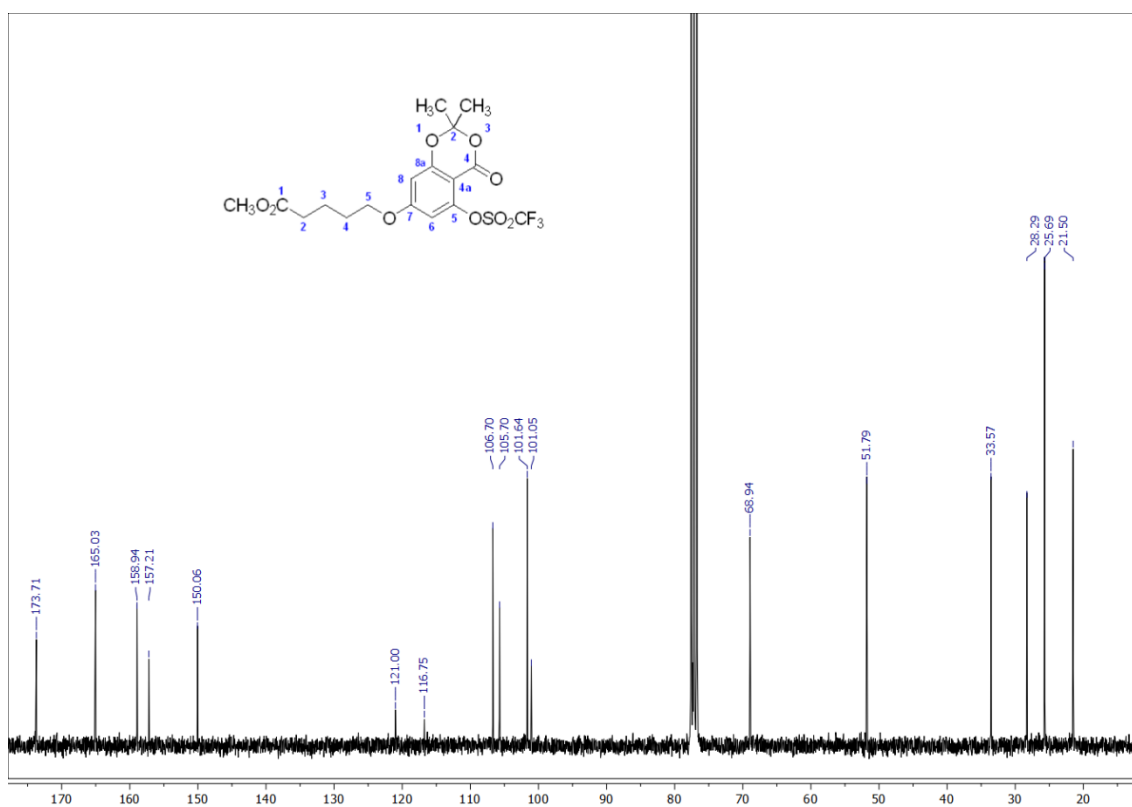
To calculate the false suspect rate, the t -value of a one-tailed Student's t -test for semi-quantitative methods with inversely proportional response to analyte concentration was determined according to Equation 5-7.

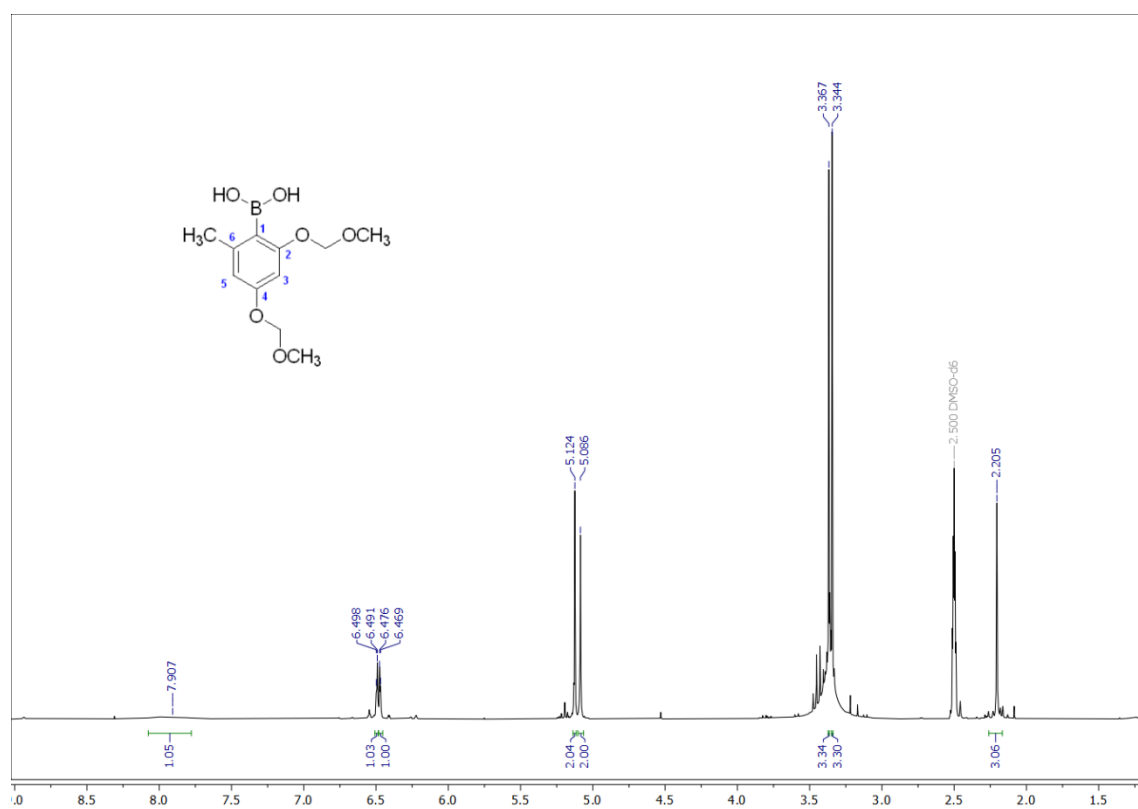
$$t\text{-value} = (\text{mean}_{\text{zero}} - \text{cut-off}) / \text{SD}_{\text{zero}} \quad \text{Equation 5-7}$$

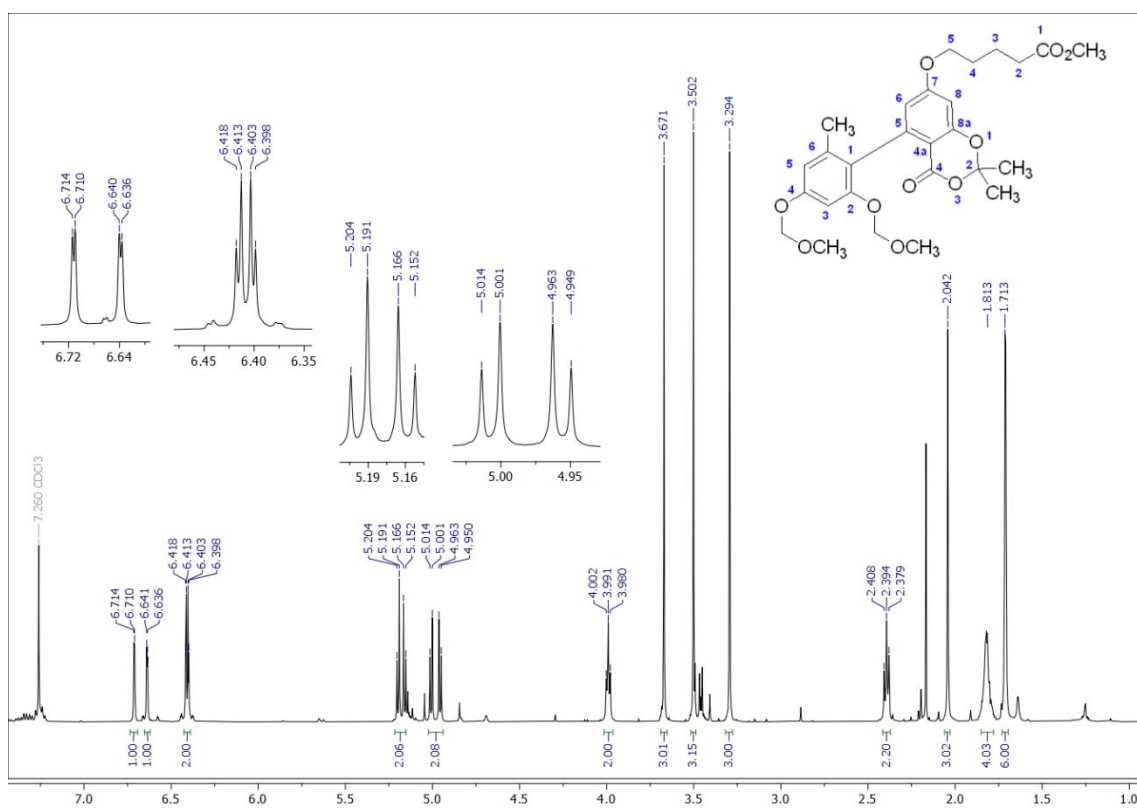
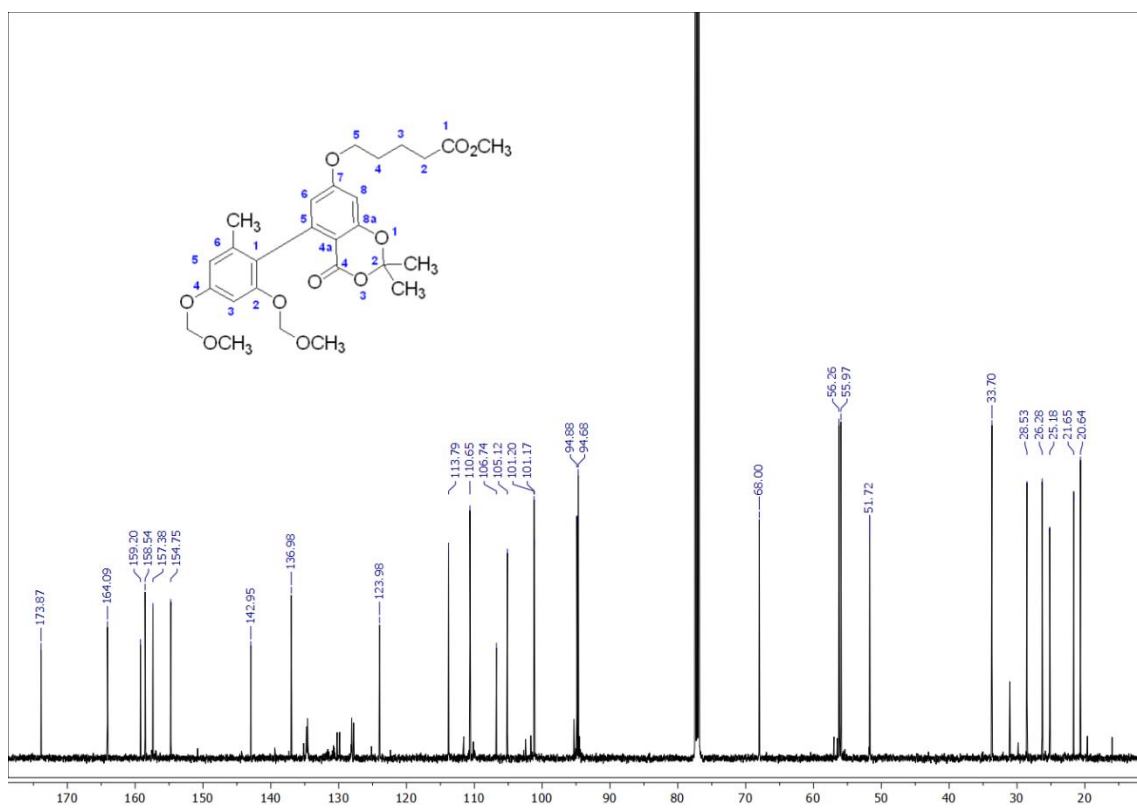
where the $\text{mean}_{\text{zero}}$ is the mean of the T/C values obtained for the undoped samples and SD_{zero} is the corresponding standard deviation. The obtained t -value was used to determine the false suspect rate for a one-tailed distribution using the DIST-T function of Microsoft Excel (Redmond, WA, USA).

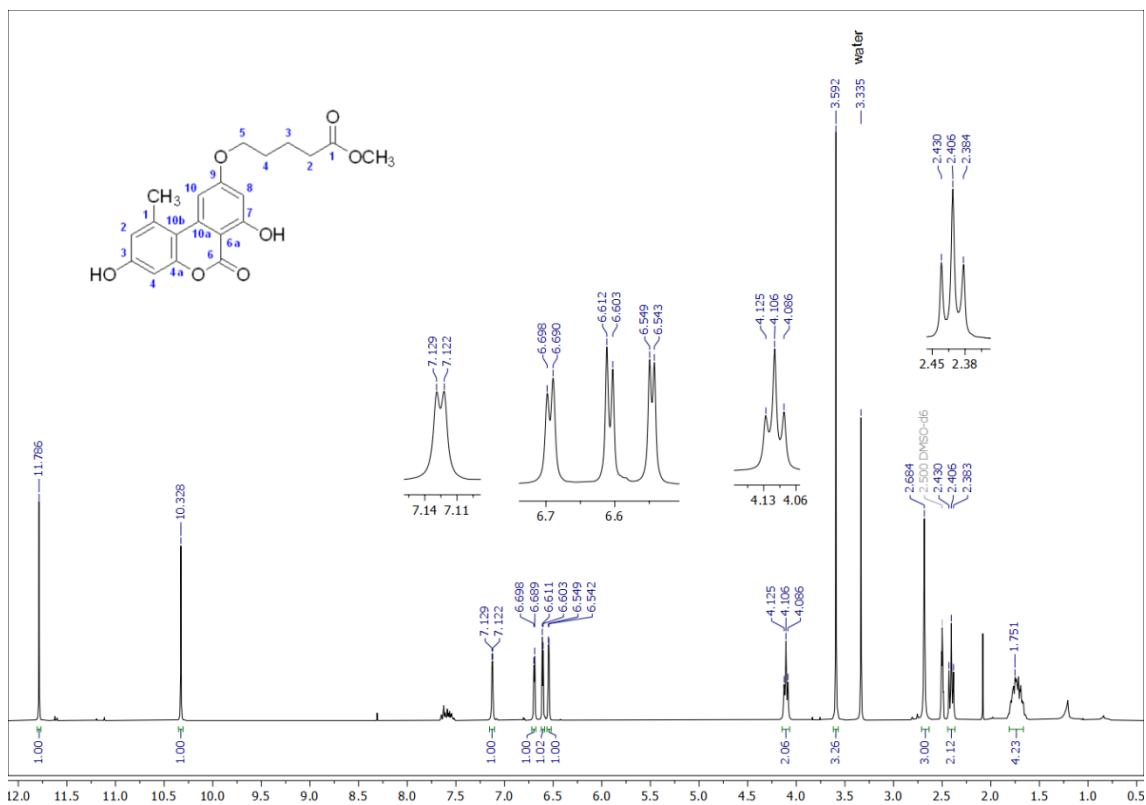
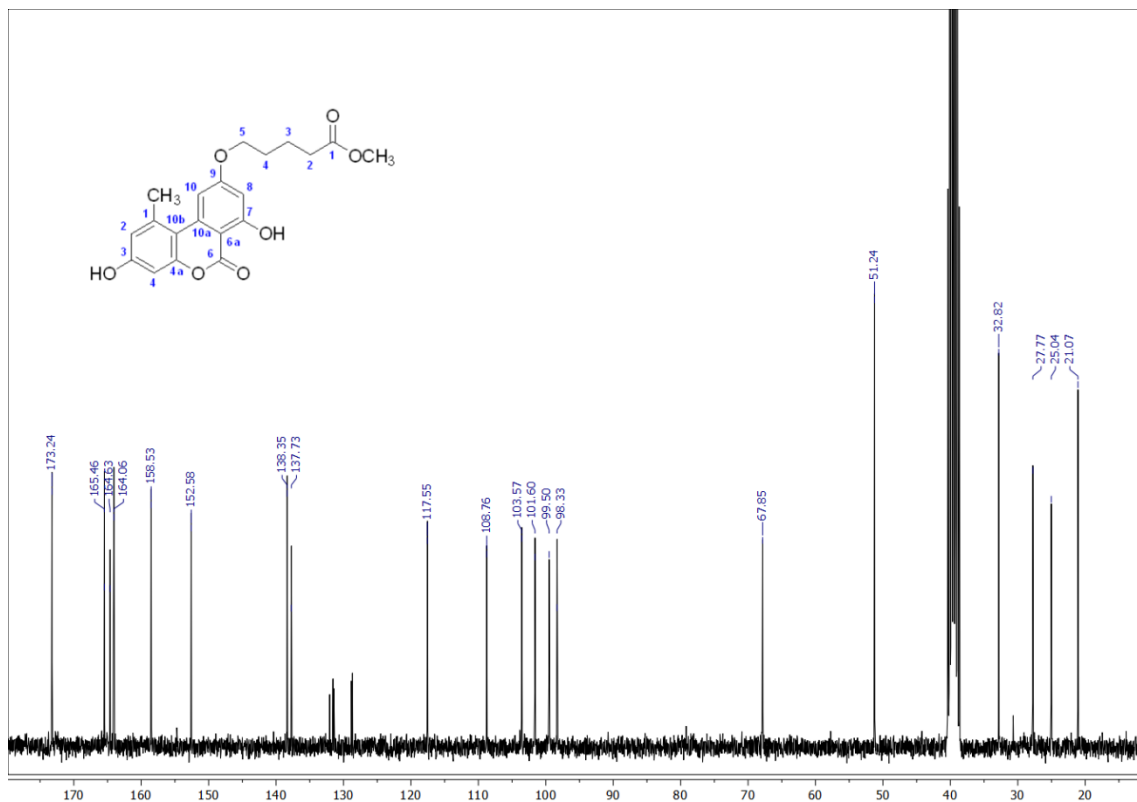
6. ANNEXES

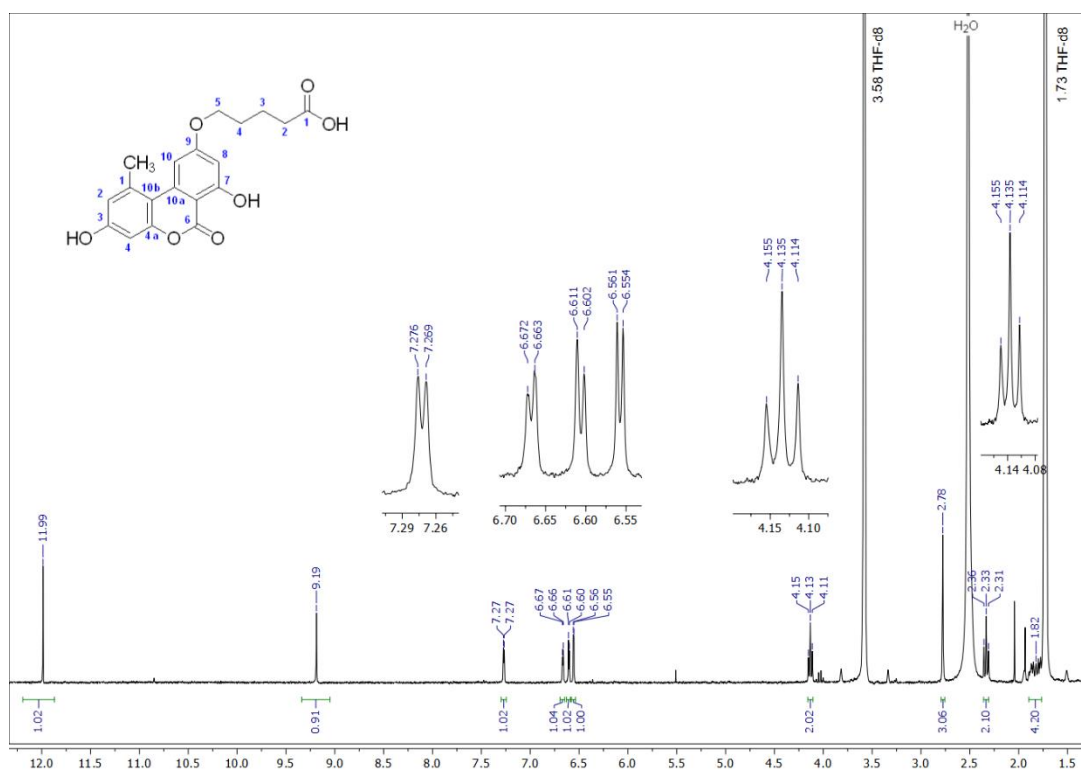
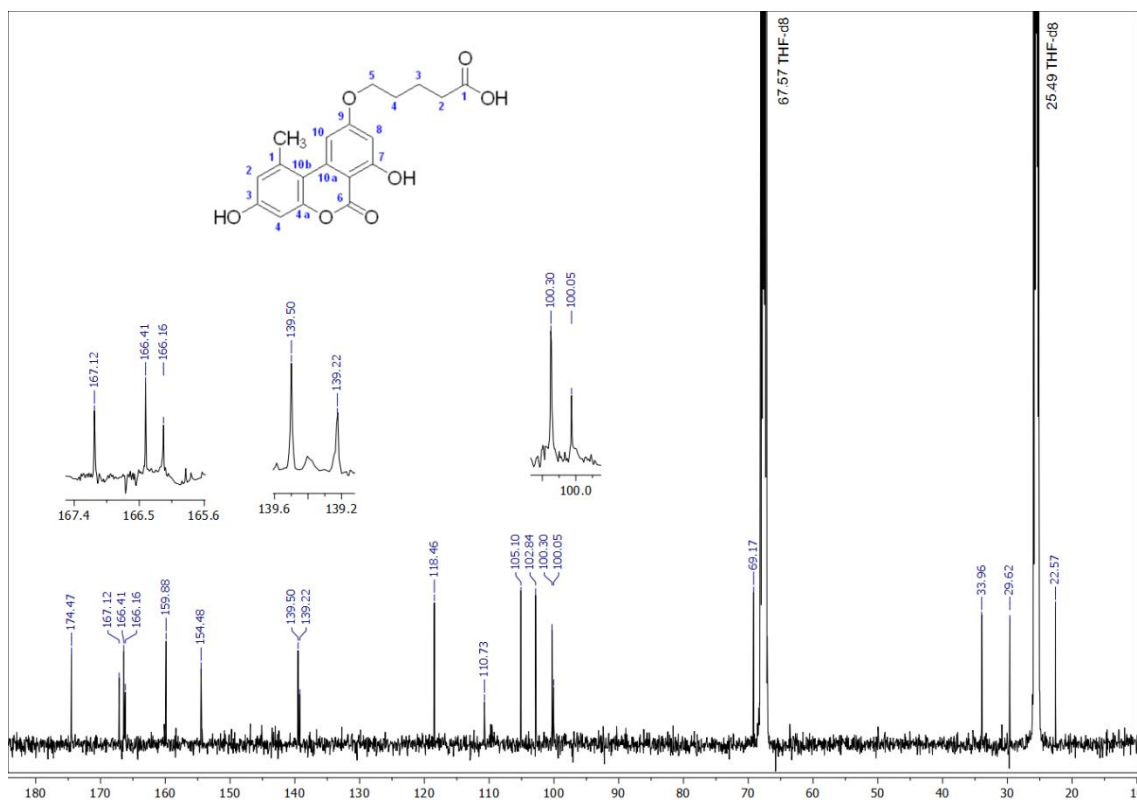
6.1. NMR spectra

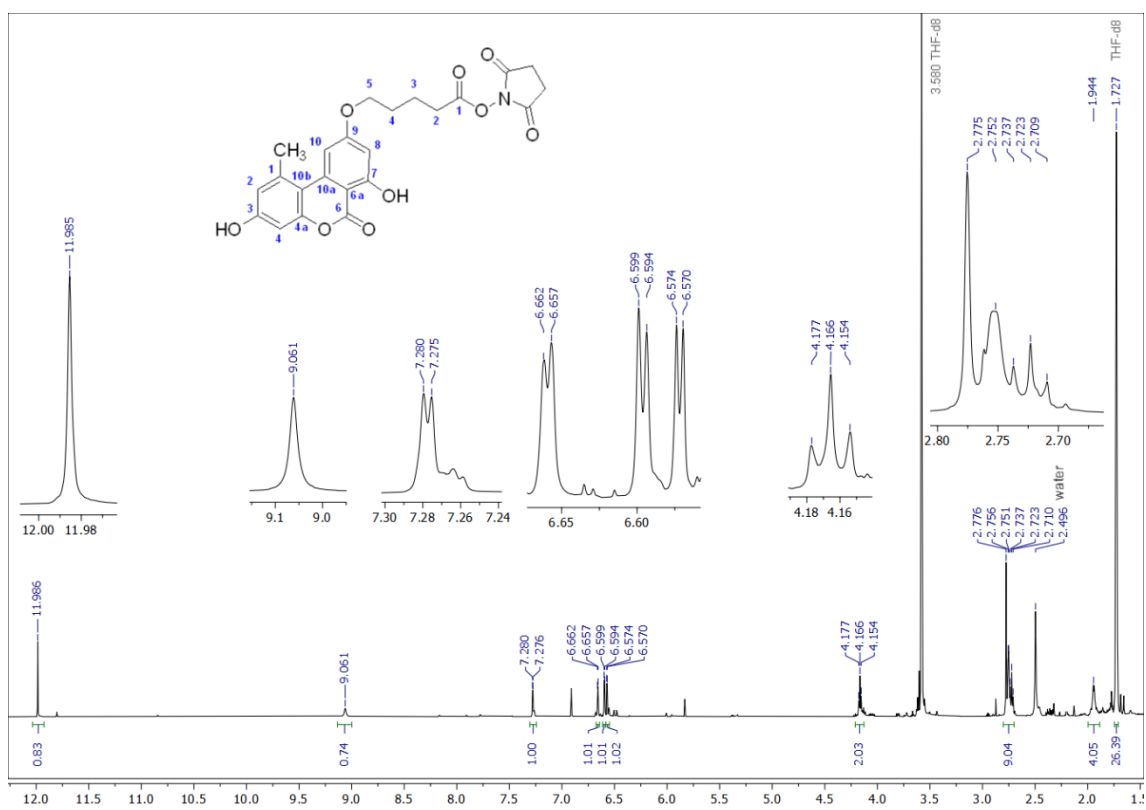
^1H NMR spectrum (300 MHz) of aryl triflate **4** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) of aryl triflate **4** in CDCl_3 

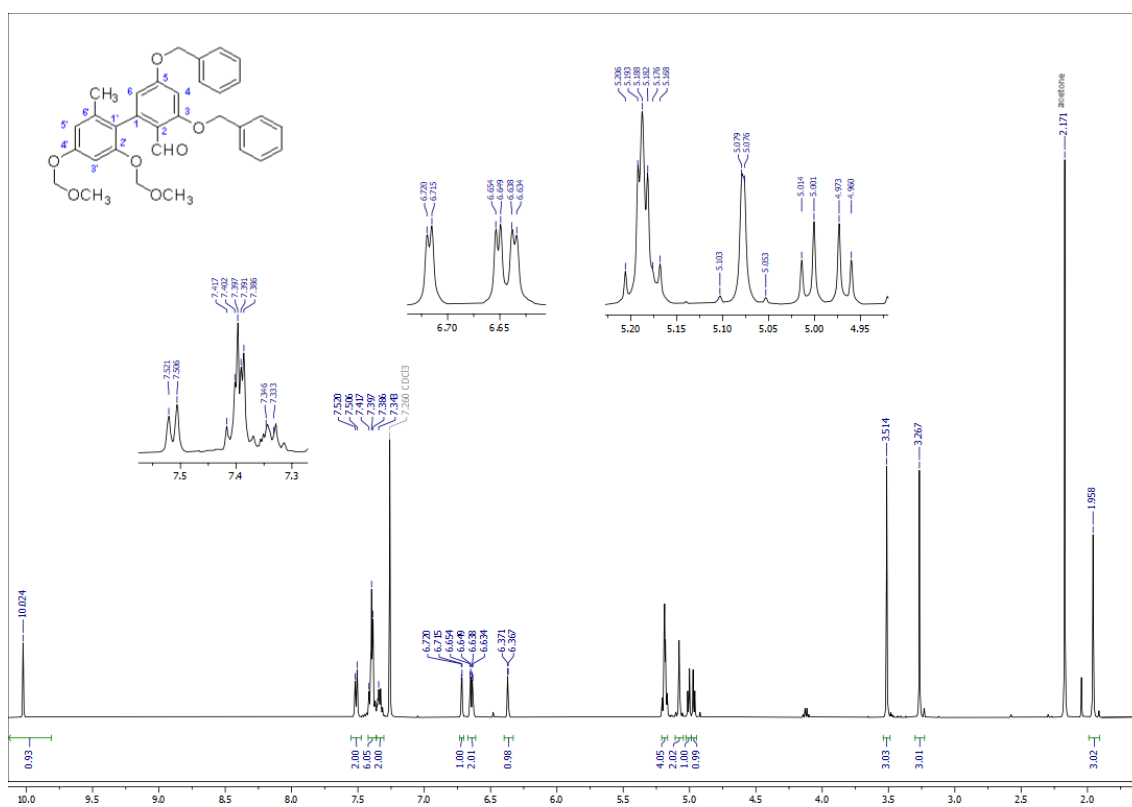
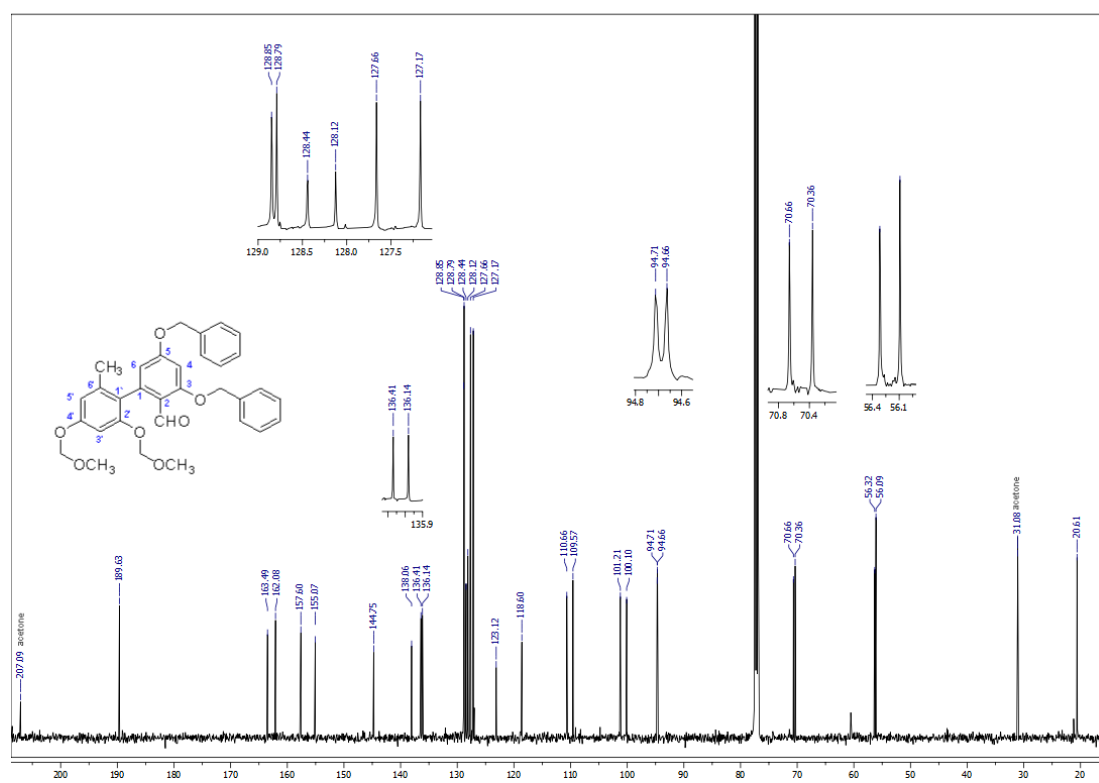
^1H NMR spectrum (300 MHz) of boronic acid **7** in DMSO-d_6 

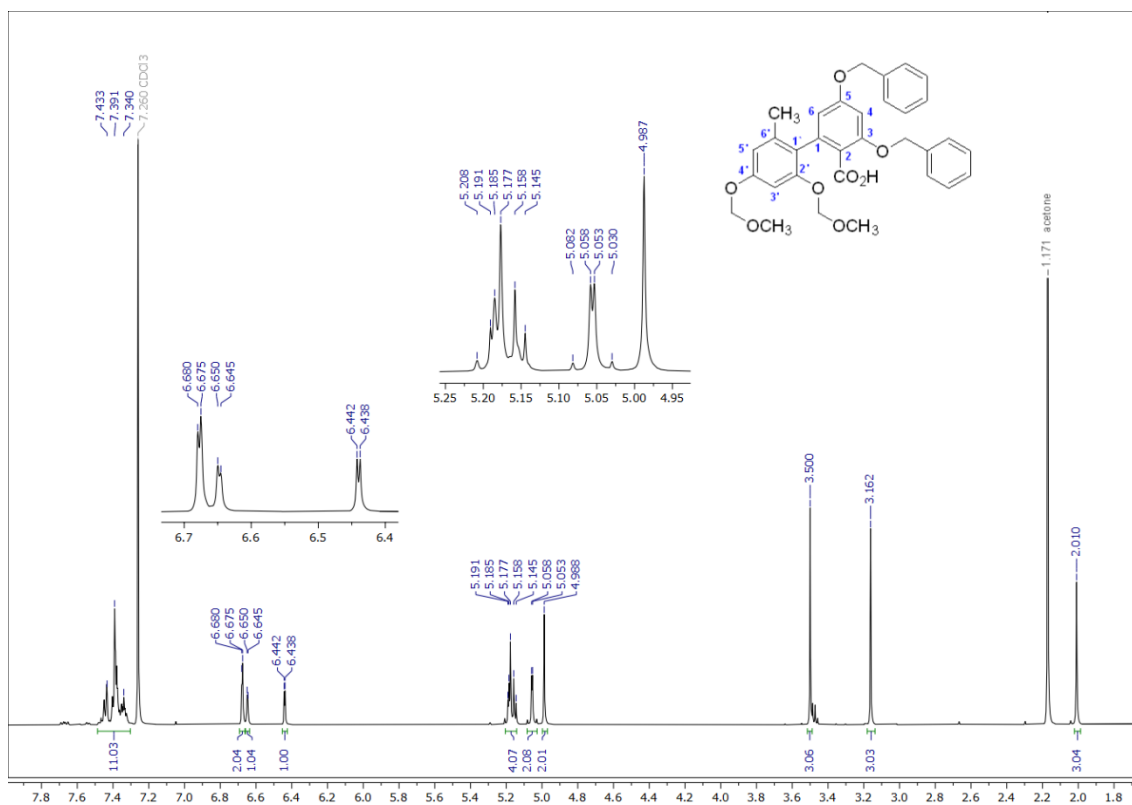
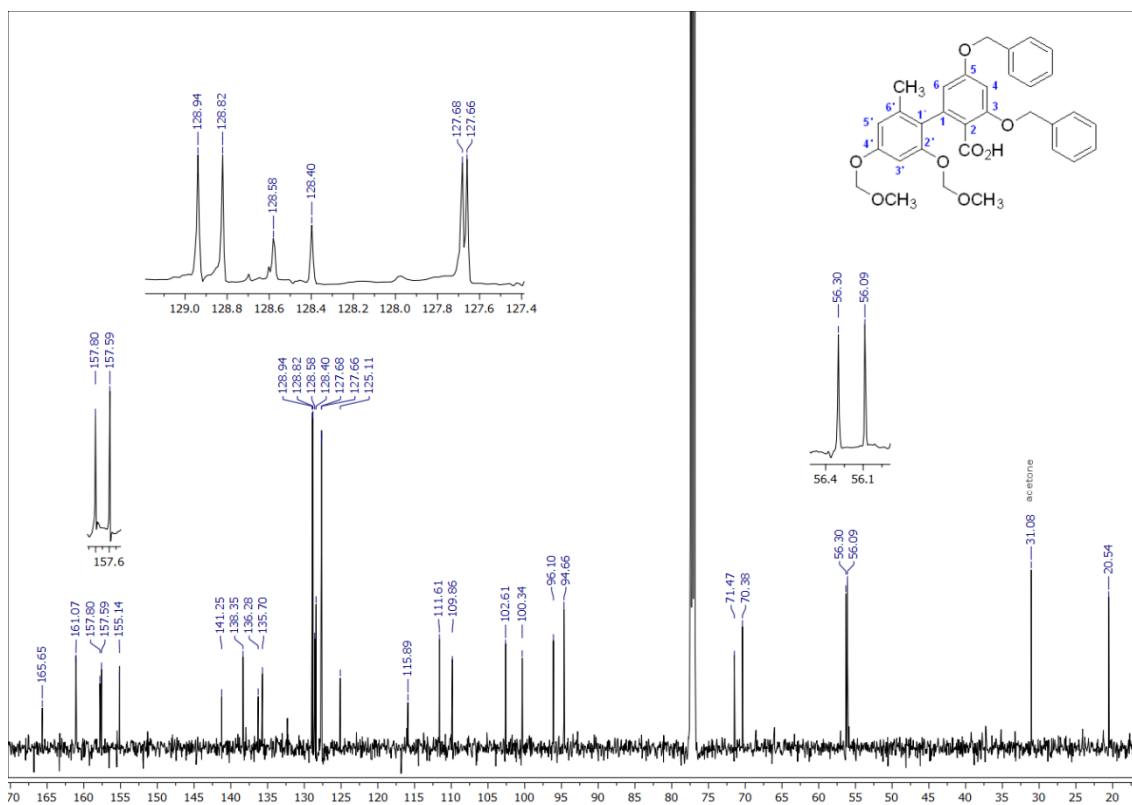
^1H NMR spectrum (300 MHz) of biaryl compound **8** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) of biaryl compound **8** in CDCl_3 

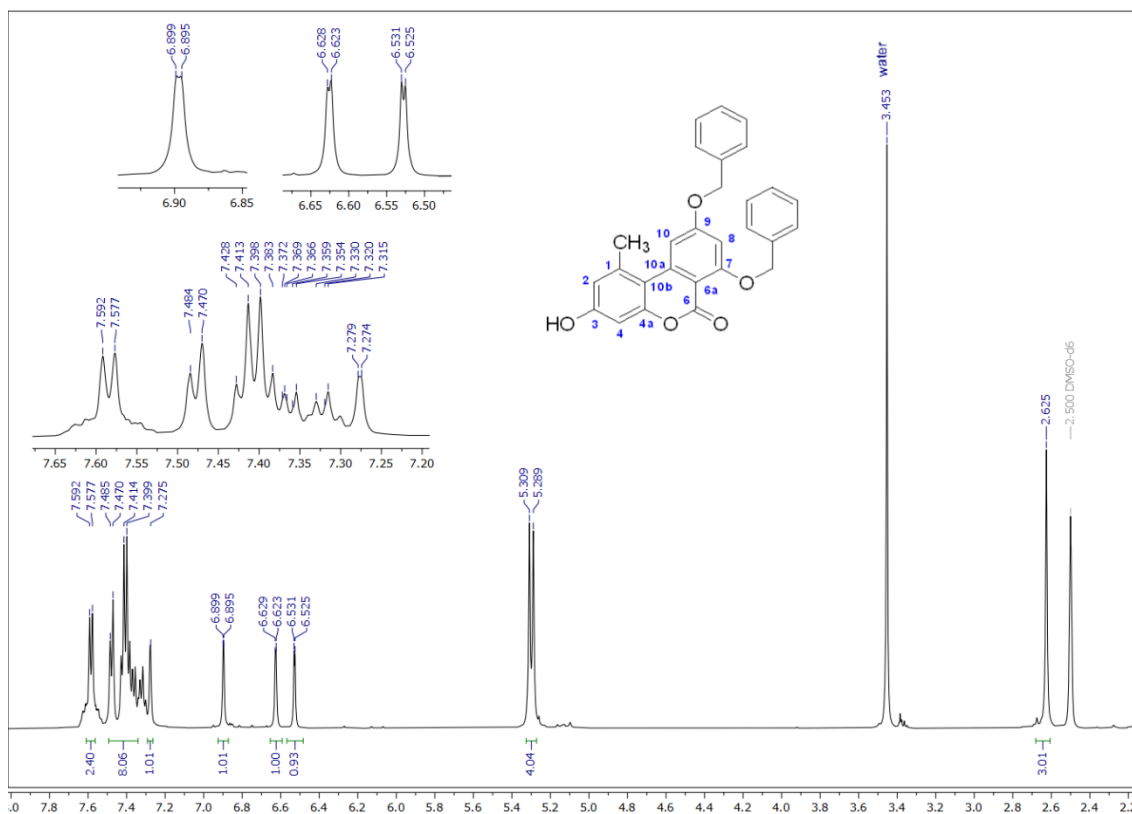
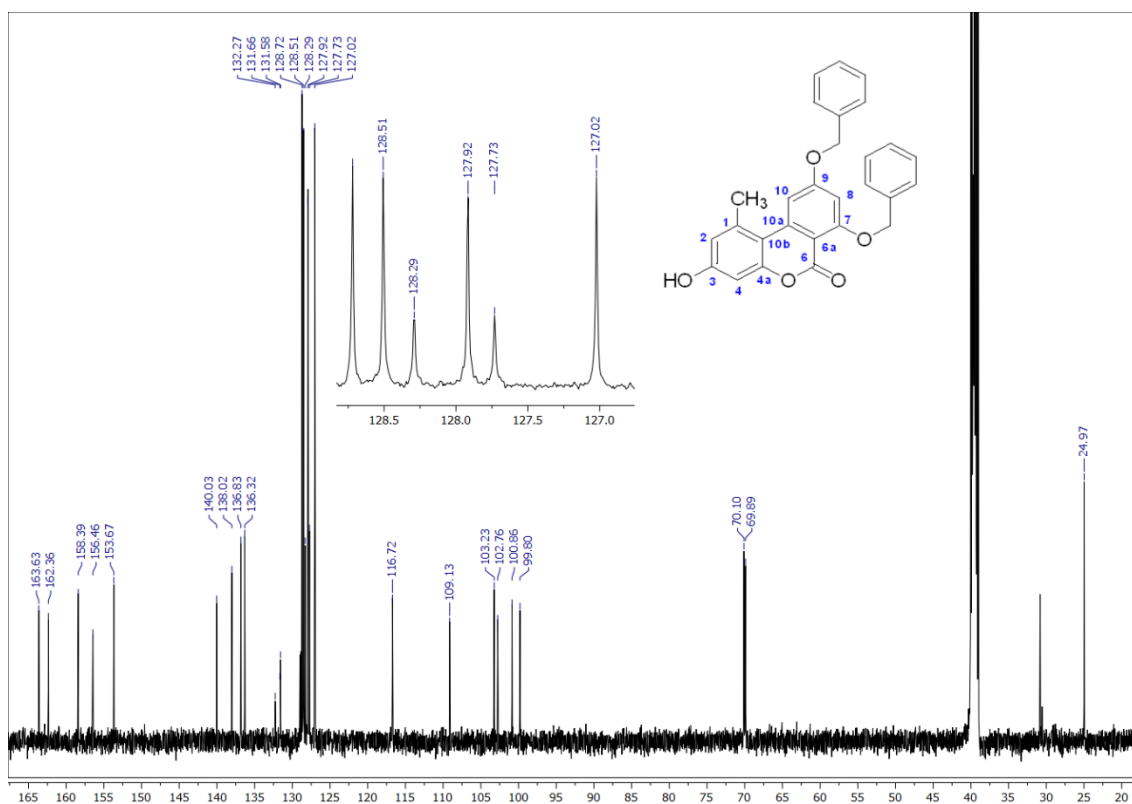
^1H NMR spectrum (300 MHz) of compound **12** in $\text{DMSO-}d_6$  ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) of compound **12** in $\text{DMSO-}d_6$ 

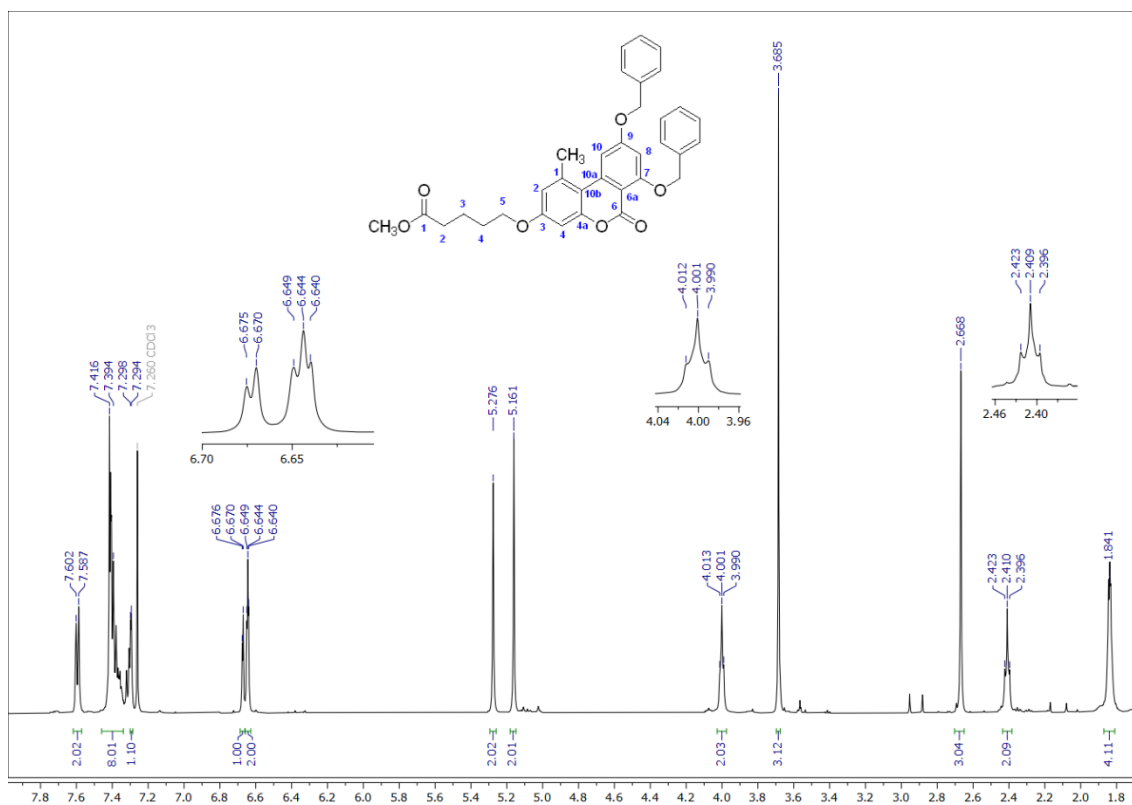
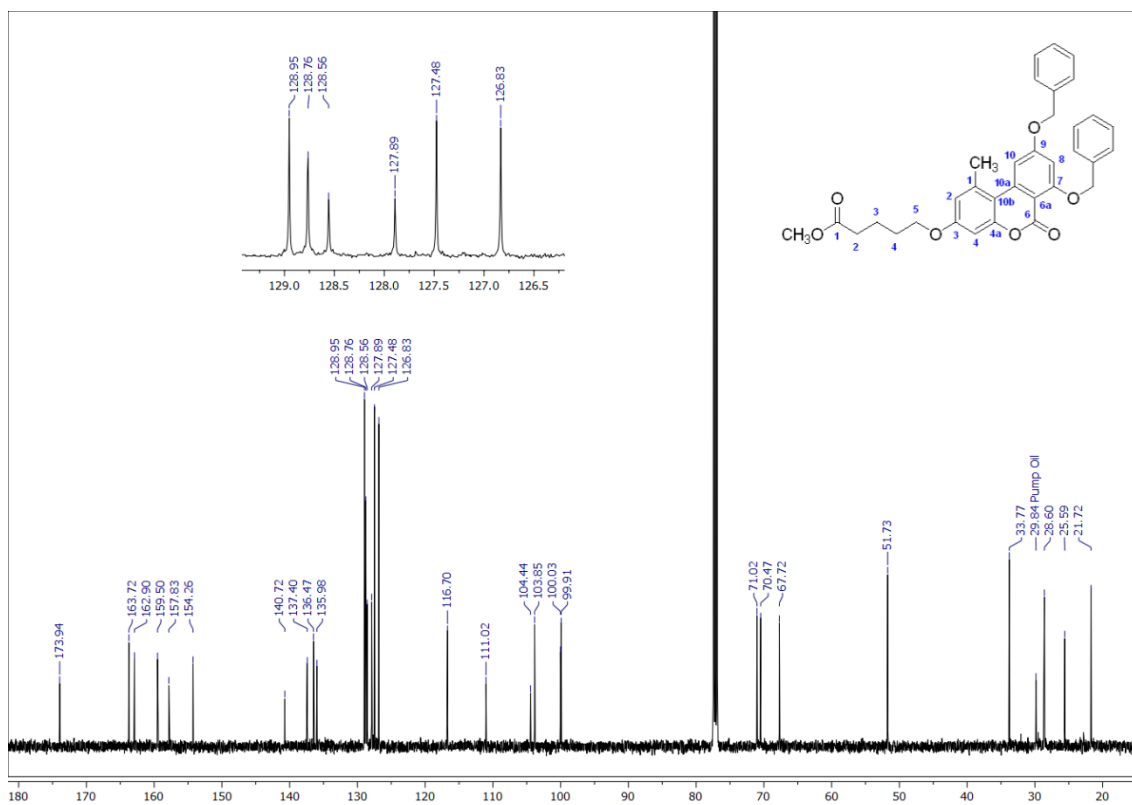
^1H NMR spectrum (300 MHz) of haptén AL α in THF- d_8  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of haptén AL α in THF- d_8 

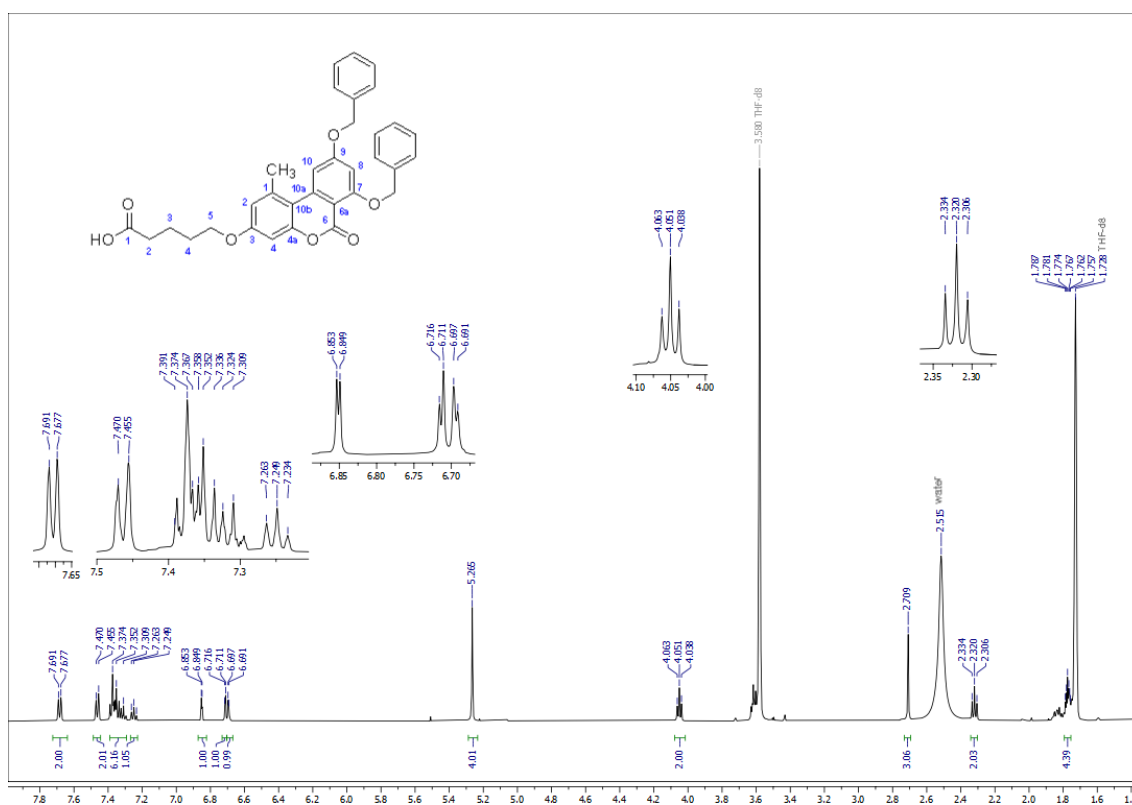
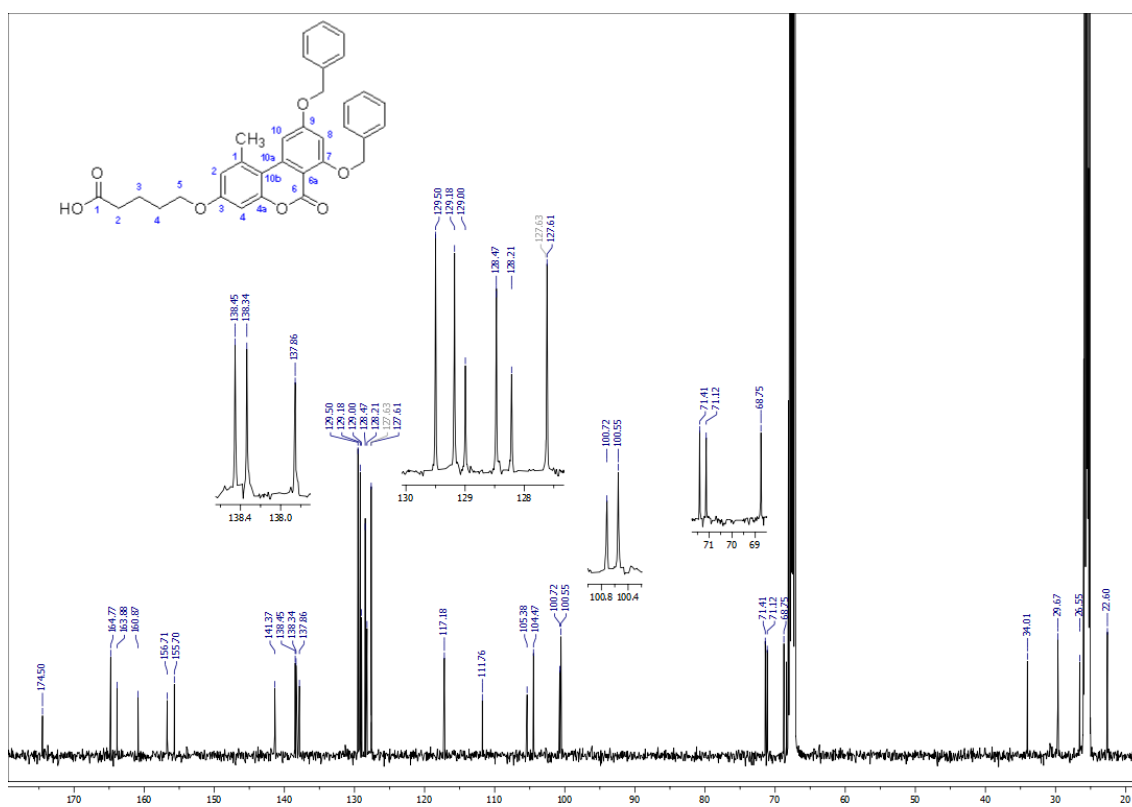
^1H NMR spectrum (500 MHz) of AL α -NHS ester in THF- d_8 

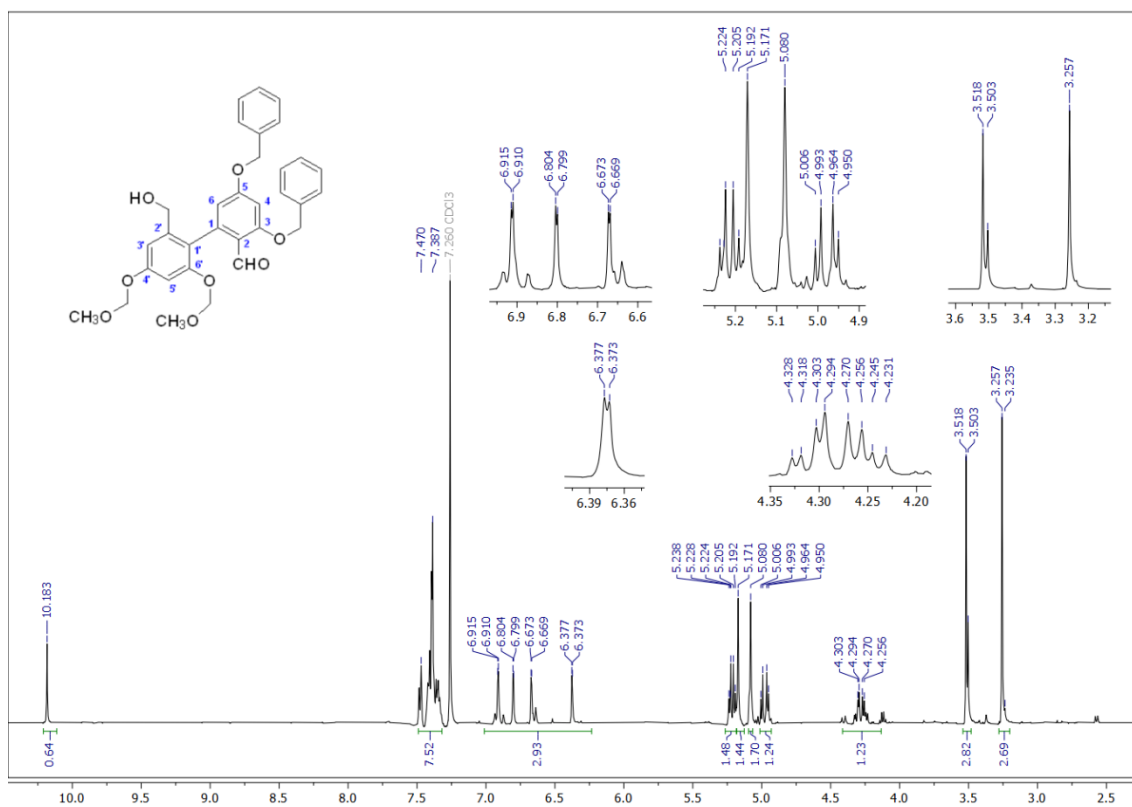
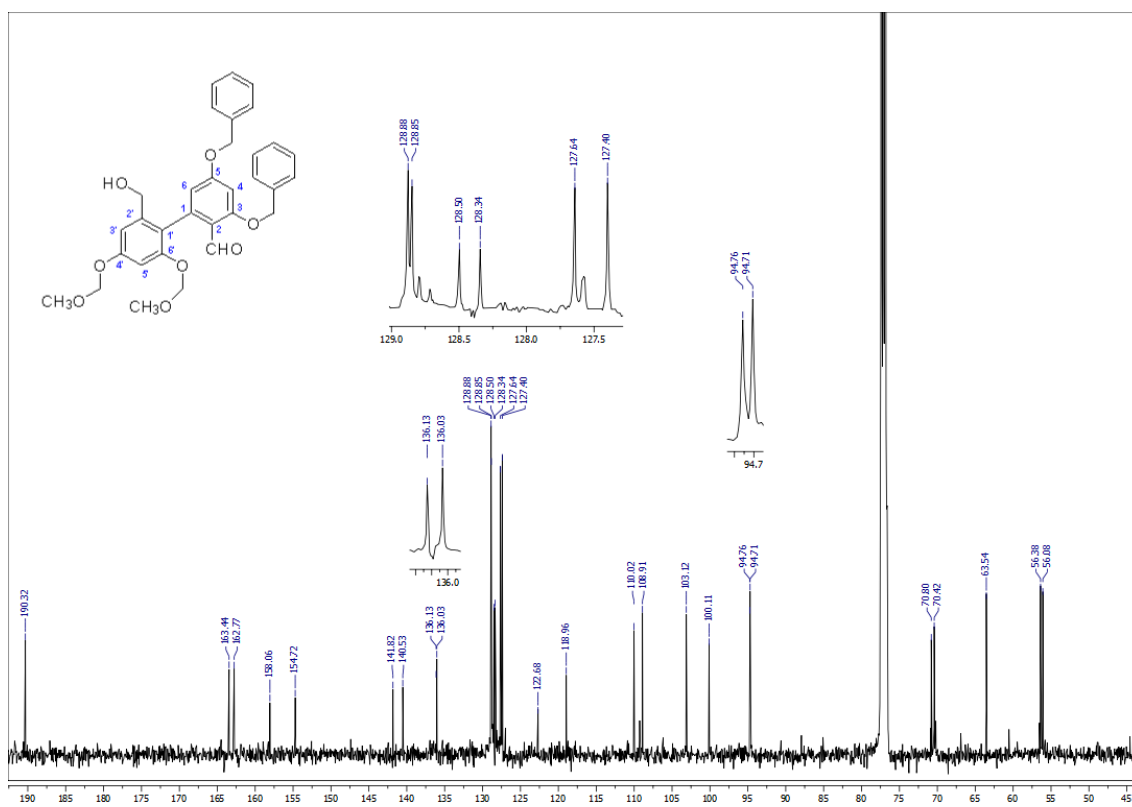
^1H NMR spectrum (500 MHz) of biphenyl-2-carbaldehyde **14** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of biphenyl-2-carbaldehyde **14** in CDCl_3 

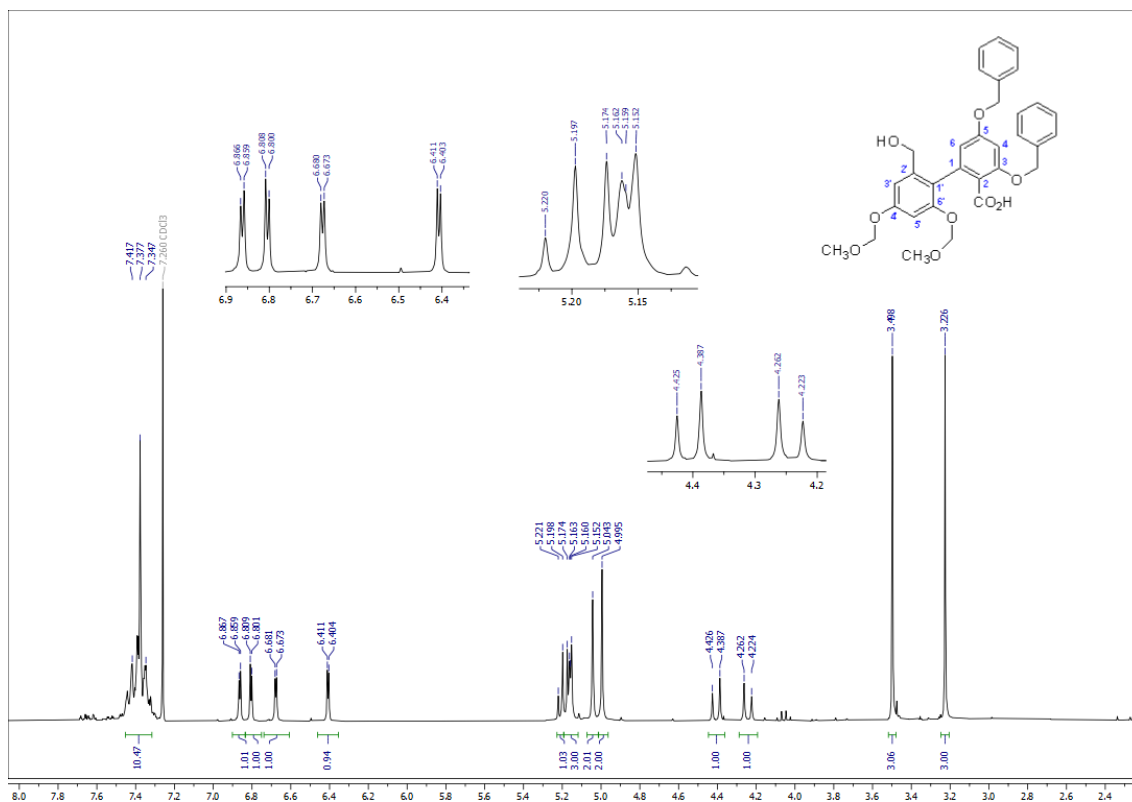
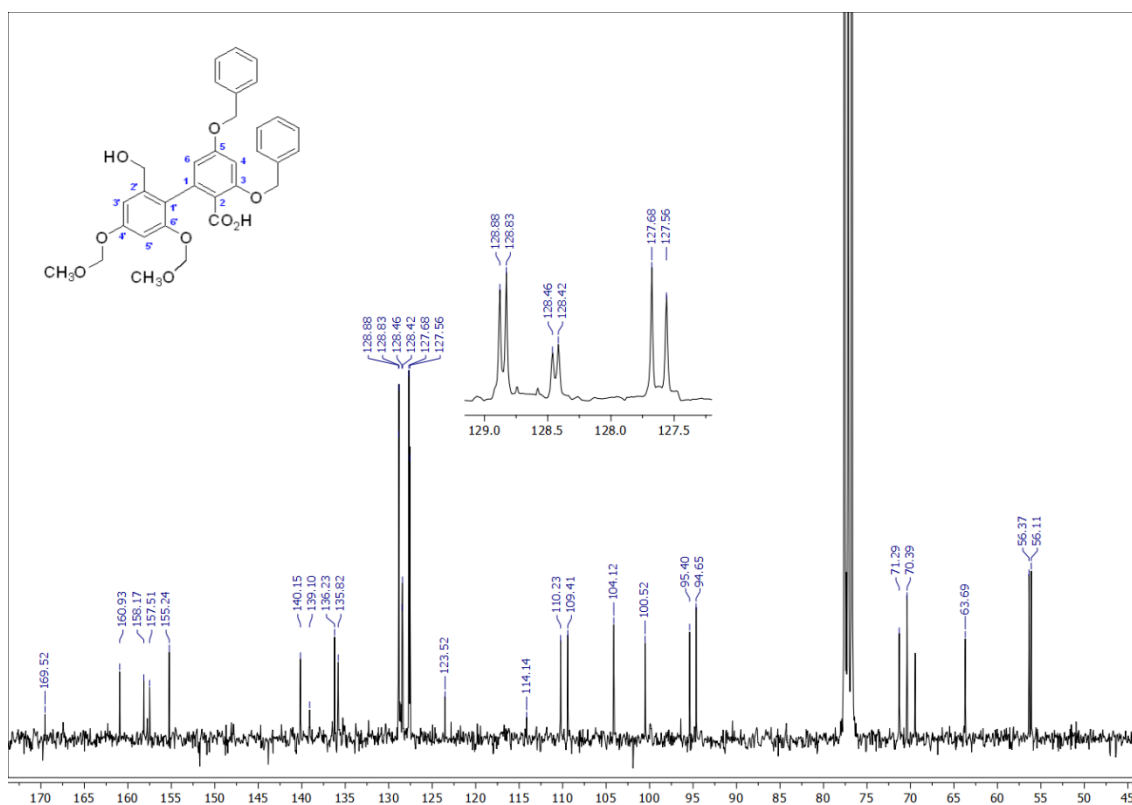
^1H NMR spectrum (500 MHz) of biphenyl-2-carboxylic acid **15** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of biphenyl-2-carboxylic acid **15** in CDCl_3 

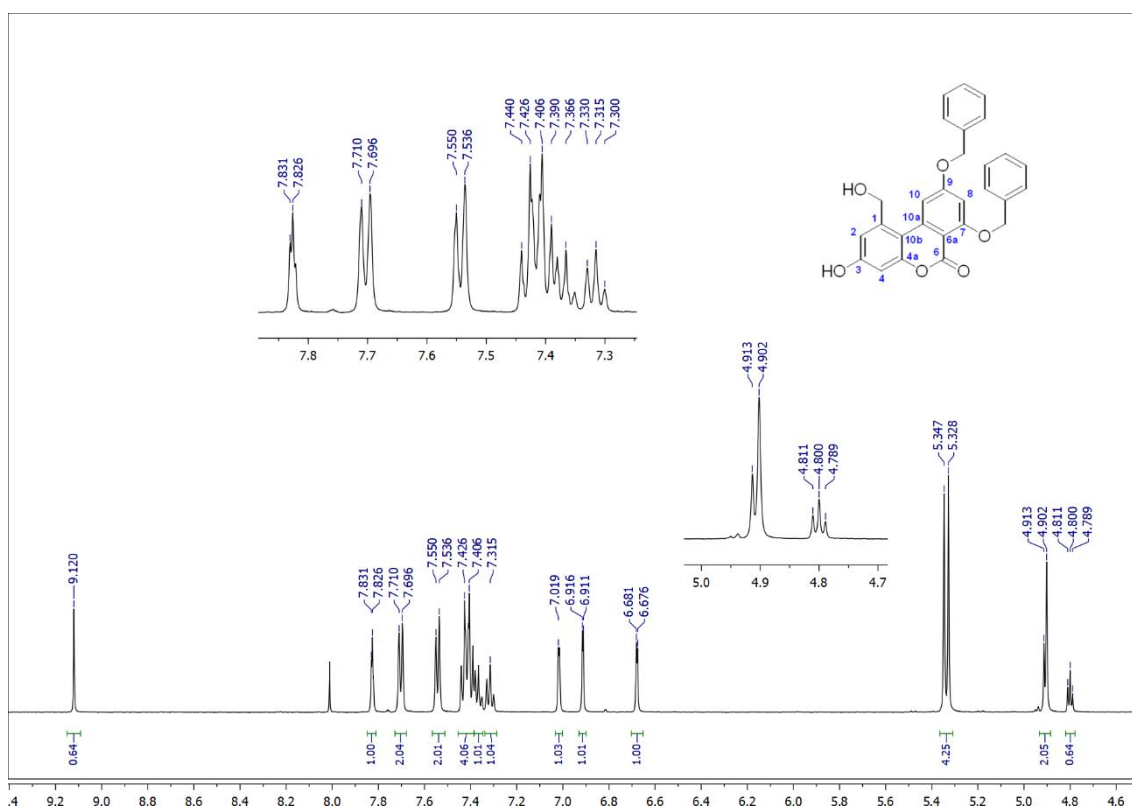
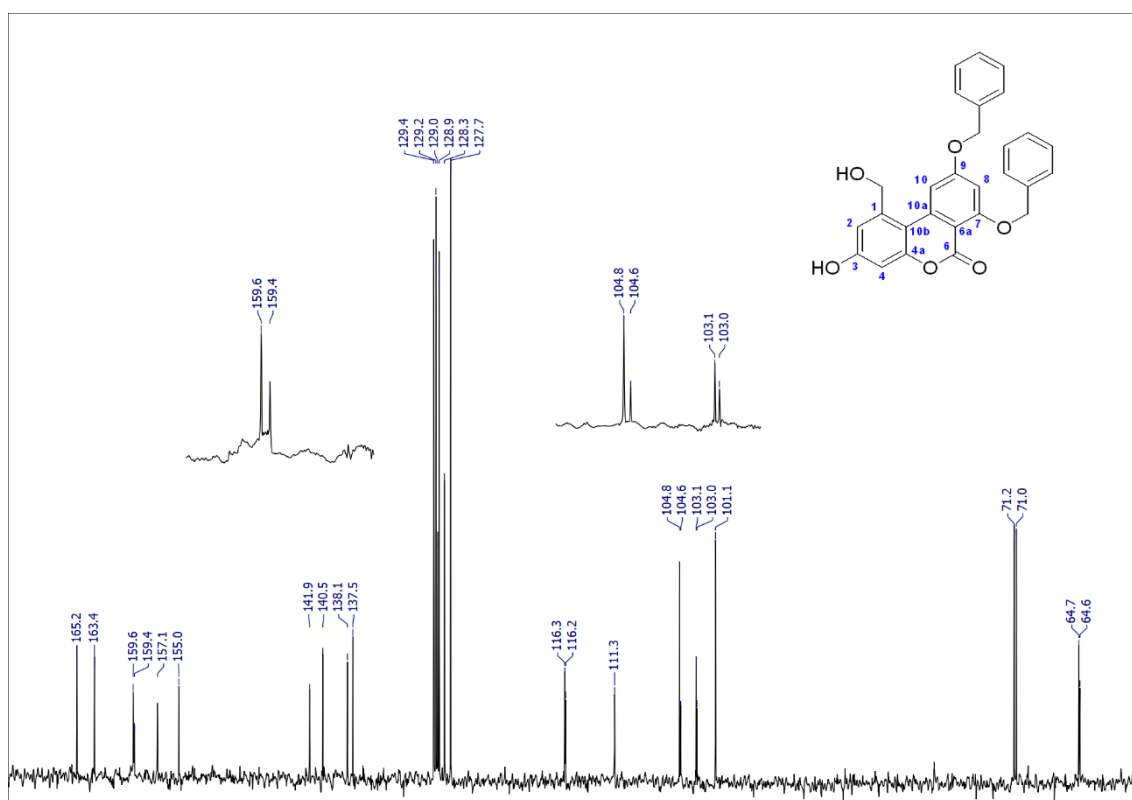
^1H NMR spectrum (500 MHz) of 7,9-dibenzyl ether of alternariol (**16**) in DMSO-d_6  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of 7,9-dibenzyl ether of alternariol (**16**) in DMSO-d_6 

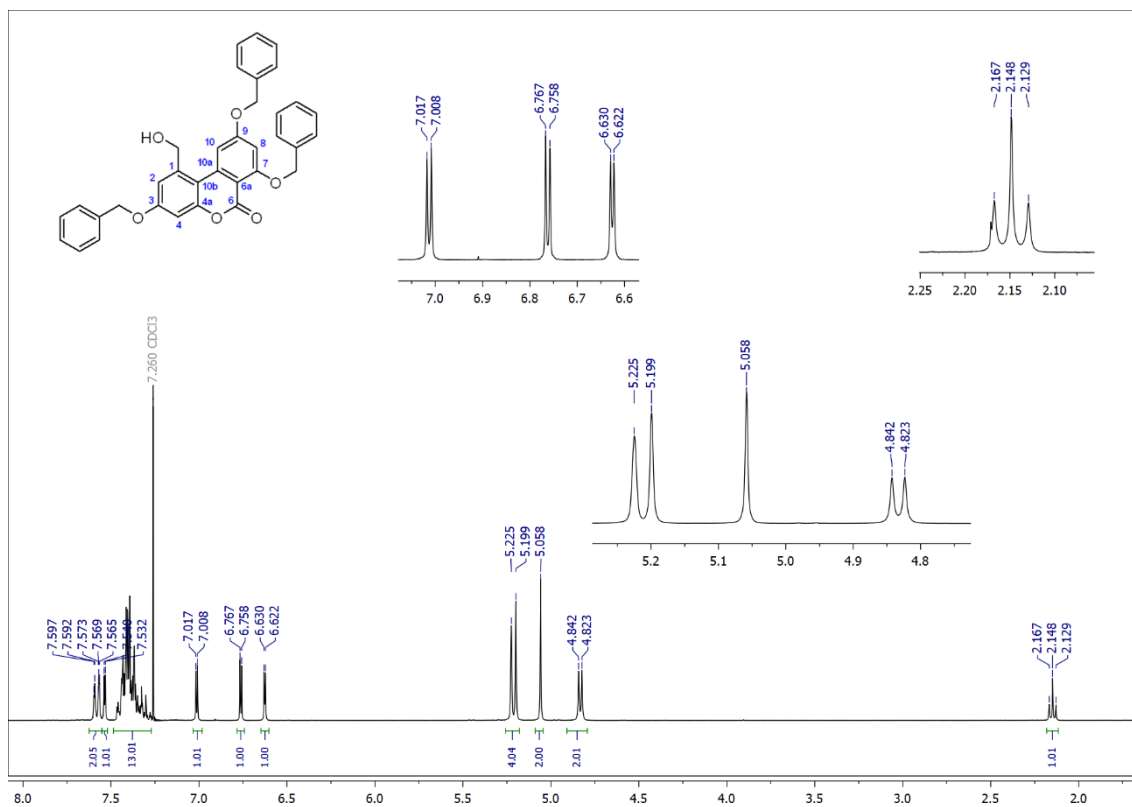
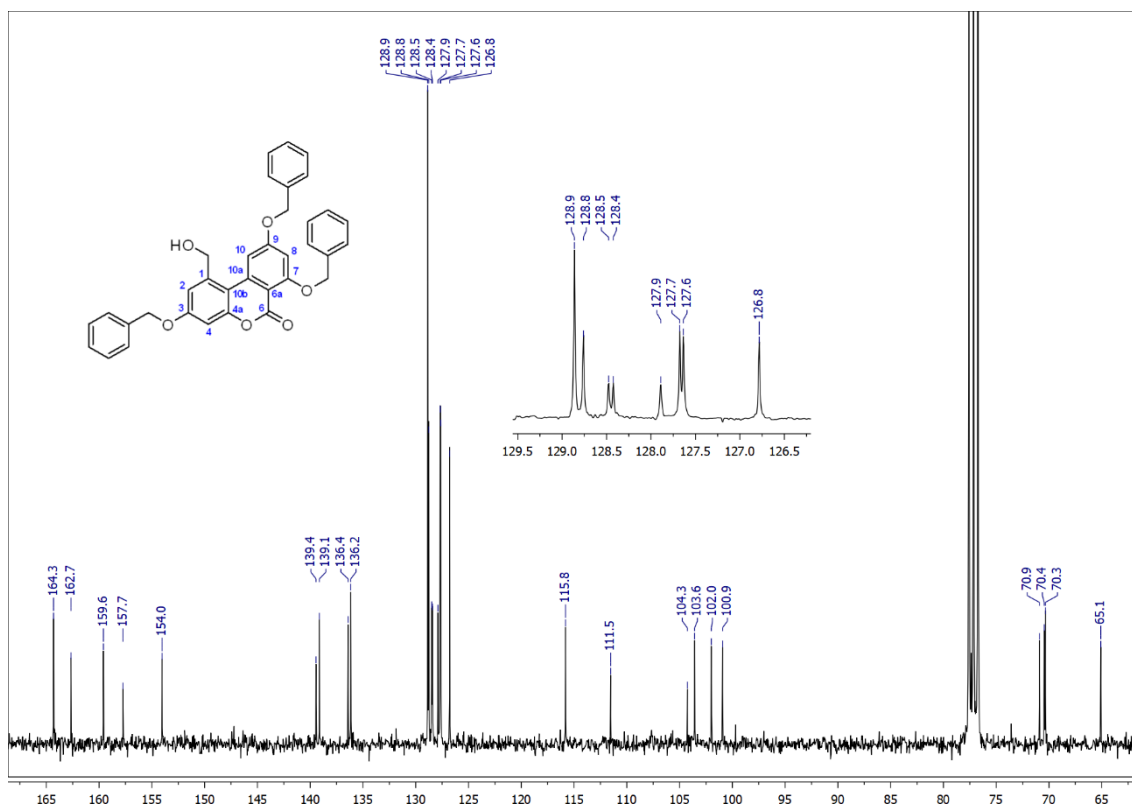
^1H NMR spectrum (500 MHz) of methyl ester **17** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of methyl ester **17** in CDCl_3 

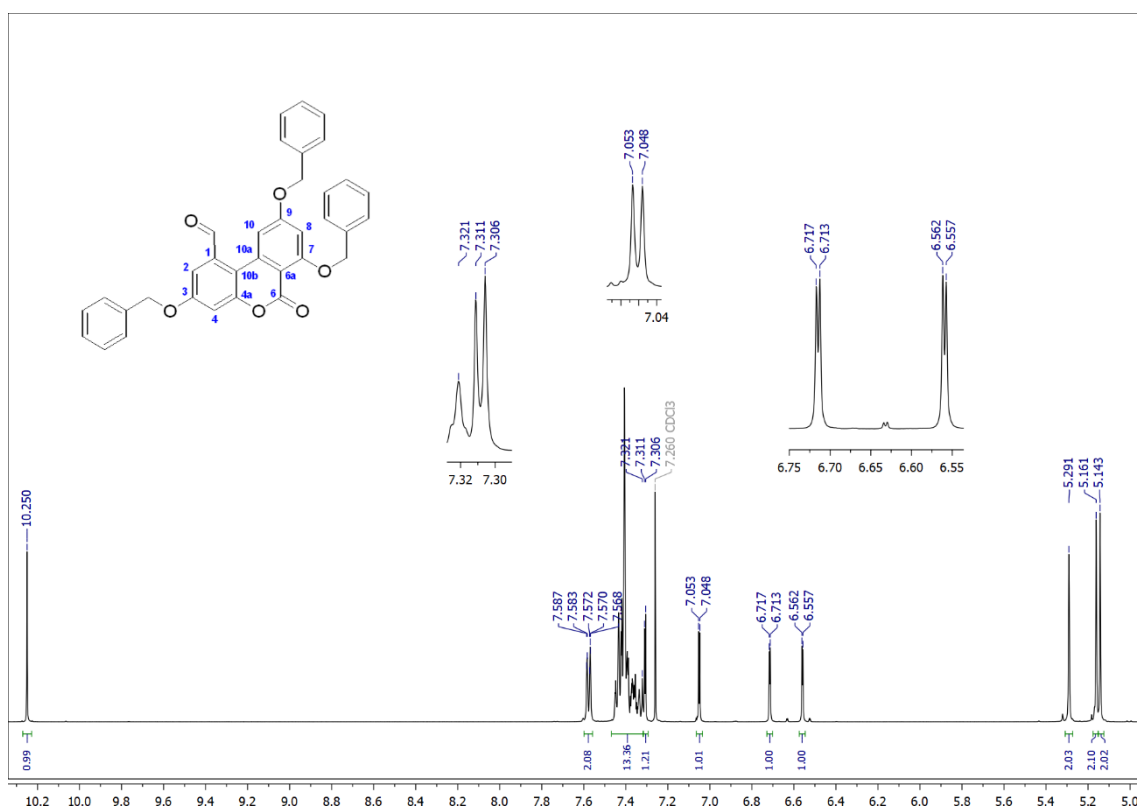
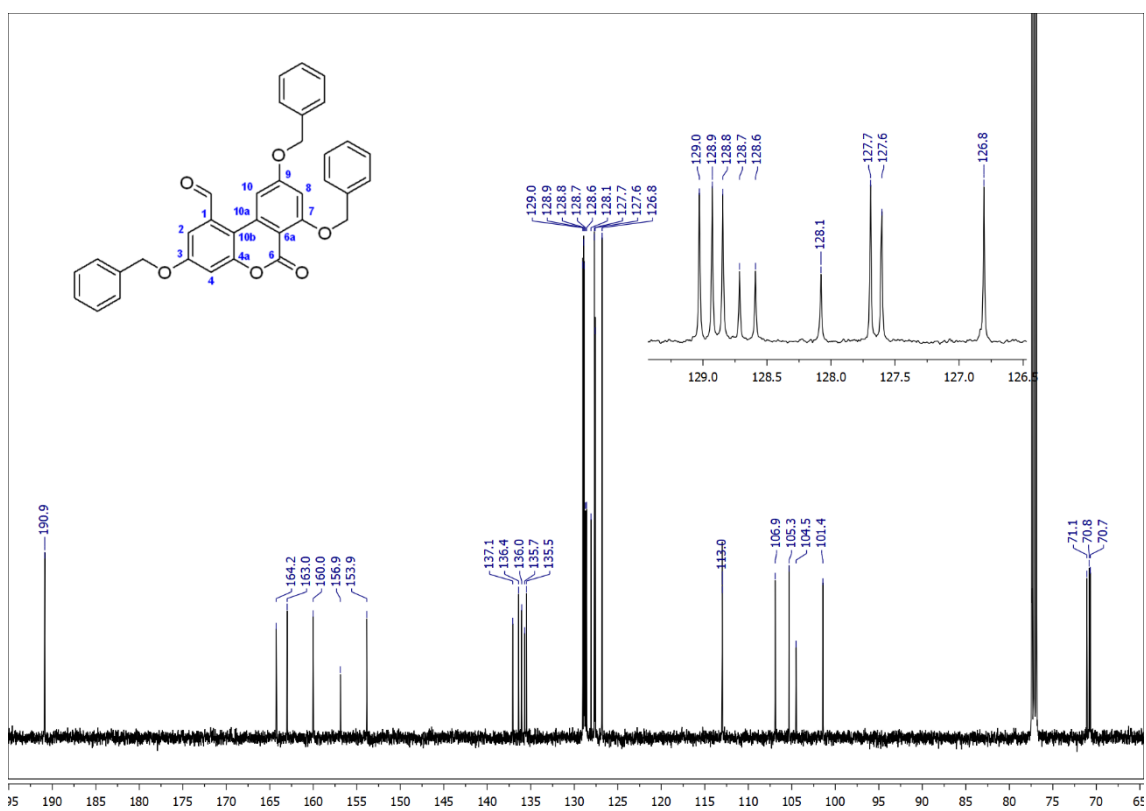
^1H NMR spectrum (500 MHz) of dibenzyl ether of hapten ALb (**18**) in THF- d_8  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of dibenzyl ether of hapten ALb (**18**) in THF- d_8 

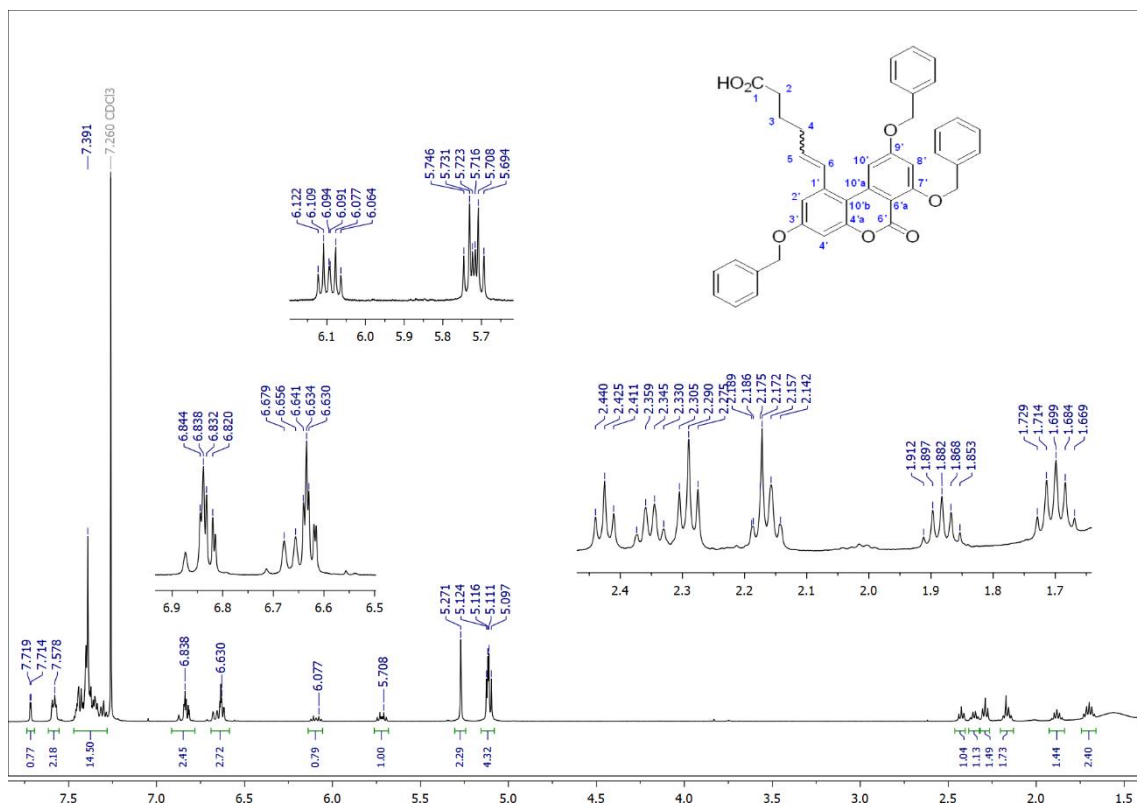
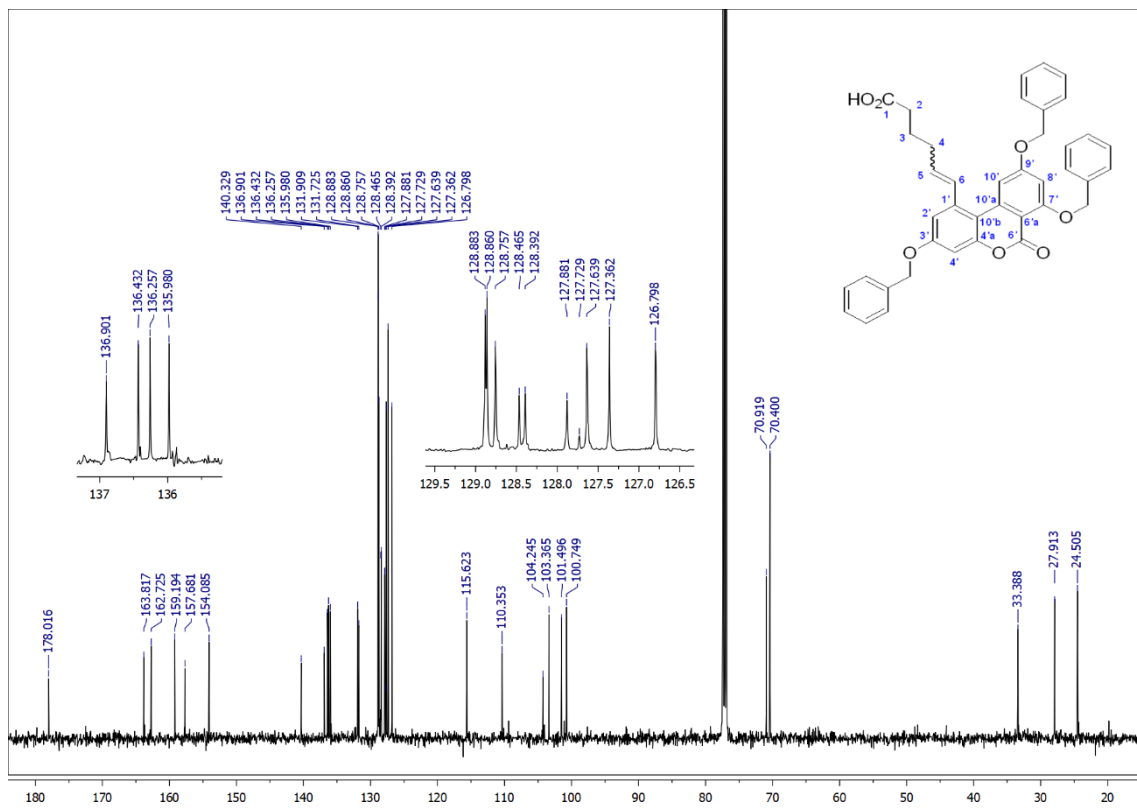
^1H NMR spectrum (500 MHz) of biphenyl-2-carbaldehyde **21** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of biphenyl-2-carbaldehyde **21** in CDCl_3 

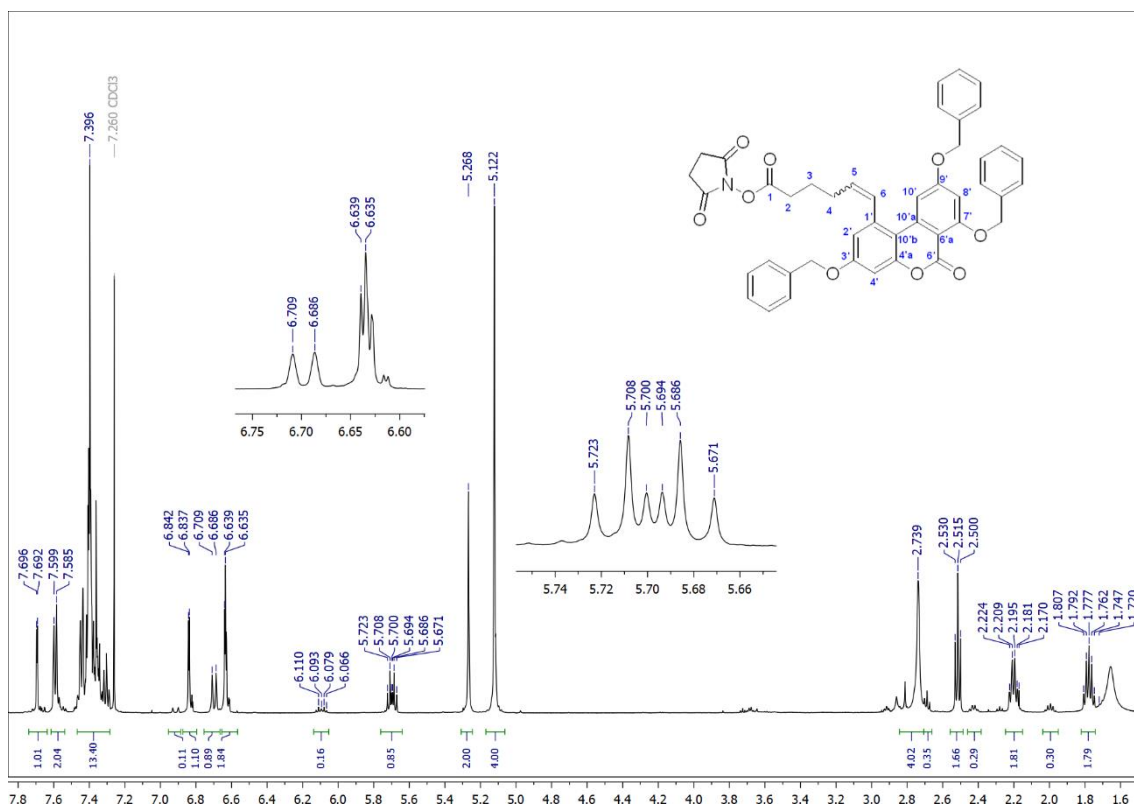
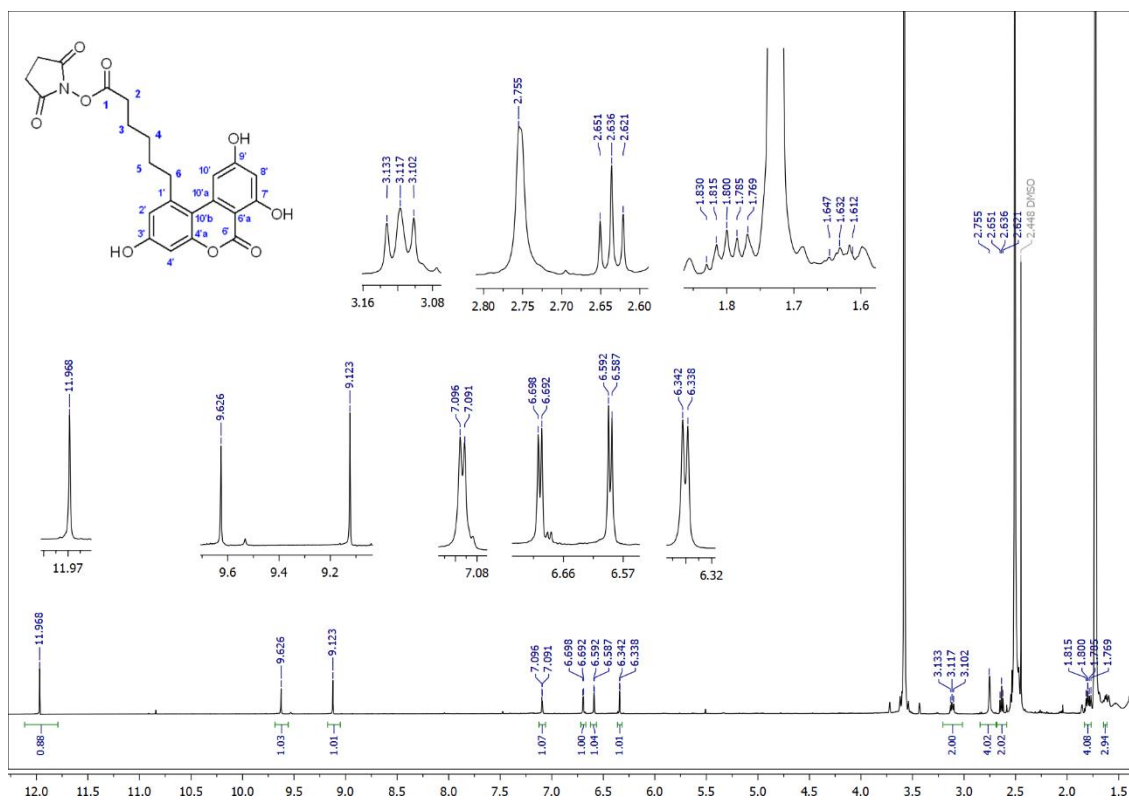
^1H NMR spectrum (300 MHz) of biarylcarboxylic acid **22** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) of biarylcarboxylic acid **22** in CDCl_3 

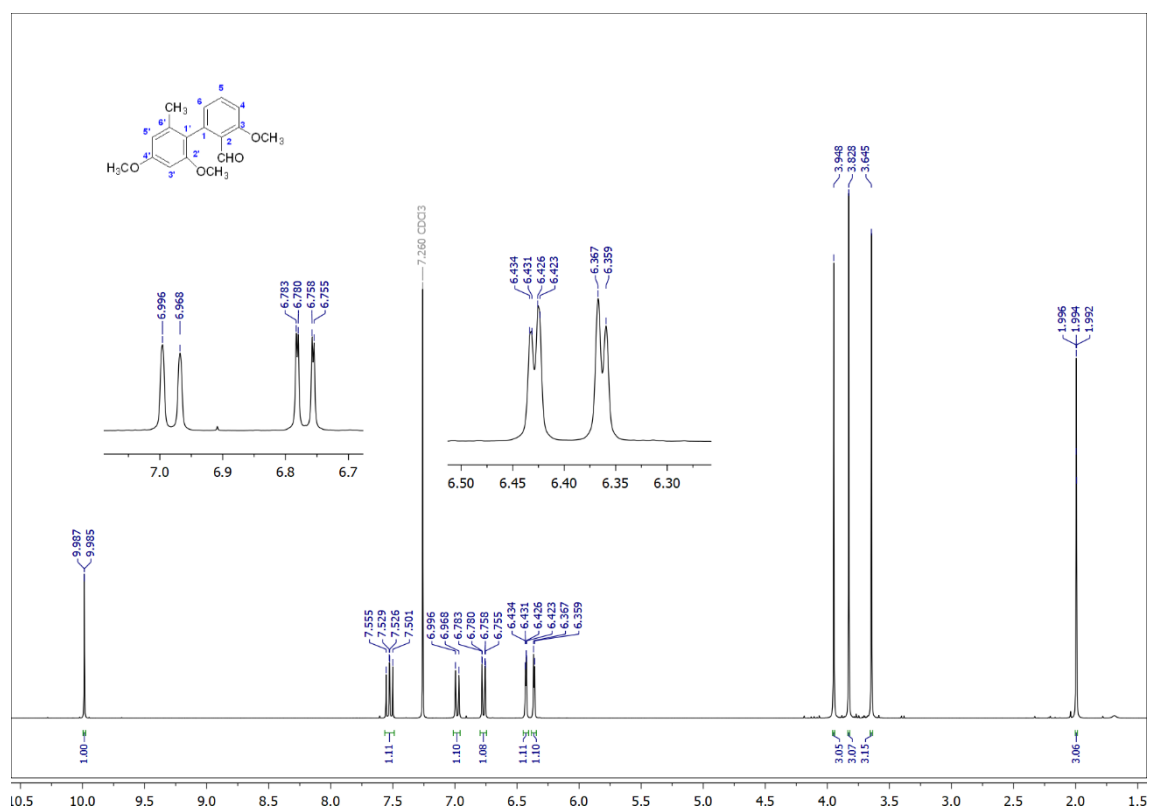
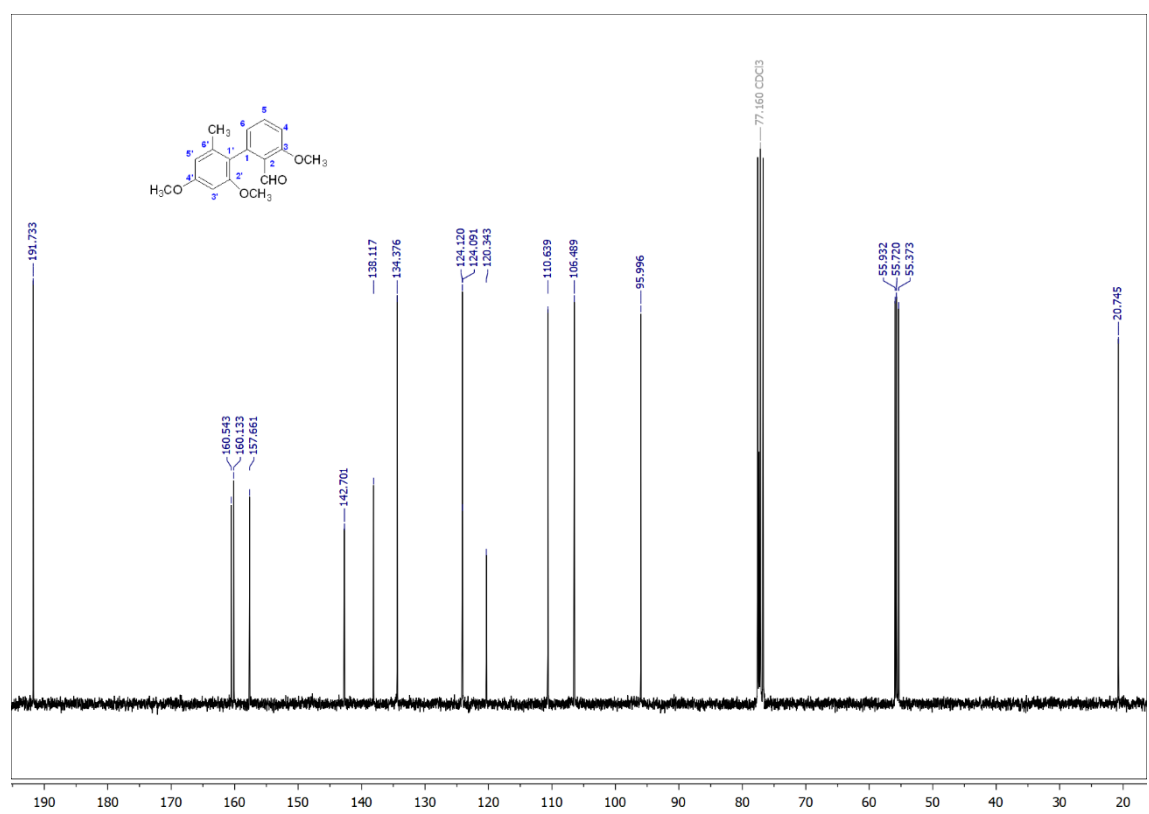
^1H NMR spectrum (500 MHz) of compound **23** in acetone- d_6  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of compound **23** in acetone- d_6 

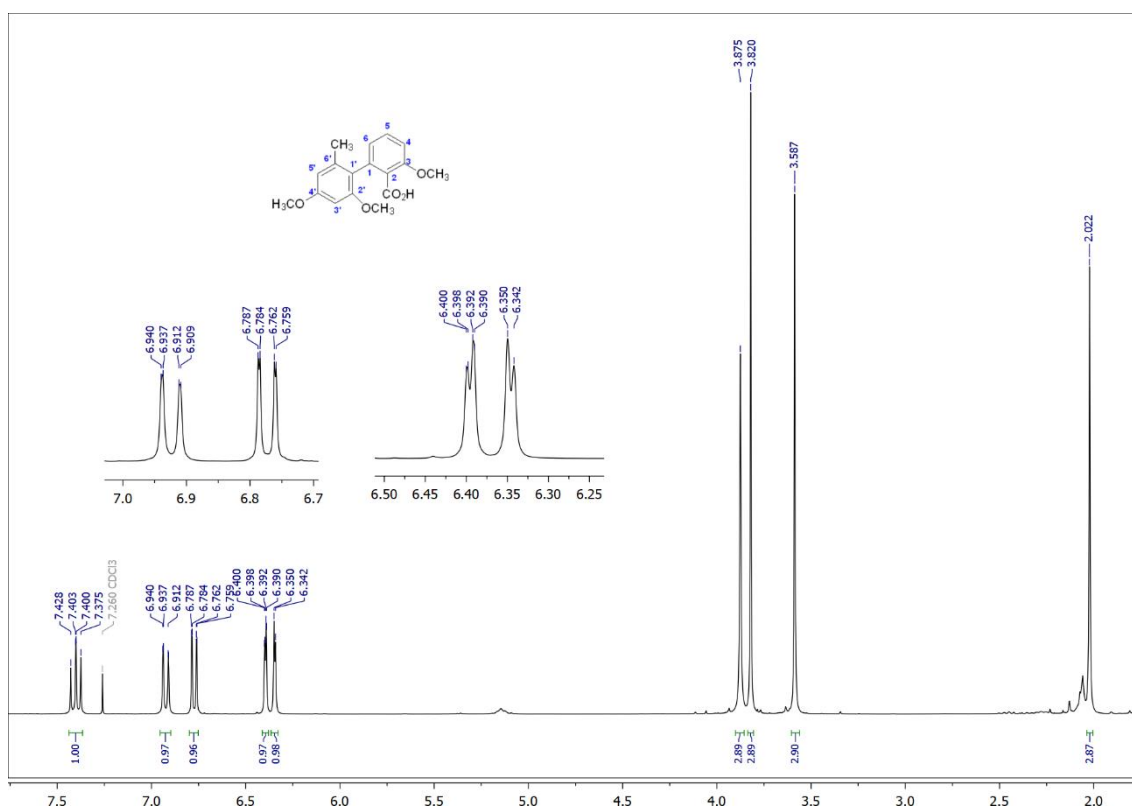
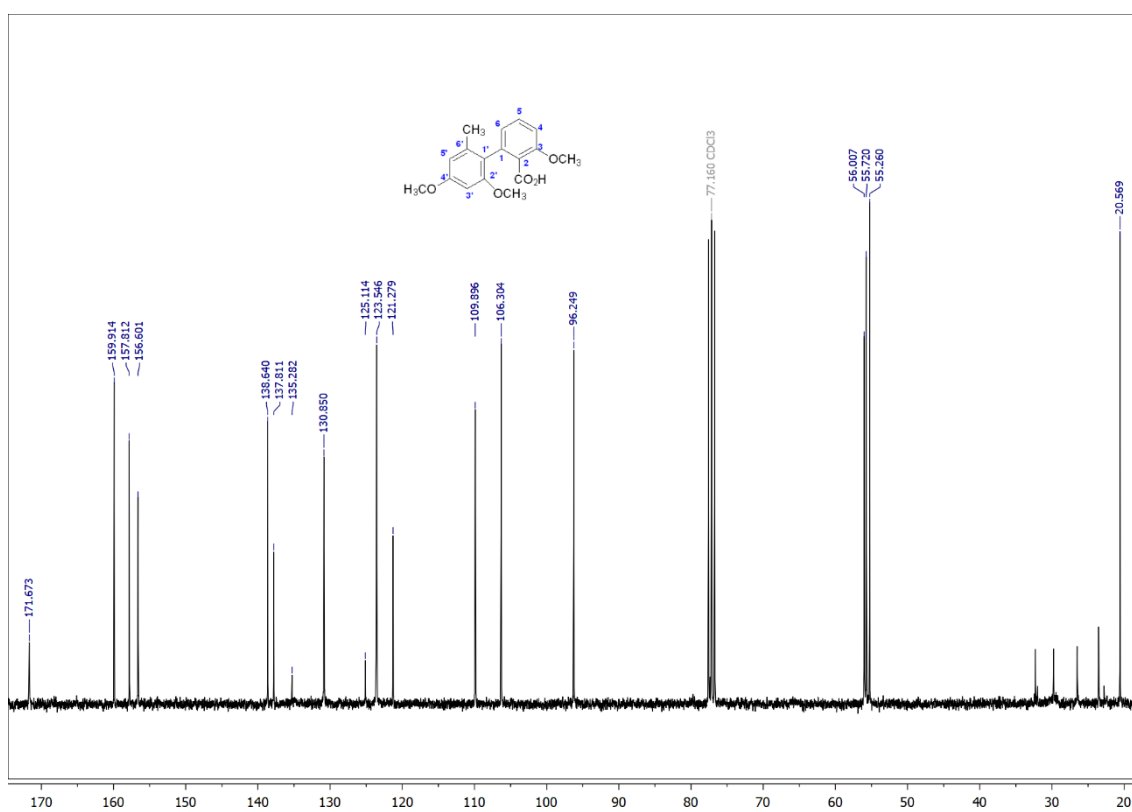
^1H NMR spectrum (300 MHz) of compound **24** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) of compound **24** in CDCl_3 

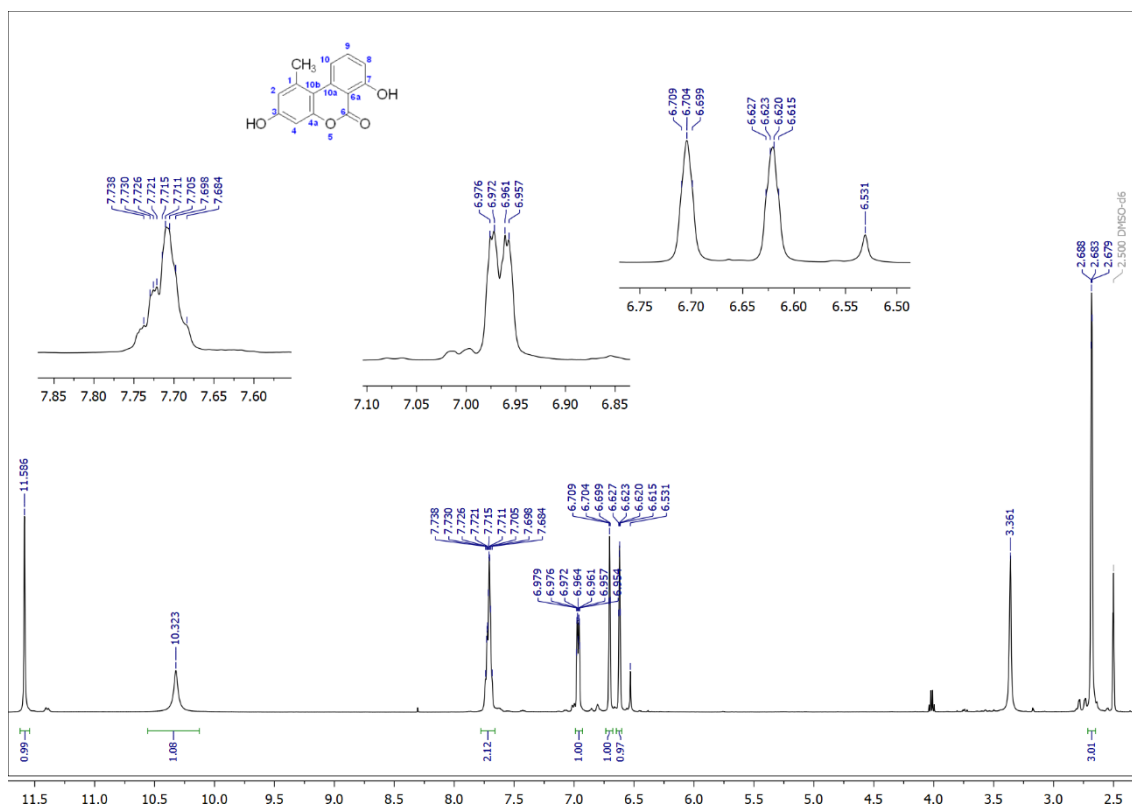
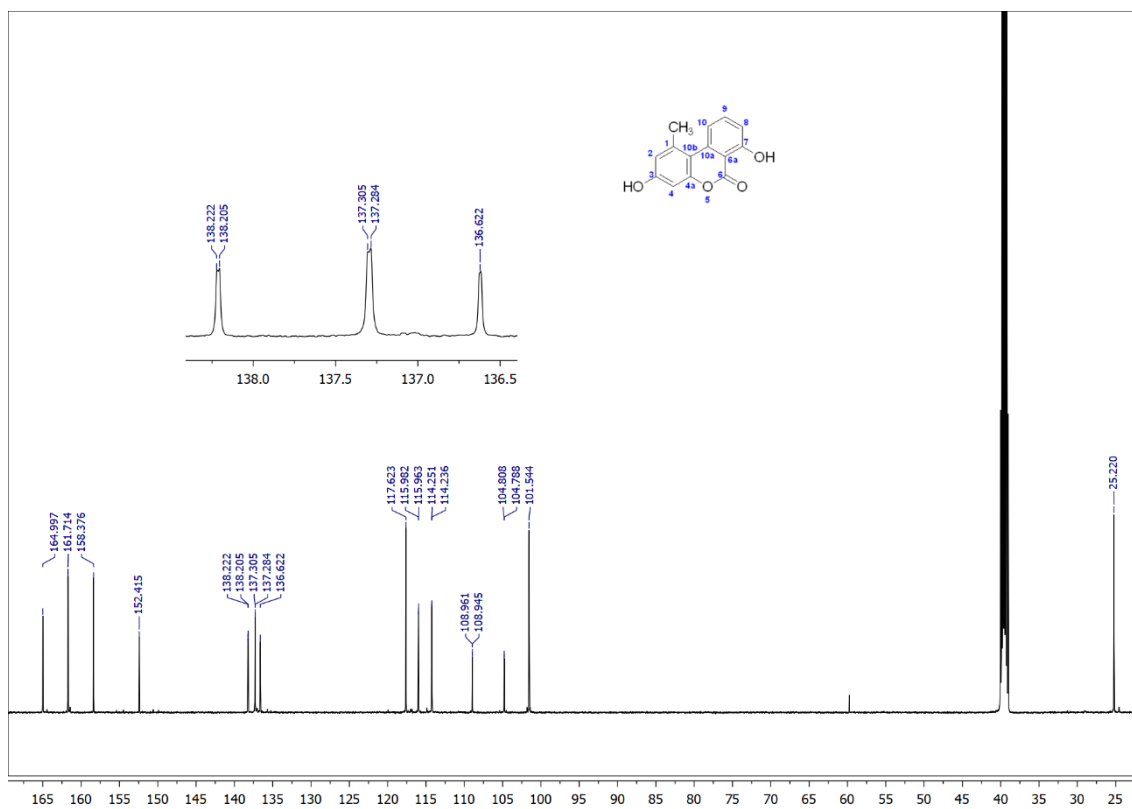
^1H NMR spectrum (500 MHz) of compound **25** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of compound **25** in CDCl_3 

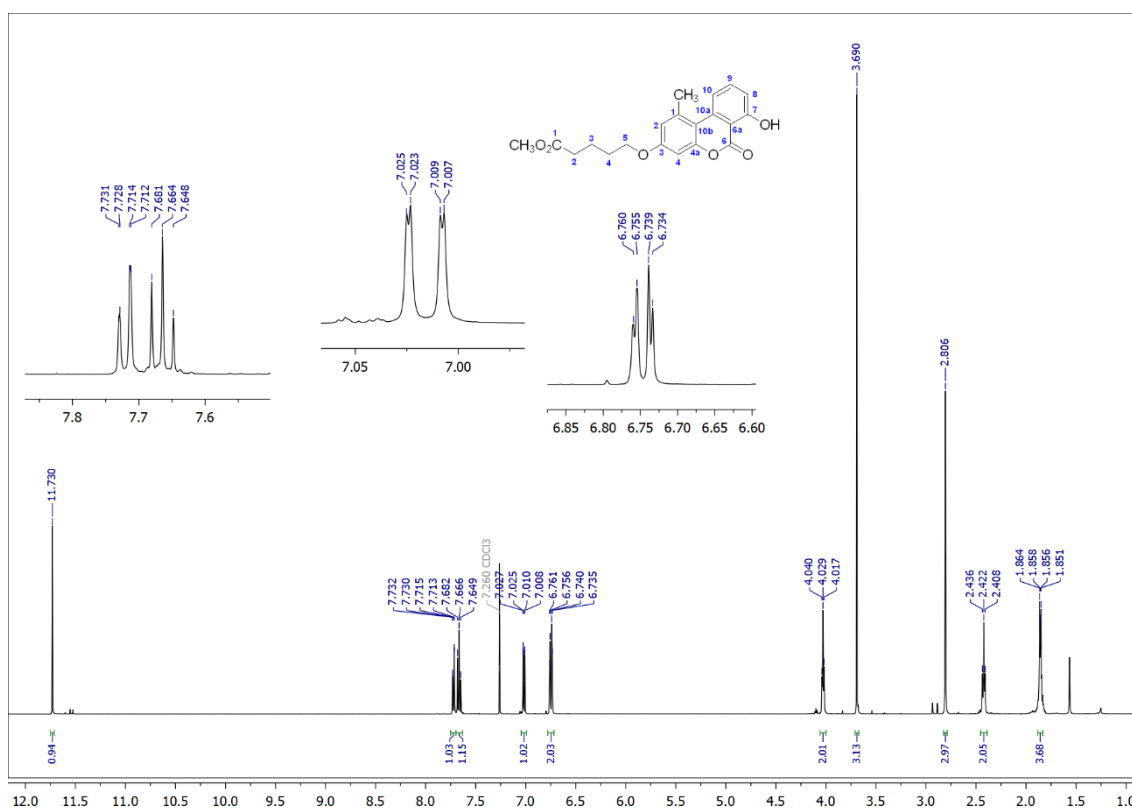
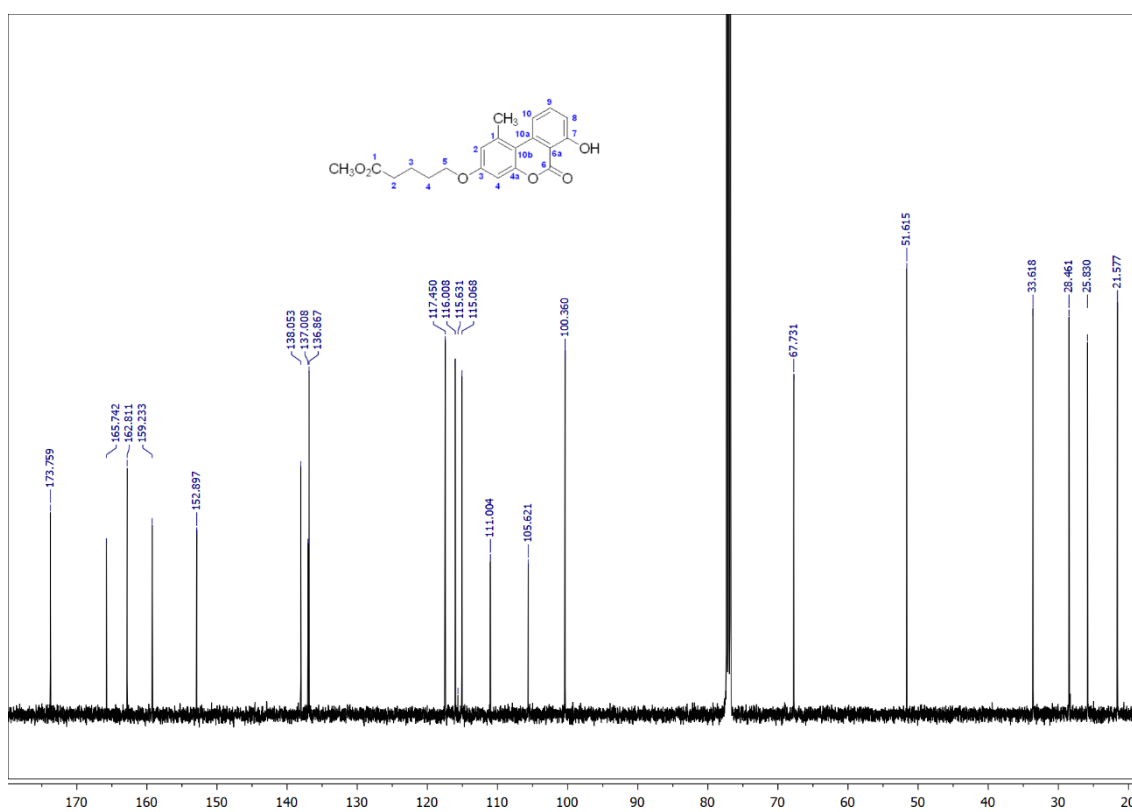
^1H NMR spectrum (500 MHz) of dibenzyl ether of hapten ALm (**26**) in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of dibenzyl ether of hapten ALm (**26**) in CDCl_3 

^1H NMR spectrum (500 MHz) of tribenzyl ether of ALm-NHS ester **27** in CDCl_3  ^1H NMR spectrum (500 MHz) of ALm-NHS ester in THF-d_8 

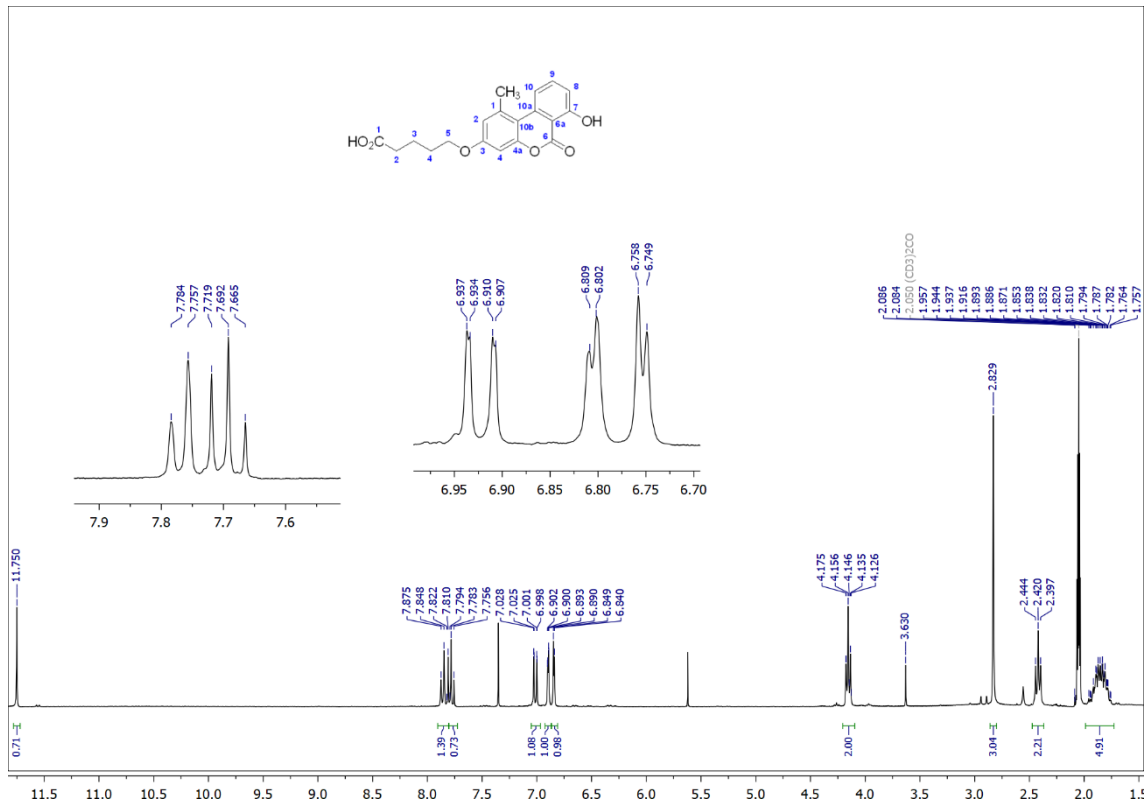
^1H NMR spectrum (500 MHz) of compound **32** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) of compound **32** in CDCl_3 

^1H NMR spectrum (300 MHz) of compound **33** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) of compound **33** in CDCl_3 

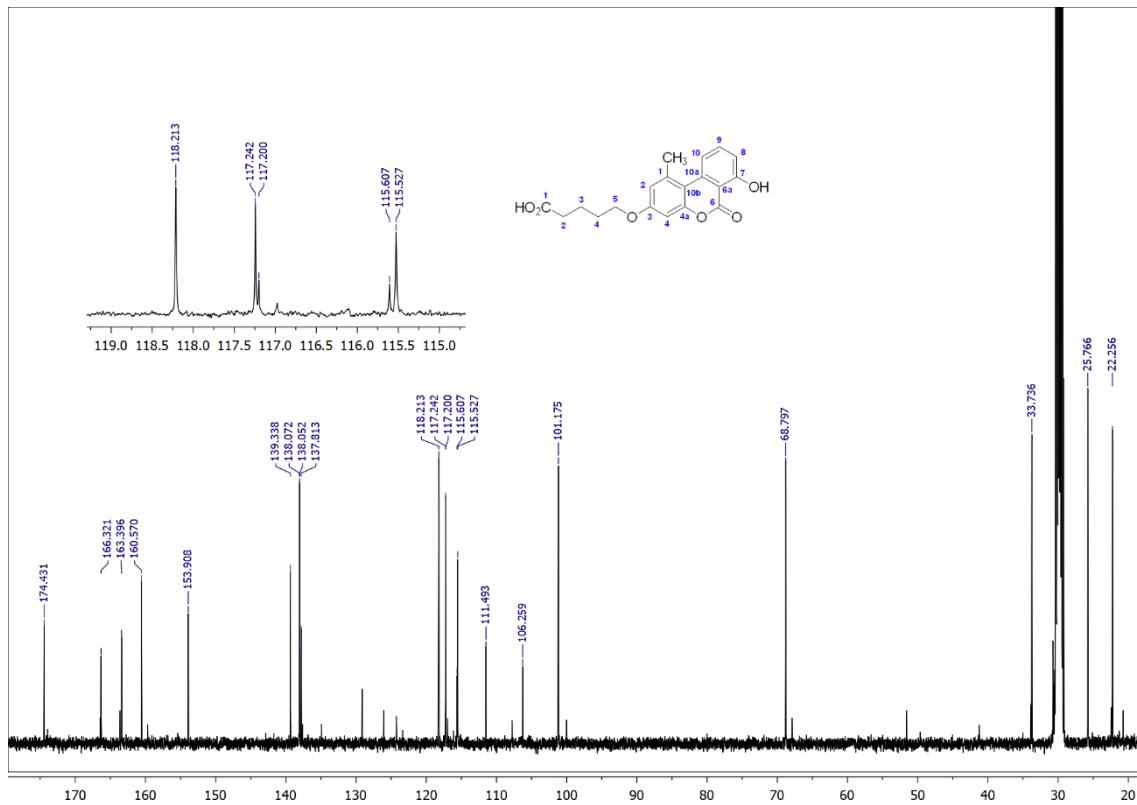
¹H NMR spectrum (300 MHz) of compound **34** in DMSO-d₆¹³C NMR spectrum (75 MHz) of compound **34** in DMSO-d₆

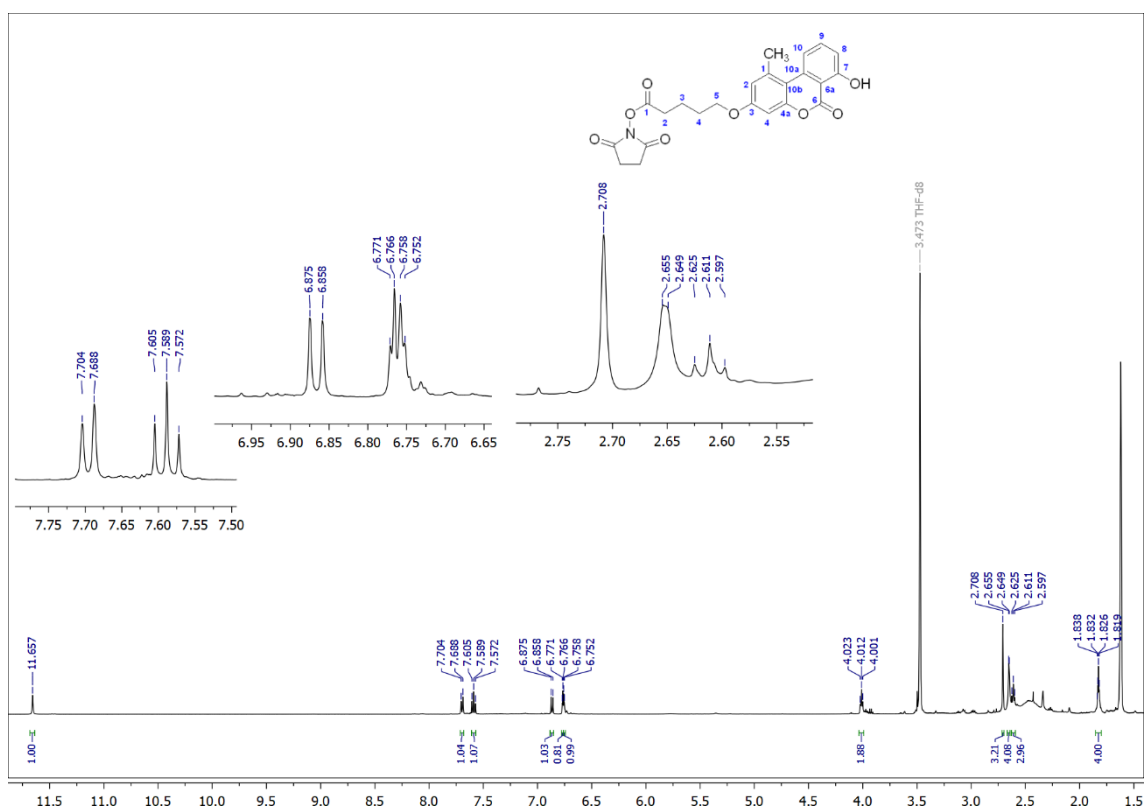
^1H NMR spectrum (500 MHz) of compound **35** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of compound **35** in CDCl_3 

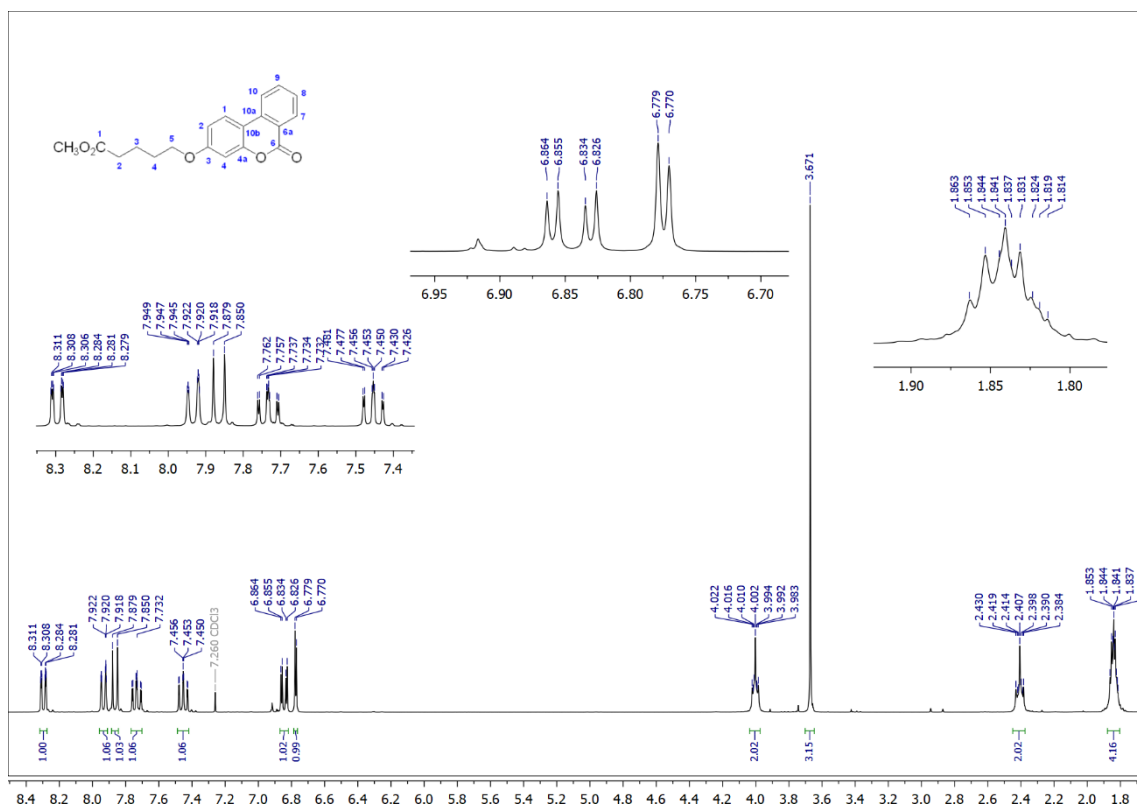
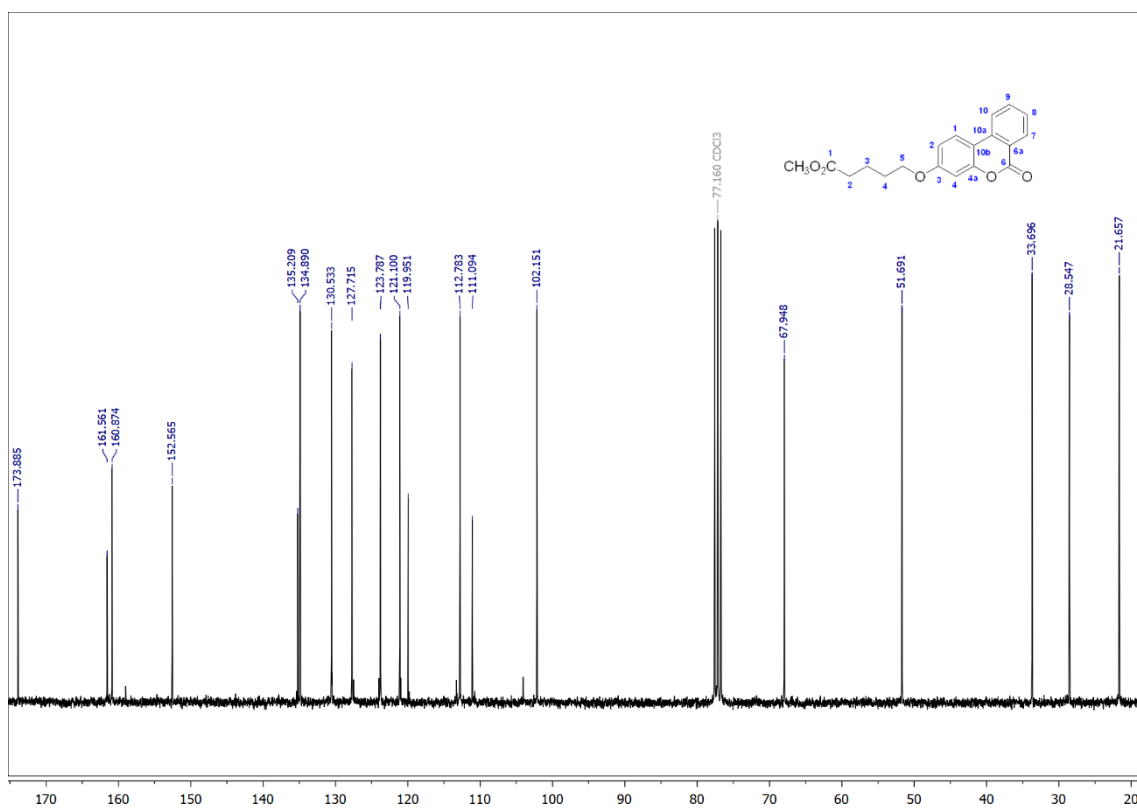
¹H NMR spectrum (300 MHz) of hapten ALh1 in acetone-d6

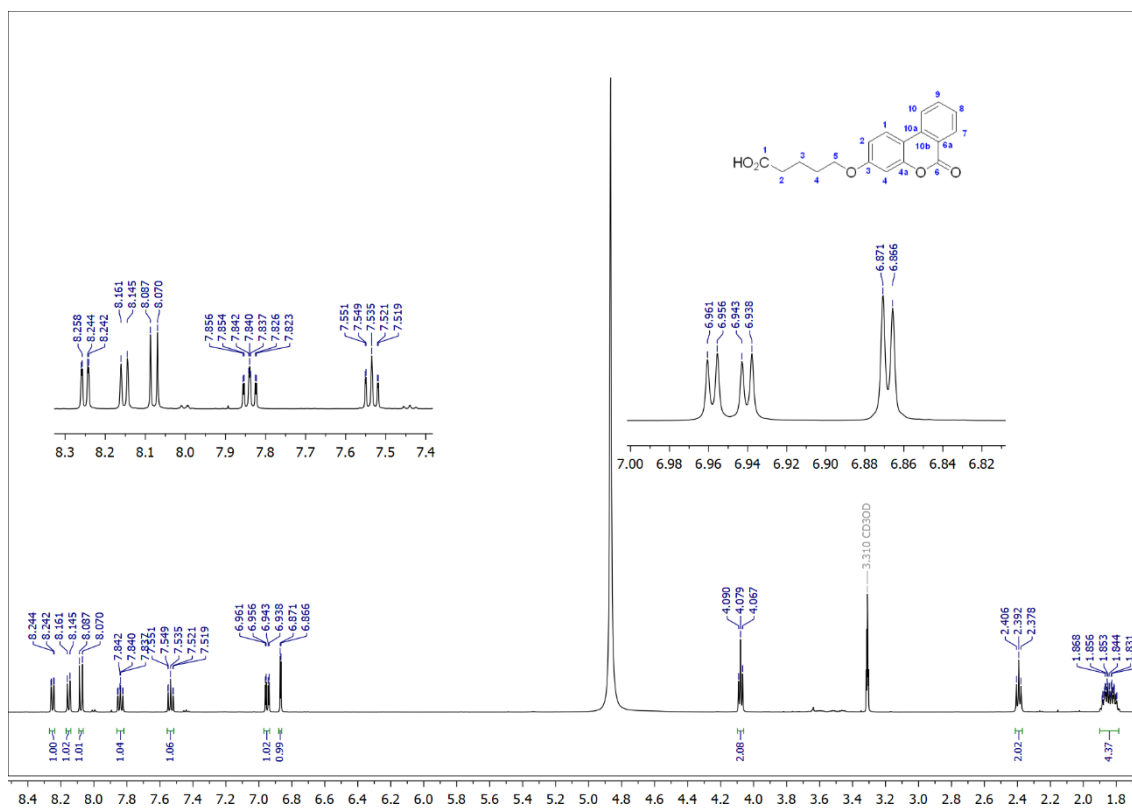
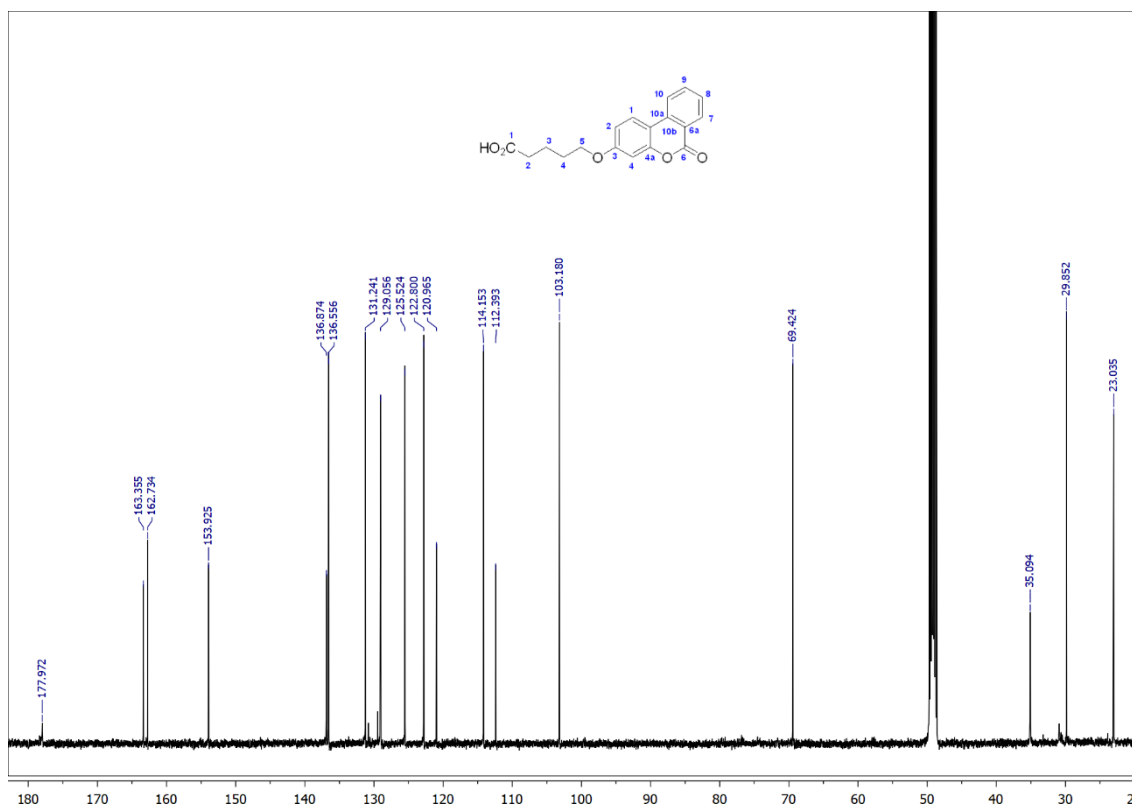


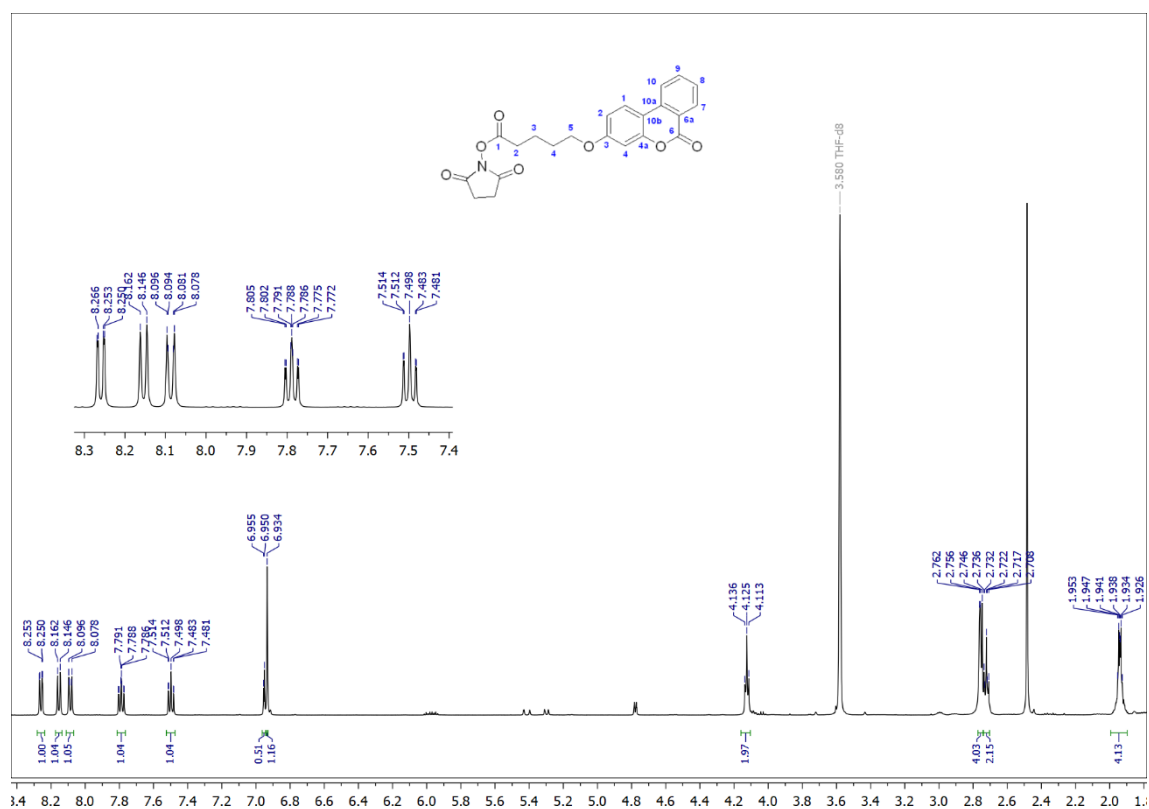
¹³C NMR spectrum (75 MHz) of hapten ALh1 in acetone-d6

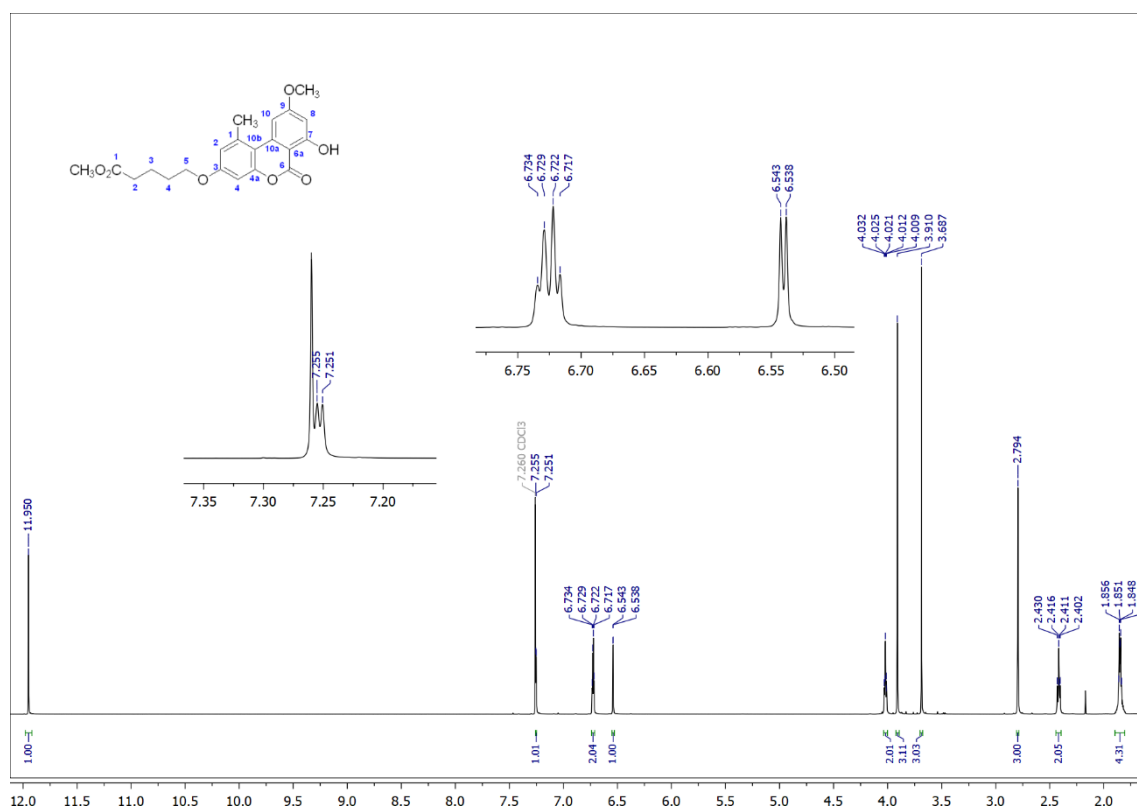
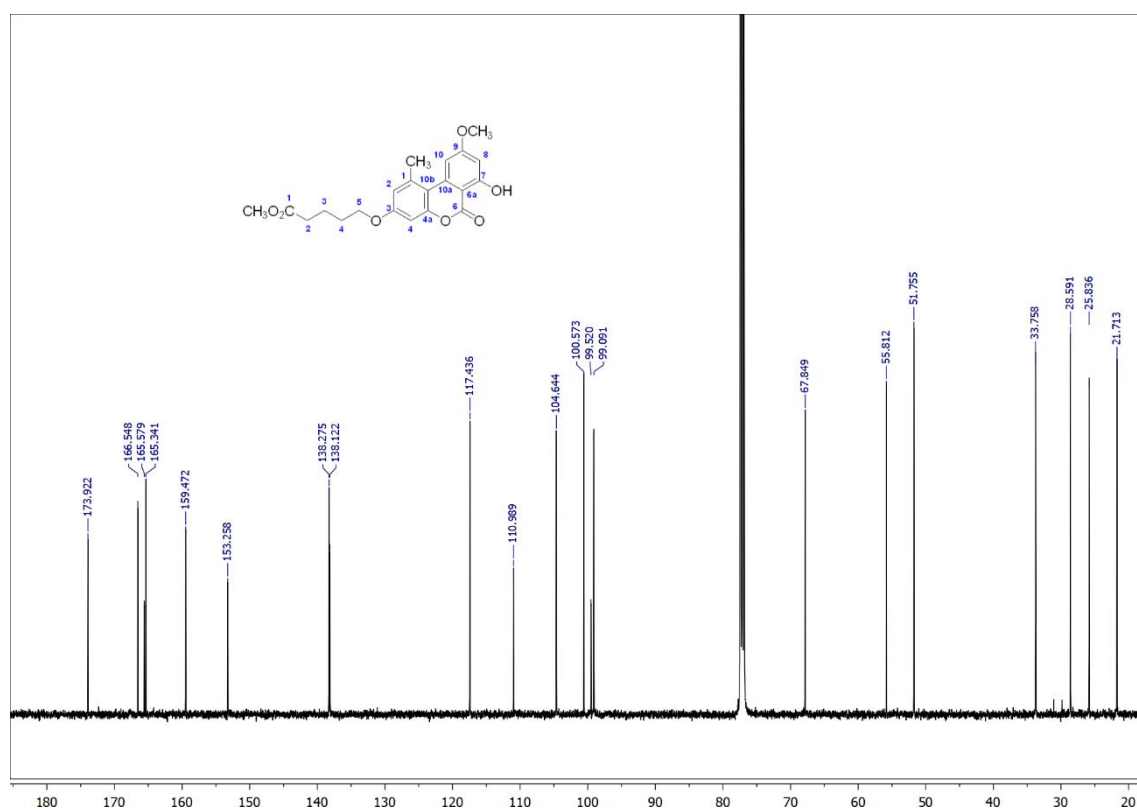


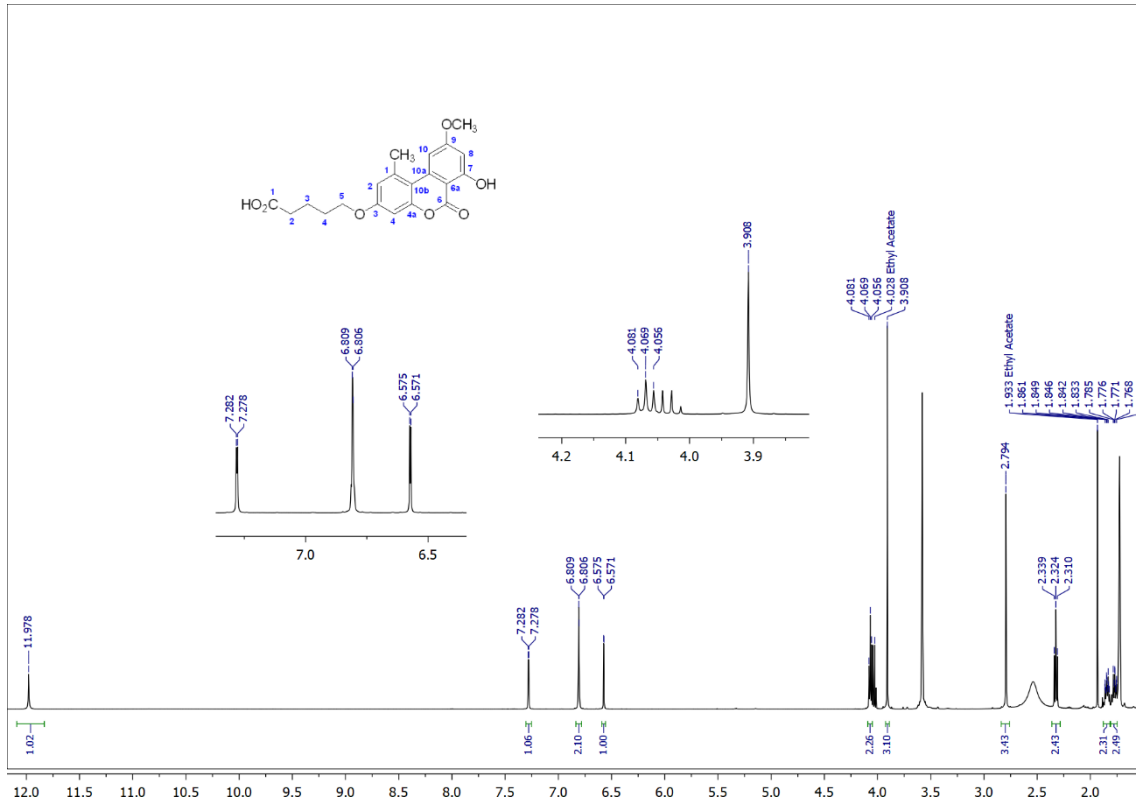
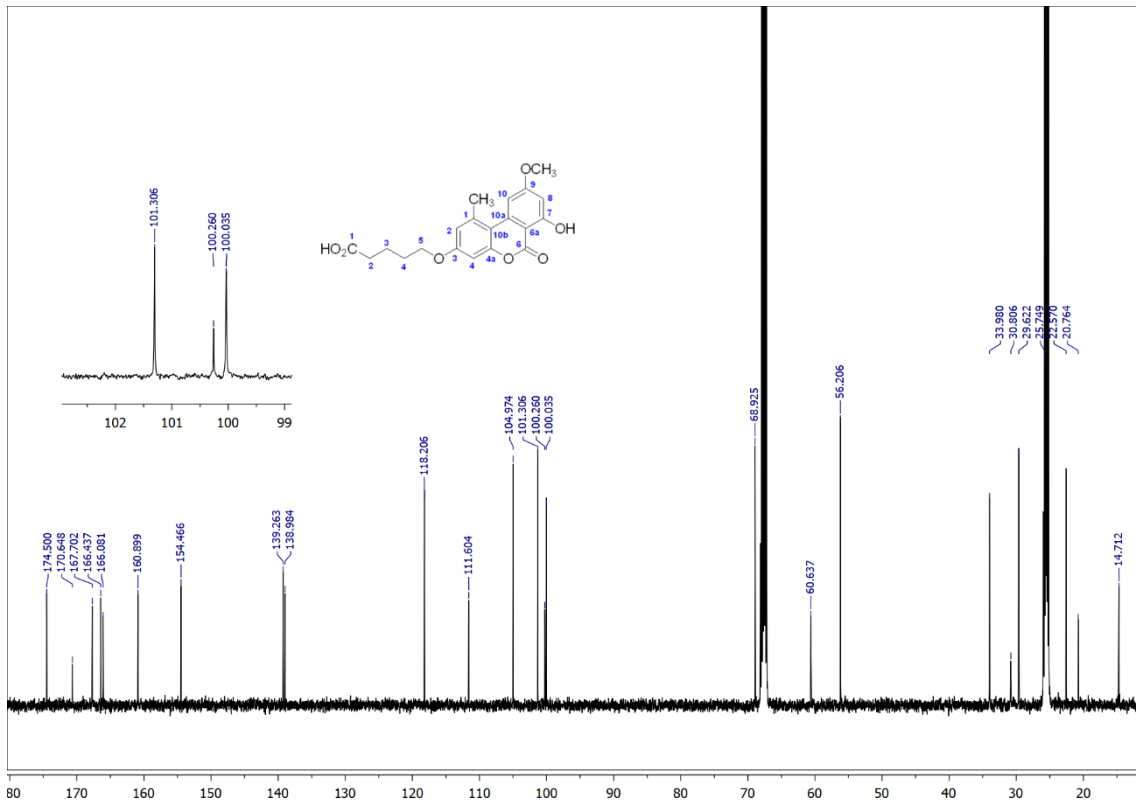
^1H NMR spectrum (500 MHz) of ALh1-NHS ester in THF- d_8 

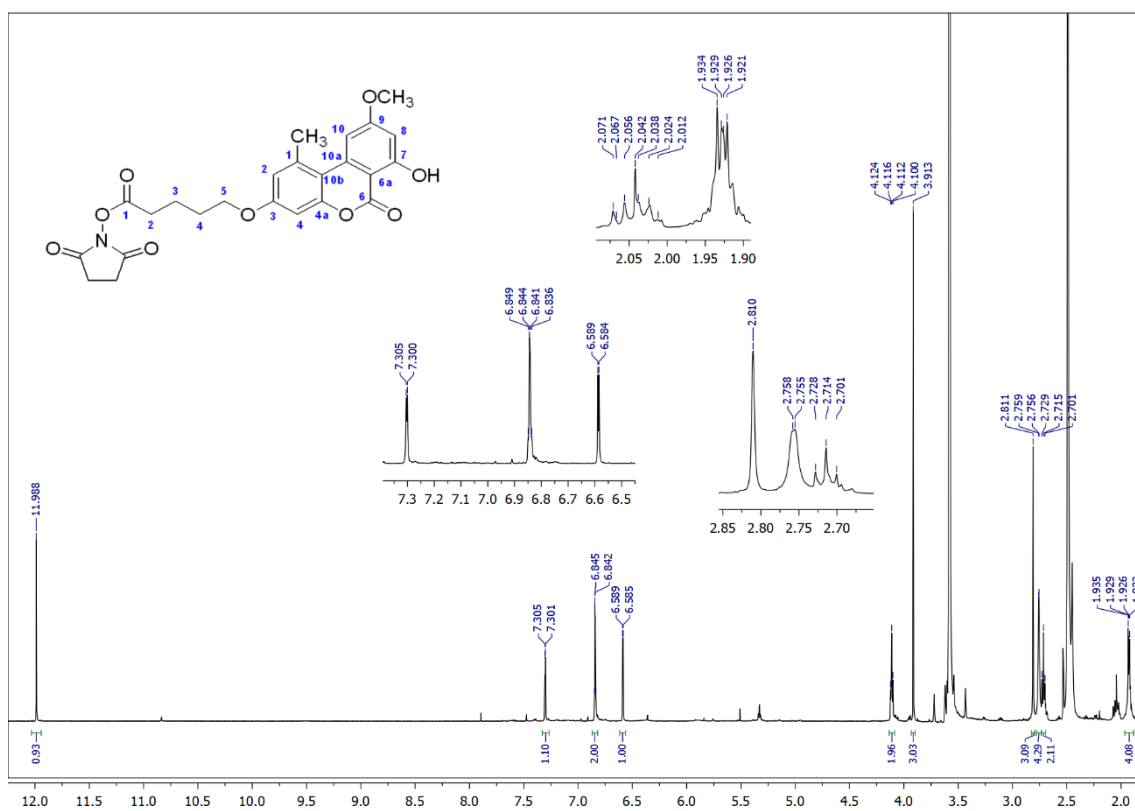
^1H NMR spectrum (300 MHz) of compound **37** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) of compound **37** in CDCl_3 

^1H NMR spectrum (500 MHz) of hapten ALh2 in CD_3OH  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of hapten ALh2 in CD_3OH 

^1H NMR spectrum (500 MHz) of ALh2-NHS ester in THF- d_8 

^1H NMR spectrum (500 MHz) of compound **38** in CDCl_3  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of compound **38** in CDCl_3 

^1H NMR spectrum (500 MHz) of hapten AMEb in THF- d_8  ^{13}C NMR spectrum (126 MHz) of hapten AMEb in THF- d_8 

^1H NMR spectrum (500 MHz) of AME*b*-NHS ester in THF- d_8 

6.2. Tables

Table 6-1. Results obtained by competitive ELISA and HPLC for the analysis of alternariol in healthy pears infected with a mixture of two mycotoxigenic strains (AA-1 and AA-2) of *Alternaria alternata*.

| Sample ^d | ELISA ^e | | | | UHPLC ^f | | | |
|---------------------|----------------------------|--------|--------|-------|----------------------------|--------|-------|--|
| | [AOH] (µg/Kg) ^g | | CV(%) | | [AOH] (µg/Kg) ^g | | CV(%) | |
| M1 ^a | 9 | 28.6 | ± 3.5 | 12.1 | 21.6 | ± 4.0 | 18.4 | |
| | 12 | 48.7 | ± 8.5 | 17.5 | 35.6 | ± 3.1 | 8.8 | |
| | 15 | 59.6 | ± 6.5 | 10.9 | 46.1 | ± 4.0 | 8.7 | |
| | 19 | 92.4 | ± 11.2 | 12.1 | 71.8 | ± 4.4 | 6.1 | |
| | 22 | 104.5 | ± 11.4 | 10.9 | 75.5 | ± 4.2 | 5.6 | |
| M2 ^b | 7 | 19.8 | ± 2.5 | 12.8 | 21.8 | ± 1.4 | 6.6 | |
| | 10 | 44.4 | ± 7.6 | 17.1 | 42.5 | ± 5.5 | 13.0 | |
| | 13 | 58.8 | ± 15.7 | 26.7 | 47.7 | ± 3.3 | 6.9 | |
| | 16 | 59.8 | ± 7.4 | 12.4 | 54.5 | ± 4.6 | 8.5 | |
| | 17 | 86.4 | ± 13.2 | 15.3 | 77.4 | ± 5.2 | 6.8 | |
| | 18 | 102.0 | ± 19.2 | 18.8 | 97.8 | ± 5.9 | 6.0 | |
| | 20 | 110.6 | ± 16.6 | 15.0 | 103.2 | ± 6.3 | 6.1 | |
| M3 ^c | 25 | 168.6 | ± 20.6 | 12.2 | 162.0 | ± 15.5 | 9.6 | |
| | 27 | 214.6 | ± 24.1 | 11.2 | 197.2 | ± 11.2 | 5.7 | |
| | 8 | 23.6 | ± 4.6 | 19.4 | 22.5 | ± 4.9 | 21.9 | |
| | 11 | 48.8 | ± 7.5 | 15.4 | 49.5 | ± 3.6 | 7.3 | |
| | 14 | 56.7 | ± 7.1 | 12.5 | 60.9 | ± 4.1 | 6.8 | |
| | 21 | 103.7 | ± 13.0 | 12.5 | 100.5 | ± 6.8 | 6.8 | |
| | 23 | 113.8 | ± 13.7 | 12.1 | 128.5 | ± 9.7 | 7.5 | |
| | 24 | 128.2 | ± 15.0 | 11.7 | 126.8 | ± 6.2 | 4.9 | |
| | 26 | 177.4 | ± 9.5 | 5.4 | 210.9 | ± 18.2 | 8.6 | |
| 28 | 241.5 | ± 45.3 | 18.7 | 249.3 | ± 11.4 | 4.6 | | |
| 29 | 228.1 | ± 42.2 | 18.5 | 247.8 | ± 8.8 | 3.6 | | |

^a Wound maceration diameter 7.5 ± 3.0 mm. ^b Wound maceration diameter 13.6 ± 1.7 mm. ^c Wound maceration diameter 28 ± 3.5 mm. ^d Random sample name. ^e Results are the mean of three replicates. ^f Results are the mean of 5 replicates. ^g Values are expressed as the mean and standard deviation of the replicates indicated in each case.

6.3. Patents and publications

- Addante-Moya, L. G.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A.; Agulló, C.; Mercader, J. V. Assessment of the Optimum Linker Tethering Site of Alternariol Haptens for Antibody Generation and Immunoassay Development. *Toxins*. **2021**.
<https://doi.org/10.3390/toxins13120883>.
- Addante-Moya, L. G.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A.; Agulló, C.; Mercader, J. V. Compuestos y Anticuerpos para la Inmunodetección de Alternariol. P202230811. **2022**.

7. REFERENCES

- (1) Valera, E.; García-Febrero, R.; Elliott, C. T.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M.-P. Electrochemical Nanoprobe-Based Immunosensor for Deoxynivalenol Mycotoxin Residues Analysis in Wheat Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (9), 1915–1926. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1538-0>.
- (2) *Mycotoxins*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>.
- (3) Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España (AFHSE). Recomendaciones Para la Prevención, el Control y la Vigilancia de las Micotoxinas en las Fábricas de Harinas y Sémolas. *Catálogo Publicaciones la Adm. Gen. del Estado* **2015**, 118.
- (4) Gelderblom, W. C. A.; Kriek, N. P. J.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G. Toxicity and Carcinogenicity of the Fusanum Monilzforine Metabolite, Fumonisin B1, in Rats. *Carcinogenesis* **1991**, *12* (7), 1247–1251. <https://doi.org/10.1093/carcin/12.7.1247>.
- (5) Liew, W.-P.-P.; Mohd-Redzwan, S. Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota . *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* . **2018**. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00060>.
- (6) Division, N. Reglamentos a Nivel Munial Para Las Micotoxinas En Los Alimentos y Las Raciones En El Año 2003. *Food Agric. Organ. United Nations* **2004**.
- (7) Comisión Europea. Reglamento (CE) 1881/2006. Contenido Máximo de Determinados Contaminantes En Los Productos Alimenticios. *D. Of. la Unión Eur.* **2006**, *364*, 5–24.
- (8) Comisión Europea. Reglamento (CE) 1126/2007 de 28 de Septiembre de 2007 Que Modifica El Reglamento (CE) No 1881/2006 Por El Que Se Fija El Contenido Máximo de Determinados Contaminantes En Los Productos Alimenticios Por Lo Que Se Refiere a Las Toxinas de Fusarium En El Maí. *D. Of. la Unión Eur.* **2007**, *255*, 14–17.

- (9) W., B. J.; M., K. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16* (3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>.
- (10) (CONTAM), E. P. on C. in the F. C. Scientific Opinion on the Risks for Animal and Public Health Related to the Presence of *Alternaria* Toxins in Feed and Food. *EFSA J.* **2011**, *9* (10), 2407. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>.
- (11) Betina, V. *Chromatography of Mycotoxins*, 1st ed.; Elsevier Ltd, **1993**.
- (12) Raistrick, H.; Stickings, C. E.; Thomas, R. Studies in the Biochemistry of Micro-Organisms. Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether, Metabolic Products of *Alternaria tenuis*. *Biochem. J.* **1953**, *55* (3), 421–433. <https://doi.org/10.1042/bj0550421>.
- (13) Koch, K.; Podlech, J.; Pfeiffer, E.; Metzler, M. Total Synthesis of Alternariol. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (8), 3275–3276. <https://doi.org/10.1021/jo050075r>.
- (14) Estiarte, N.; Crespo-Sempere, A.; Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A. J. Effect of 1-Methylcyclopropene on the Development of Black Mold Disease and Its Potential Effect on Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether Biosynthesis on Tomatoes Infected with *Alternaria Alternata*. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *236*, 74–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.001>.
- (15) Stinson, E. E. Mycotoxins - Their Biosynthesis in *Alternaria*. *J. Food Prot.* **1985**, *48* (1), 80–91. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.1.80>.
- (16) Saha, D.; Fetzner, R.; Burkhardt, B.; Podlech, J.; Metzler, M.; Dang, H.; Lawrence, C.; Fischer, R. Identification of a Polyketide Synthase Required for Alternariol (AOH) and Alternariol-9-Methyl Ether (AME) Formation in *Alternaria alternata*. *PLoS One* **2012**, *7* (7), e40564.
- (17) Ostry, V. *Alternaria* Mycotoxins: An Overview of Chemical Characterization, Producers, Toxicity, Analysis and Occurrence in Foodstuffs. *World Mycotoxin J.* **2008**, *1* (2), 175–188. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.x013>.
- (18) Leeper, F. J.; Staunton, J. Biomimetic Syntheses of Polyketide Aromatics from Reaction of an Orsellinate Anion with Pyrones and a Pyrylium Salt. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, No. 0, 1053–1059. <https://doi.org/10.1039/P19840001053>.
- (19) Abell, C.; Bush, B. D.; Staunton, J. Biomimetic Syntheses of the Polyketide Fungal Metabolites Alternariol and Rubrofusarin: Models for Cyclisation Reactions Catalysed by Polyketide Synthase Enzymes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, No. 1, 15–17. <https://doi.org/10.1039/C39860000015>.
- (20) Fürstner, A.; Thiel, O. R.; Kindler, N.; Bartkowska, B. Total Syntheses of (S)-(–)-Zearalenone and Lasiodiplodin Reveal Superior Metathesis Activity of Ruthenium Carbene Complexes with Imidazol-2-Ylidene Ligands. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (23), 7990–7995. <https://doi.org/10.1021/jo0009999>.
- (21) Bringmann, G.; Götz, R.; Keller, P. A.; Walter, R.; Boyd, M. R.; Lang, F.; Garcia, A.; Walsh, J. J.; Tellitu, I.; Bhaskar, K. V.; Kelly, T. R. A Convergent Total Synthesis of the Michellamines. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (4), 1090–1097.

- <https://doi.org/10.1021/jo971495m>.
- (22) Sargent, M. V. Depsidone Synthesis. Part 21. A New Synthesis of Grisa-2',5'-Diene-3,4'-Diones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, No. 0, 403–411. <https://doi.org/10.1039/P19820000403>.
- (23) Abe, H.; Fukumoto, T.; Takeuchi, Y.; Harayamac, T. Synthesis of Alternariol through an Intramolecular Biaryl Coupling Reaction Using Palladium Reagent. *Heterocycles* **2007**, *74* (C), 265–271. [https://doi.org/10.3987/com-07-s\(w\)3](https://doi.org/10.3987/com-07-s(w)3).
- (24) Won, M.; Kwon, S.; Kim, T. H. An Efficient Synthesis of Alternariol. *J. Korean Chem. Soc.* **2015**, *59* (5), 471–474. <https://doi.org/10.5012/jkcs.2015.59.5.471>.
- (25) Crudo, F.; Varga, E.; Aichinger, G.; Galaverna, G.; Marko, D.; Dall'Asta, C.; Dellafiora, L. Co-Occurrence and Combinatory Effects of *Alternaria* Mycotoxins and Other Xenobiotics of Food Origin: Current Scenario and Future Perspectives. *Toxins*. **2019**. <https://doi.org/10.3390/toxins11110640>.
- (26) Altemöller, M.; Podlech, J.; Fenske, D. Total Synthesis of Altenuene and Isoaltenuene. *European J. Org. Chem.* **2006**, No. 7, 1678–1684. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200500904>.
- (27) Berthiller, F.; Dall'Asta, C.; Schuhmacher, R.; Lemmens, M.; Adam, G.; Krska, R. Masked Mycotoxins: Determination of a Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (9), 3421–3425. <https://doi.org/10.1021/jf047798g>.
- (28) Stypuła-Trębas, S.; Minta, M.; Radko, L.; Jedziniak, P.; Posyniak, A. Nonsteroidal Mycotoxin Alternariol Is a Full Androgen Agonist in the Yeast Reporter Androgen Bioassay. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *55*, 208–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.036>.
- (29) Lehmann, L.; Wagner, J.; Metzler, M. Estrogenic and Clastogenic Potential of the Mycotoxin Alternariol in Cultured Mammalian Cells. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44* (3), 398–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.013>.
- (30) Terminiello, L.; Patriarca, A.; Pose, G.; Fernández Pinto, V.; Pinto, V. F. Occurrence of Alternariol, Alternariol Monomethyl Ether and Tenuazonic Acid in Argentinean Tomato Puree L. Terminiello 1, A. Patriarca 2, G. Pose z, V. Fernbndez Pinto 2. *Mycotoxin Res.* **2006**, *22* (4), 236–240.
- (31) Králová, J.; Hajšlová, J.; Poustka, J.; Hochman, M.; Bjelková, M.; Odstrčilová, L. Occurrence of *Alternaria* Toxins in Fibre Flax, Linseed, and Peas Grown in Organic and Conventional Farms: Monitoring Pilot Study. *Czech J. Food Sci.* **2006**, *24* (6), 288–296. <https://doi.org/10.17221/3327-cjfs>.
- (32) Scott, P. M.; Lawrence, G. A.; Lau, B. P. Y. Analysis of Wines, Grape Juices and Cranberry Juices For *Alternaria* Toxins. *Mycotoxin Res.* **2006**, *22* (2), 142–147. <https://doi.org/10.1007/BF02956778>.
- (33) Ostry, V.; Skarkova, J.; Laichmannová, L.; Kyrova, V.; Ruprich, J. *Characterization of*

- Alternaria alternata* Strains Isolated from Czech Foodstuffs; **2009**.
- (34) Häggblom, P.; Stepinska, A.; Solyakov, A. *Alternaria Mycotoxins in Swedish Feed Grain*; Stuttgart-Fellbach, Germany, **2007**.
- (35) Fraeyman, S.; Croubels, S.; Devreese, M.; Antonissen, G. Emerging Fusarium and *Alternaria* Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. *Toxins*. **2017**. <https://doi.org/10.3390/toxins9070228>.
- (36) Liu, G. T.; Qian, Y. Z.; Zhang, P.; Dong, W. H.; Qi, Y. M.; Guo, H. T. Etiological Role of *Alternaria alternata* in Human Esophageal Cancer. *Chin. Med. J. (Engl)*. **1992**, *105* (5), 394–400.
- (37) Puntschner, H.; Kütt, M.-L.; Skrinjar, P.; Mikula, H.; Podlech, J.; Fröhlich, J.; Marko, D.; Warth, B. Tracking Emerging Mycotoxins in Food: Development of an LC-MS/MS Method for Free and Modified *Alternaria* Toxins. *Anal. Bioanal. Chem*. **2018**, *410* (18), 4481–4494. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1105-8>.
- (38) Gambacorta, L.; El Darra, N.; Fakhoury, R.; Logrieco, A. F.; Solfrizzo, M. Incidence and Levels of *Alternaria* Mycotoxins in Spices and Herbs Produced Worldwide and Commercialized in Lebanon. *Food Control* **2019**, *106*, 106724. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106724>.
- (39) Sauer, D. B.; Seitz, L. M.; Burroughs, R.; Mohr, H. E.; West, J. L.; Milleret, R. J.; Anthony, H. D. Toxicity of *Alternaria* Metabolites Found in Weathered Sorghum Grain at Harvest. *J. Agric. Food Chem*. **1978**, *26* (6), 1380–1383. <https://doi.org/10.1021/jf60220a022>.
- (40) Griffin, G. F.; Chu, F. S. Toxicity of the *Alternaria* Metabolites Alternariol, Alternariol Methyl Ether, Altenuene, and Tenuazonic Acid in the Chicken Embryo Assay. *Appl. Environ. Microbiol*. **1983**, *46* (6), 1420–1422. <https://doi.org/10.1128/aem.46.6.1420-1422.1983>.
- (41) Pero, R. W.; Posner, H.; Blois, M.; Harvan, D.; Spalding, J. W. Toxicity of Metabolites Produced by the “*Alternaria*”. *Environ. Health Perspect*. **1973**, *4*, 87–94. <https://doi.org/10.1289/ehp.730487>.
- (42) Scott, P. M.; Stoltz, D. R. Mutagens Produced by *Alternaria alternata*. *Mutat. Res. Toxicol*. **1980**, *78* (1), 33–40. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-1218\(80\)90023-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-1218(80)90023-3).
- (43) Kilbey, B. J.; Legator, M.; Nichols, W.; Ramel, C. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **1984**.
- (44) An, Y.; Zhao, T.; Miao, J.; Liu, G.; Zheng, Y.; Xu, Y.; Van Etten, R. L. Isolation, Identification, and Mutagenicity of Alternariol Monomethyl Ether. *J. Agric. Food Chem*. **1989**, *37* (5), 1341–1343. <https://doi.org/10.1021/jf00089a029>.
- (45) Fernández-Blanco, C.; Juan-García, A.; Juan, C.; Font, G.; Ruiz, M.-J. Alternariol Induce Toxicity via Cell Death and Mitochondrial Damage on Caco-2 Cells. *Food Chem. Toxicol*. **2016**, *88*, 32–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.022>.
- (46) Solhaug, A.; Vines, L. L.; Ivanova, L.; Spilsberg, B.; Holme, J. A.; Pestka, J.; Collins, A.;

- Eriksen, G. S. Mechanisms Involved in Alternariol-Induced Cell Cycle Arrest. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2012**, *738–739*, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.09.001>.
- (47) Panigrahi, S.; Dallin, S. Toxicity of the *Alternaria Spp* Metabolites, Tenuazonic Acid, Alternariol, Alvertoxin-i, and Alternariol Monomethyl Ether to Brine Shrimp (*Artemia Salina* L) Larvae. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *66* (4), 493–496. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2740660411>.
- (48) Grover, S.; Lawrence, C. B. The *Alternaria alternata* Mycotoxin Alternariol Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences.* **2017**. <https://doi.org/10.3390/ijms18071577>.
- (49) Demuner, A. J.; Barbosa, L. C. A.; Miranda, A. C. M.; Geraldo, G. C.; da Silva, C. M.; Giberti, S.; Bertazzini, M.; Forlani, G. The Fungal Phytotoxin Alternariol 9-Methyl Ether and Some of Its Synthetic Analogues Inhibit the Photosynthetic Electron Transport Chain. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (12), 2234–2245. <https://doi.org/10.1021/np4005882>.
- (50) Fehr, M.; Pahlke, G.; Fritz, J.; Christensen, M. O.; Boege, F.; Altemöller, M.; Podlech, J.; Marko, D. Alternariol Acts as a Topoisomerase Poison, Preferentially Affecting the II α Isoform. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53* (4), 441–451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mnfr.200700379>.
- (51) Solhaug, A.; Eriksen, G. S.; Holme, J. A. Mechanisms of Action and Toxicity of the Mycotoxin Alternariol: A Review. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *119* (6), 533–539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bcpt.12635>.
- (52) Njumbe Ediage, E.; Di Mavungu, J. D.; Goryacheva, I. Y.; Van Peteghem, C.; De Saeger, S. Multiplex Flow-through Immunoassay Formats for Screening of Mycotoxins in a Variety of Food Matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (1), 265–278. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5803-3>.
- (53) Scott, P. M. Analysis of Agricultural Commodities and Foods for *Alternaria* Mycotoxins. *J. AOAC Int.* **2001**, *84* (6), 1809–1817. <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.6.1809>.
- (54) Lau, B. P. Y.; Scott, P. M.; Lewis, D. A.; Kanhere, S. R.; Cl  roux, C.; Roscoe, V. A. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry of the *Alternaria* Mycotoxins Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Fruit Juices and Beverages. *J. Chromatogr. A* **2003**, *998* (1–2), 119–131. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00606-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00606-x).
- (55) Herebian, D.; Z  hlke, S.; Lamsh  ft, M.; Spiteller, M. Multi-Mycotoxin Analysis in Complex Biological Matrices Using LC-ESI/MS: Experimental Study Using Triple Stage Quadrupole and LTQ-Orbitrap. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (7), 939–948. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jssc.200800589>.
- (56) Rodr  guez-Carrasco, Y.; Ma  nes, J.; Berrada, H.; Juan, C. Development and Validation of a LC-ESI-MS/MS Method for the Determination of *Alternaria* Toxins Alternariol, Alternariol Methyl-Ether and Tentoxin in Tomato and Tomato-Based Products. *Toxins.* **2016**. <https://doi.org/10.3390/toxins8110328>.

- (57) Aroud, H.; May, B.; Dietrich, H.; Schweiggert, R.; Kemmlein, S. Influence of Processing Steps on the Fate of Ochratoxin A, Patulin, and Alternariol during Production of Cloudy and Clear Apple Juices. *Mycotoxin Res.* **2021**, *37*. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00443-x>.
- (58) Matysik, G.; Giryń, H. Gradient Thin-Layer Chromatography and Densitometry Determination of *Alternaria* Mycotoxins. *Chromatographia* **1996**, *42* (9), 555–558. <https://doi.org/10.1007/BF02290291>.
- (59) Scott, P. M.; Weber, D.; Kanhere, S. R. Gas Chromatography-Mass Spectrometry of *Alternaria* Mycotoxins. *J. Chromatogr. A* **1997**, *765* (2), 255–263. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00917-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00917-X).
- (60) Nolan, P.; Auer, S.; Spehar, A.; Elliott, C. T.; Campbell, K. Current Trends in Rapid Tests for Mycotoxins. *Food Addit. Contam. Part A* **2019**, *36* (5), 800–814. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1595171>.
- (61) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principios de Bioquímica*; Omega: Barcelona, **2009**.
- (62) Anfossi, L.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; D'Arco, G.; Giraudi, G. Lateral-Flow Immunoassays for Mycotoxins and Phycotoxins: A Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (2), 467–480. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6033-4>.
- (63) Burkin, A. A.; Kononenko, G. P. Enzyme Immunassay of Alternariol for the Assessment of Risk of Agricultural Products Contamination. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2011**, *47* (1), 72–76. <https://doi.org/10.1134/S0003683811010030>.
- (64) Ackermann, Y.; Curtui, V.; Dietrich, R.; Gross, M.; Latif, H.; Märtlbauer, E.; Usleber, E. Widespread Occurrence of Low Levels of Alternariol in Apple and Tomato Products, as Determined by Comparative Immunochemical Assessment Using Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (12), 6360–6368. <https://doi.org/10.1021/jf201516f>.
- (65) Kong, D.; Xie, Z.; Liu, L.; Song, S.; Zheng, Q.; Kuang, H. Development of an Immunochromatographic Assay for the Detection of Alternariol in Cereal and Fruit Juice Samples. *Food Agric. Immunol.* **2017**, *28* (6), 1082–1093. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1326469>.
- (66) Singh, G.; Velasquez, L.; Brady, B.; Koerner, T.; Huet, A.-C.; Delahaut, P. Development of an Indirect Competitive ELISA for Analysis of Alternariol in Bread and Bran Samples. *Food Anal. Methods* **2018**, *11* (5), 1444–1450. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1126-5>.
- (67) Wang, J.; Peng, T.; Zhang, X.; Yao, K.; Ke, Y.; Shao, B.; Wang, Z.; Shen, J.; Jiang, H. A Novel Hapten and Monoclonal Antibody-Based Indirect Competitive ELISA for Simultaneous Analysis of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Wheat. *Food Control* **2018**, *94*, 65–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.027>.
- (68) Yao, C.-Y.; Xu, Z.-L.; Wang, H.; Zhu, F.; Luo, L.; Yang, J.-Y.; Sun, Y.-M.; Lei, H.-T.; Tian, Y.-X.; Shen, Y.-D. High Affinity Antibody Based on a Rationally Designed Hapten and Development of a Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Quantification of

- Alternariol in Fruit Juice, Maize and Flour. *Food Chem.* **2019**, *283*, 359–366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.127>.
- (69) Man, Y.; Liang, G.; Jia, F.; Li, A.; Fu, H.; Wang, M.; Pan, L. Development of an Immunochromatographic Strip Test for the Rapid Detection of Alternariol Monomethyl Ether in Fruit. *Toxins.* **2017**. <https://doi.org/10.3390/toxins9050152>.
- (70) Landsteiner, K. *The Specificity of Serological Reactions*; Dover Publications, Inc.: New York, **1962**.
- (71) Shen, Y.; Zhu, F.; Wang, H.; Yang, J.; Xu, Z.; Xiao, Z.; Sun, Y.; Lei, H. Preparation of Hapten, Artificial Antigen and Antibody for Detection of Residual Alternariol in Food. CN 105712970A, 2016.
- (72) Landsteiner, K. The Specificity of Serological Reactions. *J. Pharm. Sci.* **1963**, *52* (12), 1196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.2600521232>.
- (73) Landsteiner, K.; Simms, S. Production of Heterogenetic Antibodies with Mixtures of the Binding Part of the Antigen and Protein. *J. Exp. Med.* **1923**, *38* (2), 127–138. <https://doi.org/10.1084/jem.38.2.127>.
- (74) Xu, Z.-L.; Shen, Y.-D.; Beier, R. C.; Yang, J.-Y.; Lei, H.-T.; Wang, H.; Sun, Y.-M. Application of Computer-Assisted Molecular Modeling for Immunoassay of Low Molecular Weight Food Contaminants: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *647* (2), 125–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.003>.
- (75) Aboitiz, N.; Vila-Perelló, M.; Groves, P.; Asensio, J. L.; Andreu, D.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. 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* **2004**, *5* (9), 1245–1255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.200400025>.
- (76) Huisman, H.; Wynveen, P.; Setter, P. W. Studies on the Immune Response and Preparation of Antibodies against a Large Panel of Conjugated Neurotransmitters and Biogenic Amines: Specific Polyclonal Antibody Response and Tolerance. *J. Neurochem.* **2010**, *112* (3), 829–841. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06492.x>.
- (77) 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.* **1982**, *30* (3), 572–580. <https://doi.org/10.1021/jf00111a040>.
- (78) Hermanson, G. T. Chapter 19 - Vaccines and Immunogen Conjugates; Hermanson, G. T. B. T.-B. T. (Third E., Ed.; Academic Press: Boston, **2013**; pp 839–865. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00019-4>.
- (79) Parra, J.; Mercader, J. V; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Synthesis of Azoxystrobin Transformation Products and Selection of Monoclonal Antibodies for Immunoassay Development. *Toxicol. Lett.* **2012**, *210* (2), 240–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.030>.

- (80) Fuentes, J. V. M. B. and F. A. E. T. and C. A. and A. A. S. and A. A. Antibody Generation and Immunoassay Development in Diverse Formats for Pyrimethanil Specific and Sensitive Analysis. Royal Society of Chemistry (UK) **2012**. <https://doi.org/doi:10.1039/c2an35801h>.
- (81) Esteve-Turrillas, F. A.; Parra, J.; Abad-Fuentes, A.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Mercader, J. V. Hapten Synthesis, Monoclonal Antibody Generation, and Development of Competitive Immunoassays for the Analysis of Picoxystrobin in Beer. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *682* (1), 93–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.042>.
- (82) Adamczyk, M.; Buko, A.; Chen, Y.-Y.; Fishpaugh, J. R.; Gebler, J. C.; Johnson, D. D. 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.* **1994**, *5* (6), 631–635. <https://doi.org/10.1021/bc00030a019>.
- (83) Stills, H. F. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. *ILAR J.* **2005**, *46* (3), 280–293. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>.
- (84) Murphy, K. (Kenneth M. .; Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Ehrenstein, M.; Rivera Muñoz, B.; Palacios Martínez, J. R. *Inmunobiología de Janeway*, 7^a ed. en.; McGraw Hill Interamericana Editores: México, D. F, **2009**.
- (85) 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* **1990**, *8* (1), 49–56. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X\(90\)90177-N](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X(90)90177-N).
- (86) Freund, J.; Casals, J.; Hosmer, E. P. Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1937**, *37* (3), 509–513. <https://doi.org/10.3181/00379727-37-9625>.
- (87) Kindt, T.; Goldsby, R.; Osborne, B. *Inmunología de Los Trasplantes*; **2007**.
- (88) Kaltgrad, E.; Sen Gupta, S.; Punna, S.; Huang, C.-Y.; Chang, A.; Wong, C.-H.; Finn, M. G.; Blixt, O. Anti-Carbohydrate Antibodies Elicited by Polyvalent Display on a Viral Scaffold. *ChemBioChem* **2007**, *8* (12), 1455–1462. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.200700225>.
- (89) Köhler, G.; Miltein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- (90) Chodon, T.; Koya, R. C.; Odunsi, K. Active Immunotherapy of Cancer. *Immunol. Invest.* **2015**, *44* (8), 817–836. <https://doi.org/10.3109/08820139.2015.1096684>.
- (91) Altshuler, E. P.; Serebryanaya, D. V.; Katrukha, A. G. Generation of Recombinant Antibodies and Means for Increasing Their Affinity. *Biochem.* **2010**, *75* (13), 1584–1605. <https://doi.org/10.1134/S0006297910130067>.

- (92) Olsson, L.; Kaplan, H. S. Human-Human Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies of Predefined Antigenic Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77* (9), 5429–5431. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.9.5429>.
- (93) Abad, A.; Montoya, A. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42* (8), 1818–1823. <https://doi.org/10.1021/jf00044a047>.
- (94) Stanker, L. H.; Beier, R. C. Introduction to Immunoassays for Residue Analysis. In *Immunoassays for Residue Analysis*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, **1996**; Vol. 621, pp 1–2. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-1996-0621.ch001>.
- (95) Marco, M.-P.; Gee, S.; Hammock, B. D. Immunochemical Techniques for Environmental Analysis I. Immunosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1995**, *14* (7), 341–350. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-9936\(95\)97062-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-9936(95)97062-6).
- (96) Abad, A.; Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 2. Assay Optimization and Application to the Analysis of Water Samples. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (4), 1495–1501. <https://doi.org/10.1021/jf950691w>.
- (97) Di Nardo, F.; Anfossi, L.; Ozella, L.; Sacconi, A.; Giovannoli, C.; Spano, G.; Baggiani, C. Validation of a Qualitative Immunochromatographic Test for the Noninvasive Assessment of Stress in Dogs. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1028*, 192–198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.019>.
- (98) Koczula, K. M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem.* **2016**, *60* (1), 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
- (99) Tripathi, P.; Upadhyay, N.; Nara, S. Recent Advancements in Lateral Flow Immunoassays: A Journey for Toxin Detection in Food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58* (10), 1715–1734. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1276048>.
- (100) Zhang, L.; Mazouzi, Y.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *165*, 112370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112370>.
- (101) Sun, Y.; Xing, G.; Yang, J.; Wang, F.; Deng, R.; Zhang, G.; Hu, X.; Zhang, Y. Development of an Immunochromatographic Test Strip for Simultaneous Qualitative and Quantitative Detection of Ochratoxin A and Zearalenone in Cereal. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96* (11), 3673–3678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.7550>.
- (102) Pilavaki, E.; Demosthenous, A. Optimized Lateral Flow Immunoassay Reader for the Detection of Infectious Diseases in Developing Countries. *Sensors.* **2017**. <https://doi.org/10.3390/s17112673>.
- (103) Shelver, W. L.; Keum, Y.-S.; Kim, H.-J.; Rutherford, D.; Hakk, H. H.; Bergman, Å.; Li, Q. X. Hapten Syntheses and Antibody Generation for the Development of a Polybrominated Flame Retardant ELISA. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 3840–3847. <https://doi.org/10.1021/jf047863m>.

- (104) Kim, K.-O.; Kim, Y. J.; Lee, Y. T.; Hammock, B. D.; Lee, H.-S. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Organophosphorus Insecticide Bromophos-Ethyl. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (23), 6675–6682. <https://doi.org/10.1021/jf025703+>.
- (105) 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.* **2014**, *152*, 230–236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.150>.
- (106) Somovilla, J. P. and J. V. M. B. and C. A. and A. A. F. and A. A. Concise and Modular Synthesis of Regioisomeric Haptens for the Production of High-Affinity and Stereoselective Antibodies to the Strobilurin Azoxystrobin. Elsevier **2011**. <https://doi.org/doi:10.1016/j.tet.2010.11.054>.
- (107) Man, Y.; Ren, J.; Li, B.; Jin, X.; Pan, L. A Simple, Highly Sensitive Colorimetric Immunosensor for the Detection of Alternariol Monomethyl Ether in Fruit by Non-Aggregated Gold Nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410* (28), 7511–7521. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1369-z>.
- (108) Parra, J.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Generation of Anti-Azoxystrobin Monoclonal Antibodies from Regioisomeric Haptens Functionalized at Selected Sites and Development of Indirect Competitive Immunoassays. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *715*, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.014>.
- (109) Liang, D.; Luo, H.; Liu, Y.-F.; Hao, Z.-Y.; Wang, Y.; Zhang, C.-L.; Zhang, Q.-J.; Chen, R.-Y.; Yu, D.-Q. Lysilactones A–C, Three 6H-Dibenzo[b,d]Pyran-6-One Glycosides from *Lysimachia Clethroides*, Total Synthesis of Lysilactone A. *Tetrahedron* **2013**, *69* (9), 2093–2097. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.01.029>.
- (110) Mallampudi, N. A.; Choudhury, U. M.; Mohapatra, D. K. Total Synthesis of (–)-Citreisocoumarin, (–)-Citreisocoumarinol, (–)-12-Epi-Citreisocoumarinol, and (–)-Mucorisocoumarins A and B Using a Gold(I)-Catalyzed Cyclization Strategy. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (6), 4122–4129. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03278>.
- (111) Martinez-Solorio, D.; Belmore, K. A.; Jennings, M. P. Synthesis of the Purported Ent-Pochonin J Structure Featuring a Stereoselective Oxocarbenium Allylation. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (10), 3898–3908. <https://doi.org/10.1021/jo200332d>.
- (112) Yuan, L.; Sanford, A. R.; Feng, W.; Zhang, A.; Zhu, J.; Zeng, H.; Yamato, K.; Li, M.; Ferguson, J. S.; Gong, B. Synthesis of Crescent Aromatic Oligoamides. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (26), 10660–10669. <https://doi.org/10.1021/jo050798a>.
- (113) Hinman, A. W.; Davis, D.; Kheifets, V. Preparation of Resorcinol Compounds for Dermatological Use. US20140256830 A1, **2014**.
- (114) Lozada, J.; Liu, Z.; Perrin, D. M. Base-Promoted Protodeboronation of 2,6-Disubstituted Arylboronic Acids. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (11), 5365–5368. <https://doi.org/10.1021/jo500734z>.
- (115) Marcyk, P.; Brown, L. E.; Huang, D.; Cowen, L. E.; Whitesell, L. Preparation of Resorcylyate

- Aminopyrazole Compounds as Hsp90 Inhibitors and Uses Thereof. WO 2020/227368 A1, **2020**.
- (116) Rödel, T.; Gerlach, H. Enantioselective Synthesis of the Polyketide Antibiotic (3R,4S)-(-)-Citrinin. *Liebigs Ann.* **1995**, *5*, 885–888. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jlac.1995199505129>.
- (117) Mundy, B. P.; Ellerd, M. G.; Favalaro, F. G. Index. In *Name Reactions and Reagents in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, **2005**. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780471739876.index>.
- (118) Carlson, E. J.; Riel, A. M. S.; Dahl, B. J. Donor–Acceptor Biaryl Lactones: PH Induced Molecular Switches with Intramolecular Charge Transfer Modulation. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (46), 6245–6249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.09.016>.
- (119) Stadlbauer, S.; Ohmori, K.; Hattori, F.; Suzuki, K. A New Synthetic Strategy for Catechin-Class Polyphenols: Concise Synthesis of (-)-Epicatechin and Its 3-O-Gallate. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (67), 8425–8427. <https://doi.org/10.1039/C2CC33704E>.
- (120) Yamaguchi Nobuyuki; Yuyama, Daisuke; Sakamoto, Kayo; Suzuki, Keisuke; Matsumoto, Takashi, S. T. First Total Synthesis of Dermocanarin 2. *Synlett* **2016**, *27* (08), 1262–1268. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1561417>.
- (121) Mori, K.; Ohmori, K.; Suzuki, K. Stereochemical Relay via Axially Chiral Styrenes: Asymmetric Synthesis of the Antibiotic TAN-1085. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48* (31), 5633–5637. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200901968>.
- (122) Tamiya Corinna; Ohmori, Ken; Suzuki, Keisuke, M. J. Stereoselective Access to Functionalized Dihydrophenanthrenes via Reductive Cyclization of Biaryl Ene-Aldehydes. *Synlett* **2007**, *05*, 780–784. <https://doi.org/10.1055/s-2007-970771>.
- (123) Omura, K.; Swern, D. Oxidation of Alcohols by “Activated” Dimethyl Sulfoxide. a Preparative, Steric and Mechanistic Study. *Tetrahedron* **1978**, *34* (11), 1651–1660. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020\(78\)80197-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020(78)80197-5).
- (124) Nishiyama, H.; Nagaoka, M.; Takagi, I.; Shimizu, H.; Yaegashi, T.; Sawada, S.; Matsuzaki, T.; Ono, M.; Komatsu, K.; Fuchikami, K.; Umeyama, H.; Shitaka, M.; Kanou, K. Preparation of N-[3-(Hydroxycarbamoyl)Propanoyl]-L-Amino Acid Amide Derivatives as Matrix Metalloproteinase (MMP) Inhibitors. *PCT Int. Appl.*, 2009113320, **2009**.
- (125) Zysman-Colman, E.; Arias, K.; Siegel, J. Synthesis of Arylbromides from Arenes and N-Bromosuccinimide (NBS) in Acetonitrile — A Convenient Method for Aromatic Bromination. *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 440–447. <https://doi.org/10.1139/V08-176>.
- (126) Mondal, M.; Puranik, V. G.; Argade, N. P. A Facile Phenol-Driven Intramolecular Diastereoselective Thermal/Base-Catalyzed Dipolar [2 + 2] Annulation Reactions: An Easy Access to Complex Bioactive Natural and Unnatural Benzopyran Congeners. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (6), 2068–2076. <https://doi.org/10.1021/jo0624344>.
- (127) Hall, D. G. *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materials*; Wiley, **2012**.

- (128) Watanabe Norio; Suzuki, Akira, T. M. Synthesis of Sterically Hindered Biaryls via the Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Arylboronic Acids or Their Esters with Haloarenes. *Synlett* **1992**, 1992 (03), 207–210. <https://doi.org/10.1055/s-1992-21315>.
- (129) Kraus, G. A.; Roth, B. Synthetic Studies toward Verrucarol. 2. Synthesis of the AB Ring System. *J. Org. Chem.* **1980**, 45 (24), 4825–4830. <https://doi.org/10.1021/jo01312a004>.
- (130) Appel, B.; Saleh, N. N. R.; Langer, P. Domino Reactions of 1,3-Bis-Silyl Enol Ethers with Benzopyrylium Triflates: Efficient Synthesis of Fluorescent 6H-Benzo[c]Chromen-6-Ones, Dibenzo[c,d]Chromen-6-Ones, and 2,3-Dihydro-1H-4,6-Dioxachrysen-5-Ones. *Chem. – A Eur. J.* **2006**, 12 (4), 1221–1236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.200501024>.
- (131) Authority, E. F. S.; Arcella, D.; Eskola, M.; Gómez Ruiz, J. A. Dietary Exposure Assessment to *Alternaria* Toxins in the European Population. *EFSA J.* **2016**, 14 (12), e04654. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4654>.
- (132) Puvača, N.; Avantaggiato, G.; Merkuri, J.; Vuković, G.; Bursić, V.; Cara, M. Occurrence and Determination of *Alternaria* Mycotoxins Alternariol, Alternariol Monomethyl Ether, and Tentoxin in Wheat Grains by QuEChERS Method. *Toxins*. **2022**. <https://doi.org/10.3390/toxins14110791>.
- (133) Myresiotis, C. K.; Testempasis, S.; Vryzas, Z.; Karaoglanidis, G. S.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Determination of Mycotoxins in Pomegranate Fruits and Juices Using a QuEChERS-Based Method. *Food Chem.* **2015**, 182, 81–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.141>.
- (134) Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.
- (135) Wenderoth, M.; Garganese, F.; Schmidt-Heydt, M.; Soukup, S. T.; Ippolito, A.; Sanzani, S. M.; Fischer, R. Alternariol as Virulence and Colonization Factor of *Alternaria Alternata* during Plant Infection. *Mol. Microbiol.* **2019**, 112 (1), 131–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mmi.14258>.
- (136) Majdinasab, M.; Zareian, M.; Zhang, Q.; Li, P. Development of a New Format of Competitive Immunochromatographic Assay Using Secondary Antibody–Europium Nanoparticle Conjugates for Ultrasensitive and Quantitative Determination of Ochratoxin A. *Food Chem.* **2019**, 275, 721–729. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.112>.
- (137) Kaur, J.; Singh, K. V.; Boro, R.; Thampi, K. R.; Raje, M.; Varshney, G. C.; Suri, C. R. Immunochromatographic Dipstick Assay Format Using Gold Nanoparticles Labeled Protein–Hapten Conjugate for the Detection of Atrazine. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41 (14), 5028–5036. <https://doi.org/10.1021/es070194j>.
- (138) 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. 2014, pp 29–43. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/519/oj>.
- (139) Armarego, W. L. F. Purification of Laboratory Chemicals. *Purif. Lab. Chem.* **2017**, 1–1176. [https://doi.org/10.1016/s0022-328x\(00\)82974-5](https://doi.org/10.1016/s0022-328x(00)82974-5).
- (140) Presidencia, M. de la. Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre, Sobre Protección de Los Animales Utilizados para Experimentación y Otros Fines Científicos. *Boe* **2005**, 34367–34391.
- (141) BOE. Ley 32/2007, de 7 de Noviembre, Para el Cuidado de los Animales, en Su Explotación, Transporte, Experimentación y Sacrificio. *BOE* **2007**, No. 268, 45914–45920.
- (142) Council of the European Union. Regulation (EU) No 911/2010 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. *Off. J. Eur. Union* **2010**, 53, 33–75.
- (143) Huang, D. S.; LeBlanc, E. V.; Shekhar-Guturja, T.; Robbins, N.; Krysan, D. J.; Pizarro, J.; Whitesell, L.; Cowen, L. E.; Brown, L. E. Design and Synthesis of Fungal-Selective Resorcylate Aminopyrazole Hsp90 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (5), 2139–2180. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00826>.
- (144) Lu, J.; Ma, J.; Xie, X.; Chen, B.; She, X.; Pan, X. Enantioselective Total Synthesis of Aigialomycin D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17 (7), 1066–1073. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.03.027>.
- (145) 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* **1979**, 93 (1), 111–126. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90280-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90280-0).
- (146) Raab, G. M. Comparison of a Logistic and a Mass-Action Curve for Radioimmunoassay Data. *Clin. Chem.* **1983**, 29 (10), 1757–1761. <https://doi.org/10.1093/clinchem/29.10.1757>.

