

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIA QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Polímeros de impronta molecular y amplificación fotoquímica  
para el análisis de micotoxinas**

**Molecularly imprinted polymers and photochemical  
amplification for mycotoxin analysis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Tamara Dolores Moya Cavas**

DIRIGIDA POR

**Guillermo Orellana Moraleda**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Polímeros de impronta molecular y amplificación  
fotoquímica para el análisis de micotoxinas**

**Molecularly imprinted polymers and  
photochemical amplification for mycotoxin analysis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Tamara Dolores Moya Cavas**

Director  
**Guillermo Orellana Moraleda**

Madrid, 2025



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Doctorado en Química Avanzada**



**TESIS DOCTORAL**

**Polímeros de impronta molecular y amplificación  
fotoquímica para el análisis de micotoxinas**

**Molecularly imprinted polymers and  
photochemical amplification for mycotoxin analysis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Tamara Dolores Moya Cavas**

Director  
**Guillermo Orellana Moraleda**

Madrid, 2025





## AGRADECIMIENTOS

Afirmativo, son unos agradecimientos densos, pero como seguramente sea la parte que más lea de la tesis con los años, me los merezco. Bueno, todos los que me conocéis me habéis visto llorar por todos los motivos posibles que se os ocurran, pero ya sabéis que sólo lo hago para equilibrar todo lo que me hacéis reír. Cada una de las personas que estáis aquí me habéis hecho sentirme cómoda conmigo misma y ganar seguridad en lo que hago y, creedme que eso no es fácil. Jamás habría pensado que la decisión de venirme a Madrid a hacer el doctorado me iba a cambiar tanto mi vida personal y mi visión de la ciencia. Desde luego, lo más importante que he aprendido es que **sin grupo no hay ciencia** que valga. Y, por suerte, he podido expresar todos los conocimientos de cada uno de los que me han rodeado estos años, desde mi grupo, GSOLFA, hasta los dos grupos que me acogieron durante unos meses, “Génie Enzymatique et Cellulaire” liderado por Karsten Haupt y “NanoSystèmes Analytiques” liderado por Neso Sojic. Cada vez que necesitaba ayuda todos han sacado un hueco para mí. Solo pido rodearme de gente así los años que me esperan.

Durante esta etapa he conocido a personas con las que sé que voy a poder contar siempre. Quiero hacer una mención especial a la primera persona con la que conecté del grupo GSOLFA, Jose, mi frate. Desde el primer día supe que eras mi tándem, mi compi de estupideces, de cardio en paraninfo, de rescate de pájaros enfermos y, sobre todo mi consejero (aunque esto último no siempre se te da muy bien). No sé cómo agradecerte todo el apoyo que me has dado. Bueno, quizás sí, pidiéndote perdón por llamarte seta gruñona cuando estabas escribiendo la tesis (ahora te entiendo). Me dejo millones de cosas que decirte por aquí, pero me tranquiliza saber que ya te las he dicho muchas veces. En ese año también coincidí con el alternativo de Luis Calahorra, el quejicón de David, la bonica de Cristina, el destroyer de Juanjo, Dani el cocacolas y la happy flower de Elisa, sinceramente, creo que fue el año que más planes hice, gracias por hacerme sentir una más tan rápido (aunque en ocasiones no entendierais algunas de mis palabras en murcianico).

Pasado el primer año, ya empezasteis a abandonarme poco a poco, sentí que no iba a volver a tener un grupo así. Sin embargo, tuvisteis buena competencia cuando llegaron Andrea la falsa tinerfeña, Mery la poeta/actriz/química/ lo que le echas, Miriam Rapunxel, Natalia Rizada, la preciosa mami Lili, Iman la multitasking y Ya Jie la glotona. Poquito después llegaría también Paloma Mena e Irene alias La Rosalía. Con todas tengo historias divertidas para contar, pero quiero destacar a las otras dos integrantes del trío calavera (y super fans de Arde Bogotá): Miriam y Natalia. Natalia, eres la mayor personaje que he conocido en toda mi vida, creo que me haces reír y me sacas de quicio a partes iguales, será por el signo del zodiaco... gracias por aparecer y espero ver ese moño durante muchos años, aunque tenga que ir a Rivas. Rapunxel, vecina, gym sis, gemela de Jose, aitaner, alérgica alert, podría ponerte mil apodosos y me seguiría quedando corta. Sabes que eres una persona muy especial para mí, nos

tomamos nuestro tiempo para conectar, pero no creo que haya vuelta atrás. Quiero estar a tu lado y ver TODO lo que consigues en Praga, o donde te propongas, confío en ti ciegamente en todos los aspectos. Estoy muy muy muy orgullosa de ti.

Por otro lado, aunque no hemos salido mucho juntos fuera del laboratorio (y me encantaría hacerlo) quiero mencionar a Martuqui la montañera polifacética, Diego el risueño, Jing el jovenaso, Bettina la calurosa, Miguel el bebé en tránsito, Melisa la soriana, Pablo el falso malagueño, el Eze british y Fernando el viejoven, cada uno con sus peculiaridades. En todos encontré apoyo de una u otra forma y espero que cuando lo necesitéis contéis conmigo.

A mi palmera favorita, la mejor compañera de piso que podría tener, mi cuidadora de gastroenteritis. Me has hecho querer vivir acompañada, comer aún más sano, comprar plátanos de Canarias (de vez en cuando que están caros), volverme adicta a yepoda y a los batidos detox y que tenga celos de que mi madre te quiera más a ti que a mí. No te lo voy a negar, creo que hizo mucho que el primer día colocaras en el frigo un imán de Cartagena. Sé que se me va a quedar corta esta experiencia contigo, pero también sé que nos vamos a ver, ya sea en La Palma, Granada o donde sea que acabe ese culo inquieto.

A la mayor solucionadora de problemas, la sabiduría personificada y la mejor persona que conozco, Bea. Eres la luz y alegría del grupo, te mereces lo más bonito y sé que va a llegar a lo que quieres más temprano que tarde.

A continuación, los agradecimientos a la plantilla de profesores incansables y siempre dispuestos. Ana, gracias por los consejos y discusiones sobre síntesis orgánica. A Fernando Navarro, aunque fuiste duro de roer y aún te hagas el remolón de vez en cuando respondiendo un “estás muerto” a nuestras peticiones, sabemos que cada vez te caemos mejor y que te encanta ayudarnos. Así que millones de gracias de parte de todos, eres una pieza fundamental.

A mi mentora y tutora, Mari Cruz, doy gracias por haberte podido disfrutar. Recuerdo la mítica prueba de fuego del calibrado y cómo cada vez que pillabas a alguien que hablaba francés por los pasillos me lo presentabas para que practicara. Cómo te disculpabas cada vez que te salía una palabrota sin saber que yo también era muy partidaria de su inclusión. He de reconocer que, al principio, me resultaba un poco abrumador cada vez que cruzabas la puerta del laboratorio durante mis primeros meses allí y me mandabas a un sitio diferente “Tamara, tenemos que organizar para que vayas a Compiègne con Karsten ya”. Al día siguiente, “Tamara, creo que deberías ir a Verona con Alejandra Bossi”. Luego, entendí que tu *modus operandi* era ir siempre por delante, creo que eso se me pegó un poco. Nunca olvidaré unas palabras que me dijiste por teléfono durante mi estancia en Compiègne, conforme te escuchaba quería que se quedaran todas y cada una de esas palabras para siempre en mi memoria, estabas orgullosa, y eso me hizo sentir un poquito más grande. Aunque luego me dirías

otra cosa que no quise retener ni por asomo... Agradezco tu sinceridad, tu dedicación ilimitada, tus ánimos, tu humor, tu pensamiento crítico, tu ética profesional y tus valores. Tu ausencia es muy notable, pero quiero quedarme con que fuiste un regalo para todos los que coincidimos contigo, gracias por confiar en mí, darme la oportunidad de ampliar mis conocimientos en un grupo como este y conocer a toda esta gente maravillosa.

Guillermo, sabía que no me iba a equivocar proponiéndote como tutor, no hay persona de la que pueda aprender más. Gracias por decir SÍ desde el minuto 1, por estar disponible siempre para discutir sobre química y ayudarme en más de lo que puedes. Por apoyarme incondicionalmente desde cualquier parte del mundo y acompañarme a conferencias un poquito más alejadas de tu campo. En ese viaje de avión nadie pudo dormir, no había forma de callarnos (aunque eso no es muy difícil). Nunca podré agradecerte toda la paciencia que has tenido con mi impaciencia, ni que me “quitaras” el miedo a volver a un laboratorio de síntesis orgánica.

A Elena, mi otra supervisora en la sombra, gracias por confiar en mí incluso cuando ni yo misma lo hacía. Por estar codo con codo en el laboratorio conmigo cuando te encabezonabas en que algo tenía que salir. Y, sobre todo, por estar personalmente absolutamente siempre. Sé que lo sabes, pero tienes la mayor parte de la culpa de que haya conseguido llegar hasta el final. Todos coincidimos en que no podría haber mejor guía analítica del grupo, tu entusiasmo, tus ganas de que las cosas funcionen y todo tu trabajo. No es fácil, pero poco a poco llegarás a donde tú quieres, aunque ahora parezca inalcanzable. Disfruta de todo lo que has logrado.

A la gente del departamento de orgánica, gracias por contar conmigo para los planes como una más desde el principio, incluso cuando ni siquiera bajaba a la tercera ni para coger agua (aunque quizás sí que bajaba a pedir algún que otro reactivo). Quiero destacar a Sergio, Patri, Manu y Jaime. Manu y Jaime, gracias por ser las personas más risueñas que conozco y por nuestras conversaciones de pasillo inesperadamente profundas. Al tándem Sergio-Patri gracias por hacerme saber que estáis ahí, grite o no, y que independientemente del tiempo que pasemos sin hablar, vuestra buena vibra me hace sentir cómoda en cualquier momento.

A las limpiadoras Carmen, Pilar y María Jesús gracias por mimarnos tanto y animarnos con unas simples palabras. Hacéis mucho más de lo que pensáis, millones de gracias.

A los técnicos de analítica Marcos y Miriam, a Lola de RMN, a Estefanía de espectrometría de masas, a Maider de microscopía electrónica, gracias por amar vuestro trabajo y hacérselo ver con la ayuda incondicional que ofrecéis.

De los guiris que fueron integrantes del grupo durante unos meses también aprendí, Luciana me enseñó a hablar argentino, Fátima a practicar el francés, de Lauren el

estilismo y Renato casi me enseña a bailar samba, gracias por ser inesperados y, al mismo tiempo, un regalico.

A la gente que conocí durante las estancias, primero en Compiègne, Alessia, Christos, Noel, Ernesto, Alejandra, Bernadette y Karsten. Gracias por haceros inolvidables en apenas 2 meses, a pesar de la intensidad en el trabajo me encantaba pensar que iba a compartir más tiempo con vosotros. Y después, en Bordeaux, Marine la francesa más española que conocí, Guillaume el bigotudo, Bertrand el francés más simpático habido y por haber, el foquito Jerry y la manita Leslie. En especial, quiero destacar a Jerry, que, aunque chocamos mucho tengo que estarle agradecida, en primer lugar, porque dice tantas palabrotas como yo, y, en segundo, por ser mi guía junto con la manita en Bordeaux. La Leslie, mi manita mexa favorita, quiero que sepas que gracias a ti y al Jerry me hicisteis sentir una habitante/estudiante más de allí, el tiempo se me pasó volando. Manita, compartimos muchos momentos bonitos y no tan bonitos, pero siempre estuviste ahí, incluso ahora en la distancia siento toda la fuerza que me mandas en cada momento. Eres bien chida, amiga, y donde yo esté siempre tendrás una casa.

Gracias a mi familia por apoyarme siempre, a los que ya no están y a los que están, mi tía María, mis primos Raúl, Iván y Amanda, mis padrinos Esther y Vicente, y, por supuesto, a las alegrías de la casa, mis dos florecillas melladas, Alejandra y Jimena. Y, sobre todo, gracias a la persona más luchadora y dispuesta que conozco, mi madre. Porque, aunque soy más que consciente de que le encantaría tenerme a su vera, poco a poco entiende que tengo que volar y que eso no significa que no sea la persona a la que más quiero en el mundo. También agradecer a su fiel compañera, mi gatita Keira, que, aunque no me sustituye (porque yo soy mucho más pesada) sé que le da mucho cariño entre zarpazo y zarpazo.

A mis amigos del erasmus Cherine Amoura, Valeria, María Barragán, Carmen Llavona, Carmen Po, Laura J., Laura W., Pak, Marina, Irene Valero, Mireya, Ale, Borja, Miquel, Lolo, Giuliana y Marta, porque sin la experiencia que vivimos no sé si me habría atrevido a embarcarme en este proyecto. Quiero hacer una mención especial a Laura J. y a su familia por ofrecerme la tranquilidad de encontrar una casa en Madrid que era lo que más me asustaba al tomar la decisión. Gracias Lau por compartir conmigo Madrid, por acompañarme muchos de los días que me sentía abuelita y por ser mi contacto de emergencia aquí.

A mis amigos de siempre, pingüina, Ant, Cari, Irene, Manu, Maik y Juanpe, sé que cuento con vosotros para todo, me habéis hecho ser quién soy y me siento muy afortunada de teneros conmigo.

Por último, pero no menos importante, Guille, mi compañero durante casi 8 años. Gracias por aportar la tranquilidad que le falta a esta cabeza que tengo, por escaparte cada vez que puedes a Madrid, por hacerme reír hasta que me duelen los mofletes, por

hacerme desconectar y por animarme en todo lo que hago. Aunque nunca seas capaz de ver una película entera conmigo sin quedarte dormido y estos últimos meses me estés poniendo muy nerviosa escribiendo más rápido que yo la tesis, te quiero mucho y me gusta cómo nos complementamos. ¡Así que, habrá que buscar por fin alguna aventura con el mismo destino!

Y si os quiero a todos, ¿qué hago?



# ÍNDICE



# ÍNDICE

FIGURAS.....	
TABLAS.....	
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	i
SUMMARY .....	vii
RESUMEN.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción general .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Polímeros de impronta molecular.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Concepto y componentes .....	1
1.1.2. Tipos de impronta.....	2
1.1.3. Formatos físicos .....	3
1.1.4. Técnicas de caracterización de MIPs.....	5
1.1.5. Aplicaciones de los MIPs .....	7
<b>1.2. Micotoxinas .....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Principales hongos productores.....	12
1.2.2. Impacto en la salud humana y animal.....	13
1.2.3. Regulación y control .....	16
1.2.4. Métodos y tratamientos analíticos para su cuantificación.....	17
<b>Capítulo 2. Síntesis de MIPs en distintos formatos y su aplicación .....</b>	<b>27</b>
• <b>Determinación simultánea de ZON y AOH en muestras de aceite mediante partículas mixtas de MIP.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Introducción.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2. Objetivos .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3. Parte experimental .....</b>	<b>37</b>
2.3.1. Reactivos y materiales.....	37
2.3.2. Equipos y condiciones de medida.....	37
2.3.3. Polimerización en partículas de sílice .....	38
2.3.4. Diseño experimental para la preconcentración MISPE.....	39
2.3.5. Extracción de AOH y ZON usando MISPE.....	40
2.3.6. Limpieza y preconcentración de muestras de aceite usando MISPE ..	40
2.3.7. Validación del método.....	41
<b>2.4. Resultados y discusión .....</b>	<b>42</b>

2.4.1. Caracterización del MIP .....	42
2.4.2. Optimización quimiométrica del MISPE para AOH y ZON.....	47
2.4.3. Caracterización del procedimiento MISPE.....	54
2.4.4. Análisis de muestras .....	57
<b>2.5. Conclusiones.....</b>	<b>59</b>
• <b>Determinación de ácido micofenólico mediante MIPs en formato nanogel ....</b>	<b>61</b>
<b>2.6. Introducción .....</b>	<b>61</b>
<b>2.7. Objetivos .....</b>	<b>62</b>
<b>2.8. Parte experimental .....</b>	<b>63</b>
2.8.1. Reactivos y materiales .....	63
2.8.2. Equipos.....	63
2.8.3. Síntesis de MIPs-NGs.....	64
2.8.4. Caracterización y funcionalización de materiales .....	69
2.8.5. Ensayos de reconocimiento de MPA por los MIPs.....	70
<b>2.9. Resultados y discusión.....</b>	<b>72</b>
2.9.1. Estrategias de síntesis y caracterización de los MIP-NGs.....	72
2.9.2. Evaluación de la interacción analito-MIP y criterios de la preselección óptima.....	76
<b>2.10. Conclusiones .....</b>	<b>89</b>
<b>Capítulo 3. Nuevas estrategias de polimerización y desarrollo de un sensor basado en electroquímica bipolar combinada con MIPs.....</b>	<b>91</b>
• <b>Desarrollo de un sensor basado en electroquímica bipolar combinada con MIPs .....</b>	<b>91</b>
<b>3.1. Introducción .....</b>	<b>91</b>
<b>3.2. Objetivos.....</b>	<b>99</b>
<b>3.3. Parte experimental.....</b>	<b>100</b>
3.3.1. Reactivos y disolventes .....	100
3.3.2. Modificación química de la superficie del electrodo de oro.....	100
3.3.3. Medidas electroquímicas .....	102
3.3.4. Fabricación de celdas BPE .....	102
<b>3.4. Resultados y discusión.....</b>	<b>104</b>
3.4.1. Síntesis, caracterización morfológica y comportamiento electroquímico del alambre de oro recubierto con MIP .....	104

3.4.2. Plataforma clásica de BE para la cuantificación inalámbrica de ZON...	107
3.4.3. Plataforma microfluidica para la cuantificación inalámbrica de ZON ...	110
<b>3.5. Conclusiones</b>	<b>114</b>
• <i>Nuevas estrategias de polimerización</i>	<b>115</b>
<b>3.6. Introducción</b>	<b>115</b>
<b>3.7. Objetivos</b>	<b>121</b>
<b>3.8. Parte experimental</b>	<b>122</b>
3.8.1. Reactivos y materiales	122
3.8.2. Equipos	122
3.8.3. Fotopolimerización	122
3.8.4. Polimerización mediante ECL	125
3.8.5. Caracterización por TEM	133
3.8.6. Caracterización espectroscópica y por SPT	133
<b>3.9. Resultados y discusión</b>	<b>133</b>
3.9.1. Descripción de los sistemas	133
3.9.2. Elección y síntesis de los generadores de ECL	135
3.9.3. Estudio de la ECL	135
3.9.4. Caracterización de los materiales	144
<b>3.10. Conclusiones</b>	<b>155</b>
 <b>Capítulo 4.</b>	 <b>157</b>
 <b>FINAL CONCLUSIONS</b>	 <b>237</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	 <b>243</b>



# **FIGURAS Y TABLAS**



## FIGURAS

**Figura 1.** Proceso general de impronta molecular. La molécula plantilla interactúa con los monómeros funcionales, formando una cavidad que se ajusta a su forma. Tras eliminar la plantilla, queda una cavidad vacía diseñada para reconocer y unirse nuevamente a la molécula objetivo.....1

**Figura 2.** Micrografías SEM de polímeros en (A) bloque y, (B) partículas esféricas. Reproducido de la referencia [16] con permiso.....5

**Figura 3.** Ejemplo de liberación controlada de doxorrubicina (DOX) encapsulada en un MIP recubierto con un péptido de penetración celular (CPP), utilizada como estrategia en la terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer de mama. Al irradiar el fotosensibilizador (PS), este genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan las células tumorales y, al mismo tiempo, mejora la liberación de DOX al aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos. Reproducido de la referencia [30] con permiso. Copyright 2022 American Chemical Society.....8

**Figura 4.** Ejemplo de sensor óptico basado en MIPs selectivos para la detección de enrofloxacin, utilizando un haz de fibras ópticas con esferas microscópicas de impronta molecular situadas en su extremo distal. Este sistema permite la detección multiplexada y altamente selectiva de este antibiótico mediante análisis por fluorescencia. Reproducido de la referencia [38] con permiso.....10

**Figura 5.** Clasificación de los (bio)ensayos según si el complejo anticuerpo-antígeno o MIP-analito se separa o no del analito libre. Reproducido de la referencia [41] con permiso. Copyright 2010 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.....11

**Figura 6.** Estrategias de detección fluorescente en sistemas basados en MIPs para la monitorización de la interacción MIP-analito. Se presentan las estrategias según el origen de la señal fluorescente, junto con sus gráficas correspondientes: A) analito no fluorescente (ensayo competitivo o no competitivo por desplazamiento); B) analito fluorescente; C) polímero etiquetado. Reproducido de la referencia [41] con permiso. Copyright 2010 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.....12

**Figura 7.** Mapa de la aplicación de DSM para la gestión de micotoxinas, que se basa en datos del primer semestre de 2024 y muestra los niveles cuantificados de micotoxinas en muestras de pollo a nivel global.<sup>60</sup>.....15

**Figura 8.** Estructuras químicas de algunas de las micotoxinas legisladas.....17

**Figura 9.** Estructuras químicas de algunas de las micotoxinas aún no legisladas.....17

**Figura 10.** A) Esquema del inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) múltiple para la detección simultánea de varias micotoxinas. B1) Plataforma de análisis semicuantitativo para LFIA. B2) Plataforma de análisis cualitativo para LFIA. Las tiras del 1 a 9 representan esquemáticamente los resultados de detección. Reproducido de la referencia [80] con permiso. Copyright 2014 American Chemical Society.....21

**Figura 11.** Tipos principales de biosensores para la detección electroquímica de micotoxinas basados en nanomateriales. Reproducido de la referencia [82] con permiso.....22

- Figura 12.** Voltamperograma cíclico típico en el que  $j_{PC}$  y  $j_{PA}$  representan las densidades de corriente catódica y anódica máximas, respectivamente, para una reacción redox reversible.  $E_{PA}$  y  $E_{PC}$  indican los potenciales de los picos correspondientes frente a la referencia de  $Ag^0$ . ..... 23
- Figura 13.** Esquema del proceso de fabricación y funcionamiento del sensor MIP/PtPd-NPC/GCE. Reproducido de referencia [91] con permiso de referencia..... 24
- Figura 14.** Esquema que representa la morfología (arriba) y las propiedades luminiscentes (abajo) de las nano-capas MIP y NIP, así como la interacción del monómero funcional incorporado en la red polimérica con el TeA añadido, incluyendo la intensidad de luminiscencia y los tiempos de vida de emisión. Reproducido de la referencia [24] con permiso. .... 26
- Figura 15.** Estructuras moleculares de zearalenona (ZON) y sus derivados  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL) y  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL), junto con el alternariol (AOH) y su derivado el alternariol monometil éter (AME). Las estructuras con los anillos coloreados representan las moléculas plantilla utilizadas en cada caso: 2,4-dihidroxibenzoato de ciclododecilo (CDHB) y 3,8,9-trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S2). ..... 28
- Figura 16.** Procedimiento de extracción en fase sólida empleando un MIP como adsorbente (MISPE). En un cartucho con el MIP empaquetado se realizan los siguientes procedimientos: 1) acondicionamiento; 2) carga de la muestra; 3) lavado para eliminar interferentes retenidos en el MIP de manera no selectiva; 4) elución del analito retenido selectivamente y, finalmente, se regenera el cartucho para volverlo a usar. .... 28
- Figura 17.** Proceso de extracción y purificación de micotoxinas en muestras de aceite utilizando MISPE, antes del análisis por HPLC. .... 41
- Figura 18.** Cambio en el desplazamiento químico del protón H5 del CDHB en función de la fracción molar de EAMA (base) en DMSO- $d_6$  ( $[S2] = 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). A) Espectro de RMN  $^1H$  mostrando el desplazamiento del protón H5. B) Gráfico de Job que ilustra la relación entre ambas moléculas. .... 42
- Figura 19.** Espectros FTIR de las partículas de sílice porosa (negro), MIP (rojo) y NIP (azul) (estas dos últimas después de la eliminación de la sílice). .... 44
- Figura 20.** Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77 K para los polímeros con impronta molecular de CDHB (marrón) y S2 (naranja), y para los polímeros sin impronta molecular (azul). .... 44
- Figura 21.** Curvas de distribución de tamaño de poro obtenidas a partir de las secciones de A) desorción y B) adsorción de las isotermas de  $N_2$  para los polímeros con impronta molecular por CDHB (marrón) y S2 (naranja), así como para los polímeros sin impronta molecular (azul). ..... 45
- Figura 22.** Micrografías SEM de las microesferas mezcladas de A) MIP y B) NIP preparadas con impronta por CDHB y S2 y sin impronta alguna. .... 46
- Figura 23.** Isotermas de unión en equilibrio para ZON con el MIP (azul) y con el NIP correspondiente (rojo) en DMSO. Las líneas continuas corresponden a los ajustes a la ecuación de Freundlich ( $B = aF^n$ ) (10 puntos,  $n = 2$ ). .... 47

- Figura 24.** Gráficos de probabilidad normal del residual estudentizado. A) ZON-MISPE, B) AOH-MISPE, C) ZON-NISPE y D) AOH-NISPE.....51
- Figura 25.** Gráficos del residual estudentizado frente a recuperación predicha. A) ZON-MISPE, B) AOH-MISPE, C) ZON-NISPE y D) AOH-NISPE.....51
- Figura 26.** Gráficos de recuperación real frente a recuperación predicha. A) ZON-MISPE, B) AOH-MISPE, C) ZON-NISPE y D) AOH-NISPE.....52
- Figura 27.** Gráficos de contorno de la función de deseabilidad general para la extracción de ZON y AOH basada en MISPE y NISPE.....53
- Figura 28.** Rectas de calibrado para A) ZON (MISPE:  $y = 2.33 \times C_{ZON} - 11.47$ ,  $r^2 = 0.995$ ; NISPE:  $y = 0.49 \times C_{ZON} - 1.42$ ,  $r^2 = 0.982$ ) y B) AOH (MISPE:  $y = 2.43 \times C_{AOH} - 8.20$ ,  $r^2 = 0.994$ ; NISPE:  $y = 0.05 \times C_{AOH} - 0.64$ ,  $r^2 = 0.981$ ) utilizando MISPE y NISPE ( $V = 30$  mL en tampón fosfato  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8.2).....55
- Figura 29.** Porcentaje de recuperación en el MISPE (barras rojas) y en el NISPE (barras azules) de AOH, ZON,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL, AME, OCRA, RES y TeA ( $V = 30$  mL en tampón fosfato  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8.2) añadidos a una concentración de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada uno de los compuestos ensayados ( $RSD \leq 12\%$ ,  $n = 3$ ), junto con sus correspondientes valores de  $\log P$ . ..... 555
- Figura 30.** Cromatograma HPLC-FLD del extracto MISPE de una muestra de aceite de maíz infectada naturalmente por *Fusarium* (línea roja) y fortificada con AOH y ZON a una concentración de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (línea azul). .....58
- Figura 31.** Esquema del proceso de funcionalización de las bolas de vidrio (GBs) con la molécula plantilla (GBs-MPA) y su posterior empaquetado en la columna de vidrio con camisa termostalizada (C1). Los pistones P1 y P2 ajustan el espacio en la columna, facilitando la formación del MIP en formato nanogel sobre las GBs-MPA mediante la técnica de polimerización en fase sólida. ....65
- Figura 32.** A) Imagen comparativa de las GBs-OH, GBs-NH<sub>2</sub> y GBs-MPA tras la adsorción de Orange II. La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad de grupos amino libres superficiales presentes en cada muestra. B) Recta de calibrado ( $A = 0.018 \times C_{\text{OrangeII}} + 0.019$ ;  $r^2 = 1.0$ ) del colorante Orange II adsorbido electrostáticamente a pH 3 en partículas aminadas, obtenida por medida de la absorción de luz a 485 nm en agua a pH 3 tras desorción del indicador, utilizada para la cuantificación de los grupos amino en las GBs funcionalizadas. ....74
- Figura 33.** Caracterización mediante dispersión de luz (A, B) y espectroscopía UV-vis (C) de los MIPs obtenidos en formato nanogel: A) Primer lote de MIP no fluorescente (línea continua) y segundo lote preparado reutilizando el empaquetamiento de la columna con GBs-MPA (línea discontinua). B) MIP fluorescente (MIP01) sintetizado en el grupo del Prof. K. Haupt (línea continua) y el mismo MIP sintetizado en el grupo GSOLFA (línea punteada). Las imágenes en la esquina superior derecha de cada gráfico muestran el aspecto del MIP correspondiente en suspensión. C) Espectros de absorción y emisión del MIP fluorescente suspendido en agua. D) Imágenes de los MIPs tras liofilización utilizados para la cuantificación del rendimiento de polimerización: MIP no fluorescente (izquierda) y MIP fluorescente (derecha).....75
- Figura 34.** Esquema de las interacciones esperadas entre el MPA y el monómero AMPN durante la síntesis del polímero por precipitación (MIP02) en DMSO. En la esquina inferior izquierda se muestra una imagen del polímero sintetizado. ....76

**Figura 35.** Curva de calibrado del MIP01 ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ) en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7) ( $I_{577} = 12000 \times C_{MIP} + 37000$ ,  $r^2 = 0.99$ )..... 77

**Figura 36.** A) Esquema del ensayo de unión del MIP fluorescente con una concentración constante de GBs-MPA en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7). El área recuadrada en negro corresponde a la medida directa del MIP no unido. B) Gráfico que representa el MIP unido a las GBs-MPA, obtenido tras la incubación de  $25 \text{ mg}$  de GBs-MPA ( $= 16 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MPA) con concentraciones de MIP entre  $50$  y  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante  $1 \text{ h}$  a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ . El MIP no unido se calcula extrapolando la luminiscencia ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$ ) medida en el sobrenadante a la curva de calibrado del MIP, y el MIP unido se determina por diferencia. La imagen insertada muestra los viales tras la incubación..... 77

**Figura 37.** Esquema del ensayo de unión de una concentración constante de MIP fluorescente ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) con las GBs-MPA en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7). El área recuadrada en negro corresponde a la medida directa del MIP no unido. B) Gráfico que muestra el MIP no unido a las GBs-MPA, obtenido tras la incubación durante  $1 \text{ h}$  a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  de  $15$  a  $100 \text{ mg}$  de GBs-MPA (puntos), y de  $25 \text{ mg}$  de GBs-NH<sub>2</sub> (triángulo negro) como control, con una concentración de MIP de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El MIP no unido se calcula extrapolando la luminiscencia ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$ ) medida en el sobrenadante a la curva de calibrado del MIP, y el MIP unido se determina por diferencia. .... 78

**Figura 38.** A) Esquema del ensayo de unión para una concentración constante de MIP fluorescente de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  con  $25 \text{ mg}$  de GBs-MPA en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7), seguido de la eliminación del MIP no unido y la adición de MPA libre en el mismo disolvente inicial. B) Gráfico que muestra el porcentaje de MIP desprendido según la luminiscencia hallada en el sobrenadante ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$ ) tras la adición de distintas concentraciones de MPA ( $1, 10, 100$  y  $1000 \text{ nmol L}^{-1}$ ) e incubación durante  $1 \text{ h}$  a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  (último paso del ensayo descrito anteriormente). .... 79

**Figura 39.** A) Esquema del ensayo competitivo de unión al MIP fluorescente en presencia de GBs-MPA y MPA libre en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7). B) Gráfico que muestra el porcentaje de MIP unido ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$ ), medido directamente sobre el sólido, tras la adición de  $25 \text{ mg}$  de GBs-MPA (equivalentes a  $16 \text{ nmol L}^{-1}$  de MPA) y diferentes concentraciones de MPA libre ( $0.01, 1, 10, 100$  y  $1000 \text{ nmol L}^{-1}$ ) y de MIP ( $20, 100$  y  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), después de  $1 \text{ h}$  de incubación a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ . .... 80

**Figura 40.** (Izq.) Esquema del ensayo competitivo con partículas magnéticas (mBs) no bloqueadas en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7). (Dcha.) Gráficos que muestran la correlación entre la cantidad de mBs ( $6$  y  $13 \mu\text{g}$ ), la concentración de MIP ( $2, 10, 20$  y  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la intensidad de luminiscencia del MIP a  $577 \text{ nm}$  ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ) en las mBs (proporcional al MIP unido), en presencia de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MPA (barras rosas) y en su ausencia (barras granates) tras  $1 \text{ h}$  de incubación a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  (dcha.). .... 81

**Figura 41.** Ensayo competitivo con  $6 \mu\text{g}$  de partículas magnéticas (mBs) en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7). Se muestra la correlación entre la naturaleza de las mBs. A) No bloqueadas. B) Bloqueadas con una disolución de caseína en PBS. La concentración de MIP ( $2$  y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la intensidad de fluorescencia del MIP a  $577 \text{ nm}$  ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ) en las mBs, en presencia (barras rosas) y en ausencia (barras granates) de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MPA tras  $1 \text{ h}$  de incubación a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ . .... 81

- Figura 42.** Ensayo competitivo con 6  $\mu\text{g}$  de partículas magnéticas (mBs) bloqueadas con una disolución de caseína en PBS. Se muestra la correlación entre la concentración de MIP ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la intensidad de luminiscencia del MIP a 577 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ ) en las mBs, en presencia (barras rosas) y ausencia (barras granates) de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MPA, tras 1 h de incubación a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  en diferentes disoluciones tampón a una concentración de  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  y pH 7 (PB, PBST, HEPES y MES).....82
- Figura 43.** Ensayo competitivo bajo las condiciones seleccionadas previamente: 6  $\mu\text{g}$  de mBs bloqueadas, en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7) con  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MIP, incubado durante 1 h a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se muestra la correlación entre la presencia de MPA ( $0.2$  y  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y su ausencia, y la intensidad de luminiscencia del MIP a 577 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ ) medida directamente sobre las mBs. ....83
- Figura 44.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  del MIP02 (izquierda) y del NIP (derecha) en ACN tras incubación con distintas concentraciones de MPA durante 1 h. 84
- Figura 45.** Intensidad de fluorescencia a 505 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  del NIP en ACN (barra cárnea) en ausencia y presencia de  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  de MPA (barra marrón), TBAOH (barra verde) y Ácido benzoico (BA, barra violeta). El NIP se incubó con el respectivo analito durante 1 h. ....84
- Figura 46.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) del MIP y del NIP tras incubación con diferentes concentraciones de MPA en ACN con un 10% de agua durante 1 h. ....84
- Figura 47.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) del MIP tras incubación con  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  de MPA en ACN con un 10% de agua durante 0, 5, 15 y 60 min. ....85
- Figura 48.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) de MIP y NIP tras incubación durante 15 min con distintas concentraciones de MPA en ACN con un 5% de agua. ....85
- Figura 49.** Porcentaje de desactivación de la fluorescencia del NIP (círculos azules) y del MIP (círculos rojos) a 505 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) en ACN con un 5% de agua, en presencia de MPA. Los factores de impronta (IFs) para cada concentración de MPA se representan con puntos negros. La estructura del MPA se muestra sobre la gráfica. La recta de ajuste para el MIP (línea discontinua roja) responde a la siguiente ecuación:  $I_{505} = -0.02 \times C_{\text{MPA}} + 99.5$ ,  $r^2 = 0.99$ ....86
- Figura 50.** Porcentaje de desactivación de la fluorescencia del polímero a 505 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) en ACN con un 5% de agua de: A) NIP (triángulos azules) y MIP (triángulos rojos) en presencia de acil-MPAG; y B) NIP (cuadrados azules) y MIP (cuadrados rojos) en presencia de MPAG. Los factores de impronta (IFs) para cada concentración de MPA se representan con puntos negros. Las estructuras de ambos interferentes se muestran sobre su gráfica.....88
- Figura 51.** Esquema de un sistema de BE en configuración abierta. Las flechas indican las reacciones redox inducidas en los polos catódico y anódico, respectivamente. ....92
- Figura 52.** Esquema de un sistema de BE en configuración cerrada. Las flechas indican las reacciones redox inducidas en los polos catódico y anódico, respectivamente. ....93
- Figura 53.** Ilustración del sistema híbrido MIP–bipolar en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de ZON, con una representación de las reacciones redox asociadas, los alambres de oro polarizados anódica y catódicamente ( $\delta^+$  y  $\delta^-$ , respectivamente), y la emisión resultante del LED verde en presencia de la micotoxina cuando se aplica un campo eléctrico adecuado entre los electrodos de alimentación. Reproducido de la referencia [178] con permiso.....98

- Figura 54.** Ilustración del procedimiento experimental para preparar los electrodos de oro recubiertos con MIP. Los dos primeros pasos implican la funcionalización de los alambres para garantizar la formación del polímero en la superficie metálica, seguida de la polimerización radicalaria. En el paso final se elimina la molécula plantilla, dejando los sitios de reconocimiento para la unión del MIP a la micotoxina..... 101
- Figura 55.** Celda electroquímica bipolar clásica compuesta por tres LEDs conectados por alambres de oro, donde la parte anódica consiste en oro, MIP y polímero sin impronta (NIP), respectivamente.. ..... 103
- Figura 56.** Ilustración de una celda microfluídica para electroquímica bipolar (izquierda) y la realización final de la celda (derecha), con un LED conectado mediante alambres de oro. La región anódica contiene la capa MIP..... 104
- Figura 57.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) del alambre de Au virgen (negro) y de los electrodos modificados con MIP (rojo) y NIP (azul). Reproducido de la referencia [178] con permiso. .... 105
- Figura 58.** Estudio voltamperométrico del sistema redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) en la superficie de un electrodo de disco de oro (A) virgen, (B) recubierto con MIP y (C) recubierto con NIP, en una disolución tampón de fosfato de  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8.2 ( $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ), en ausencia (línea negra) y presencia (línea roja) de ZON ( $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ). ..... 105
- Figura 59.** Ilustración del “efecto compuerta” de un MIP sobre un alambre de Au conectado al ánodo de un LED. A) El MIP se hincha debido a la presencia de moléculas de agua, dificultando el acceso de las sondas redox ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) al electrodo bipolar. B) El MIP se contrae cuando el analito se une a los sitios de reconocimiento, facilitando el acceso de la sonda al electrodo. Las barras grises representan el ánodo de electrodo de alimentación para el fenómeno electroquímico bipolar inalámbrico..... 106
- Figura 60.** Emisión normalizada del microLED en función de la concentración de ZON en una disolución acuosa  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  en tampón fosfato (pH 8.2) en presencia del par  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ( $0.8 \text{ mmol L}^{-1}$  de cada uno), sometida a un campo eléctrico constante de  $1.16 \text{ V cm}^{-1}$  para los BPE híbridos Au@MIP (puntos rojos) y Au@NIP (rombos azules). Inserto: fotografías de la luz verde del LED generada por los BPE Au@MIP y Au@NIP bajo dichas condiciones, a las concentraciones de ZON indicadas. La barra verde debajo del LED indica la escala, correspondiente a  $1.7 \text{ mm}$ . Reproducido de la referencia [178] con permiso.....106
- Figura 61.** Estructuras químicas de las toxinas ZON y DON (arriba). Intensidad de luz del LED normalizada en función de la concentración de ZON (puntos rojos) o DON (rombos morados), en una disolución acuosa de fosfato a  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 8.2) en presencia de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ( $0.8 \text{ mmol L}^{-1}$  cada uno), con un campo eléctrico constante de  $1.16 \text{ V cm}^{-1}$  utilizando un BPE híbrido Au@MIP (abajo). Reproducido de la referencia [178] con permiso.....106

**Figura 62.** (A) Espectros de intensidad del LED medidos en el espectrómetro CCD en función de la concentración de ZON (0 – 70 ng mL<sup>-1</sup>) en una disolución acuosa de tampón fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8.2), en presencia de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> y [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> (0.8 mmol L<sup>-1</sup> de cada uno), aplicando un campo eléctrico constante de 1.8 V cm<sup>-1</sup> con una celda BE microfluídica Au/LED/Au@MIP. (B) Área normalizada bajo el espectro de emisión en función de la concentración de ZON obtenida de los datos espectrales en la **Figura 62A**. La línea discontinua roja representa el mejor ajuste a la ecuación  $y = 0.01 \times C_{ZON} - 0.04$ . (C) Área normalizada bajo el espectro de emisión en función de la concentración de ZON en el rango de concentración 0 – 2000 ng mL<sup>-1</sup>. Reproducido de la referencia [178] con permiso.....111

**Figura 63.** Espectros de intensidad del LED en función de la concentración de ZON (indicada en la figura), obtenidos en una disolución acuosa de tampón fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8.2) en presencia de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> y [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> (0.8 mmol L<sup>-1</sup> de cada uno), aplicando un campo eléctrico constante (1.8 V cm<sup>-1</sup>) con un BPE híbrido Au@MIP. ....112

**Figura 64.** (A) Área de emisión normalizada en función de las concentraciones de ZON (puntos rojos) y DON (rombos morados), medida en una disolución acuosa de tampón fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8.2) en presencia de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> y [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> (0.8 mmol L<sup>-1</sup> de cada uno) a un campo eléctrico constante (1.8 V cm<sup>-1</sup>) con un BPE híbrido Au@MIP. (B) Espectros de intensidad del LED registrados a una concentración de ZON de 30 ng mL<sup>-1</sup> (línea roja) y una concentración de DON de 30 ng mL<sup>-1</sup> (línea discontinua morada) bajo las mismas condiciones experimentales. Reproducido de la referencia [178] con permiso.....113

**Figura 65.** Gráfico de la región de confianza conjunta elíptica (EJCR) utilizando el método de regresión de mínimos cuadrados ordinarios (OLS) para las concentraciones de ZON medidas con la plataforma microfluídica y con el dispositivo electroquímico bipolar clásico. El inserto muestra el EJCR para la pendiente y la ordenada en el origen en el ajuste de regresión de las concentraciones obtenidas experimentalmente frente a los valores de referencia. El caso ideal, con una ordenada en el origen igual a 0 y una pendiente de 1, está marcado con un punto rojo, mientras que el resultado experimental, con una ordenada en el origen de 0.70 y una pendiente de 1.01, está indicado por un punto negro. ....113

**Figura 66.** Representación de los mecanismos principales de generación de ECL. A) En el mecanismo de aniquilación, el luminóforo se somete a procesos alternos de oxidación y reducción en el electrodo, generando especies reactivas. La interacción de estas produce un estado excitado que emite luz al relajarse. B) En el mecanismo de correactantes, tanto el luminóforo como el correactante reaccionan simultáneamente en el electrodo, creando especies intermediarias que, mediante transferencias de electrones, activan el estado excitado del luminóforo, desencadenando la emisión de luz. ....118

**Figura 67.** Imagen del sistema ECL utilizado. ....127

**Figura 68.** Espectro de emisión de los QDs Mn-ZnS (línea naranja) y espectro de absorción del MB (en azul) en ACN. ....134

**Figura 69.** Voltamperograma cíclico de una disolución de ACN (0.1 mol L<sup>-1</sup> TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70/30) obtenido entre 0 y -1.5 V en presencia (línea roja) y ausencia (línea azul) de O<sub>2</sub>, con una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup>. ....136

**Figura 70.** Funcionalización del SPCE mediante ciclovoltamperometría: electrografting de 4-nitrobenzenodiazonio en la superficie del electrodo (izquierda), y electroreducción del grupo nitro a grupo amino, permitiendo la inmovilización de los QDs (derecha). ....137

**Figura 71.** Voltamperograma de los QDs funcionalizados en una disolución de ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) con  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA (izquierda), y señal ECL emitida por los QDs unidos al electrodo a  $590 \text{ nm}$  durante 10 barridos de potencial de 0 a  $1.4 \text{ V}$  (derecha) en una disolución libre de O<sub>2</sub>. A la derecha, se muestra también una imagen del electrodo con los QDs inmovilizados. .... 137

**Figura 72.** QDs inmovilizados sobre partículas magnéticas aminadas Dynabeads. A) Bajo iluminación con luz ambiente, bajo luz UV ( $312 \text{ nm}$ ) y bajo luz UV con atracción por un imán. B) Celda de ECL con Dynabeads–QDs dispuestos sobre el electrodo de trabajo con la ayuda de un imán. .... 138

**Figura 73.** ECL de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  [Ru(bpy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub> en tampón fosfato (pH 6.2) tras aplicar 4 barridos de potencial ( $0 - 1.4 \text{ V}$ ; velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) en diferentes electrodos: sin modificar (línea azul), modificados con grupos amino e inmovilización de QDs (línea naranja) y modificados solo con grupos amino (línea verde). .... 139

**Figura 74.** ECL de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  RD3 (línea morada), y de partículas de sílice pirogénica con 14% de RD3 adsorbido (línea gris). En ambos casos, se utilizaron  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de oxalato en disolución y se realizaron 3 barridos de potencial ( $0 - 1.4 \text{ V}$ ; velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) en ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>). .... 139

**Figura 75.** Voltamperograma cíclico de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  [Ru(phen)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> en ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA como correactante, en aire (línea gris) y bajo Ar (línea negra) (izquierda). Señal de ECL a  $588 \text{ nm}$  de [Ru(phen)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> en aire (línea gris) y bajo Ar (línea negra) tras 9 barridos de potencial de 0 a  $1.4 \text{ V}$  (derecha). .... 140

**Figura 76.** Voltamperogramas cíclicos de [Ru(phen)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> en disolución, adsorbido en mNBs sonicadas (línea naranja, *corresponde al lote 3*) y sin tratar con ultrasonidos (línea verde, *corresponde al lote 2*) en ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA como correactante, bajo atmósfera de Ar (izquierda). Señal de ECL a  $588 \text{ nm}$  de [Ru(phen)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> en disolución, adsorbido en mNBs tratadas con ultrasonidos y sin tratar, en el mismo medio, tras 9 barridos de potencial en el rango de 0 a  $1.4 \text{ V}$  (derecha).. .... 141

**Figura 77.** Voltamperogramas cíclicos (izquierda) y sus señales de ECL correspondientes (derecha) de partículas funcionalizadas con RP3, obtenidas mediante el procedimiento B: A) primera medida y B) segunda réplica. Experimentos realizados en ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA como correactante, bajo atmósfera de Ar tras 9 barridos de potencial en el rango de 0 a  $1.4 \text{ V}$ . .... 141

**Figura 78.** A) y B) Voltamperogramas cíclicos (dos réplicas) de partículas con una capa de sol-gel, con sus señales de ECL correspondientes en C). D) Imagen de la celda electroquímica mostrando la distribución irregular de las partículas sobre el electrodo, incluso con la ayuda de un imán. E) Voltamperogramas cíclicos de partículas con dos capas de sol-gel y F) sus señales de ECL correspondientes, significativamente más débiles en comparación con las partículas con una sola capa. Los experimentos se realizaron en ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA como correactante, bajo atmósfera de Ar, tras 9 barridos de potencial en el rango de 0 a  $1.4 \text{ V}$ . .... 142

**Figura 79.** Señales de ECL de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  RP3 en disolución en una mezcla de ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v), en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBA<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, utilizando diferentes ventanas de potencial: hasta  $1.45 \text{ V}$  (línea gris),  $1.60 \text{ V}$  (línea roja) y  $2.00 \text{ V}$  (línea negra). .... 143

<b>Figura 80.</b> Señales de ECL obtenidas en diferentes medios y ventanas de potencial para evaluar el papel del DMSO como correactante: 0 a 2 V (izquierda) y -1.6 a 2 V (derecha). Los experimentos realizados en una mezcla de ACN (con 0.1 mol L <sup>-1</sup> TBAPF <sub>6</sub> )/DMSO (70:30 v/v) (línea negra) y ACN puro (línea verde), ambas sin TBA <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .....	144
<b>Figura 81.</b> Caracterización espectroscópica de los QDs de ZnS dopados con Mn(II) en ACN. A) Espectro de absorción. B) Espectro de fluorescencia (incluye el de fosforescencia) excitando a 290 nm. C) Espectro de fosforescencia ( $\lambda_{exc} = 290$ nm). D) Esquema de los niveles electrónicos del ZnS dopado con Mn <sup>2+</sup> , que explica la emisión fosforescente a 590 nm.....	145
<b>Figura 82.</b> Micrografía TEM de los QDs de ZnS dopados con Mn <sup>2+</sup> .....	145
<b>Figura 83.</b> A) Esquema del proceso experimental utilizado para sintetizar el polímero por irradiación. B) Micrografías TEM del polímero después del proceso de lavado: a la izquierda, dispersión de los QDs en la red polimérica y, a la derecha, ampliación de la zona que muestra los detalles de la estructura.....	146
<b>Figura 84.</b> Micrografías TEM de las mNBs sintetizadas (izquierda) y detalles más ampliados de las mismas (derecha).....	147
<b>Figura 85.</b> Micrografías TEM de las partículas obtenidas en diferentes lotes: A) Lote 2, sin aplicación previa de ultrasonidos y con RP3 añadido al inicio de la reacción. B)–D) Lotes sometidos previamente a ultrasonidos. B) Lote 3, con RP3 incorporado desde el inicio. C) Lote 1, con RP3 agregado tras 1 h de reacción. D) Lote 4, con menor cantidad de RP3 añadido tras 1 h de reacción.....	148
<b>Figura 86.</b> Perfiles cinéticos de extinción de la luminiscencia del complejo fotoexcitado [Ru(phen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> adsorbido en mNBs@SiO <sub>2</sub> . A) Cuando se incorpora al inicio de la síntesis (lote 3). B) Cuando se añade tras 1 h de reacción (lote 1). Ambos se midieron en ACN equilibrado al aire, con excitación a 463 nm ( $\lambda_{em} = 588$ nm).....	149
<b>Figura 87.</b> Micrografías TEM de las partículas previamente sometidas a ultrasonidos, sintetizadas utilizando MeOH en lugar de EtOH y añadiendo desde el inicio el complejo RD3 en lugar de RP3. ....	150
<b>Figura 88.</b> Espectros de luminiscencia ( $\lambda_{exc} = 447$ nm) en ACN de las partículas magnéticas recubiertas de sílice con RP3 adsorbido. El lote 3 presenta un máximo de emisión a 596 nm (línea discontinua azul) y el lote 1 a 590 nm (línea discontinua roja). Las imágenes de las cubetas con las partículas correspondientes, ubicadas en el lado derecho de la figura, muestran una mayor luminiscencia en las del lote 3, observadas bajo luz UV.....	150
<b>Figura 89.</b> Micrografía de las partículas obtenidas mediante una síntesis sol-gel alternativa utilizando Triton X-100 como surfactante, siguiendo el procedimiento B de la sección experimental.....	151
<b>Figura 90.</b> Micrografías de las partículas obtenidas mediante la síntesis sol-gel alternativa utilizando Triton X-100 como surfactante, siguiendo el procedimiento B con algunas modificaciones descritas en la sección experimental. ....	151
<b>Figura 91.</b> Espectros de luminiscencia ( $\lambda_{exc} = 447$ nm) de las partículas magnéticas recubiertas de sílice con RP2PSi enlazado covalentemente. Las partículas con una sola capa sol-gel muestran un máximo de emisión a 590 nm (línea discontinua morada), mientras que las partículas con dos capas sol-gel presentan un máximo a 596 nm (línea discontinua azul clara). ....	152

**Figura 92.** CVs y estructuras de algunos de los componentes para la polimerización ECL: A) CP-I. B) DHMI, C) EAMA.HCl y D) TBA<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Los compuestos se prepararon a una concentración de 5 mmol L<sup>-1</sup> en una mezcla de ACN (con 0.1 mol L<sup>-1</sup> TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y se midieron bajo atmósfera de Ar, en el rango de -1 a 1.5 V a 50 mV s<sup>-1</sup>. El sistema de electrodos utilizado para las medidas estaba compuesto por GCE como electrodo de trabajo, Ag<sup>0</sup> como electrodo de referencia y platino como contraelectrodo..... 153

**Figura 93.** CVs de la mezcla de prepolimerización en una disolución de ACN (con 0.1 mol L<sup>-1</sup> TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) bajo atmósfera de Ar, tras aplicar 8 ciclos a 50 mV s<sup>-1</sup> en el rango de 0 a 1.5 V (izquierda). Micrografía TEM de la disolución resultante (derecha)..... 154

**Figura 94.** Micrografías TEM de la mezcla de prepolimerización (antes de la irradiación izquierda) y tras la exposición a una radiación de 642 nm (derecha).....154

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los principales géneros de hongos y las micotoxinas más comunes que generan.....	13
<b>Tabla 2.</b> Lista de micotoxinas y sus riesgos asociados en humanos y animales.....	14
<b>Tabla 3.</b> Métodos analíticos descritos en bibliografía para la determinación de ZON, AOH y sus derivados.....	30
<b>Tabla 4.</b> Comparación de los diferentes tipos de polimerización para el desarrollo de MIPs selectivos para AOH y ZON.....	34
<b>Tabla 5.</b> Parámetros de MS/MS con monitoreo de reacciones múltiples (MRM), voltaje del fragmentador y energía de colisión.....	41
<b>Tabla 6.</b> Parámetros texturales de los polímeros con impronta molecular de CDHB y S2, así como de los polímeros sin impronta molecular.....	45
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de las isoterma de unión en equilibrio para la unión de ZON y AOH (en DMSO) por los respectivos MIPs y NIPs. La capacidad de unión del polímero ( $a$ ) y el índice de heterogeneidad de los sitios de unión ( $m$ ) se obtuvieron a partir del ajuste de los datos experimentales ( <b>Figura 23</b> ) a la isoterma de Freundlich correspondiente. La constante de asociación ( $K$ ) y las capacidades de unión específicas ( $N$ ) se calcularon a partir de las ecuaciones 3 y 4. Los datos para el polímero con impronta molecular de AOH se publicaron en un trabajo anterior.....	47
<b>Tabla 8.</b> Diseño central compuesto para la optimización del MISPE de micotoxinas.....	48
<b>Tabla 9.</b> Coeficientes de regresión de los modelos de mínimos cuadrados en función de los factores codificados.....	50
<b>Tabla 10.</b> Condiciones experimentales óptimas, recuperación predicha de micotoxinas en MISPE y NISPE, e intervalo de predicción al 95%.....	54
<b>Tabla 11.</b> Recuperación de micotoxinas bajo las condiciones óptimas de extracción.....	54
<b>Tabla 12.</b> Límite máximo residual (LMR), linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), límite de decisión ( $CC_{\alpha}$ ) y capacidad de detección ( $CC_{\beta}$ ) para la validación del método de análisis de las micotoxinas objetivo.....	56
<b>Tabla 13.</b> Valores de repetibilidad ( $RSD_r$ ), precisión intermedia ( $RSD_R$ ) y relación del valor de cantidad recuperada ( $R_A$ ) para AOH y ZON en aceite de maíz refinado .....	57
<b>Tabla 14.</b> Análisis de micotoxinas en una muestra de aceite de maíz orgánico comercial ( $n = 3$ ; $\alpha = 0.05$ ).....	57
<b>Tabla 15.</b> Análisis de micotoxinas en aceites de girasol y oliva ( $n = 3$ ; $\alpha = 0.05$ ).....	58
<b>Tabla 16.</b> Tabla comparativa de los polímeros sintetizados para la detección de MPA .....	68
<b>Tabla 17.</b> Condiciones experimentales y concentraciones finales obtenidas para cada uno de los lotes de partículas sintetizados.....	130



# **ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$\alpha$ -ZOL	$\alpha$ -Zearalenol
$\beta$ -ZOL	$\beta$ -Zearalenol
<i>A</i>	Absorbancia
Acil-MPAG	Glucurónido de ácido acil-micofenólico
Afla	Aflatoxina
AIBN	Azobis-isobutironitrilo
AME	Alternariol monometil éter
AMPN	<i>N</i> -alil-4-(4'-metil-piperazinil)-1,8-naftalimida
APTES	3-aminopropiltrióxido de silano
AOH	Alternariol
AuNPs	Nanopartículas de oro
BA	Ácido benzoico
BC	Disolución tampón de carbonato
BHT	Butilhidroxitolueno
Boc	<i>Terc</i> -butiloxicarbonilo
BPE	Electrodo bipolar ( <i>Bipolar Electrode</i> )
CC <sub><math>\alpha</math></sub>	Límite de decisión
CC <sub><math>\beta</math></sub>	Capacidad de detección
CCDn	Diseño compuesto central ( <i>Central Composite Design</i> )
CCF	Cromatografía de capa fina
CIP	Polímero control con impronta ( <i>Control-Imprinted Polymer</i> )
CP-I	2-Yodo-2-metilpropionitrilo
CV	Voltamperometría cíclica
DAD	Detección por arreglo de diodos ( <i>Diode Array Detection</i> )
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCHC	Química de hidrazina covalente dinámica ( <i>Dynamic Covalent Hydrazine Chemistry</i> ).
DLS	Dispersión dinámica de luz ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DON	Deoxinivalenol
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva ( <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> )
DPV	Voltamperometría de pulso diferencial
EAMA	<i>N</i> -(2-Aminoetil)metacrilamida
ECL	Electroquimioluminiscencia
EDC	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDMA	Dimetacrilato de etilenglicol
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ( <i>European Food Safety Authority</i> )

EJCR	Gráfico de la región de confianza conjunta elíptica ( <i>Elliptical Joint Confidence Region Chart</i> ).
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
EPA	Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. ( <i>Environmental Protection Agency</i> )
ESI	Ionización por electrospray
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FB	Fumonisina
FEG	Pistola de emisión de campo
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster ( <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> )
GBs	Bolas de vidrio
GCB	Negro de carbono grafitizado ( <i>Graphitized Carbon Black</i> )
GCE	Electrodo de carbono vítreo ( <i>Glassy Carbon Electrode</i> )
GPC	Cromatografía de permeación en gel ( <i>Gel Permeation Chromatography</i> )
HATU	Hexafluorofosfato de azabenzotriazolotetrametiluronio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-sulfónico
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
ICH	Consejo Internacional de Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano
IF	Factor de impronta ( <i>Imprinting Factor</i> )
IL	Intensidad de luminiscencia
ILAs	Ensayos similares a inmunológicos ( <i>Immuno-Like Assays</i> ).
JECFA	Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios
$K$	Constante de asociación
$K_0$	Afinidad media de la molécula objetivo
$K_{SV}$	Constante de Stern-Volmer
$k_{ISC}$	Velocidad de conversión intersistema ( <i>Intersystem Crossing Rate</i> )
KPS	Persulfato de potasio
$k_q$	Constante de velocidad del proceso de desactivación
$k_{RISC}$	Velocidad de conversión intersistema inversa
$l$	Longitud total de los electrodos bipolares
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral ( <i>Lateral Flow Immunoassay</i> )
LMR	Límite máximo residual
$m$	Medida de la heterogeneidad de los sitios de unión
MAM	Metacrilamida

MB	Azul de metileno
mBs	Partículas magnéticas micrométricas
MIP	Polímero de impronta molecular ( <i>Molecularly Imprinted Polymer</i> )
MIPs-NGs	Polímeros de impronta molecular en formato nanogel
MISPE	Extracción en fase sólida mediante polímeros de impronta molecular ( <i>Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction</i> )
MPA	Ácido micofenólico
MPAG	Glucurónido de ácido micofenólico
mNBs	Nanopartículas magnéticas
NIP	Polímero sin impronta molecular ( <i>Non-Imprinted Polymer</i> )
NIPAM	<i>N</i> -isopropilacrilamida
NISPE	Extracción en fase sólida mediante polímeros sin impronta molecular
NPs	Nanopartículas
NR	No registrado
NVP	<i>N</i> -vinilpirrolidona
OTA	Ocratoxina A
PAA	<i>N</i> -fenilacrilamida
PB	Disolución tampón fosfato
PBST	Disolución salina de tampón fosfato con 0.05% de Tween-20
PdTFPP	<i>meso</i> -tetra(pentafluorofenil)-porfirina de paladio(II)
PDI	Índice de polidispersidad
PEGDA	Diacrilato de poli(etilenglicol)
PET	Transferencia electrónica fotoinducida ( <i>Photoinduced Electron Transfer</i> )
phen	1,10-fenantrolina
PS	Fotosensibilizador
PSE	Error pseudoestándar
Q	Concentración del desactivador
QDs	Puntos cuánticos ( <i>Quantum Dots</i> )
QL	Quimioluminiscencia
QuEChERS	Rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro ( <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i> )
R <sub>A</sub>	Cantidad recuperada
RCMP	Sistema de polimerización mediado por complejación reversible ( <i>Reversible Complexation Mediated Polymerization</i> )
RD3	Tris(fenil fenantrolina) rutenio(II)
RES	Resorcinol
R <sub>f</sub>	Factor de retención

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP2PSi	Derivado silanizado de Tris(1,10-fenantrolina) rutenio(II)
RP3	Tris(1,10-fenantrolina) rutenio(II)
RSD <sub>R</sub>	Precisión intermedia
RSD <sub>t</sub>	Precisión intra-día
RT	Temperatura ambiente
S <sub>BET</sub>	Valores del área BET
S2	3,8,9-Trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona
S	Área de la señal bajo la curva
S <sub>t</sub>	Superficie externa
SAX	Intercambio aniónico fuerte ( <i>Strong Anion Exchange</i> )
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SMCC	( <i>N</i> -maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo
SMD	Dispositivo de montaje en superficie ( <i>Surface-Mount-Device</i> )
SME	Margen de error simultáneo
SPCE	Electrodo de carbono serigrafiado ( <i>Screen Printed Carbon Electrode</i> )
SPE	Extracción en fase sólida ( <i>Solid Phase Extraction</i> )
SPT	Cronometraje de fotón único ( <i>Single-Photon Timing</i> )
SPR	Resonancia de plasmón de superficie
SWR	Voltamperograma de onda cuadrada
TBA	Tetrabutilamonio
TBA <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Oxalato de tetrabutilamonio
TBAOH	Hidróxido de tetrabutilamonio
TBAM	<i>N-terc</i> -butilacrilamida
TBAPF <sub>6</sub>	Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio
TEA	Trietilendiamina
TEOS	Tetraetilortosilicato
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	Tetrametiletildiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TFD	Terapia fotodinámica
TM	Molécula plantilla
TPA	Tripropilamina
U	Incertidumbre de medida
δ	Desplazamiento químico
δ <sup>+/-</sup>	Polarización del electrodo
ΔE	Diferencia de potencial entre picos anódico y catódico en un voltamperograma cíclico

$\Delta V$	Diferencia de polarización del BPE híbrido
$V_{\text{micro}}$	Volumen de microporos
$V_{\text{p}}$	Volumen de meso-macroporos
XPS	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X ( <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> )



## **RESUMEN**



## SUMMARY

Accurate and sensitive detection of contaminants such as mycotoxins is a priority challenge in the field of food safety. In this context, fully engineered molecular imprinted polymers (MIPs) have emerged as a very attractive alternative to antibodies and the corresponding biosensors due to their high analyte selectivity, chemical stability, low cost and reusability. This thesis focuses on the design and development of advanced analytical methods and functional devices based on MIPs, with the aim of improving mycotoxin detection through innovative approaches never used before in combination with MIPs, such as electrochemiluminescence (ECL), bipolar electrochemiluminescence (BE) and photochemical amplification. Although one of the traditional goals of our research has been to apply them to real samples, not all systems have reached this validation stage due to the novelty of the strategies explored and the necessarily limited timeframe of the doctoral work.

After a brief introduction, **chapter 2** focuses on two main lines. Firstly, a previously unreported MIP-based method for the *simultaneous* preconcentration of zearalenone (ZON) and alternariol (AOH) was developed and optimized. By using MIPs together with a chemometric experimental design to optimize the experimental conditions, a robust procedure was established based on cartridges loaded with a 1:1 (w/w) mixture of the two mycotoxin-selective polymers, using specific solvents for optimal washing and elution. The extracts were analyzed by HPLC with direct fluorescence detection, showing lower detection limits of  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  for ZON and  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  for AOH. The method was successfully validated on vegetable oils with recoveries ranging from 92% to 113% and low variation (RSD < 6%). Furthermore, the results were confirmed by HPLC-MS/MS, demonstrating the reliability of the method and the usefulness of MIPs as synthetic molecular recognition elements.

In the second part, the synthesis of MIPs in *nanogel* format for the selective and rapid detection of mycophenolic acid (MPA), a mycotoxin with immunosuppressive properties, is explored. This type of MIPs has never been used for mycotoxin analysis. Due to the complexity of their preparation, a research stage was carried out at an international reference laboratory specialized in this type of material. Nanogels were obtained by solid phase polymerization and precipitation, and a detailed characterization of their physico-chemical properties (size, stability, recognition capacity) was carried out. Although a good structural characterization was obtained, the prepared nanogels showed a limited affinity for MPA, highlighting the need to redesign the system, either by incorporating more specific functional monomers and/or by using an alternative template molecule with available carboxylic groups to establish stronger interactions with the analyte. Nevertheless, this research has allowed us to gain a thorough understanding of the synthesis and behavior of MIPs in

nanogel format, laying the foundations for their future application to the detection of other mycotoxins of interest.

**Chapter 3** also consists of two parts: in the first, a *hybrid* sensor system for the detection of zearalenone (ZON) based on MIPs, *bipolar electrochemistry* (BE) and optical emission as a transduction signal, is described for the first time. The proof-of-concept involved the wireless electroanalysis of ZON, a mycotoxin with estrogenic activity, using a light-emitting diode (LED) with a MIP-modified anode and a cathode golden wires, *without physical (wireless) connection to feeders*. Molecular recognition of the ZON by the thin MIP coating facilitates the redox reaction of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  system at the gold wire ends of the LED, generating a light signal proportional to the analyte concentration. By *integrating* this system into a *microfluidic* platform, a highly sensitive analytical device was developed, capable of quantifying ZON in a linear range of 10 – 70 ng mL<sup>-1</sup>, demonstrating the potential of these sensors for portable applications in food contaminant analysis and visual warning systems.

In the second part of Chapter 3, innovative polymer synthesis strategies of MIPs were explored with the aim of developing optical sensors based on these materials for the selective detection of AOH. In particular, two light-induced methods were investigated: direct *photopolymerization* and *electrochemiluminescence* (ECL)-induced *polymerization*. These strategies aimed to generate functional polymer monolayers on luminescent surfaces compatible with a future FRET (*Förster resonance energy transfer*)-based assay. To this end, light-emitting particles were synthesized and different initiator systems were analyzed, as well as the influence of experimental parameters such as the type of porogen. However, several technical challenges were identified, including unwanted monomer conversion during photopolymerization, the low efficiency of ECL systems using immobilized Ru(II) polypyridine complexes, the interference of DMSO as a co-reactant, and the general instability of the initiator system. Although it was not possible to obtain a functional optical sensor at this stage, the work provided valuable insight into the factors limiting the efficiency of these strategies, guiding future optimization in the development of MIP-based sensors with luminescent response.

Finally, **chapter 4**





## RESUMEN

La detección precisa y sensible de contaminantes como las micotoxinas representa un desafío prioritario en el ámbito de la seguridad alimentaria. En este contexto, los polímeros de impronta molecular (MIPs),—totalmente artificiales—, se han revelado como una alternativa muy atractiva a los anticuerpos y los correspondientes biosensores, gracias a la notable selectividad al analito, estabilidad química, bajo coste y reusabilidad de los primeros. Esta tesis doctoral se centra en el diseño y desarrollo de métodos analíticos avanzados y dispositivos funcionales basados en MIPs, con el objetivo de mejorar la detección de micotoxinas mediante enfoques innovadores nunca antes utilizados conjuntamente con los MIPs, tales como la electroquimioluminiscencia (ECL), la electroquímica bipolar (BE) y la amplificación fotoquímica. Si bien uno de los fines habituales de nuestra investigación ha sido su aplicación en muestras reales, no todos los sistemas alcanzaron esta fase de validación debido a la novedad de las estrategias exploradas y al necesariamente limitado tiempo de ejecución del trabajo de tesis.

Tras una breve Introducción, el **capítulo 2** aborda dos líneas principales. En primer lugar, se desarrolló y optimizó un método basado en MIPs para la preconcentración *simultánea* de zearalenona (ZON) y alternariol (AOH), algo no descrito anteriormente. Mediante el uso conjunto de MIPs y un diseño experimental quimiométrico para la optimización de las condiciones experimentales, se logró establecer un procedimiento robusto basado en cartuchos cargados con una mezcla 1:1 (p/p) de los dos polímeros selectivos a cada una de las micotoxinas, empleando disolventes específicos para el lavado y la elución óptimos. Los extractos se analizaron por HPLC con detección de fluorescencia directa, mostrando límites de detección inferiores a  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para ZON y  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  para AOH. El método fue validado con éxito en aceites vegetales, alcanzando recuperaciones entre el 92% y el 113%, con baja dispersión ( $\text{RSD} < 6\%$ ). Además, los resultados se confirmaron mediante HPLC-MS/MS, demostrando la fiabilidad del método y la utilidad de los MIPs como elementos sintéticos de reconocimiento molecular.

En una segunda parte, se explora la síntesis de MIPs en formato *nanogel* para la detección selectiva y rápida de ácido micofenólico (MPA), micotoxina con propiedades inmunosupresoras. Este tipo de MIPs nunca antes había sido utilizado para el análisis de micotoxinas. Dada la complejidad de su preparación, se llevó a cabo una estancia de investigación en un laboratorio de referencia internacional especializado en este tipo de materiales. Durante ésta se obtuvieron nanogeles mediante polimerización en fase sólida y por precipitación, y se realizó una caracterización detallada de sus propiedades fisicoquímicas (tamaño, estabilidad, capacidad de reconocimiento). Aunque se obtuvo una buena caracterización estructural, los nanogeles preparados mostraron una afinidad limitada hacia el MPA,

lo cual pone de manifiesto la necesidad de rediseñar el sistema, ya sea mediante la inclusión de monómeros funcionales más específicos y/o mediante el uso de una molécula plantilla alternativa con grupos carboxilo disponibles para establecer interacciones más fuertes con el analito. A pesar de ello, esta investigación nos ha permitido adquirir un conocimiento profundo sobre la síntesis y comportamiento de MIPs en formato nanogel, sentando las bases para su aplicación futura en la detección de otras micotoxinas de interés.

El **capítulo 3** también comprende dos partes: en la primera, se describe por primera vez un sistema sensor *híbrido* para la detección de zearalenona (ZON) basado en MIPs, *electroquímica bipolar* (BE) y emisión óptica como señal de transducción. La prueba de concepto abordó el electroanálisis inalámbrico de ZON, una micotoxina con actividad estrogénica, utilizando un diodo emisor de luz (LED) con un ánodo modificado con MIP y un cátodo hechos de sendos hilos de oro, *sin conexión física* (*wireless*) a los electrodos “de alimentación” (*feeders*). El reconocimiento molecular de la ZON por el fino recubrimiento MIP facilita la reacción redox del sistema  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  en los extremos de oro del LED, generando una señal luminosa proporcional a la concentración del analito. Al *integrar* este sistema con una plataforma *microfluídica*, se desarrolló un dispositivo analítico muy sensible, capaz de cuantificar ZON en un rango lineal de 10 a 70 ng mL<sup>-1</sup>, mostrando el potencial de estos sensores para aplicaciones portátiles en el análisis de contaminantes alimentarios y sistemas de alarma visual.

En la segunda parte del capítulo 3, se han explorado estrategias innovadoras de *síntesis polimérica* de MIPs con el objetivo de desarrollar sensores ópticos basados en estos materiales para la detección selectiva de AOH. En particular, se investigaron dos métodos inducidos por la luz: la *fotopolimerización* directa y la *polimerización* inducida por *electroquimioluminiscencia* (ECL). Estas estrategias buscaban generar monocapas poliméricas funcionales sobre superficies luminiscentes, compatibles con un futuro ensayo tipo FRET (*Förster resonance energy transfer*). Para ello, se sintetizaron partículas emisoras de luz y se analizaron distintos sistemas iniciadores, así como la influencia de parámetros experimentales como el tipo de porógeno. Sin embargo, se identificaron varios desafíos técnicos, entre los que se encuentran la conversión no deseada de monómeros durante la fotopolimerización, la baja eficiencia de los sistemas ECL que emplean complejos polipiridínicos de Ru(II) inmovilizados, la interferencia del DMSO al actuar como correactante y la inestabilidad general del sistema iniciador. Aunque no se logró obtener un sensor óptico funcional en esta etapa, el trabajo aportó un conocimiento valioso sobre los factores que limitan la eficacia de estas estrategias, orientando líneas de optimización futura en el desarrollo de sensores basados en MIPs con respuesta luminiscente.

Finalmente, el **capítulo 4**



# CAPÍTULO 1



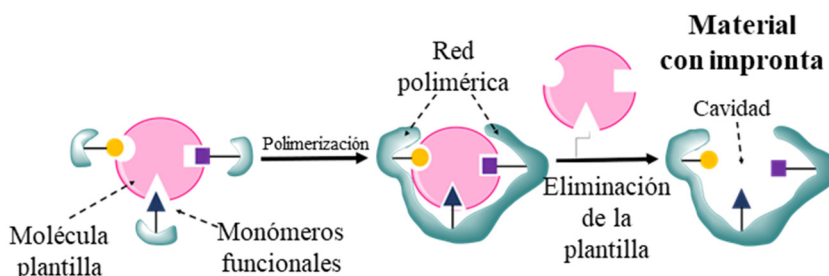
# Capítulo 1. Introducción general

## 1.1. Polímeros de impronta molecular

### 1.1.1. Concepto y componentes

Los **polímeros de impronta molecular** (MIPs) son materiales sintéticos que tienen la capacidad de reconocer y unirse selectivamente a una molécula específica, imitando la función de los receptores naturales en los organismos vivos. Se fabrican mediante un proceso que involucra la impronta de una molécula objetivo, conocida como molécula plantilla, dentro de una matriz polimérica. Al finalizar la polimerización, la **molécula plantilla** se extrae de la matriz, dejando cavidades en el polímero que son complementarias en forma, tamaño y funcionalidad a la molécula original. Estos sitios de unión específicos están diseñados para interactuar con el analito de interés de forma recurrente (**Figura 1**).<sup>1</sup> Simultáneamente, se emplean dos tipos de polímeros como controles para evaluar la eficacia del proceso de impronta molecular. Estos polímeros son conocidos como polímero sin impronta (NIP, del inglés *non-imprinted polymer*) y polímero control con impronta (CIP, del inglés *control-imprinted polymer*). El NIP se sintetiza en ausencia de la molécula plantilla, lo que implica que no presenta cavidades específicas para el reconocimiento molecular, y, generalmente, es menos poroso. Por otro lado, el CIP es un polímero con impronta molecular utilizando una molécula diferente a la de interés, lo que permite descartar que el reconocimiento molecular esté determinado exclusivamente por la porosidad del material. Ambos controles son importantes para validar la especificidad y el rendimiento del polímero con impronta molecular, si bien el CIP no siempre se prepara.

Aunque los MIPs realizan funciones análogas a las de los sistemas biológicos de reconocimiento molecular, su elaboración a partir de estructuras poliméricas altamente reticuladas les otorga una mayor estabilidad, robustez y versatilidad en comparación con, por ejemplo, los anticuerpos. Además, su fabricación barata y su capacidad para prepararlos a gran escala, facilitan su aplicación en condiciones extremas.<sup>2,3</sup>



**Figura 1.** Proceso general de impronta molecular. La molécula plantilla interactúa con los monómeros funcionales, formando una cavidad que se ajusta a su forma. Tras eliminar la plantilla, queda una cavidad vacía diseñada para reconocer y unirse nuevamente a la molécula objetivo.

## *Introducción general*

Para la elaboración de polímeros de impronta molecular, es esencial comprender los roles de sus componentes fundamentales:<sup>4</sup>

### **Molécula plantilla**

Proporciona la estructura específica que el polímero debe reconocer y ha de contener grupos funcionales que permanezcan inalterados durante la polimerización, así como grupos capaces de formar aductos estables entre la plantilla y el monómero.

### **Monómeros funcionales**

Polimerizan alrededor de la plantilla para conformar la matriz polimérica. La selección del monómero funcional afecta a la estructura del sitio de reconocimiento, y su concentración influye en el número de sitios de unión.

### **Monómeros entrecruzantes**

Agentes que estabilizan la estructura polimérica al formar una red tridimensional que fija los monómeros funcionales alrededor de la molécula plantilla. El tipo y cantidad de monómero entrecruzante son factores cruciales, ya que influyen directamente en la morfología y en el rendimiento mecánico del MIP. Un alto número de unidades de monómero entrecruzante por unidad de monómero funcional permite obtener un material poroso más estable.

### **Disolvente o porógeno**

La naturaleza del porógeno afecta a la eficiencia de la impronta, ya que facilita la mezcla de los componentes de polimerización y promueve la interacción entre molécula plantilla y el monómero funcional. Un mayor contenido de porógeno resulta en un aumento en el tamaño de los poros del material.

### **Iniciadores**

Los compuestos peroxídicos y azoicos se utilizan comúnmente como iniciadores en la síntesis de MIPs mediante polimerización por radicales libres. Este proceso debe realizarse en una atmósfera de gas inerte para prevenir reacciones secundarias con el oxígeno, que inhiben la polimerización.

La eficacia y la especificidad del MIP en aplicaciones de reconocimiento molecular dependen de la selección y combinación precisa de estos componentes.

## **1.1.2. Tipos de impronta**

Existen tres tipos principales de impronta molecular en la fabricación de MIPs, dependiendo de cómo interactúan los monómeros con la molécula plantilla durante la formación del polímero.

## Covalente

En este método, se forman durante la polimerización enlaces covalentes reversibles entre la plantilla y el monómero que se rompen para liberar la molécula plantilla, dejando cavidades específicas. Esto proporciona alta especificidad en la unión, gracias a la estabilidad de los enlaces covalentes. Sin embargo, la eliminación de la plantilla es más compleja y el reconocimiento molecular es más lento, ya que la formación y ruptura de estos enlaces es necesaria para el reconocimiento molecular (*rebinding*). Un ejemplo es el uso de ácidos borónicos, que forman enlaces covalentes reversibles con dioles, generando sitios de reconocimiento selectivos y reutilizables, ideales para compuestos con grupos diol como los monosacáridos.<sup>5</sup>

## Semicovalente

En este caso, las interacciones entre la molécula plantilla y los monómeros son covalentes durante la formación del polímero. Sin embargo, una vez que se retira la plantilla, el reconocimiento y la reincorporación de la molécula objetivo se llevan a cabo mediante interacciones no covalentes. Este enfoque combina la especificidad del método covalente durante la síntesis, con la rapidez y flexibilidad del *rebinding* no covalente. No obstante, puede que no sea tan eficiente en el reconocimiento como los métodos basados únicamente en interacciones no covalentes. Para mejorar la precisión del sitio de reconocimiento, a veces se emplea un espaciador sacrificial que ayuda a posicionar y configurar la plantilla durante la polimerización y que luego se elimina, dejando un sitio de unión más preciso y específico.<sup>6</sup>

## No covalente

Este es el tipo más común de impronta molecular. En este método, las interacciones entre los monómeros y la molécula plantilla no son covalentes en ningún momento, involucrando aductos asociados mediante enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas o fuerzas de Van der Waals. Es el método más simple y fácil de implementar, con un proceso de eliminación de la molécula plantilla mucho más sencillo. Además, el *rebinding* de la molécula objetivo es rápido, lo que lo hace adecuado para diversas aplicaciones. Sin embargo, dado que las interacciones no covalentes son más débiles, la especificidad puede ser menor en comparación con los métodos que utilizan interacciones covalentes.<sup>7</sup>

### 1.1.3. Formatos físicos

Los MIPs pueden prepararse en diversos formatos físicos, cada uno con características y aplicaciones específicas que afectan a su rendimiento y funcionalidad en distintos contextos. A continuación, se describen en detalle estos formatos y sus respectivas ventajas y usos.

### Bloque

Se trata de un formato de impronta molecular donde los monómeros, la plantilla y los agentes de entrecruzamiento se mezclan directamente para formar un polímero sólido. Una vez completada la polimerización, el material resultante se somete a procesos de molienda y tamizado, lo que da lugar a un polímero con tamaños y formas irregulares. Esta irregularidad es desfavorable para aplicaciones cromatográficas, ya que provoca un ensanchamiento de los picos cromatográficos, lo que dificulta la resolución y precisión de las separaciones.<sup>8</sup> Asimismo, también resulta inconveniente para la fabricación de sensores, donde se requiere uniformidad en el tamaño y la forma de las partículas para asegurar una respuesta consistente y confiable. Además, durante la disgregación mecánica del polímero sintetizado, puede producirse una destrucción parcial de los grupos funcionales, así como una disminución en la accesibilidad de los sitios de reconocimiento. Aunque este método es rápido y sencillo, presenta limitaciones en cuanto a su reproducibilidad y selectividad.

### Partículas

Se obtienen a través de técnicas como la polimerización en suspensión, emulsión o precipitación, produciendo micro o nanopartículas esféricas (**Figura 2**). Estas partículas destacan por su alta relación superficie-volumen, lo que incrementa significativamente la accesibilidad a los sitios de reconocimiento, haciéndolas especialmente útiles en aplicaciones como sensores, catálisis y liberación controlada de fármacos.<sup>9</sup> Sin embargo, su síntesis es más compleja y costosa en comparación con la polimerización en bloque, debido a que el tamaño y la calidad de las partículas dependen de diversos factores, tales como la temperatura, la velocidad de agitación y el tipo de medio dispersante o disolvente utilizado. Esto resalta la importancia de controlar con precisión las condiciones experimentales.

- *Polimerización en suspensión.* Permite obtener partículas esféricas, aunque de tamaño considerablemente grande (de micrómetros a milímetros). Además, el medio dispersante puede afectar negativamente al reconocimiento molecular de los MIPs.<sup>10</sup>
- *Polimerización en emulsión.* Este método es eficaz para producir partículas monodispersas y de pequeño tamaño (de decenas a cientos de nanómetros). Sin embargo, la presencia de agua y surfactantes puede comprometer la estabilidad de las interacciones entre la plantilla y los monómeros funcionales, limitando su uso en la síntesis de MIPs.<sup>11</sup>
- *Polimerización por precipitación.* Se caracteriza por la obtención de partículas esféricas y uniformes de tamaño pequeño (menos de 1  $\mu\text{m}$ ), pero requiere una cantidad considerable de plantilla y disolvente, lo que implica un mayor

consumo de recursos en comparación con otros métodos como la polimerización en bloque.<sup>12</sup>

## Membranas

Se componen de capas delgadas de polímero con cavidades específicas en su superficie, fabricadas mediante técnicas como la polimerización por radiación o electrospinning.<sup>13,14</sup> Son especialmente adecuadas para la filtración selectiva y la detección de moléculas, gracias a su alta especificidad superficial. No obstante, su capacidad de carga es limitada debido a la menor cantidad de sitios de reconocimiento disponibles en comparación con otros formatos de mayor volumen.

## Nanogeles

Los nanogeles son redes poliméricas tridimensionales que se expanden al entrar en contacto con disolventes. Esta capacidad de hinchamiento les permite encapsular moléculas y liberar su contenido de manera precisa, lo que resulta especialmente beneficioso en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos y en sensores bioquímicos, donde la respuesta rápida a cambios en el entorno es crucial. No obstante, la síntesis de nanogeles es más compleja y costosa en comparación con otros formatos debido a la necesidad de emplear técnicas avanzadas para controlar con exactitud su estructura y propiedades durante el proceso de polimerización.<sup>15</sup>

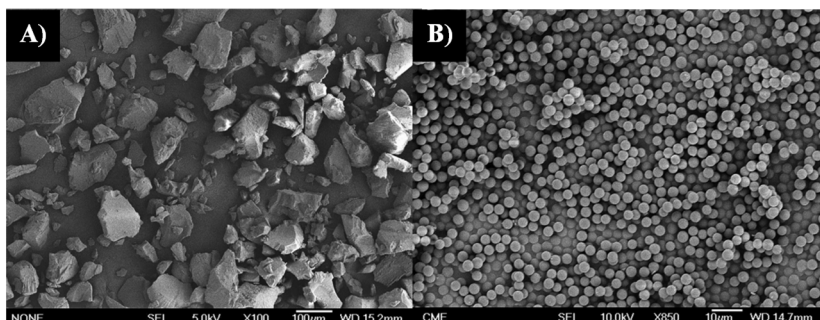


Figura 2. Micrografías SEM de polímeros en (A) bloque y, (B) partículas esféricas. Reproducido de la referencia [16] con permiso.

### 1.1.4. Técnicas de caracterización de MIPs

Las técnicas de caracterización son esenciales para evaluar y optimizar los MIPs. Estas metodologías permiten analizar la estructura, morfología y capacidad de reconocimiento de los MIPs, garantizando su desempeño en aplicaciones específicas. A través de diversas herramientas, como espectroscopía, microscopía y análisis térmico, se obtiene información crucial para ajustar y validar estos materiales especializados. En esta sección se describen brevemente las principales técnicas de caracterización de MIPs y su relevancia.

### **Espectroscopía infrarroja (FTIR)**

Técnica utilizada para identificar grupos funcionales en los MIPs mediante la absorción de radiación infrarroja, proporcionando información sobre las vibraciones moleculares y enlaces químicos presentes en el polímero.<sup>17</sup>

### **Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)**

Técnica que permite analizar la composición elemental y los estados de oxidación de la superficie de los MIPs mediante la detección de electrones emitidos tras la irradiación de éstos con rayos X.<sup>18</sup>

### **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se emplea para obtener imágenes detalladas de la superficie de los MIPs, ofreciendo información sobre la morfología y la estructura de ésta a escala nanométrica.<sup>19</sup> En SEM, un haz de electrones barre la superficie de la muestra. Los electrones interactúan con los átomos de la muestra, generando electrones secundarios y retrodispersados que se capturan para crear una imagen tridimensional de la superficie.

### **Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Proporciona imágenes de alta resolución de la estructura interna y detalles atómicos de los MIPs, permitiendo visualizar la disposición y tamaño de las partículas o poros.<sup>20</sup> En TEM, un haz de electrones de alta energía atraviesa una muestra extremadamente delgada. Los electrones que pasan a través de la muestra forman una imagen bidimensional de su estructura interna, proyectada en un detector o pantalla.

### **Análisis de superficie específica (BET)**

La porosimetría por adsorción de nitrógeno expone una cantidad fija de polímero seco a un gas (usualmente nitrógeno) bajo presiones controladas. La cantidad de gas adsorbido en función de la presión permite generar isothermas de adsorción, que al ser analizadas con la teoría BET y modelos matemáticos, proporcionan información sobre el área superficial específica, el volumen y diámetro promedio de poros, y su distribución. Esta técnica es útil para analizar microporos y mesoporos, definidos por la IUPAC como poros menores a 2 nm (microporos) y entre 2-50 nm (mesoporos), respectivamente.<sup>21,22</sup>

### **Calorimetría de barrido diferencial (DSC)**

Permite analizar las propiedades térmicas de los MIPs, como las transiciones de fase, la estabilidad térmica y la temperatura de descomposición.<sup>23</sup>

## **Espectroscopía de fluorescencia y absorción de luz**

Métodos que analizan las propiedades ópticas de los MIPs, midiendo la absorción y emisión de luz para estudiar la interacción entre los monómeros funcionales y la plantilla.<sup>24</sup>

## **Dispersión dinámica de luz (DLS)**

Técnica que mide el tamaño de partículas en suspensión o de moléculas en disolución mediante el análisis de las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada. Estas fluctuaciones se deben al movimiento browniano de las partículas, y a partir de ellas se calcula su tamaño hidrodinámico. La DLS se utiliza ampliamente para estudiar nanopartículas, coloides y macromoléculas en medios líquidos. Es una técnica no invasiva y rápida, ideal para determinar distribuciones de tamaño en muestras heterogéneas.<sup>25</sup> Generalmente, el mismo equipo que incorpora la DLS también permite la medida del potencial zeta, un parámetro que describe la estabilidad electrocinética de las partículas en suspensión al cuantificar la magnitud de su carga superficial en un medio determinado (usualmente agua). No obstante, para la determinación del potencial zeta se requieren cubetas especiales diseñadas con electrodos integrados, las cuales facilitan la aplicación de un campo eléctrico y permiten la detección del movimiento electroforético de las partículas en la muestra.

### **1.1.5. Aplicaciones de los MIPs**

Los MIPs constituyen materiales altamente versátiles que encuentran aplicaciones en una amplia variedad de áreas científicas y tecnológicas, gracias a su capacidad de reconocimiento selectivo y su estabilidad estructural. Su uso se ha extendido a campos como la cromatografía y la separación de compuestos, la liberación controlada de moléculas activas, la adsorción de contaminantes ambientales, así como el desarrollo de sensores y ensayos biomiméticos. La diversidad de estas aplicaciones destaca la flexibilidad y potencial de los MIPs para resolver problemas complejos en ámbitos industriales, ambientales y biomédicos, consolidándose como herramientas clave en estos sectores. A continuación, se explican más en detalle algunas de estas aplicaciones.

## **Cromatografía y separación de compuestos**

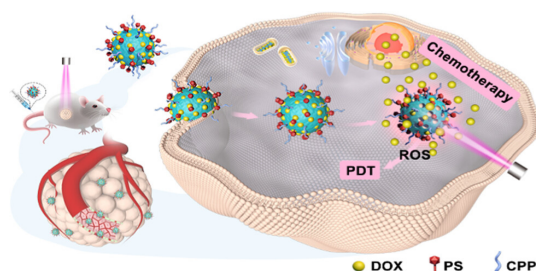
Los MIPs se utilizan ampliamente en cromatografía y separación de compuestos debido a su capacidad para reconocer y retener de manera selectiva moléculas específicas. En cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), los MIPs se emplean como fases estacionarias, donde sus cavidades específicas permiten la separación de analitos de interés con alta precisión. Al estar diseñados para reconocer moléculas con una estructura similar a la plantilla utilizada en su síntesis, los MIPs facilitan la separación de compuestos en mezclas complejas, y la purificación de

## Introducción general

productos farmacéuticos o la separación de enantiómeros.<sup>26,27</sup> Además, los MIPs también se integran en técnicas de extracción en fase sólida (MISPE, del inglés, “*molecularly imprinted solid phase extraction*”), donde actúan como adsorbentes selectivos, mejorando la preconcentración y purificación de analitos en matrices ambientales, biológicas o alimentarias. Gracias a su estabilidad química y térmica, los MIPs proporcionan ventajas sobre las fases estacionarias convencionales, ya que pueden operar bajo condiciones extremas sin perder su capacidad de reconocimiento molecular. En conjunto, el uso de MIPs en cromatografía y separación de compuestos ofrece una mayor especificidad, eficiencia y robustez en comparación con otras técnicas de separación tradicionales.<sup>28</sup>

## Liberación controlada de moléculas activas

En aplicaciones farmacéuticas, los MIPs se utilizan para diseñar sistemas de liberación controlada que permiten la administración prolongada y específica de fármacos (**Figura 3**). Los MIPs permiten capturar y liberar el medicamento de manera gradual y precisa, según las necesidades terapéuticas.<sup>29,30</sup> Este enfoque proporciona múltiples beneficios, como la reducción de los efectos secundarios asociados con las dosis elevadas de fármacos, la mejora de la biodisponibilidad y la optimización de la liberación en el sitio deseado del organismo. Además, los MIPs pueden diseñarse para responder a estímulos específicos, como cambios en el pH o la presencia de ciertas enzimas, lo que permite una liberación dirigida y adaptativa del principio activo.<sup>31</sup> En otras aplicaciones, como en la liberación de compuestos en sistemas agrícolas o de nutrición, los MIPs aseguran una liberación controlada y eficiente de nutrientes o pesticidas, optimizando su eficacia y minimizando el impacto ambiental.<sup>32</sup>



**Figura 3.** Ejemplo de liberación controlada de doxorubicina (DOX) encapsulada en un MIP recubierto con un péptido de penetración celular (CPP), utilizada como estrategia en la terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer de mama. Al irradiar el fotosensibilizador (PS), este genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan las células tumorales y, al mismo tiempo, mejora la liberación de DOX al aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos. Reproducido de la referencia [30] con permiso. Copyright 2022 American Chemical Society.

## Adsorbentes de contaminantes ambientales

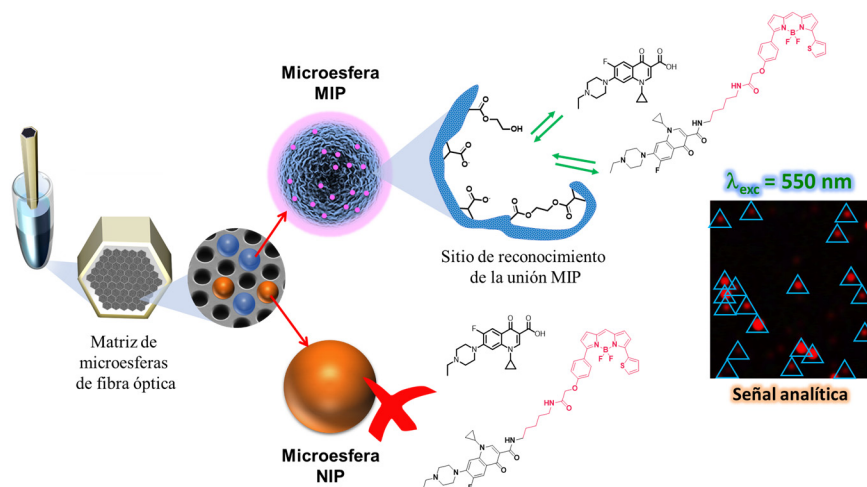
Los MIPs destacan como adsorbentes efectivos en la remoción de contaminantes ambientales, gracias a su diseño especializado con cavidades que replican la estructura de los contaminantes a eliminar. En el tratamiento de aguas residuales y suelos contaminados, los MIPs se utilizan para eliminar compuestos tóxicos y persistentes, tales como pesticidas, metales pesados y productos farmacéuticos.<sup>33-35</sup> Su capacidad para retener estos contaminantes con alta eficacia y selectividad los convierte en una herramienta ideal para la purificación ambiental y la protección de recursos hídricos. Además, su estabilidad y resistencia a condiciones ambientales variadas permiten su uso en procesos prolongados y bajo diversas condiciones operativas. Los MIPs también pueden regenerarse y reutilizarse en múltiples ciclos de adsorción, ofreciendo una solución sostenible para la mejora de la calidad del medio ambiente.

## Sensores

Un sensor es un dispositivo diseñado para identificar cambios en su entorno y convertir estos cambios en señales medibles, adecuadas para diversas aplicaciones. Su función principal es responder a estímulos físicos, químicos o biológicos, tales como luz, temperatura, presión, humedad, pH o concentración de sustancias químicas. Al detectar estos estímulos, el sensor produce una señal en forma de voltaje, corriente, frecuencia, intensidad lumínica u otras variables, que se interpreta y procesa por sistemas electrónicos o computacionales, posibilitando la monitorización, el control o el registro de parámetros físicos o químicos en tiempo real o cuasirreal.<sup>36</sup>

El componente de reconocimiento con sitios específicos de los sensores se acopla a un transductor que genera una señal detectable. La unión del analito a estos sitios provoca cambios en las propiedades fisicoquímicas del sistema, los cuales se registran a través de técnicas ópticas, acústicas o electroanalíticas.<sup>37</sup> Por ejemplo, la interacción de la molécula objetivo con el MIP puede modificar las propiedades ópticas del material, como el color o la intensidad de la luz emitida. Estos cambios se pueden medir mediante técnicas como la espectroscopía de absorción, la fluorescencia o la refractometría (**Figura 4**).<sup>38</sup>

A diferencia de los sensores tradicionales que emplean simplemente colorantes orgánicos que suelen tener una respuesta analítica menos selectiva, los sensores basados en MIPs sobresalen por su alta selectividad hacia el analito objetivo.<sup>39</sup> Esta capacidad de reconocimiento específico en sus cavidades es fundamental para obtener medidas precisas incluso en presencia de compuestos interferentes, ya que minimiza su influencia y elimina la necesidad de procedimientos de separación complejos. Por lo tanto, los sensores basados en MIPs como elemento de reconocimiento representan una alternativa más rápida y eficiente en comparación con otros tipos de sensores.



**Figura 4.** Ejemplo de sensor óptico basado en MIPs selectivos para la detección de enrofloxacin, utilizando un haz de fibras ópticas con esferas microscópicas de impronta molecular situadas en su extremo distal. Este sistema permite la detección multiplexada y altamente selectiva de este antibiótico mediante análisis por fluorescencia. Reproducido de la referencia [38] con permiso.

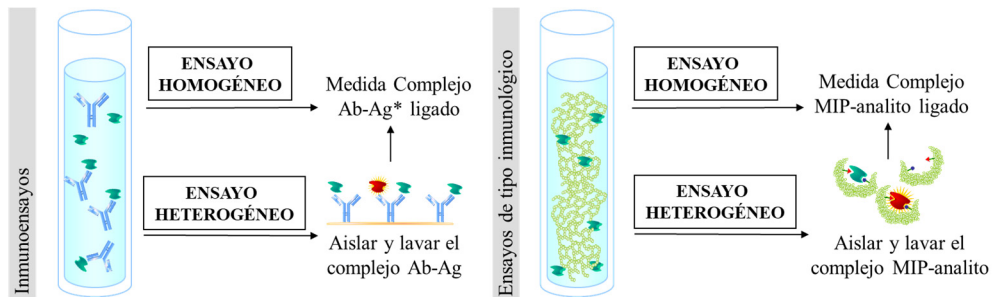
## Ensayos biomiméticos

Para los ensayos inmunológicos basados en MIPs, conocidos como ensayos ILAs (del inglés, “*Immuno-Like Assays*”), es fundamental contar con sitios de unión que sean altamente selectivos y de gran afinidad, así como un método sensible para señalar el evento de unión. Se han explorado diversos modos de detección analítica en combinación con MIPs para el desarrollo de ILAs, siendo los más utilizados los métodos ópticos, enzimáticos, radiocelulares y electroquímicos.

En este apartado se describen los ensayos fluorescentes de tipo inmunológico FILAs (FILAs, del inglés “*Fluoro Immuno-Like Assays*”). La fluorimetría es una técnica óptica que destaca por su sensibilidad y especificidad (la sensibilidad de fluorescencia es de 10 a 1000 veces superior a la de las medidas por absorción de luz). La detección de moléculas individuales se basa principalmente en el uso de compuestos marcados con fluoróforos. Además, las determinaciones fluorimétricas permiten la captura simultánea de múltiples parámetros, tales como las longitudes de onda de excitación y de emisión, el tiempo de vida de fluorescencia y la polarización de la emisión, lo que ofrece mayor especificidad y versatilidad en las medidas analíticas.<sup>40,41</sup>

Los ensayos FILAs, como otros ensayos biomiméticos, pueden clasificarse en dos tipos principales: homogéneos y heterogéneos (**Figura 5**). En los **ensayos homogéneos**, todas las reacciones ocurren en una sola fase, sin necesidad de separar los componentes ligados de los no ligados. Son más sencillos y rápidos, ya que no requieren pasos adicionales de lavado. Por otro lado, los **ensayos heterogéneos** involucran múltiples fases, donde los componentes no ligados deben separarse de los ligados mediante técnicas de lavado. Esto permite una mayor precisión en la detección

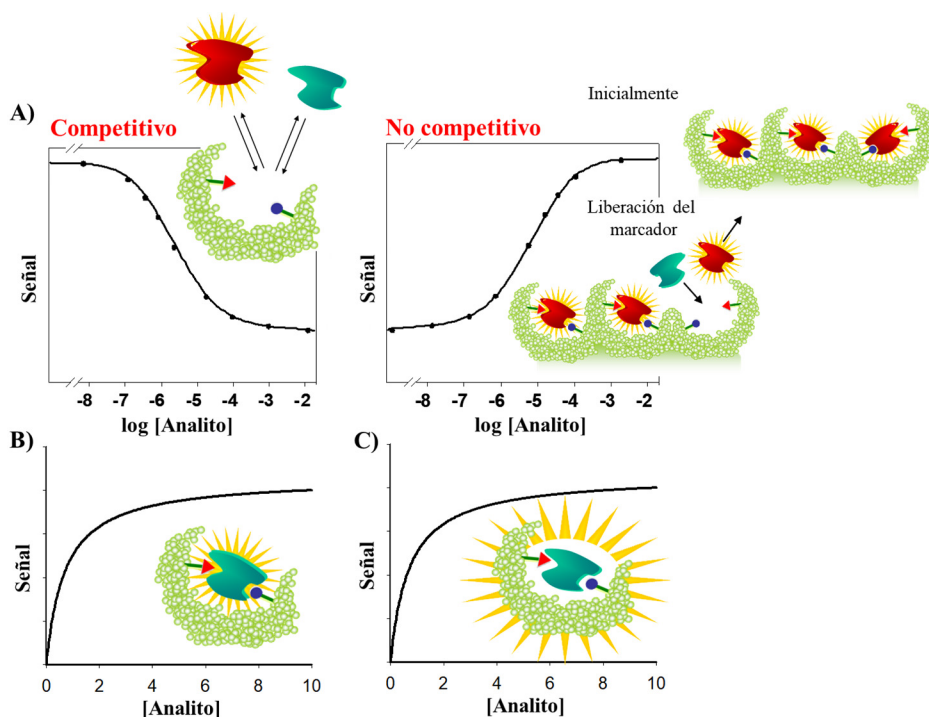
de los componentes de interés, ya que se eliminan las moléculas no deseadas antes de la lectura final.



**Figura 5.** Clasificación de los (bio)ensayos según si el complejo anticuerpo-antígeno o MIP-analito se separa o no del analito libre. Reproducido de la referencia [41] con permiso. Copyright 2010 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

A continuación, se presentan algunas estrategias de detección fluorescente aplicables en sistemas basados en MIPs, que permiten monitorizar la interacción entre el analito y el polímero, ya sea aprovechando las propiedades fluorescentes del analito o mediante el etiquetado fluorescente del polímero.

- **Analito no fluorescente.** Si el analito no presenta fluorescencia, se utiliza un análogo fluorescente que imita al analito y compite por los sitios de unión en el MIP. Este tipo de ensayo es competitivo o no competitivo (o de desplazamiento), y la cantidad de analito presente en la muestra se deduce indirectamente en función de la cantidad de análogo fluorescente que se une o desplaza (**Figura 6A**).<sup>42</sup>
- **Analito fluorescente.** En este caso, el analito en sí tiene propiedades fluorescentes, por lo que su unión al MIP puede ser monitorizada directamente. No se requiere ninguna modificación adicional ni etiquetas externas, ya que las propiedades ópticas naturales del analito permiten su detección (**Figura 6B**).<sup>43</sup>
- **Polímero etiquetado.** En este enfoque, el polímero está marcado con un fluoróforo que puede cambiar sus propiedades ópticas al interactuar con el analito de interés.<sup>24</sup> Además, si el exceso de polímero fluorescente no unido se ha eliminado mediante un proceso de lavado adecuado, la fluorescencia medida será directamente proporcional a la concentración del analito (**Figura 6C**).<sup>44</sup>



**Figura 6.** Estrategias de detección fluorescente en sistemas basados en MIPs para la monitorización de la interacción MIP-analito. Se presentan las estrategias según el origen de la señal fluorescente, junto con sus gráficas correspondientes: A) analito no fluorescente (ensayo competitivo o no competitivo por desplazamiento); B) analito fluorescente; C) polímero etiquetado. Reproducido de la referencia [41] con permiso. Copyright 2010 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

## 1.2. Micotoxinas

Una micotoxina es una sustancia química tóxica producida por ciertos hongos durante su metabolismo secundario. Estas toxinas pueden contaminar alimentos y piensos, presentando un riesgo considerable para la salud de los organismos que las consumen. Químicamente, las micotoxinas son moléculas pequeñas y estables que resisten la descomposición térmica y otros procesos de degradación, lo que les permite persistir en diversos ambientes y productos de la cadena trófica. Su prevención en la agricultura y la industria alimentaria requiere controlar las condiciones que favorecen el crecimiento de hongos, como la humedad y la temperatura, además de realizar inspecciones y análisis para detectar su presencia en los alimentos.<sup>45</sup>

### 1.2.1. Principales hongos productores

Los hongos productores de micotoxinas son organismos que contaminan cultivos agrícolas tanto durante su crecimiento en el campo como en el almacenamiento postcosecha. A continuación, en la **Tabla 1**, se describen las principales familias de hongos.

**Tabla 1.** Clasificación de los principales géneros de hongos y las micotoxinas más comunes que generan.

Micotoxina	Alimentos presentes	Principales especies de hongos productores
<b>Género <i>Aspergillus</i><sup>46</sup></b>		
Aflatoxinas (Afla)	Maíz, cacahuets, trigo, arroz, leche	<i>A. flavus</i>
Ocratoxina A (OTA)	Cereales, uvas, vino, café	<i>A. ochraceus</i>
<b>Género <i>Penicillium</i><sup>47-49</sup></b>		
Ocratoxina A	Cereales	<i>P. verrucosum</i>
Patulina	Manzanas y productos derivados	<i>P. expansum</i>
Citrinina	Arroz y cereales	<i>P. citrinum</i>
Ácido micofenólico	Uvas y vino	<i>P. brevicompactum</i>
<b>Género <i>Fusarium</i><sup>50</sup></b>		
Zearalenona (ZON)	Maíz, trigo, cebada, aceites y productos derivados	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
Deoxivalenol (DON)	Trigo, cebada y productos derivados	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
Nivalenol	Trigo, cebada y productos derivados	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
Toxinas T-2 y HT-2	Cereales	<i>F. armeniacum</i>
Fumonisinias (FB)	Maíz, arroz	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
<b>Género <i>Alternaria</i><sup>51</sup></b>		
Alternariol (AOH)	Trigo, tomate, maíz, aceites y derivados	<i>A. alternata</i>
Ácido tenuazónico (TeA)	Tomates, manzanas, aceitunas, trigo	<i>A. longipes</i>

### 1.2.2. Impacto en la salud humana y animal

La acumulación de micotoxinas en humanos y animales representa un grave riesgo para la salud, debido a su nivel de toxicidad. En la **Tabla 2** se enumeran algunos de los efectos que provocan las micotoxinas en salud.

## Introducción general

**Tabla 2.** Lista de micotoxinas y sus riesgos asociados en humanos y animales.

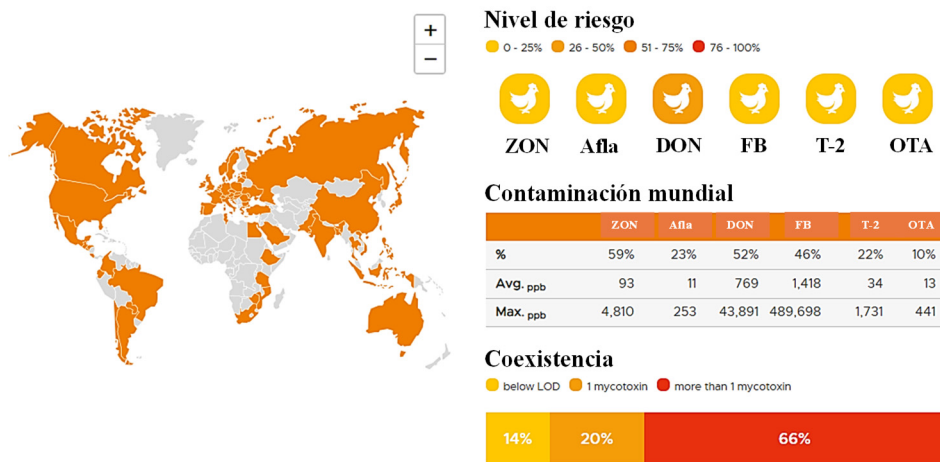
Micotoxina	Riesgo asociado
Afla	Hepatotóxicas, carcinógenos del grupo 1
OTA	Afecta a los riñones, efectos inmunosupresores y teratogénicos
Patulina	Problemas gastrointestinales
Citrinina	Afecta a los riñones
ZON	Estrogénica, trastornos reproductivos graves
DON, T-2, HT-2	Vómitos, inmunosupresión y necrosis
FB	Hepatotóxicas y nefrotóxicas, relacionadas con un mayor riesgo de cáncer esofágico <sup>52</sup>
AOH, AME	Incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que resulta en daño oxidativo del ADN, lípidos y proteínas. Provoca una reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes <sup>53</sup>

Si bien los efectos individuales de cada micotoxina son preocupantes por sí mismos, el riesgo aumenta considerablemente cuando varias micotoxinas coexisten. Este fenómeno, conocido como **sinergia de micotoxinas**, ocurre cuando la combinación de dos o más micotoxinas genera un efecto tóxico mayor que la suma de sus efectos individuales. Esto puede suceder a través de distintos mecanismos, como la interferencia en rutas metabólicas, donde las micotoxinas alteran enzimas clave, aumentando la toxicidad global. Además, la acción conjunta de las micotoxinas puede comprometer el sistema inmunológico de forma más severa o incrementar la permeabilidad intestinal, facilitando la absorción de otras toxinas y agravando su impacto.<sup>54,55</sup> Existen numerosos ejemplos que ilustran este fenómeno. La combinación de Afla B1 y FB1, por ejemplo, aumenta significativamente el riesgo de daño hepático y desarrollo de tumores, además de intensificar la supresión del sistema inmune.<sup>56</sup> De manera similar, la sinergia entre ZON y DON puede causar graves alteraciones en la función reproductiva y digestiva.<sup>57</sup> Dado que la mayoría de micotoxinas suelen coexistir, es esencial disponer de técnicas que permitan su detección simultánea para evaluar con precisión el riesgo toxicológico. Los MIPs representan una prometedora alternativa para mejorar significativamente la detección simultánea y el control de su contaminación en alimentos y piensos.

En este sentido, la capacidad de detectar y controlar eficazmente la presencia de micotoxinas es crucial para mitigar sus efectos adversos. La contaminación por micotoxinas no solo tiene un impacto en la salud, sino que también conlleva repercusiones económicas y sociales. Desde el punto de vista económico, genera importantes pérdidas en la producción agrícola. Socialmente, afecta a la salud pública, genera desconfianza en el sistema alimentario y agrava las desigualdades en

comunidades vulnerables.<sup>58</sup> Estos impactos resaltan la importancia de adoptar medidas eficaces para el control de la contaminación por micotoxinas y la protección de la salud pública, así como para garantizar la estabilidad económica y social. En este contexto, también resultan esenciales las herramientas y aplicaciones que muestren de manera clara y accesible el riesgo directo y real al que nos enfrentamos.

La **Figura 7** muestra un mapa de la aplicación de la empresa DSM para la gestión de micotoxinas. El mapa emplea una escala de colores que indica la coexistencia de micotoxinas en un mismo animal, donde el amarillo representa la menor prevalencia y el rojo la mayor. Además, indica el porcentaje de muestras contaminadas a nivel mundial para cada micotoxina, junto con información sobre las concentraciones media y máxima encontradas, expresadas en partes por billón (ppb).<sup>59</sup> Esta información proporciona una visión detallada sobre la distribución e impacto de cada micotoxina, facilitando la identificación de áreas clave en la gestión del riesgo.



**Figura 7.** Mapa de la aplicación de DSM para la gestión de micotoxinas, que se basa en datos del primer semestre de 2024 y muestra los niveles cuantificados de micotoxinas en muestras de pollo a nivel global.<sup>60</sup>

### 1.2.3. Regulación y control

#### Normativas y organismos reguladores

La regulación de micotoxinas es esencial para proteger la salud pública y garantizar la seguridad alimentaria. Los límites permitidos y las prácticas de control se basan en la evaluación de riesgos y la evidencia científica disponible, y pueden variar según las normativas locales e internacionales. La implementación efectiva de estas regulaciones es clave para mitigar los riesgos asociados con la exposición a micotoxinas. La regulación y control de micotoxinas en alimentos están gestionados por diversas normativas y organismos reguladores a nivel internacional y nacional. Entre los principales organismos se encuentran:

La Organización Mundial de la Salud (**OMS**) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (**FAO**). A través del Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (**JECFA**), ambas organizaciones proporcionan recomendaciones sobre límites seguros para diferentes micotoxinas en alimentos y piensos.<sup>61,62</sup>

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (**EFSA**). En la Unión Europea, la EFSA evalúa los riesgos asociados a las micotoxinas y emite directrices y recomendaciones para la regulación de estas toxinas en alimentos y piensos.<sup>63</sup>

Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (**EPA**). La EPA establece normas para micotoxinas en productos agrícolas y medioambientales, incluyendo límites de concentración permitidos en cultivos y en el ambiente.<sup>64</sup>

Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (**FDA**). La FDA regula los niveles de micotoxinas permitidos en alimentos y piensos, y proporciona directrices para el monitoreo y control de estas toxinas.<sup>65</sup>

Organización Internacional de Normalización (**ISO**). ISO desarrolla estándares internacionales para métodos de análisis y control de micotoxinas, facilitando la uniformidad en la detección y evaluación.<sup>66</sup>

#### Micotoxinas legisladas

Las micotoxinas que han sido objeto de legislación y regulación específica están contempladas en el *Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión Europea*.<sup>67</sup> Estas incluyen un límite máximo de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  para las **aflatoxinas** totales en aceite de maíz en la UE. La **ocratoxina A**, por su parte, está regulada en cereales, café y vino, con un límite máximo de  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$  en cereales y productos a base de cereales. Las **fumonisin** tienen un límite de  $4000 \mu\text{g kg}^{-1}$  en maíz. La **zearalenona** tiene un límite de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  en cereales y productos derivados. Finalmente, el **deoxinivalenol**, también conocido como vomitoxina, está limitado a  $1750 \mu\text{g kg}^{-1}$  en cereales. La **Figura 8** recoge la estructura química de las micotoxinas mencionadas.

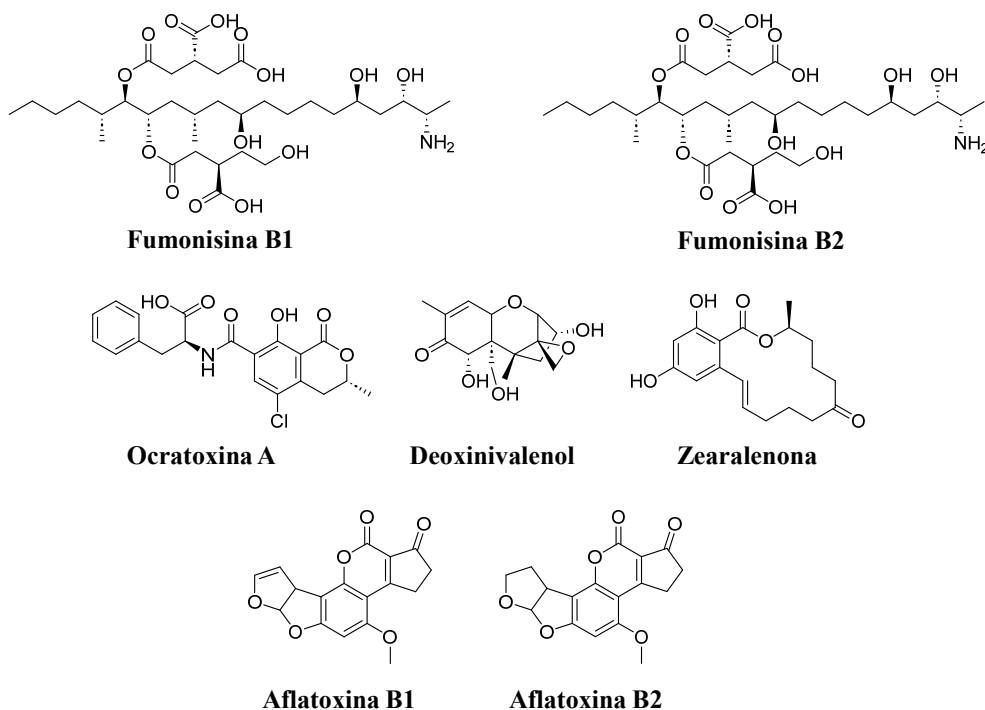


Figura 8. Estructuras químicas de algunas de las micotoxinas legisladas.

### Micotoxinas no legisladas

Algunas micotoxinas, a pesar de ser conocidas por su toxicidad, todavía no están sujetas a límites máximos específicos en la legislación actual. Ejemplos de estas incluyen el AOH y sus derivados, así como el TeA (Figura 9).<sup>68</sup> La falta de regulación específica no minimiza su potencial riesgo, y la monitorización de estas micotoxinas sigue siendo crucial para la seguridad alimentaria.

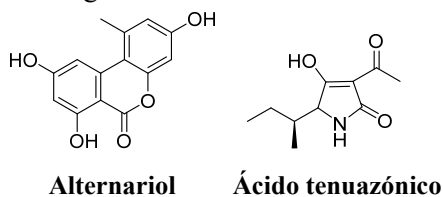


Figura 9. Estructuras químicas de algunas de las micotoxinas aún no legisladas.

#### 1.2.4. Métodos y tratamientos analíticos para su cuantificación

Los métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en alimentos han experimentado un notable desarrollo en los últimos años, motivados por la necesidad de detectar estas sustancias a niveles de concentración extremadamente bajos debido a sus implicaciones en la salud pública. Estos métodos comprenden una amplia variedad de técnicas, tanto cromatográficas como no cromatográficas, que ofrecen

## Introducción general

distintos grados de precisión, sensibilidad y especificidad. No obstante, antes de la etapa analítica, el tratamiento de las muestras es una fase crítica para garantizar la fiabilidad y exactitud de los resultados obtenidos.

Uno de los procedimientos más utilizados en la preparación de muestras es el método **QuEChERS** (del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), el cual ha ganado popularidad debido a su sencillez y eficiencia en la extracción de micotoxinas. QuEChERS consiste en una extracción inicial con disolventes orgánicos seguida de una limpieza rápida con sales. Esta técnica destaca por su bajo coste y facilidad de implementación, haciéndola ideal para el análisis de alimentos y otras matrices complejas.<sup>69</sup> A su vez, han surgido variantes como QuEChERS-SPE-DLLME(CCDn), que integra la extracción en fase sólida (**SPE**, del inglés *Solid Phase Extraction*) con adsorbentes y la microextracción en fase líquida dispersiva (**DLLME**, del inglés *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), optimizadas mediante diseños experimentales (CCDn, del inglés *Central Composite Design*) para mejorar la limpieza de la muestra y la preconcentración de los analitos. En la SPE, la muestra se pasa a través de un material sólido que adsorbe los compuestos de interés y luego los analitos se eluyen con un disolvente adecuado. La DLLME, por su parte, permite una separación eficaz de los analitos utilizando una fase dispersiva y una fase extractante.<sup>70</sup> Otro enfoque destacado es el QuEChERS-MISPE (del inglés *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*), que permite una mayor selectividad hacia micotoxinas específicas utilizando MIPs. Estos materiales ofrecen una extracción altamente selectiva.<sup>71</sup>

Adicionalmente, la extracción líquido-líquido **LLE**, del inglés *Liquid-Liquid Extraction*) y su combinación con la SPE en diferentes variantes han demostrado ser métodos efectivos para el aislamiento y purificación de micotoxinas en matrices alimentarias complejas. En el LLE, los analitos se transfieren de una fase líquida a otra mediante disolventes inmiscibles. La combinación LLE-SPE integra ambos métodos para mejorar la purificación y concentración de los analitos. Variantes adicionales incluyen LLE-SPE con carbón grafitizado (GCB, del inglés *Graphitized Carbon Black*), que mejora la adsorción de compuestos no polares y elimina interferencias, y LLE-SPE con intercambio iónico (SAX, del inglés *Strong Anion Xchanger*), que utiliza un material de intercambio aniónico basado en sales de amonio cuaternario para separar analitos basados en sus cargas iónicas.<sup>72,73</sup>

Otras técnicas, como el uso de la química covalente dinámica con hidrazina (DCHC, del inglés *Dynamic Covalent Hydrazine Chemistry*) y la cromatografía de permeación en gel (GPC, del inglés *Gel Permeation Chromatography*), se emplean para optimizar la purificación y separación de los analitos. La DCHC utiliza enlaces covalentes dinámicos con hidrazina para una extracción más selectiva y eficiente, mientras que la GPC separa los analitos según su tamaño molecular utilizando un gel poroso.<sup>74,75</sup>

Estos tratamientos de muestra resultan esenciales para eliminar interferencias y preconcentrar las micotoxinas, lo que permite obtener límites de detección más bajos y resultados analíticos más precisos. La combinación de métodos de preparación de muestras adecuados con técnicas analíticas avanzadas garantiza la fiabilidad en el análisis de micotoxinas. Más adelante, en la **Tabla 3** del capítulo 2, se presentan los trabajos más relevantes sobre el análisis de micotoxinas, con especial énfasis en las micotoxinas ZON, AOH y sus derivados, que constituyen el foco de esta tesis doctoral. Las técnicas analíticas empleadas se clasifican en dos categorías: cromatográficas y no cromatográficas.

### Técnicas analíticas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas son esenciales en el análisis de micotoxinas en alimentos debido a su capacidad para separar estos compuestos tóxicos con alta precisión y sensibilidad. Estas técnicas permiten evaluar la presencia de micotoxinas en matrices alimentarias complejas, siendo capaces de identificar y cuantificar los contaminantes a niveles de traza. En el ámbito industrial, las técnicas cromatográficas se han consolidado como las más utilizadas debido a su comprobada eficacia en la detección de micotoxinas, la alta resolución que ofrecen y su capacidad para manejar grandes volúmenes de muestras con precisión.

Con el fin de potenciar la eficacia del equipo, se utilizan detectores acoplados, diseñados con características específicas que enriquecen las capacidades avanzadas de la cromatografía, permitiendo una identificación y cuantificación precisa de micotoxinas.

La cromatografía líquida (LC) acoplada a la detección de **fluorescencia** (FLD, del inglés *Fluorescence Detector*) mide la fluorescencia de los analitos, siendo útil para compuestos que son intrínsecamente fluorescentes o que pueden ser modificados para emitir fluorescencia. Aunque esta técnica es relativamente económica y sencilla de usar, su aplicación está limitada a compuestos con propiedades fluorescentes, como la ZON y el AOH.<sup>76</sup> Por otro lado, la LC acoplada a **absorción UV-vis** (DAD, del inglés *Diode Array Detection*) se basa en la medida de la absorción de luz en la región ultravioleta-visible del espectro, siendo adecuada para compuestos que absorben en estas longitudes de onda. Aunque es una técnica económica y fácil de manejar, su sensibilidad y especificidad son menores en comparación con la espectrometría de masas y la fluorescencia. Muchas micotoxinas, como la Afla B1 y la OTA, presentan absorción en el UV.<sup>77</sup>

### Técnicas no cromatográficas

Los métodos no cromatográficos son cada vez más relevantes en la detección de micotoxinas, especialmente cuando se buscan análisis rápidos, portátiles y de bajo coste. Estos métodos permiten una evaluación eficiente y directa, lo que resulta

## Introducción general

fundamental en aplicaciones de control de calidad en tiempo real y análisis *in situ*. Entre los enfoques más destacados de esta tesis doctoral se encuentran los inmunoensayos y los biosensores. Estos dos métodos representan el núcleo de los avances en técnicas no cromatográficas.

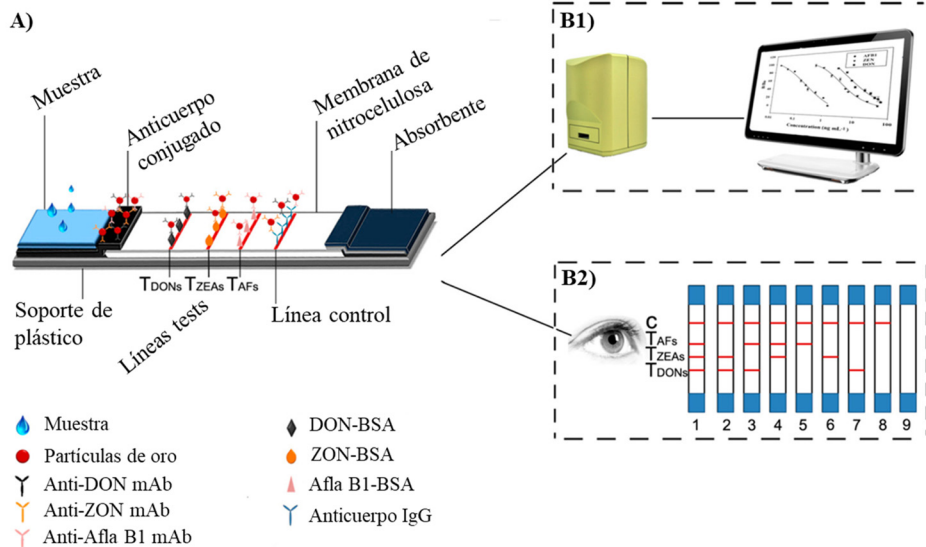
### Inmunoensayos

Los inmunoensayos son técnicas analíticas fundamentales para la detección de micotoxinas, basados en la alta especificidad de los anticuerpos que se unen selectivamente a estas toxinas, lo que facilita su identificación y cuantificación. Entre los inmunoensayos más comunes se encuentran el ELISA (en inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) y los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA, en inglés *Lateral Flow Immunoassay*), ambos susceptibles de ser adaptados para su correspondiente uso con MIPs en lugar de anticuerpos.

El **ELISA** comienza con la preparación de la muestra, donde se extraen las micotoxinas utilizando los disolventes adecuados. A continuación, se tapiza la placa con un anticuerpo específico que se une a la superficie del pocillo. Al añadir la muestra extraída, las micotoxinas presentes se unen al anticuerpo inmovilizado, formando un aducto. En la siguiente etapa, se incorpora un anticuerpo secundario marcado con una enzima, que se une a la micotoxina. Al añadir un sustrato específico, se produce una reacción que genera un cambio de color, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de micotoxina en la muestra. Finalmente, se mide la absorbancia en un lector de placas y se compara con una curva de calibrado para determinar la cantidad exacta de micotoxina.<sup>78</sup> Aunque el ELISA es reconocido por su alta sensibilidad, la matriz alimentaria puede causar interferencias, lo que requiere ajustes en el proceso de extracción y optimización del método. Además, los **FLIAs**, que utilizan fluorescencia para la detección, pueden ofrecer ventajas adicionales en términos de sensibilidad y rapidez. Estos aspectos se abordaron con mayor detalle en la sección dedicada a las aplicaciones de los MIPs de esta tesis doctoral.

Por otro lado, el **LFIA** se caracteriza por su simplicidad y portabilidad, siendo ideal para ensayos *in situ*.<sup>79</sup> La muestra, tras ser preparada, se aplica en un dispositivo que contiene una tira reactiva. Esta tira incluye un área de muestra y un área de captura donde se encuentran inmovilizados anticuerpos específicos para la micotoxina. A medida que la muestra fluye por capilaridad, si la micotoxina está presente, competirá con un conjugado de anticuerpo marcado que también se une a los mismos anticuerpos. Esto genera un aducto que se retiene en la zona de captura, produciendo una señal visual (como una línea de color) que indica la presencia de la micotoxina (**Figura 10**).<sup>80</sup> La intensidad de esta señal es proporcional a la concentración de la micotoxina en la muestra, permitiendo su cuantificación. Aunque el LFIA es accesible y no requiere equipos sofisticados, su sensibilidad suele ser menor que la del ELISA,

lo que puede limitar su eficacia en la detección de concentraciones muy bajas de micotoxinas.



**Figura 10.** A) Esquema del inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) múltiple para la detección simultánea de varias micotoxinas. B1) Plataforma de análisis semicuantitativo para LFIA. B2) Plataforma de análisis cualitativo para LFIA. Las tiras del 1 a 9 representan esquemáticamente los resultados de detección. Reproducido de la referencia [80] con permiso. Copyright 2014 American Chemical Society.

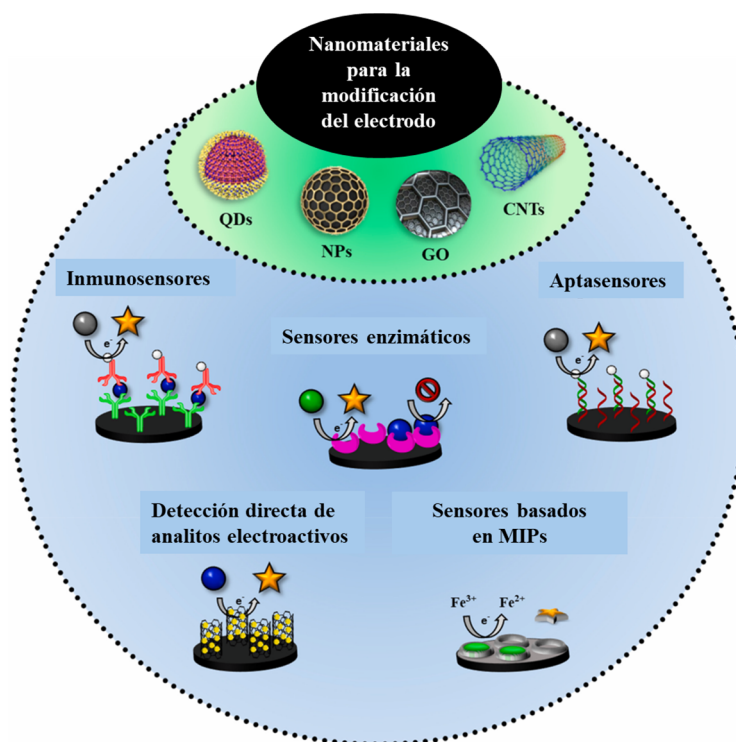
Los inmunoensayos son muy valorados por su gran sensibilidad en el seguimiento de la seguridad alimentaria. No obstante, el elevado coste de las biomoléculas utilizadas, los principios del bienestar animal, las exigentes condiciones de almacenamiento y la limitada disponibilidad de anticuerpos específicos han impulsado la búsqueda de alternativas más asequibles, como el uso de MIPs. Por ello, el desarrollo y la optimización de estos materiales siguen siendo áreas de investigación activa en el análisis de micotoxinas.

## Biosensores

Un **biosensor** es un sensor que incorpora un elemento biológico de reconocimiento, como enzimas, anticuerpos o aptámeros, o bien receptores biomiméticos, como los MIPs. Dependiendo del transductor utilizado para convertir la señal biológica en una señal detectable y cuantificable, los biosensores se pueden clasificar en dos tipos principales: electroquímicos y ópticos.<sup>81</sup>

### Biosensores electroquímicos

Este tipo de biosensores utiliza un transductor electroquímico para convertir la interacción entre el analito y el receptor en una señal eléctrica. En la **Figura 11** se presenta su clasificación según la clase de receptor empleado.

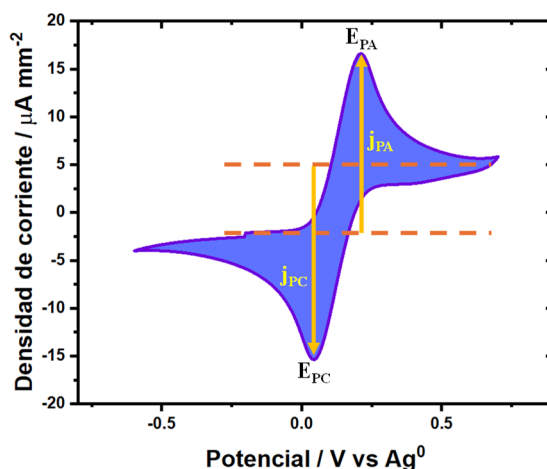


**Figura 11.** Tipos principales de biosensores para la detección electroquímica de micotoxinas basados en nanomateriales. Reproducido de la referencia [82] con permiso.

Los sensores electroquímicos basados en MIPs adoptan diversas modalidades de transducción,<sup>83-86</sup> tales como amperometría, voltamperometría, impedanciometría, conductividad, potenciometría y capacitancia.<sup>30</sup> Estos dispositivos suelen incorporar monómeros conductores en la estructura del MIP para facilitar la transmisión de la señal. La detección del analito puede realizarse mediante su unión directa o a través de ensayos no competitivos por desplazamiento. Para lograr una transducción eficiente, el receptor MIP debe estar cercano a la superficie del transductor, lo cual se consigue mediante electropolimerización directa o aplicando un recubrimiento de polímero preformado. En el campo del análisis de alimentos, la mayoría de los estudios con sensores MIP se orientan a la detección de moléculas pequeñas, mientras que solo una minoría se enfoca en biomoléculas de mayor tamaño.<sup>87,88</sup> A continuación, se explican dos de las modalidades de transducción más utilizadas.

La *voltamperometría* mide la densidad de corriente producida por un barrido de potencial aplicado a una combinación de tres celdas electrolíticas presentes en una disolución. Se varía el potencial aplicado al electrodo y se mide la respuesta de corriente resultante, la cual se puede utilizar para cuantificar la concentración del analito objetivo, que suele ser proporcional a la cantidad de analito presente. Estos biosensores ofrecen ventajas como alta sensibilidad, respuesta rápida y la capacidad de detectar múltiples analitos simultáneamente. El barrido de potencial puede ser

generado mediante voltamperometría de barrido lineal (LSV, del inglés *Linear Sweep Voltammetry*), voltamperometría cíclica (CV, del inglés *Cyclic Voltammetry*), voltamperometría de pulso diferencial (DPV, del inglés *Differential Pulse Voltammetry*) o voltamperometría de onda cuadrada (SWV, del inglés *Square Wave Voltammetry*). En particular, la voltamperometría cíclica es de gran interés, ya que permite identificar los picos de corriente correspondientes a los procesos de oxidación y reducción del analito (**Figura 12**). Ya en 2016, B. Zhou *et al.*<sup>89</sup> presentaron un sensor basado en MIPs para detectar ZON, aprovechando el efecto sinérgico de nanocintas de grafeno reducido (rGNRs) y nanopartículas de oro (AuNPs) sobre un electrodo de carbono vitrificado (GCE, del inglés *Glassy Carbon Electrode*). El sensor se caracterizó a través de CV y DPV y se investigaron las condiciones de electrodeposición y adsorción de ZON. Los resultados mostraron que el sensor presentaba un amplio rango lineal ( $1 - 500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y un límite de detección de  $0.34 \text{ ng mL}^{-1}$ , además de ser de bajo coste, selectivo y estable, lo que resalta su gran potencial para la detección precisa de ZON en alimentos.



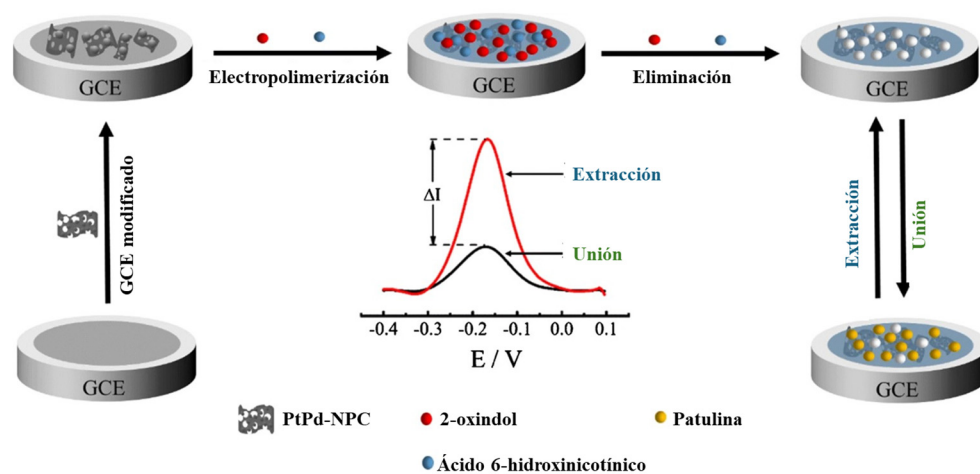
**Figura 12.** Voltamperograma cíclico típico en el que  $j_{PC}$  y  $j_{PA}$  representan las densidades de corriente catódica y anódica máximas, respectivamente, para una reacción redox reversible.  $E_{PA}$  y  $E_{PC}$  indican los potenciales de los picos correspondientes frente a la referencia de  $\text{Ag}^0$ .

La *impedanciometría* mide la impedancia en la interfaz entre el electrodo y el electrolito al aplicar una corriente alterna. Así, Hasim Munawar *et al.*<sup>90</sup> han desarrollado un sensor selectivo a FB1 usando un electrodo de Pt recubierto con un composite conductor de polipirrol y porfirina de zinc, sobre el cual acoplaron covalentemente nanoMIPs. Este sensor mostró una sensibilidad notable y un bajo límite de detección ( $2 \times 10^{-5}$  y  $7 \times 10^{-4} \text{ ng mL}^{-1}$ ), sin respuesta cruzada a otras micotoxinas.

En general, los biosensores electroquímicos son fáciles de fabricar y miniaturizar, lo que los hace rentables y les otorga ventajas como alta selectividad y sensibilidad. Para potenciar aún más estas cualidades, diversos estudios han explorado estrategias

## Introducción general

innovadoras de diseño. Un ejemplo destacado es el uso de un electrodo recubierto con carbono poroso dopado con nitrógeno para incrementar la conductividad del material. Este electrodo es adicionalmente modificado con nanopartículas de PtPd que actúan como catalizadores para amplificar la señal electroquímica. Sobre el electrodo modificado, se sintetiza un MIP selectivo para la patulina, empleando dos moléculas plantillas que imitan las características del analito de interés. Según el estudio, el uso de plantillas duales mejora la selectividad del MIP al permitir que las cavidades del polímero reproduzcan mejor tanto las características estructurales como funcionales de la patulina, optimizando así la detección incluso a bajas concentraciones. Una vez sintetizado, el MIP se enfrenta al analito en presencia de una sonda redox,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , dado que la patulina no es electroactiva. Se mide la variación en la corriente eléctrica durante la reacción redox en la superficie del electrodo. La señal de corriente decrece a mayores concentraciones de patulina, lo que permite cuantificar la cantidad del analito presente (**Figura 13**). Aunque el sensor no detectó patulina en muestras de zumo, el método logró recuperaciones superiores al 94% en muestras contaminadas.<sup>91</sup>



**Figura 13.** Esquema del proceso de fabricación y funcionamiento del sensor MIP/PtPd-NPC/GCE. Reproducido de referencia [91] con permiso de referencia.

## Biosensores ópticos

Los biosensores ópticos emplean un transductor óptico para detectar variaciones en distintas propiedades que tienen lugar cuando el analito interactúa con el receptor biológico o biomimético. Esta interacción puede alterar parámetros ópticos, como la intensidad o el ángulo de la luz reflejada o emitida, permitiendo así la cuantificación precisa del analito en la muestra.

Según el tipo de transductor, estos sensores se clasifican en sensores de luminiscencia, de absorción, Raman o de reflectancia. A continuación, se describen brevemente los

diferentes tipos de sensores de luminiscencia, los cuales se han utilizado frecuentemente para la cuantificación de micotoxinas debido a su rapidez y sensibilidad en la medida y tienen una estrecha relación con el enfoque de esta tesis doctoral.

- Quimioluminiscencia (QL)

Emisión de luz como resultado de una **reacción química**, sin necesidad de una fuente externa de luz para la excitación; la energía proviene directamente de la reacción química que ocurre en el sistema.

- Electroquimioluminiscencia (ECL)

La luz se genera por una **reacción electroquímica**. En este proceso, se aplica un potencial eléctrico a un sistema que contiene compuestos quimioluminiscentes.

- Bioluminiscencia

Emitida por organismos vivos, como luciérnagas y ciertos tipos de medusas, la luz se genera a través de una **reacción enzimática** que involucra luciferinas y luciferasas.

- Fosforescencia

Emisión de luz que persiste durante un periodo prolongado después de la excitación, debido a la existencia de electrones en estados excitados de larga vida (tripletes) antes de su vuelta al estado fundamental con emisión de un fotón.

- Fluorescencia

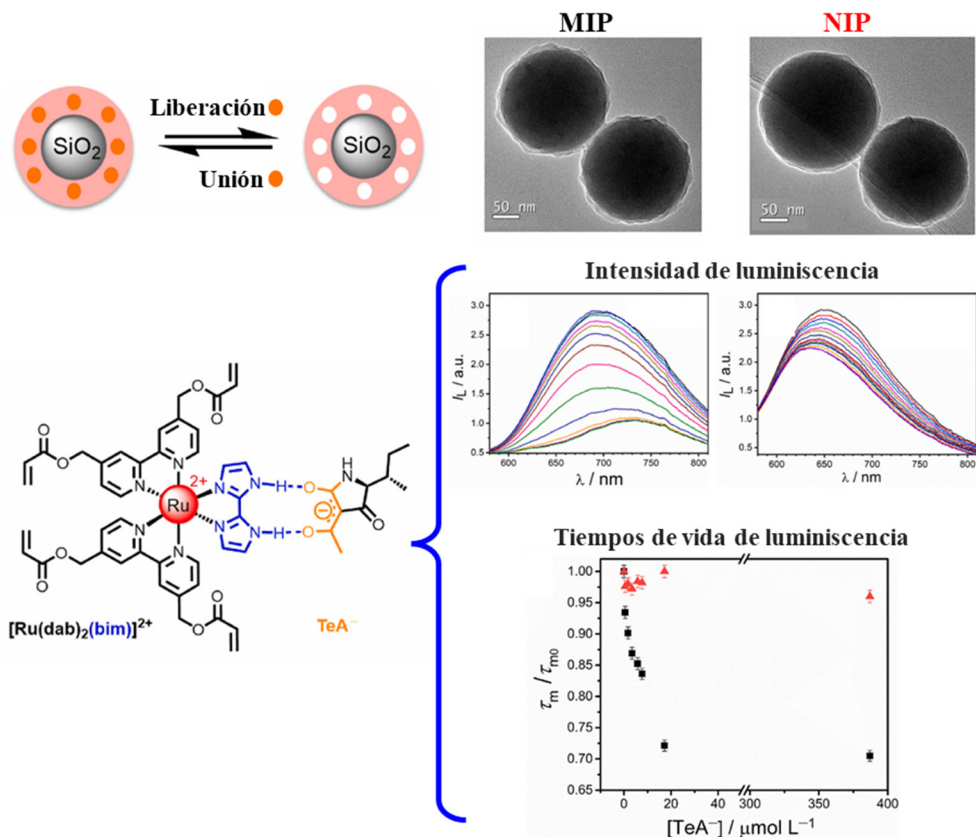
La luz se emite inmediatamente después de la excitación, con un corto tiempo de vida. Los electrones regresan rápidamente al estado fundamental, liberando energía en forma de luz.

Estas técnicas son fundamentales para la cuantificación de micotoxinas, proporcionando herramientas avanzadas y sensibles para la monitorización y evaluación de estos contaminantes en diversos entornos.

En un trabajo reciente, se ha desarrollado un sensor óptico biomimético que emplea nanopartículas de sílice recubiertas con una capa nanométrica de MIP luminiscente.<sup>24</sup> Esta capa polimérica, de aproximadamente 10 nm de grosor, permite la detección rápida del ácido tenuazónico (TeA) en menos de 5 s. El principio de funcionamiento del sensor se basa en la interacción entre el analito y un complejo de coordinación luminiscente de rutenio(II) trifuncional, el cual está covalentemente anclado en la matriz polimérica. Específicamente, dicha interacción ocurre entre los N-H del ligando bimidazol y el anión 1,3-dicetonato del TeA, lo que induce modificaciones tanto en la intensidad como en el tiempo de vida de la luminiscencia del complejo. Estos cambios generan una señal óptica clara y fácilmente detectable (**Figura 14**). Este innovador enfoque no solo garantiza una elevada selectividad hacia el ácido

## Introducción general

tenuazónico, sino que también permite una cuantificación precisa en tiempo real, representando un avance notable en la detección de micotoxinas debido a la posibilidad real de utilizar el tiempo de vida de emisión como señal analítica, con las ventajas que ello representa al tratarse de una magnitud intensiva y no extensiva (como la intensidad de emisión).



**Figura 14.** Esquema que representa la morfología (arriba) y las propiedades luminiscentes (abajo) de las nano-capas MIP y NIP, así como la interacción del monómero funcional incorporado en la red polimérica con el TeA añadido, incluyendo la intensidad de luminiscencia y los tiempos de vida de emisión. Reproducido de la referencia [24] con permiso.

## **CAPÍTULO 2**



## Capítulo 2. Síntesis de MIPs en distintos formatos y su aplicación

- *Determinación simultánea de ZON y AOH en muestras de aceite mediante partículas mixtas de MIP*

### 2.1. Introducción

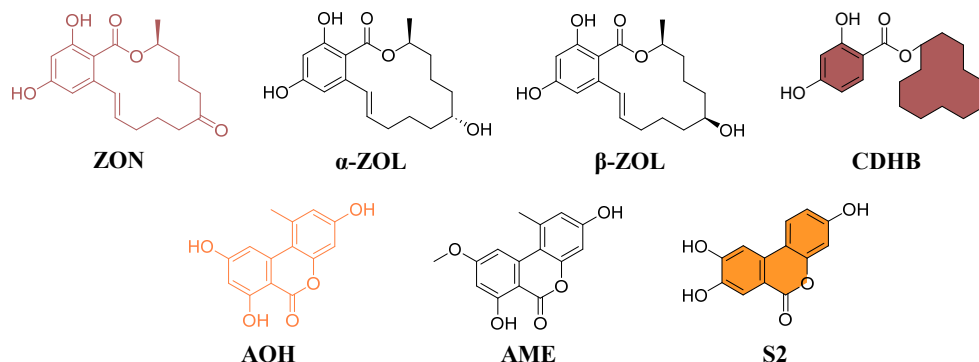
Como se detalla en el capítulo 1, debido a la fuerte sinergia entre las micotoxinas presentes en los alimentos, es fundamental contar con técnicas que permitan su detección y cuantificación simultánea, manteniendo una vigilancia constante para identificar posibles micotoxinas emergentes. La zearalenona (ZON) y el alternariol (AOH) son dos ejemplos: mientras que existe abundante información sobre los efectos de la ZON en la salud humana y animal, así como sobre sus límites máximos residuales en una amplia variedad de alimentos, el AOH ha comenzado a recibir mayor atención debido a su creciente aparición en diversas muestras alimentarias. Aunque todavía no ha sido legislado como una micotoxina regulada, la investigación sobre los efectos perjudiciales del AOH está avanzando rápidamente.

Además de las micotoxinas principales, como la ZON y el AOH, resulta crucial poder cuantificar sus metabolitos, tales como el  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL), el  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL) y el alternariol monometil éter (AME), ya que su rápido metabolismo en el organismo puede contribuir significativamente a la toxicidad general (**Figura 15**). Ambas micotoxinas coexisten frecuentemente en alimentos como cereales y aceites vegetales, los cuales constituyen una parte fundamental de la dieta humana. Estos aceites, especialmente vulnerables a la contaminación por hongos, han mostrado presencia de ZON y AOH en estudios previos realizados en aceites de girasol, colza, oliva, sésamo y maíz.<sup>92-96</sup> Debido a que las micotoxinas suelen encontrarse en niveles muy bajos y en matrices complejas, resulta indispensable desarrollar métodos analíticos rápidos y fiables que permitan su detección y cuantificación simultánea de manera eficiente. La **Tabla 3** resume varios métodos cromatográficos utilizados en estudios previos para la cuantificación de estas micotoxinas y algunos de sus derivados.

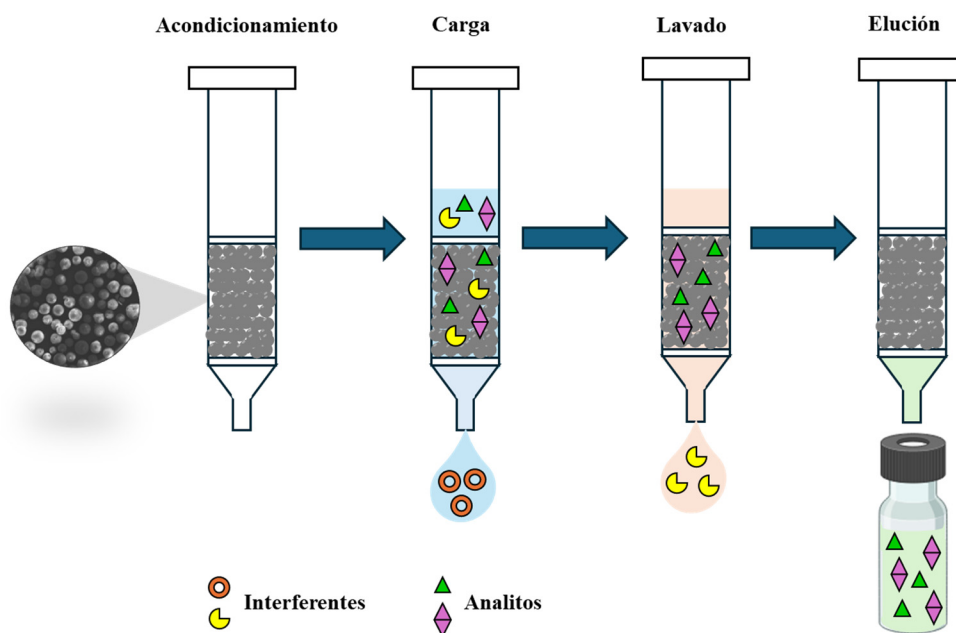
La síntesis de MIPs capaces de reconocer ZON y AOH se ha descrito previamente por nuestro grupo y otros (**Tabla 4**).<sup>71,97-102</sup> Sin embargo, hasta donde sabemos, no se han realizado intentos para llevar a cabo la extracción simultánea de micotoxinas con estructuras químicas muy diferentes en términos de tamaño, forma y funcionalidad utilizando MIPs.<sup>103</sup> Hasta la fecha, se han reportado dos enfoques alternativos para aplicar estos polímeros a la extracción selectiva de más de una molécula objetivo: a) mezclar MIPs individuales selectivos para cada analito, o b) utilizar dos o más plantillas para la preparación del MIP.<sup>91,104</sup> El primer enfoque tiene la ventaja de que el número de cavidades de unión específicas es mayor en comparación con los MIPs

## Determinación simultánea de ZON y AOH en muestras de aceite

de plantilla múltiple, los cuales presentan una mayor heterogeneidad en los sitios de unión.<sup>104–106</sup> No obstante, las condiciones de extracción por SPE deben optimizarse cuidadosamente para mejorar el reconocimiento selectivo de los diferentes analitos de interés en los cartuchos empacutados con MIPs, especialmente cuando éstos presentan propiedades químicas diferentes.



**Figura 15.** Estructuras moleculares de zearalenona (ZON) y sus derivados  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL) y  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL), junto con el alternariol (AOH) y su derivado el alternariol monometil éter (AME). Las estructuras con los anillos coloreados representan las moléculas plantilla utilizadas en cada caso: 2,4-dihidroxibenzoato de ciclododecilo (CDHB) y 3,8,9-trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S2).



**Figura 16.** Procedimiento de extracción en fase sólida empleando un MIP como adsorbente (MISPE). En un cartucho con el MIP empacutado se realizan los siguientes procedimientos: 1) acondicionamiento; 2) carga de la muestra; 3) lavado para eliminar interferentes retenidos en el MIP de manera no selectiva; 4) elución del analito retenido selectivamente y, finalmente, se regenera el cartucho para volverlo a usar.

Los MIPs se utilizan comúnmente en cartuchos para la extracción en fase sólida con impronta molecular (MISPE), donde capturan y preconcentran selectivamente los analitos antes de la elución en un volumen menor (**Figura 16**).<sup>107</sup> La técnica MISPE facilita la limpieza de las muestras y la preconcentración de los analitos objetivo, mejorando así la cuantificación en matrices complejas.<sup>96,99,108</sup> Varias empresas producen ahora cartuchos en cantidades industriales, aunque suelen ser selectivos para una sola micotoxina o para una familia de micotoxinas estructuralmente relacionadas.<sup>98,99</sup>

**Tabla 3.** Métodos cromatográficos descritos en bibliografía para la determinación de ZON, AOH y sus derivados.

Micotoxinas	Técnica	Muestra	Extracción	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSDr (%)	Ref
AOH, AME, TeA y otros derivados	HPLC-MS/MS	Productos de tomate, aceites vegetales, productos de panadería, zumos y semillas de girasol	LLE	AOH: 0.2 – 2.8 AME: 0.04 – 0.4 TeA: 3.6 – 34	AOH: 0.6 – 9.3 AME: 0.1 – 1.2 TeA: 12-110	AOH: 7.5 – 13 AME: 9 – 17 TeA: 3.2 – 9	93
AOH, AME, TeA y otros derivados	LC-MS/MS	Salsa de tomate, aceite de girasol y harina de trigo	LLE	AOH: 0.1 – 0.6 AME: 0.03 – 0.05 TeA: 6 – 7	AOH: 0.2 – 1.2 AME: 0.06 – 0.1 TeA: 8 – 14	AOH: 3 – 35 AME: 3 – 20 TeA: 5 – 22	94
ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL, AOH, AME y otros	UHPLC-MS/MS	Papilla de trigo, pipas de girasol, pimentón, pimienta negra y manzana	QuEChERS	NR	20 – 480	1 – 5	109
ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL, AOH, AME y otros	UHPLC-MS/MS	Frutos secos	LLE	NR	ZON: 2.2 – 6.1 $\alpha$ -ZOL: 14 – 18 $\beta$ -ZOL: 15 – 16 AOH: 3 – 9.6 AME: 0.8 – 2.9	ZON: 2 – 7 $\alpha$ -ZOL: 2 – 12 $\beta$ -ZOL: 2 – 8 AOH: 1 – 7 AME: 1 – 7	110
ZON	HPLC-FLD	Aceite de colza y de maíz	GPC	10	20	2.8 – 3.1	111
ZON y extractos ZON	HPLC-FLD y HPLC-MS/MS	Aceite de maíz	DCHC	10 <sup>a</sup> y 5 <sup>b</sup>	30 <sup>a</sup> y 15 <sup>b</sup>	1.4 <sup>a</sup> y 9.7 <sup>b</sup>	74

Tabla 3. Continuación.

Micotoxinas	Técnica	Muestra	Extracción	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSDr (%)	Ref
ZON	HPLC-FLD	Cerveza	MISPE en línea	1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	5.4 <sup>c</sup> and 2.5 <sup>d</sup>	108
ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL, AOH, AME y otros	UHPLC-MS/MS	Temeros y ensilado de maíz	QuEChERS	NR	ZON: 0.5 $\alpha$ -ZOL: 1-2.5 $\beta$ -ZOL: 2.5 AOH: 1-5 AME: 0.5-2.5	ZON: 3.1-3.2 $\alpha$ -ZOL: 2.5-3.8 $\beta$ -ZOL: 2.8-4.1 AOH: 1.8-2 AME: 1.9-4.9	112
AOH, AME, TeA y otros	HPLC-MS/MS	Cereales, productos derivados del tomate y semillas de girasol	LLE-SPE (pre- concentración)	AOH: 2-3 AME: 0.2-0.4 TeA: 1-2	AOH: 7-11 AME: 0.8-1 TeA: 5-8	AOH: 9-14 AME: 7-11 TeA: 3-12	99
ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL y otros	GC-MS	Aceites vegetales: maíz, cacahuete, colza, soja y girasol	GPC	ZON: 0.06 $\alpha$ -ZOL: 0.03 $\beta$ -ZOL: 0.01	ZON: 1.1 $\alpha$ -ZOL: 0.1 $\beta$ -ZOL: 0.03	ZON: 6.3 $\alpha$ -ZOL: 7.7 $\beta$ -ZOL: 5.9	95
ZON, AOH y otros	UHPLC- Orbitrap MS	Cebada checa	QuEChERS	NR	NR	ZON: 8.3 AOH: 7.7	113
ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL y otros	HPLC-MS/MS y ELISA	Maíz molido	LLE-SPE (GCB)	ZON: 3 <sup>b</sup> y 18.5 <sup>c</sup> $\alpha$ -ZOL: 5 $\beta$ -ZOL: 3	NR	ZON: 7 $\alpha$ -ZOL: 10 $\beta$ -ZOL: 5	72
ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL, AOH, AME y otros	HPLC-MS/MS	Granos de maíz	LLE	ZON: 0.3 $\alpha$ -ZOL: 0.8 $\beta$ -ZOL: 0.8 AOH: 0.6 AME: 0.05	NR	NR	114

Tabla 3. Continuación.

Micotoxinas	Técnica	Muestra	Extracción	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSDr (%)	Ref
ZON, AOH, AME y otros	HPLC-MS/MS	Maíz molido	LLE	ZON: 0.15 AOH: 1 AME: 1	ZON: 0.5 AOH: 5 AME: 5	ZON: 6.9 AOH: 5.6 AME: 9.0	115
ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL, AOH, AME y otros	HPLC-MS/MS	Maíz y piensos	LLE	ZON: 0.46 - 0.64 $\alpha$ -ZOL: 1.3 $\beta$ -ZOL: 1.2 AOH: 0.15 - 0.4 AME: 0.16 - 1.2	ZON: 1.5 - 2.1 $\alpha$ -ZOL: 4.5 $\beta$ -ZOL: 3.5 AOH: 0.5 - 1.4 AME: 0.54 - 3.8	NR	116
ZON	HPLC-FLD	Aceite de maíz	DCHC	10	30	4	117
ZON	HPLC-FLD	Germen de maíz, aceite de maíz refinado y margarina	LLE- SPE(SAX)	10	15	< 13.1	73
ZON y otros	HPLC-FLD	Cereales, judías y aceites (aceite de maíz)	QuEChERS-SPE(HLB)-DLLME(CCDn)	0.03 - 11 ZON: 11 (aceite de maíz)	0.1 - 38 ZON: 38 (aceite de maíz)	< 8.13	70

Tabla 3. Continuación.

Micotoxinas	Técnica	Muestra	Extracción	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSDr (%)	Ref
ZON, FBI y OTA	UPLC-MS/MS	Aceites: maíz, colza y soja	LLE-MSPE (pre-concentración)	1.03	NR	< 5.7	96
AOH y AME	UPLC-MS/MS	Zumo de tomate y aceite de sésamo	QuEChERS-MISPE (pre-concentración)	AOH: 0.52 – 1.26 AME: 0.31 – 1.38	AOH: 1.03 – 2.52 AME: 0.63 – 2.77	AOH: 5 – 9 AME: 1 – 14	71

<sup>a</sup> Medido por el método HPLC-FLD; <sup>b</sup> Medido por el método HPLC-MS/MS; <sup>c</sup> Usando adsorbente C18; <sup>d</sup> Usando adsorbente MIP; <sup>e</sup> Medido por el método ELISA; 1-ALPP: 1-alilpiperazina; ACN: acetonitrilo; AOH: alternariol; AME: alternariol monometil éter; CCDn: diseño compuesto central; CV: voltamograma cíclico; DAD: detección por arreglo de diodos; DCHC: química de hidrazina covalente dinámica; DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva; DMSO: dimetilsulfoxido; EAMA: *N*-(2-aminoetil)metacrilamida clorhidrato; EDMA: dimetacrilato de etilenglicol; ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; FBI: fumonisina B1; FLD: detector de fluorescencia; GC: cromatografía de gases; GCB: negro de carbono grafitizado; HLB: balance hidrofílico-lipofílico; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; LOD: límite de detección; LC: cromatografía líquida; LLE: extracción líquido-líquido; MAA: ácido metacrílico; MAM: metacrilamida; MeOH: metanol; MS/MS: espectrometría de masas en tándem; MSPE: extracción en fase sólida magnética; OTA: ocratoxina A; PPy: polipirrol; QuEChERS: rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro; SAX: intercambio aniónico fuerte; SPE: extracción en fase sólida; SWR: voltamograma de onda cuadrada; SPR: resonancia de plasmones de superficie; TeA: ácido tenuazónico; UHPLC: cromatografía líquida de ultra alto rendimiento; UPLC: cromatografía líquida de ultra rendimiento; ZON: zearalenona;  $\alpha$ -ZOL:  $\alpha$ -zearaleno;  $\beta$ -ZOL:  $\beta$ -zearaleno;  $\alpha$ -ZAL:  $\alpha$ -zearalano;  $\beta$ -ZAL:  $\beta$ -zearalano

Tabla 4. Comparación de los diferentes tipos de polimerización para la preparación de MIPs selectivos a AOH y ZON.

Plantilla	Monómero funcional / entrecruzante	Porógeno	Iniciador	Polimerización	Detección	Muestra	Molécula(s) objetivo	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ref.
S2	EAMA+MAM /EDMA	DMSO /ACN	ABDV	Partículas esféricas	HPLC-FLD	Tomate	AOH, AME	NR	97
S2	4-VP +MAM /EDMA	ACN	ABDV	Partículas esféricas	HPLC-MS/MS	Tomate, aceite de sésamo	AOH, AME	AOH: 0.52 – 1.26 AME: 0.31 – 1.38	71
CDHB	1-ALPP /TRIM	ACN	AIBN	Bloque	HPLC-FLD	NR	ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL, $\beta$ -ZAL	NR	100
CDHB	1-ALPP /TRIM	ACN	AIBN	Bloque	HPLC-FLD	Cereales, pienso para cerdos	ZON, $\alpha$ -ZOL	ZON: 1.7 – 2.4 $\alpha$ -ZOL: 0.7 – 1.3	118
CDHB	2-DAEM /EDMA	Tolueno	V-40	Minisuspensión	HPLC-DAD	NR	ZON	NR	119
QUE	4-VP /EDMA	Ftalato de dibutilo	NR	Bloque	HPLC-MS/MS	Harina de cereales	ZON, $\alpha$ -ZOL, $\beta$ -ZOL, $\beta$ -ZAL, DAI,	ZON: 0.044	120

Tabla 4. Continuación.

Monómero funcional / entrecruzante	Porógeno	Iniciador	Polimerización	Detección	Muestra	Molécula(s) objetivo	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ref.
4-VP+MAA /EDMA	DMSO	AIBN	Precipitación	HPLC-DAD	Trigo, maíz	ZON	240	121
CCA	MeOH	NR	Electropolimerización	CV y SWV	Cultivo, arroz, cervezas	ZON	$1 \times 10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$	122
ZON PPy	ACN	NR	Electropolimerización	SPR	Maíz	ZON	0.3	123

1-ALPP: 1-alilpiperazina; ACN: acetonitrilo; AOH: alternariol; AME: alternariol monometil éter; ABDV: 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo); AIBN: azobisisobutironitrilo; CCA: ácido cumarina-3-carboxílico; CDHB: ciclohexil 2,4-dihidroxibenzoato; CV: voltamperograma cíclico; 2-DAEM: 2-(dimetilaminoetil)-metacrilato; DAD: detección por arreglo de diodos; DAI: daidzeína; DMSO: dimetilsulfóxido; EAMA: N-(2-aminoetil)metacrilamida clorhidrato; EDMA: dimetacrilato de etilenglicol; FLD: detector de fluorescencia; GEN: genisteína; HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento; LOD: límite de detección; MAA: ácido metacrílico; MAM: metacrilamida; MeOH: metanol; MS/MS: espectrometría de masas en tándem; NR: no reportado; PPy: polipirrol; QUE: quercetina; S2: 3,8,9-trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona; SWR: voltamperograma de onda cuadrada; SPR: resonancia de plasmones de superficie; TRIM: trimetilpropano trimetacrilato; V-40: 1,1'-Azobis(ciclohexano-1-carbonitrilo); 4-VP: 4-vinilpiridina; ZON: zeaxalenona;  $\alpha$ -ZOL:  $\alpha$ -zeaxalenol;  $\beta$ -ZOL:  $\beta$ -zeaxalenol;  $\alpha$ -ZAL:  $\alpha$ -zeaxalanol;  $\beta$ -ZAL:  $\beta$ -zeaxalanol.

## **2.2. Objetivos**

Los objetivos principales de este trabajo están orientados al desarrollo de un método efectivo basado en MIPs para la extracción en fase sólida, que permita la medida simultánea de las micotoxinas ZON y AOH en aceites vegetales, con el fin de demostrar su aplicabilidad en matrices complejas y mejorar la capacidad de detección y cuantificación de estas micotoxinas en productos alimentarios. A continuación, se detallan los objetivos específicos de este capítulo:

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas del MIP diseñado para ZON y AOH, con el fin de asegurar su capacidad de reconocimiento selectivo y eficacia en la extracción de ambas micotoxinas.
- Aplicar herramientas quimiométricas para optimizar las condiciones del proceso MISPE mediante el uso de MIPs, buscando maximizar la recuperación y selectividad de AOH y ZON en aceites vegetales.
- Validar el procedimiento MISPE optimizado, evaluando parámetros como la capacidad de extracción, reproducibilidad, precisión y selectividad, con el objetivo de asegurar la eficiencia del método en la extracción simultánea de ambas micotoxinas.
- Aplicar el método desarrollado para el análisis de muestras reales de aceites vegetales contaminados con AOH y ZON, verificando la aplicabilidad y robustez del procedimiento en matrices complejas de alimentos.

## **2.3. Parte experimental**

### **2.3.1. Reactivos y materiales**

El metanol (MeOH) y el acetonitrilo (ACN) de grado HPLC fueron adquiridos a Fisher (Waltham, MA, EE.UU.), mientras que el dimetilsulfóxido (DMSO) de grado HPLC fue suministrado por VWR (West Chester, PA, EE.UU.). El ácido trifluoroacético (TFA) fue suministrado por Fluorochem (Glossop, Reino Unido), y tanto el hidrógenodifluoruro de amonio como el fosfato disódico anhidro fueron adquiridos a Fisher. Por su parte, el fosfato monosódico y el hidróxido de tetrabutilamonio en metanol (TBAOH) provinieron de Merck (Darmstadt, Alemania). Merck también suministró el clorhidrato del metacrilato *N*-(2-aminoetil), la metacrilamida (MAM, 98%) y el dimetacrilato de etilenglicol (EDMA, 98%). La *N*-(2-aminoetil) metacrilamida (EAMA, 98%) en forma de clorhidrato, se adquirió a Polysciences (Washington, PA, EE.UU.). Este clorhidrato se neutralizó con una cantidad estequiométrica de TBAOH en MeOH, tras lo cual se eliminó el disolvente mediante rotaevaporación y el sólido resultante se disolvió en DMSO anhidro, previamente purgado con argón. Cuando fue necesario, los monómeros se purificaron mediante cromatografía justo antes de su uso, utilizando una columna para eliminación de inhibidores de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). El iniciador 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (ABDV) se adquirió a Wako (Neuss, Alemania) y se recristalizó en metanol antes de su uso. Alternariol monometil éter (AME),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZON),  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL), resorcinol (RES) y ocratoxina A (OTA) se compraron a Merck. El alternariol (AOH) fue suministrado por Apollo Scientific (Bredbury, Cheshire, Reino Unido) y la zearalenona (ZON) por ABCR (Karlsruhe, Alemania). El agua se purificó utilizando un sistema Milli-Q Direct Q-3UV (Merck-Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Las moléculas plantilla, 3,8,9-trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S2) y 2,4-dihidroxibenzoato de ciclododecilo (CDHB), se sintetizaron en el laboratorio siguiendo protocolos previamente optimizados.<sup>118,124</sup>

### **2.3.2. Equipos y condiciones de medida**

El pH de las disoluciones tampón se ajustó utilizando un medidor de pH GLP 22 (Crison; Barcelona, España). El sistema cromatográfico utilizó un cromatógrafo de alta resolución HP1100 (Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una bomba cuaternaria, desgasificador en línea, auto muestreador, inyector automático, termostato para columna y un detector de fluorescencia (FLD). La separación cromatográfica se realizó en una columna Agilent ZORBAX SB-C18 HPLC (150 mm  $\times$  4.6 mm; 3.5  $\mu$ m) con una elución en gradiente utilizando agua + 0.1% TFA (A) y MeOH + 0.1% TFA (B). Las condiciones iniciales fueron 60% de B durante 4 min, seguidas de un gradiente lineal hasta el 68% de B a los 6 min, con una fase isocrática de 5 min al 68% de B, y finalmente 5 min en las condiciones iniciales para la reequilibración. La velocidad de flujo fue de 0.8 mL min<sup>-1</sup>, y la

temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. Antes del análisis, se mezclaron 100 µL de muestra con 100 µL de agua. El volumen inyectado fue de 100 µL. En estas condiciones, el AOH se eluye a los 6.5 min y la ZON a los 11.2 min. Las longitudes de onda de medida en el detector FLD fueron: 1) de 0 a 7 min,  $\lambda_{exc} = 255$  nm,  $\lambda_{em} = 404$  nm; y 2) de 7 a 15 min,  $\lambda_{exc} = 282$  nm,  $\lambda_{em} = 450$  nm. Se obtuvieron curvas de calibrado lineales para AOH y ZON en el rango de 25 a 600 µg L<sup>-1</sup> ( $r^2 \geq 0.99$ ). Se acopló un detector de matriz de diodos (DAD) al instrumento HPLC-FLD para estudiar las potenciales interferencias. Se monitoreó el resorcinol a  $\lambda_{abs} = 210$  nm, el ácido tenuazónico a  $\lambda_{abs} = 280$  nm, y la ocratoxina A con  $\lambda_{ex} = 330$  nm y  $\lambda_{em} = 460$  nm.

Las isotermas de desorción de nitrógeno a 77 K se midieron con un instrumento ASAP 2020 (Micromeritics, Norcross, GA, EE.UU.). Las muestras se desgasificaron a 50 °C durante 2 h antes de las medidas. El área BET ( $S_{BET}$ ), el área superficial externa ( $S_t$ ), y la distribución del tamaño de poros de los polímeros se calcularon como se describió en la sección 1.1.4.<sup>101</sup> Las muestras de polímero se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio electrónico JEOL-6400 operando a 20 kV y un microscopio JEOL JSM 6355F con pistola de emisión de campo (FEG) operando a 15 kV (Centro Nacional de Microscopía Electrónica en la UCM). Las muestras para SEM se recubrieron con una fina capa de oro antes de la observación. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se registraron en un espectrómetro Bruker Avance DPX500 operando a 500 MHz (Centros de Asistencia a la Investigación de la UCM). Los espectros FT-IR se obtuvieron con un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier Tensor 27 (Bruker, Billerica, MA, EE.UU.) equipado con un detector DLATGS (Microwatt, Stuart, FL, EE.UU.).

### **2.3.3. Polimerización en partículas de sílice**

Los polímeros se sintetizaron utilizando *N*-(2-aminoetil) metacrilamida (EAMA) como monómero funcional, metacrilamida como co-monómero y dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) como agente entrecruzante, junto con esferas de sílice como esqueleto sacrificable para la polimerización.<sup>125</sup> Se utilizaron dos compuestos sintéticos, 3,8,9-trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S2) y 2,4-dihidroxibenzoato de ciclododecilo (CDHB), que exhibían similitudes estructurales con AOH y ZON, respectivamente, en cuanto a tamaño, funcionalidad y forma, como sustitutos de las correspondientes moléculas plantilla para las síntesis de los MIPs. Antes de la síntesis de éstos, se neutralizó el clorhidrato de *N*-(2-aminoetil) metacrilamida (EAMA) añadiendo TBAOH en una proporción 1:1 para obtener el monómero funcional básico. Para ello, se eliminó el disolvente de la disolución comercial de 1 mol L<sup>-1</sup> de TBAOH en metanol mediante rotaevaporación, y el residuo sólido se disolvió en DMSO anhidro. Se utilizaron microesferas de sílice (SilicaSphere™ PC, diámetro de 40–75 µm, tamaño de poro de 500 Å, SiliCycle, Quebec, Canadá) como moldes sacrificables para la síntesis del MIP. El monómero funcional EAMA (0.31 mmol) se mezcló con 0.31 mmol de MAM en 0.34 mL de disolvente (DMSO para el MIP-ZON

y ACN–DMSO 70:30 v/v para el MIP-AOH), junto con la molécula plantilla (0.16 mmol de CDHB para el MIP-ZON o S2 para el MIP-AOH), y la mezcla de prepolimerización se dejó equilibrar durante 30 min. Entonces la mezcla se combinó con 3.12 mmol de EDMA y ABDV (5% en peso del total de monómeros). Luego se introdujeron 3.02 g de sílice en un vial de vidrio de 12 mL y se añadió la mezcla de prepolimerización gota a gota sobre la sílice, agitando hasta que las esferas fluyeran libremente. El vial se selló con un septum, se purgó con nitrógeno durante 5 min y se dejó polimerizar a 50 °C durante 24 h. Después de la polimerización, el molde de sílice se disolvió con una disolución acuosa de hidrógenodifluoruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{HF}_2$ ) 3 mol L<sup>-1</sup> (3 × 150 mL) para obtener las esferas porosas de MIP. Para eliminar la molécula plantilla, los MIPs se lavaron con 0.5 L de MeOH–TFA (95:5 v/v) y 0.3 L de MeOH. Posteriormente, se mantuvieron en un horno a 50 °C hasta alcanzar la completa sequedad. Antes de empaquetar en los cartuchos SPE, las esferas se sedimentaron utilizando MeOH–agua (80:20 v/v) para eliminar las partículas finas de polímero. Los MIPs se secaron durante la noche en una estufa de vacío, se mezclaron en una proporción 1:1 en peso y se agitaron hasta obtener una mezcla homogénea antes de ser empaquetados en los cartuchos SPE. Los NIPs se prepararon de la misma manera, pero sin las moléculas plantilla.

#### **2.3.4. Diseño experimental para la preconcentración MISPE**

Se utilizó un diseño compuesto central (CCDn) para optimizar el método MISPE. Las variables incluidas en el estudio fueron: a) el volumen de carga de la muestra (L); b) la cantidad de acetonitrilo en el disolvente de lavado (A); c) el volumen de disolvente de lavado (W); y d) el volumen de disolvente de elución (E). El dominio experimental utilizado para evaluar la influencia de las variables experimentales fue el siguiente: a) L: 14 – 31 mL en tampón fosfato 0.050 mol L<sup>-1</sup> (pH 8.2); b) A: acetonitrilo–agua 13 – 28% (v/v); c) W: 2 – 4 mL; d) E: 1.5 – 2.5 mL de MeOH–TFA, 97:3 v/v. La masa de polímero empaquetada en los cartuchos SPE y el caudal se mantuvieron constantes en 150 mg y 0.5 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. Se llevaron a cabo un total de 54 experimentos en un orden aleatorio para generar los datos experimentales del diseño CCDn. De estos, 16 correspondieron al diseño factorial (duplicado), 8 a puntos axiales (duplicado) y 6 a réplicas del punto central. La respuesta seleccionada fue la recuperación de ambas micotoxinas en el MIP y en el NIP. Se propuso un modelo multivariante para cada respuesta. El diseño experimental, las superficies de respuesta estimadas mediante regresión lineal múltiple y los resultados de la optimización se generaron y analizaron utilizando el programa estadístico Design Expert 10 (Stat-Ease, MN, EE.UU.). La adecuación del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación ajustado ( $\text{Adj } r^2$ ), que considera el número de parámetros en el modelo en relación con el número de ejecuciones en el diseño, el coeficiente de determinación predicho ( $\text{Pred } r^2$ ) y la prueba de falta de ajuste del modelo basada en el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Además, se

utilizaron tres gráficos diagnósticos para evaluar la adecuación de los modelos empíricos: 1) un gráfico de probabilidad normal del residual estudentizado, 2) el residual estudentizado frente a los valores predichos, y 3) los valores predichos frente a los valores reales de respuesta. El programa del modelo ajustado proporcionó las condiciones óptimas.

### **2.3.5. Extracción de AOH y ZON usando MISPE**

Los cartuchos de extracción en fase sólida (5 mL, Varían, Palo Alto, CA, EE.UU.) se empaquetaron con 150 mg de MIP o el correspondiente NIP. Los cartuchos se equilibraron con 10 mL de MeOH y 10 mL de tampón fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8.2). La muestra (30 mL), disuelta en tampón fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8.2), se percoló a través de los cartuchos a un caudal constante de 0.8 mL min<sup>-1</sup> con ayuda de una bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson; Villiers-le-Bel, Francia) de 4 canales. Los cartuchos se enjuagaron con 2 mL de mezcla ACN-agua (20:80 v/v) para eliminar los compuestos retenidos de forma no específica. Finalmente, las micotoxinas se eluyeron con 2.5 mL de metanol que contenía 5% de TFA y los cartuchos se reequilibraron con MeOH y tampón fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8.2) antes de una nueva aplicación. Los eluyentes de la columna MISPE se inyectaron en el sistema HPLC-FLD para su análisis. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **2.3.6. Limpieza y preconcentración de muestras de aceite usando MISPE**

La extracción de muestras se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente con algunas modificaciones (**Figura 17**).<sup>71</sup> Las muestras de aceite (2.0000 ± 0.0025 g) se combinaron con 10 mL de agua ultrapura agitando durante 15 min en un agitador Vibromatic (J.P. Selecta, Barcelona, España). Luego, se añadieron 10 mL de ACN y la mezcla se agitó durante otros 15 min para, a continuación, añadir (4.00 ± 0.05) g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Tras 15 min de agitación con un agitador orbital, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 3200 rpm (centrífuga Ultrafree<sup>®</sup>-MC, Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Se recogió una alícuota (5 mL) del sobrenadante y se evaporó hasta sequedad a 60 °C utilizando un módulo Turbovap LV (Biotage AB, Uppsala, Suecia). A continuación, se añadieron 100 µL de MeOH a la disolución para mejorar la solubilidad de las micotoxinas. El extracto se redisolvió en 10 mL de tampón fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8.2) y se centrifugó durante 10 min a 11000 rpm. Finalmente, 9 mL del sobrenadante se cargaron en los cartuchos MISPE para la limpieza y preconcentración de la muestra. Las extracciones de muestras de aceite que no contenían micotoxinas en los límites de detección del método se fortificaron con disoluciones estándar de AOH y ZON para su cuantificación. Se generaron curvas de calibrado lineales en los rangos de 50 – 300 µg L<sup>-1</sup> y 100 – 500 µg L<sup>-1</sup> para AOH y ZON, respectivamente ( $r^2 > 0.99$ ). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

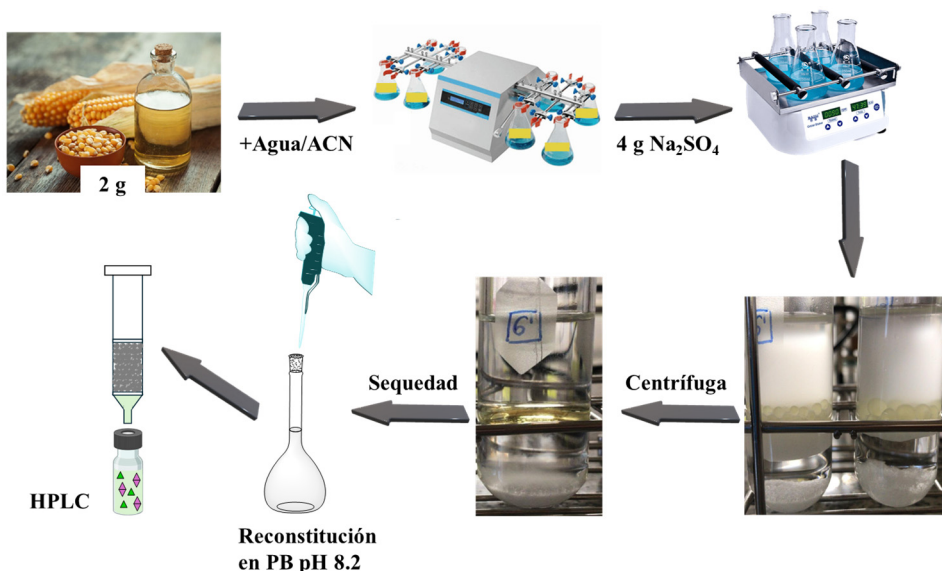


Figura 17. Proceso de extracción y purificación de micotoxinas en muestras de aceite utilizando MISPE, antes del análisis por HPLC.

### 2.3.7. Validación del método

Los extractos de muestras de aceite de maíz fortificados se utilizaron para la validación del método debido a la falta de materiales de referencia certificados. La muestra se adquirió en un supermercado local. La validación del método se llevó a cabo de acuerdo con la *Decisión de la Comisión 2002/657/CE* en términos de especificidad, linealidad, recuperación aparente e incertidumbre de medida ( $U$ ).<sup>126</sup> Se aplicaron las directrices *ICH* para evaluar el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), la repetibilidad (precisión intra-día;  $RSD_r$ ) y la reproducibilidad (precisión intermedia;  $RSD_R$ ).<sup>127</sup> La capacidad de detección ( $CC_\beta$ ) y el límite de decisión ( $CC_\alpha$ ) se calcularon aplicando el procedimiento de curva de calibrado descrito en trabajos anteriores.<sup>128,129</sup> Para verificar los resultados, las muestras se analizaron por HPLC-MS/MS utilizando el método descrito en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Parámetros de MS/MS con monitoreo de reacciones múltiples (MRM), voltaje del fragmentador y energía de colisión.

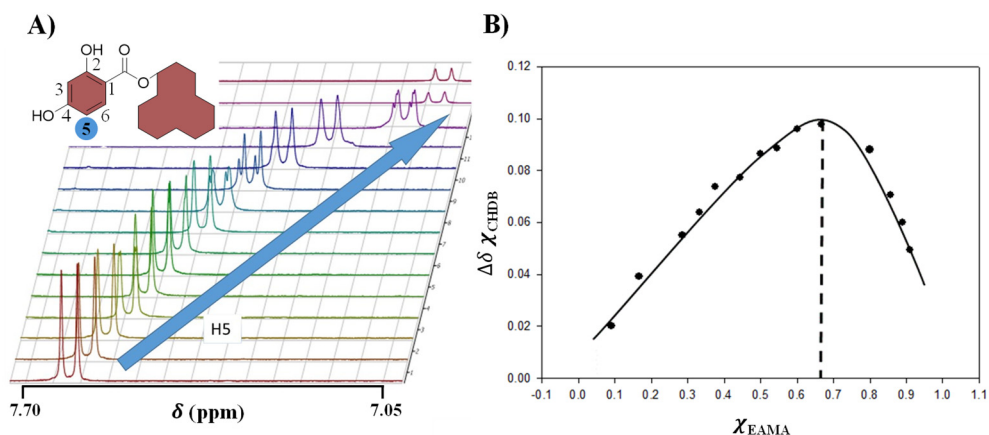
Analito	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)(*)	Voltaje del fragmentador (V)	Energía de colisión (V)
AOH	259.06	185.00/128.00	128/128	34/50
ZON	319.16 [M+H <sup>+</sup> ]	301.10/283.10	80/80	6/6
AME	273.08	128.00/115.10	128/128	50/50
$\alpha/\beta$ -ZOL	321.17	303.10/285.10	80/80	6/6

\* Iones cuantificadores/cualificadores

## 2.4. Resultados y discusión

### 2.4.1. Caracterización del MIP

Los MIPs se prepararon en formato de microesferas utilizando CDHB (para ZON) y S2 (para AOH) como moléculas plantilla (**Figura 15**). La estequiometría del aducto formado entre la plantilla CDHB y el monómero funcional EAMA en la mezcla de pre-polimerización se determinó mediante una valoración por RMN  $^1\text{H}$  en DMSO- $\text{d}_6$ . La concentración de CDHB se mantuvo constante mientras se añadían cantidades crecientes de EAMA a la disolución de análisis. El protón H5 de la molécula plantilla experimentó los cambios más significativos en el desplazamiento químico (**Figura 18A**), y los valores de  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  se usaron para representar el gráfico de Job de la **Figura 18B**, que muestra un máximo en 0.67, compatible con la formación de un aducto 2:1 EAMA-CDHB mediante una interacción de doble enlace de hidrógeno dador-aceptor (**Esquema 1**).



**Figura 18.** Cambio en el desplazamiento químico del protón H5 del CDHB en función de la fracción molar de EAMA (base) en DMSO- $\text{d}_6$  ( $[\text{S2}] = 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). **A)** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrando el desplazamiento del protón H5. **B)** Gráfico de Job que ilustra la relación entre ambas moléculas.

Las constantes de asociación en DMSO se calcularon según lo descrito a continuación. La variación en el desplazamiento químico del protón monitorizado del CDHB (H5) ( $\Delta\delta_{\text{obs}}$ ), en ausencia y en presencia de EAMA puede calcularse usando la ecuación 1,

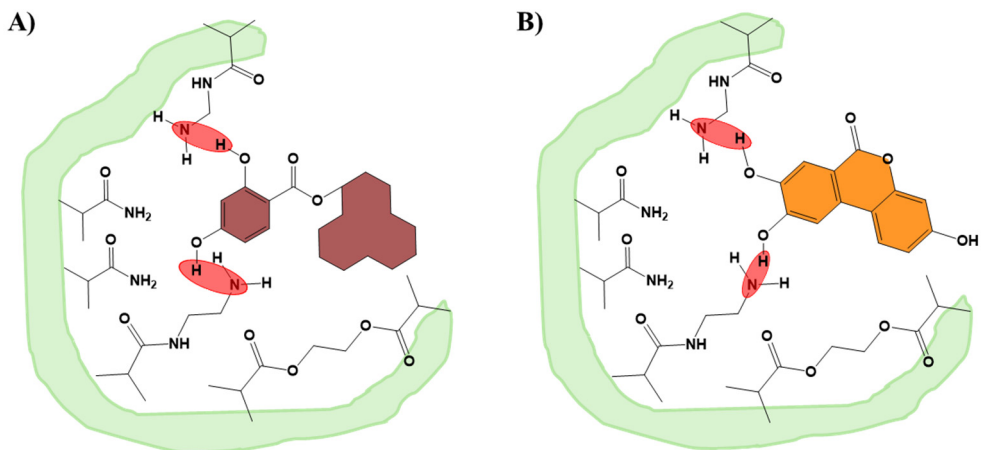
$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{K_{11}\Delta\delta_{11}^0 + 2K_{11}K_{21}[A]\Delta\delta_{21}^0}{\frac{1}{[T]} + K_{11} + 2K_{11}K_{21}[A]} \quad (1)$$

donde  $\Delta\delta_{11}^0$  y  $\Delta\delta_{21}^0$  son las diferencias entre los desplazamientos químicos del protón de las especies libres, en los aductos 1:1 o 2:1;  $K_{11}$  y  $K_{21}$  son las constantes de asociación correspondientes; y  $[A]$  y  $[T]$  son las concentraciones de EAMA libre y del sucedáneo CDHB, respectivamente. La concentración aproximada de EAMA libre es función de las concentraciones totales de molécula plantilla y EAMA ( $[T]_{\text{T}}$  y  $[A]_{\text{T}}$ ),

así como de  $K_{11}$  y  $K_{21}$  para todos los puntos de las curvas experimentales, como se refleja en la ecuación 2,

$$[A] = \frac{[A]_T + 2K_{11}K_{21}[T]_T[A]_T^2}{1 + K_{11}[T]_T + 4K_{11}K_{21}[T]_T[A]_T} \quad (2)$$

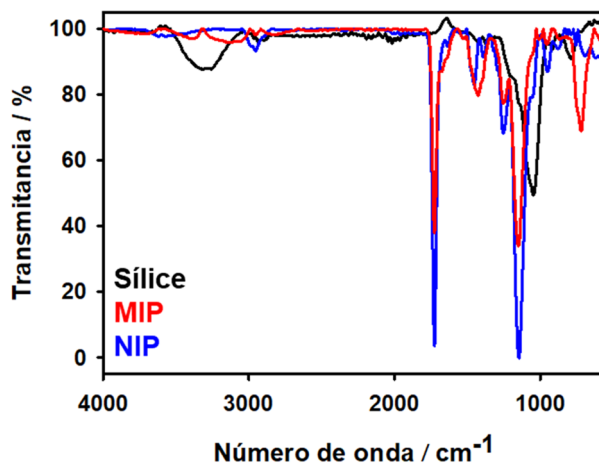
las variables  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  y  $[A]_T$  se miden experimentalmente, mientras que  $\Delta\delta_{11}^0$ ,  $\Delta\delta_{21}^0$ ,  $K_{11}$  y  $K_{21}$  se estiman mediante el ajuste de curvas a la ecuación 1. El valor de la variable intermedia  $[A]$  se calcula de manera iterativa usando la ecuación 2 para cada punto de la curva experimental.



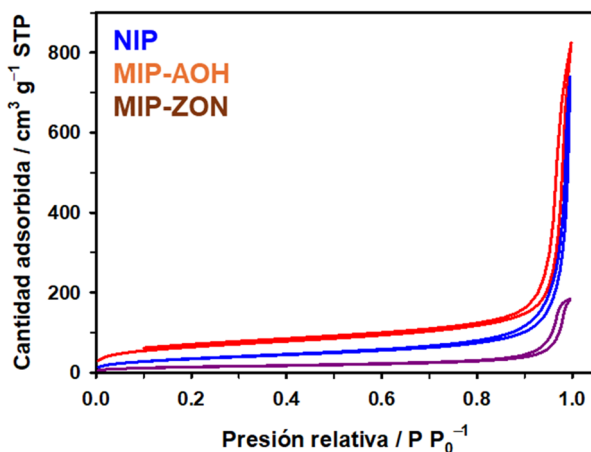
**Esquema 1.** Interacciones sugeridas entre la molécula plantilla y el monómero funcional: A) ZON-MIP y B) AOH-MIP.

Los resultados obtenidos fueron  $K_{11} = 3.7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  y  $K_{21} = 2.5 \text{ L mol}^{-1}$ . Ambos están en el mismo orden de magnitud que los descritos anteriormente para la interacción de la molécula plantilla del AOH (S2) con EAMA en el mismo disolvente (es decir,  $2.6$  y  $2.4 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  para  $K_{11}$ ,  $5.7$  y  $6.3 \text{ L mol}^{-1}$  en el caso de  $K_{21}$ , dependiendo del protón que se monitoriza).<sup>97</sup> Por lo tanto, los polímeros se sintetizaron con EAMA como monómero funcional, MAM como co-monómero y EDMA como entrecruzante en una proporción molar TM/EAMA/MAM/EDMA de 1:2:2:20, utilizando esferas de sílice como molde sacrificable. Los espectros IR mostrados en la **Figura 19** confirman que la sílice ha desaparecido en los materiales MIP y NIP después de la disolución con  $\text{NH}_4\text{HF}_2$ . Las bandas típicas de sílice a  $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$  (combinación de las bandas de tensión SiO–H y H<sub>2</sub>O–H adsorbida) y  $1040 \text{ cm}^{-1}$  (tensión Si–O) están ausentes en los espectros IR del MIP y el NIP. Estos dos materiales solo muestran las bandas intensas del grupo éster carboxílico a  $1725 \text{ cm}^{-1}$  (tensión C–O) y  $1150 \text{ cm}^{-1}$  (tensión OC–O) del monómero EDMA. Sin embargo, la vibración característica C–O (tensión) del grupo amida del monómero de acrilamida no es visible, ya que está oculta bajo la fuerte banda del grupo éster, pero la tensión OC–N (banda amida III) del MIP aparece a  $1422 \text{ cm}^{-1}$ . Sorprendentemente,

el modo de oscilación del grupo  $\text{NH}_2$  alifático del monómero EAMA a  $721\text{ cm}^{-1}$  (deformación N-H) se aprecia en el MIP, pero no tanto en el NIP, lo cual podría explicarse considerando la diferente reactividad del monómero funcional en presencia y ausencia de la plantilla.



**Figura 19.** Espectros FTIR de las partículas de sílice porosa (negro), MIP (rojo) y NIP (azul) (estas dos últimas después de la eliminación de la sílice).



**Figura 20.** Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77 K para los polímeros con impronta molecular de CDHB (marrón) y S2 (naranja), y para los polímeros sin impronta molecular (azul).

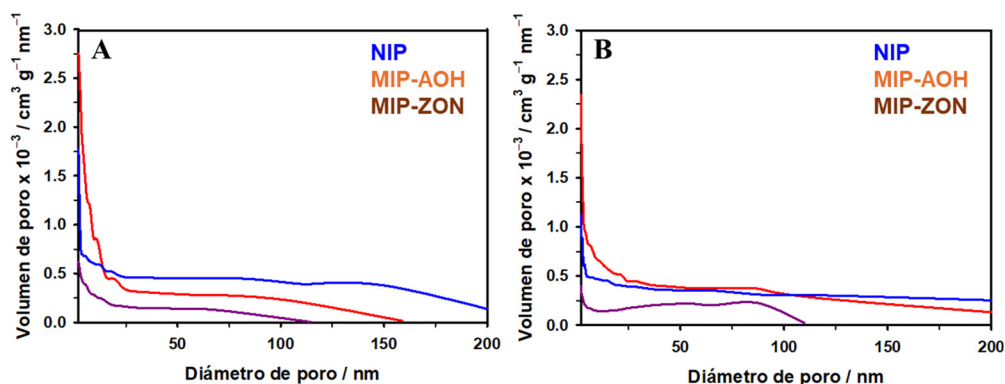
Los polímeros con impronta por CDHB y S2, así como el NIP, muestran isotermas de adsorción de nitrógeno de tipo “IV” (**Figura 20**) y un bucle de histéresis de tipo H3, que suelen asignarse a materiales meso-macro porosos.<sup>130</sup> La **Tabla 6** recoge los valores del área BET ( $S_{\text{BET}}$ ), la superficie externa ( $S_t$ ) obtenida a partir de los gráficos  $t$  y el volumen de poros correspondiente a microporos ( $V_{\text{micro}}$ ) y meso-macroporos ( $V_p$ ). Como era de esperar,  $S_{\text{BET}}$  es mayor que  $S_t$  en todos los casos. Esta diferencia es significativa en el caso del NIP debido a la importante contribución de su microporosidad al área BET. Las curvas de distribución del tamaño de poro del NIP

obtenidas de la desorción y adsorción de nitrógeno (**Figura 21**) se caracterizan por un mayor número de poros de diámetro pequeño en comparación con los polímeros con impronta. Este hecho podría atribuirse a la ausencia de la molécula plantilla durante el proceso de polimerización.

**Tabla 6.** Parámetros texturales de los polímeros con impronta molecular de CDHB y S2, así como de los polímeros sin impronta molecular.

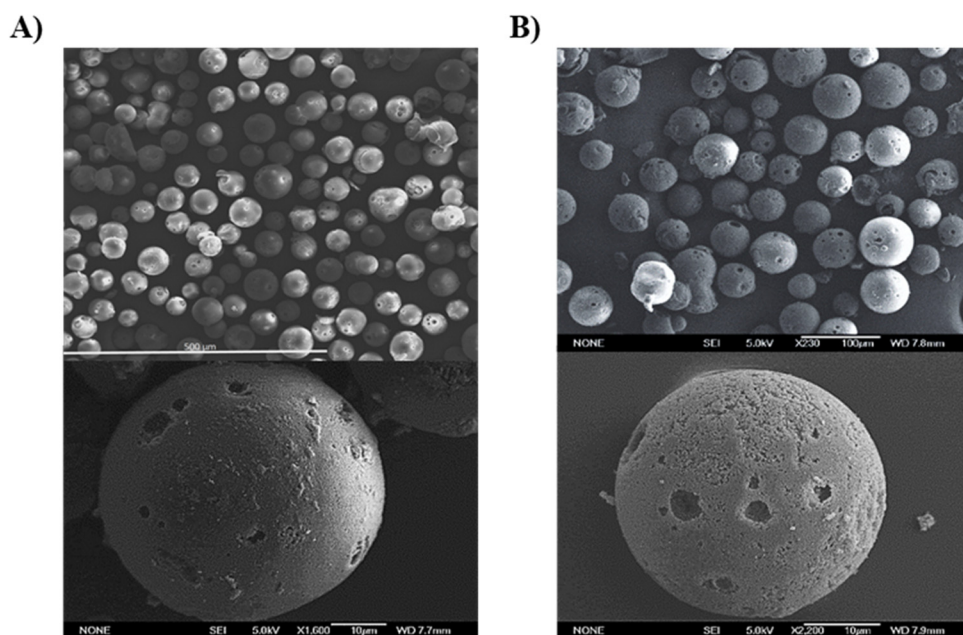
Polímero	Plantilla	$S_{BET}$ ( $m^2 g^{-1}$ )	$S_t$ ( $m^2 g^{-1}$ )	$V_{micro}$ ( $\times 10^3 cm^3 g^{-1}$ )	$V_p$ ( $cm^3 g^{-1}$ )
MIP	CDHB	51	37.2	5.9	0.27
MIP	S2	128	98	13.4	0.88
NIP	--	229	132	47.2	1.23

SBET: área BET de los materiales poliméricos;  $S_t$ : área de superficie externa;  $V_{micro}$ : volumen de los microporos;  $V_p$ : volumen de los meso-macroporos.



**Figura 21.** Curvas de distribución de tamaño de poro obtenidas a partir de las secciones de **A)** desorción y **B)** adsorción de las isothermas de  $N_2$  para los polímeros con impronta molecular por CDHB (marrón) y S2 (naranja), así como para los polímeros sin impronta molecular (azul).

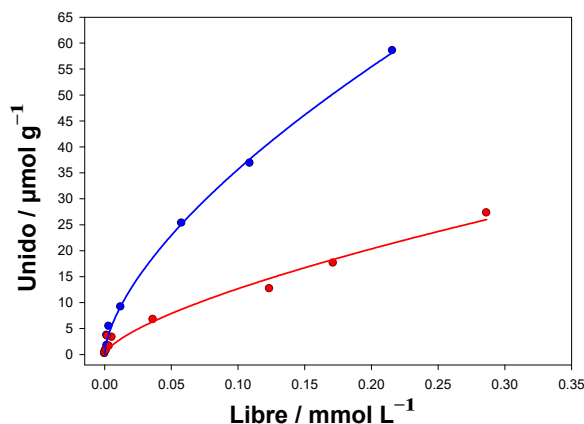
Sin embargo, como se observa en las micrografías electrónicas de barrido (**Figura 22**), las características morfológicas de la mezcla de polímeros con impronta por CDHB y S2, en una proporción 1:1 (p/p), fueron similares a las del NIP. Se obtuvieron microesferas con un rango de tamaño similar ( $60 \pm 6 \mu m$ ) debido al uso del molde de sílice sacrificable durante la polimerización. La porosidad de los materiales, determinada después de la eliminación de la sílice, fue muy similar para ambos materiales.



**Figura 22.** Micrografías SEM de las microsferas mezcladas de **A)** MIP y **B)** NIP preparadas con impronta por CDHB y S2 y sin impronta alguna.

Para evaluar los isotermas de unión en equilibrio de ZON al polímero con impronta por ZON y al NIP (**Figura 23**), 20 mg de polímero se incubaron con la micotoxina a concentraciones en el rango de  $0.005 - 0.750 \text{ mmol L}^{-1}$ , durante 24 h. El gráfico de la cantidad de toxina unida al polímero ( $B$ ,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ), en función de la concentración de micotoxina libre en el sobrenadante ( $F$ ,  $\text{mmol L}^{-1}$ ), se ajustó a la isoterma de Freundlich ( $B = aF^m$ )<sup>131</sup>, donde  $a$  es proporcional al número de sitios de unión en el polímero ( $N_T$ ) y su afinidad media por la molécula objetivo ( $K_\theta$ ), y  $m$  es un parámetro que refleja la heterogeneidad de los sitios de unión (“índice de heterogeneidad”). Su valor varía entre uno y cero, disminuyendo a medida que aumenta la heterogeneidad de los sitios de unión. Se utilizaron las ecuaciones de Rampey (Ecuaciones 3 y 4) para calcular el número aparente de sitios,  $N_{K1-K2}$ , y la afinidad promedio ponderada aparente,  $K_{K1-K2}$  (**Tabla 7**).<sup>132</sup>

La capacidad de unión de los polímeros con impronta por ZON y AOH ( $N_{MIP,ZON} = 54 \mu\text{mol g}^{-1}$ ;  $N_{MIP,AOH} = 35 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) es mayor que la de los NIPs ( $N_{NIP,ZON} = 30 \mu\text{mol g}^{-1}$ ;  $N_{NIP,AOH} = 22 \mu\text{mol g}^{-1}$ ). Lo mismo ocurre con la afinidad promedio ponderada en el rango de concentración evaluado ( $0.005 - 0.75 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ( $K_{MIP,ZON} = 135 \text{ L mmol}^{-1}$ ;  $K_{NIP,ZON} = 50 \text{ L mmol}^{-1}$ ;  $K_{MIP,AOH} = 109 \text{ L mmol}^{-1}$ ;  $K_{NIP,AOH} = 50 \text{ L mmol}^{-1}$ ), pero la diferencia entre los valores de MIP y NIP es mayor para ZON que para AOH. El índice de heterogeneidad de los polímeros con impronta por micotoxina (ZON-MIP:  $0.64 \pm 0.05$ ; AOH-MIP:  $0.41 \pm 0.07$ , **Tabla 7**) no fue significativamente diferente de los del NIP (ZON-NIP:  $0.68 \pm 0.03$ ; AOH-NIP:  $0.49 \pm 0.02$ ), aunque resultó mayor para ZON que para AOH.



**Figura 23.** Isotermas de unión en equilibrio para ZON con el MIP (azul) y con el NIP correspondiente (rojo) en DMSO. Las líneas continuas corresponden a los ajustes a la ecuación de Freundlich ( $B = aF^m$ ) (10 puntos,  $n = 2$ ).

**Tabla 7.** Parámetros de las isotermas de unión en equilibrio para la unión de ZON y AOH (en DMSO) por los respectivos MIPs y NIPs. La capacidad de unión del polímero ( $a$ ) y el índice de heterogeneidad de los sitios de unión ( $m$ ) se obtuvieron a partir del ajuste de los datos experimentales (Figura 23) a la isoterma de Freundlich correspondiente. La constante de asociación ( $K$ ) y las capacidades de unión específicas ( $N$ ) se calcularon a partir de las ecuaciones 3 y 4. Los datos para el polímero con impronta molecular de AOH se publicaron en un trabajo anterior.<sup>97</sup>

Analito/ Polímero	$K_{K1-K2}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	$K_{\text{rango}}$ (mmol L <sup>-1</sup> ) ( $K_{\text{min}} - K_{\text{max}}$ )	$N_{K1-K2}$ (μmol g <sup>-1</sup> )	$m$	$a$ (μmol g <sup>-1</sup> ) (mmol L <sup>-1</sup> ) <sup><math>m</math></sup>	$r^2$
ZON / MIP	135 ± 7	38 – 2917	54 ± 6	0.64 ± 0.05	155 ± 9	0.998
ZON / NIP	51 ± 5	25 – 1123	30 ± 3	0.68 ± 0.03	61 ± 9	0.980
AOH / MIP	109 ± 10	31 – 2014	35 ± 2	0.41 ± 0.07	75 ± 9	0.980
AOH / NIP	50 ± 4	23 – 1007	22 ± 2	0.49 ± 0.02	46 ± 2	0,997

$$N_{K1-K2} = a(1 - m^2)(K_1^{-m} - K_2^{-m}) \quad (3)$$

$$K_{K1-K2} = \left(\frac{m}{m-1}\right) \left(\frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}}\right) \quad (4)$$

#### 2.4.2. Optimización quimiométrica del MISPE para AOH y ZON

Como se indica en la sección 2.3.4, se utilizó un diseño compuesto central para la optimización de MISPE, siendo el volumen de carga de muestra (L), el volumen de lavado (W), el volumen de elución (E) y la cantidad de acetonitrilo en la disolución de lavado (A) los factores experimentales. La **Tabla 8** resume el diseño experimental, donde se seleccionaron los niveles máximos y mínimos para la distancia a los puntos axiales. Las recuperaciones en el dominio experimental estuvieron en el rango de

*Determinación simultánea de ZON y AOH en muestras de aceite*

14 – 93% y 61 – 110% en el MISPE, y en el rango de 0.26 – 97% y 0.13 – 3.9% en el NISPE para ZON y AOH, respectivamente.

**Tabla 8.** Diseño central compuesto para la optimización del MISPE de micotoxinas.

Factor	Unid.	Cód.	Nivel experimental (Nivel codificado)				
			Axial	Fact.	Central	Fact.	Ax.
Volumen carga de muestra	mL	L	5 (-2)	14 (-1)	23 (0)	31 (+1)	40 (+2)
Volumen de lavado	mL	W	1 (-2)	2 (-1)	3 (0)	4 (+1)	5 (+2)
Volumen de elución	mL	E	1 (-2)	1.5 (-1)	2 (0)	2.5 (+1)	3 (+2)
Cantidad de acetoneitrilo	%	A	5 (-2)	13 (-1)	20 (0)	28 (+1)	35 (+2)
Respuesta	Unid.	Min.	Max.	Mean	Std. Dev.	Transformación	
ZON-MIP	%	14	93	72	13	Ninguno	
AOH-MIP	%	61	110	78	9	Ninguno	
ZON-NIP	%	0.26	97	24	29	Raíz cuadrada	
AOH-NIP	%	0.13	3.9	1.2	0.92	Log natural	

Las recuperaciones de extracción en el MIP y NIP para las micotoxinas objetivo se predijeron mediante un modelo estadístico que incluye términos interactivos y polinómicos. Se consideraron inicialmente todas las posibles interacciones entre los cuatro factores. Además, los coeficientes significativos de cada modelo empírico se seleccionaron en función de la regresión escalonada y los valores de  $p$ , usando un umbral de 0.1 para añadir o eliminar coeficientes. Un análisis de varianza (ANOVA) de los modelos de superficie de respuesta estimados por la regresión escalonada mostró un valor de  $p > 0.05$  en la falta de ajuste, por lo que la falta de ajuste de los modelos estimados no fue significativa en comparación con el error puro. Por otra parte, el método de Box-Cox sugirió aplicar una transformación a las observaciones del NISPE para estabilizar la varianza. Así, se aplicaron una transformación de raíz cuadrada y una transformación de logaritmo natural a las observaciones de ZON y AOH.

Se utilizó una metodología de mínimos cuadrados para estimar los coeficientes de regresión de los modelos de regresión lineal múltiple para cada micotoxina y sistema de polímero. Todos los modelos fueron significativos con un valor de  $p < 0.0001$ . La significancia del ajuste y la capacidad de los modelos para explicar la variabilidad de la respuesta, es decir, la extracción de las micotoxinas, y predecir un valor de recuperación a partir de nuevas observaciones se estimaron calculando el coeficiente de determinación ajustado por el número de parámetros en el modelo en relación con el número de puntos en el diseño ( $\text{Adj } r^2$ ), así como el coeficiente de determinación predicho ( $\text{Pred } r^2$ ) (**Tabla 9**). El  $\text{Adj } r^2$  para los modelos de regresión de extracción de ZON, 0.8399 y 0.9748 para el MISPE y el NISPE, respectivamente, fue mayor que el de los modelos de regresión de extracción de AOH, 0.6233 y 0.6062 para el MISPE y el NISPE, respectivamente. Por lo tanto, pueden ocurrir algunas desviaciones en las predicciones para las recuperaciones de extracción de AOH. No obstante, el  $\text{Pred } r^2$ , que indica la capacidad del modelo para estimar un valor de respuesta, mostró un acuerdo razonable con el  $\text{Adj } r^2$  (la diferencia siempre fue menor que 0.2) para todos los modelos de regresión. Esto sugiere que los modelos ajustaron bien los datos y ofrecieron una estimación adecuada para la respuesta del sistema.

Los modelos empíricos se evaluaron adicionalmente utilizando tres tipos de herramientas diagnósticas: 1) el gráfico de probabilidad normal del residual estudentizado (**Figura 24**), 2) el residual estudentizado frente a los valores predichos (**Figura 25**) y 3) los valores predichos frente a las respuestas reales (**Figura 26**). Ninguno de los tres tipos de gráficos reveló ninguna deficiencia alguna de los modelos para cualquiera de las micotoxinas o polímeros (MIP y NIP).

*Determinación simultánea de ZON y AOH en muestras de aceite*

**Tabla 9.** Coeficientes de regresión de los modelos de mínimos cuadrados en función de los factores codificados.\*

Term. polinó m.	ZON-MIP		AOH-MIP		Sqrt (ZON-NIP)		Ln (AOH-NIP)	
	Coef.	Std. error	Coef.	Std. error	Coef.	Std. error	Coef.	Std. error
<b>Int.</b>	76	1.3	77	1.7	2.2	1.5×10 <sup>-1</sup>	-3.6×10 <sup>-1</sup>	1.3×10 <sup>-1</sup>
<b>W</b>					-6.7×10 <sup>-1</sup>	6.9×10 <sup>-2</sup>	-4.6×10 <sup>-1</sup>	7.3E-02
<b>E</b>			-10	3.5				
<b>A</b>	-14	1.3			-2.1	1.2×10 <sup>-1</sup>	-4.2×10 <sup>-1</sup>	8.2×10 <sup>-2</sup>
<b>LW</b>			-2.8	9.9×10 <sup>-1</sup>				
<b>LE</b>	3.9	1.0	4.1	9.9×10 <sup>-1</sup>	1.8×10 <sup>-1</sup>	8.4×10 <sup>-2</sup>		
<b>WE</b>							1.8×10 <sup>-1</sup>	9.0×10 <sup>-2</sup>
<b>WA</b>			4.4	9.9×10 <sup>-1</sup>			-1.8×10 <sup>-1</sup>	9.0×10 <sup>-2</sup>
<b>L<sup>2</sup></b>			1.7	8.2×10 <sup>-1</sup>	1.6×10 <sup>-1</sup>	7.8×10 <sup>-2</sup>	1.6×10 <sup>-1</sup>	7.3×10 <sup>-2</sup>
<b>W<sup>2</sup></b>					3.4×10 <sup>-1</sup>	7.0×10 <sup>-2</sup>	1.3×10 <sup>-1</sup>	7.3×10 <sup>-2</sup>
<b>E<sup>2</sup></b>			3.4	1.6				
<b>A<sup>2</sup></b>	-6.8	7.4×10 <sup>-1</sup>	-2.5	8.2×10 <sup>-1</sup>	8.1×10 <sup>-1</sup>	7.0×10 <sup>-2</sup>		
<b>LWE</b>	-4.0	1.0						
<b>WEA</b>			2.2	9.9×10 <sup>-1</sup>				
<b>L<sup>2</sup>W</b>	-3.9	1.0	1.8	9.9×10 <sup>-1</sup>				
<b>L<sup>2</sup>E</b>			13	3.6				
<b>L<sup>2</sup>A</b>	9.8	1.6			-9.6×10 <sup>-1</sup>	1.5×10 <sup>-1</sup>		
<b>LWEA</b>	-2.1	1.0						
<b>L<sup>2</sup>W<sup>2</sup></b>	5.1	1.5			1.0	1.4×10 <sup>-1</sup>		
<b>Adj r<sup>2</sup></b>	0.8399		0.6233		0.9748		0.6062	
<b>Pred r<sup>2</sup></b>	0.7930		0.5141		0.9673		0.5283	

\* L: Volumen de carga de muestra; W: Volumen de lavado; E: Volumen de elución; A: Cantidad de acetónitrilo en la disolución de lavado.

*Determinación simultánea de ZON y AOH en muestras de aceite*

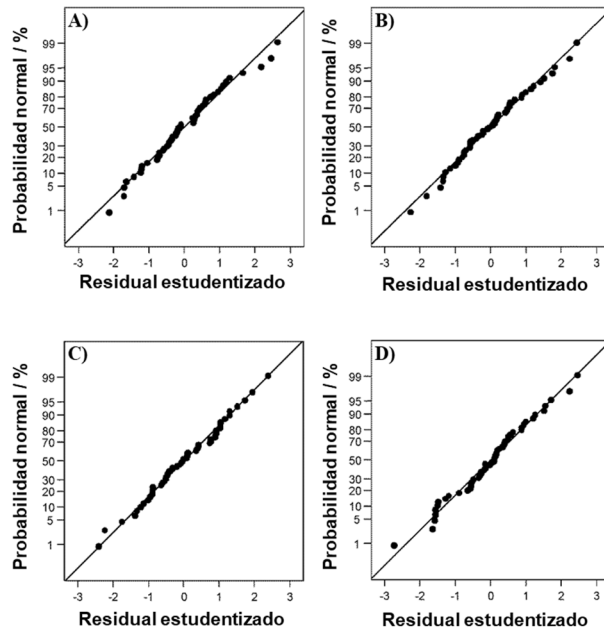


Figura 24. Gráficos de probabilidad normal del residual estudentizado. A) ZON-MISPE, B) AOH-MISPE, C) ZON-NISPE y D) AOH-NISPE.

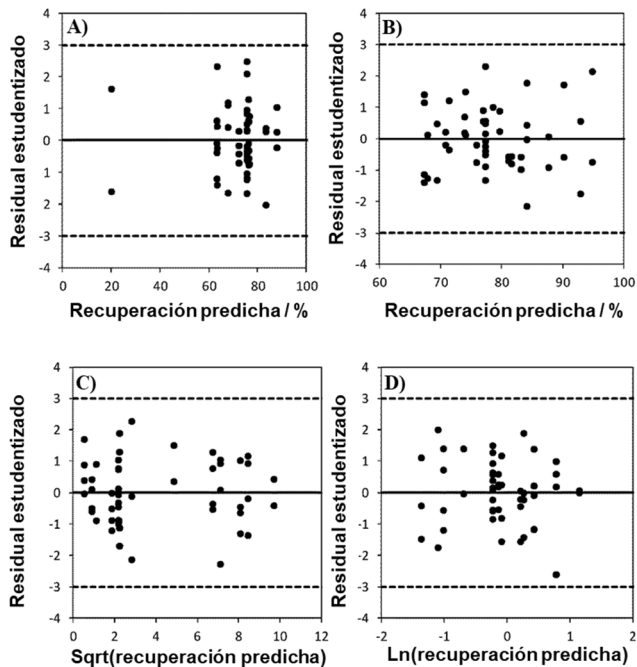
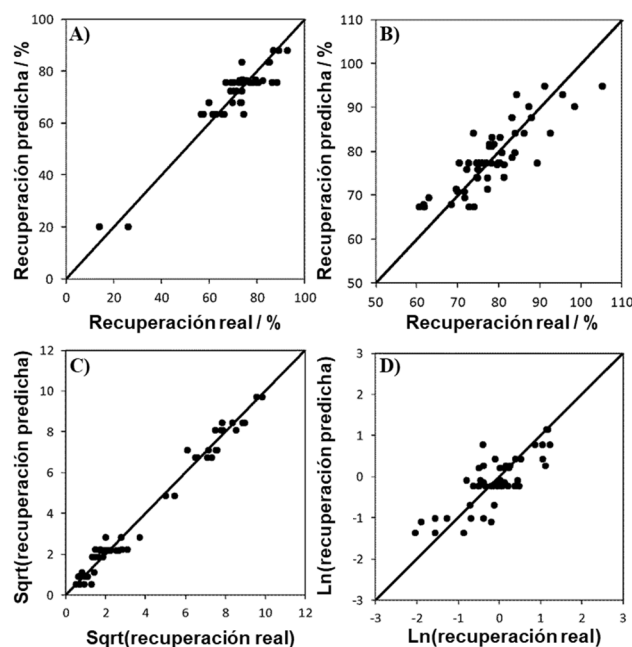


Figura 25. Gráficos del residual estudentizado frente a recuperación predicha. A) ZON-MISPE, B) AOH-MISPE, C) ZON-NISPE y D) AOH-NISPE.



**Figura 26.** Gráficos de recuperación real frente a recuperación predicha. **A)** ZON-MISPE, **B)** AOH-MISPE, **C)** ZON-NISPE y **D)** AOH-NISPE.

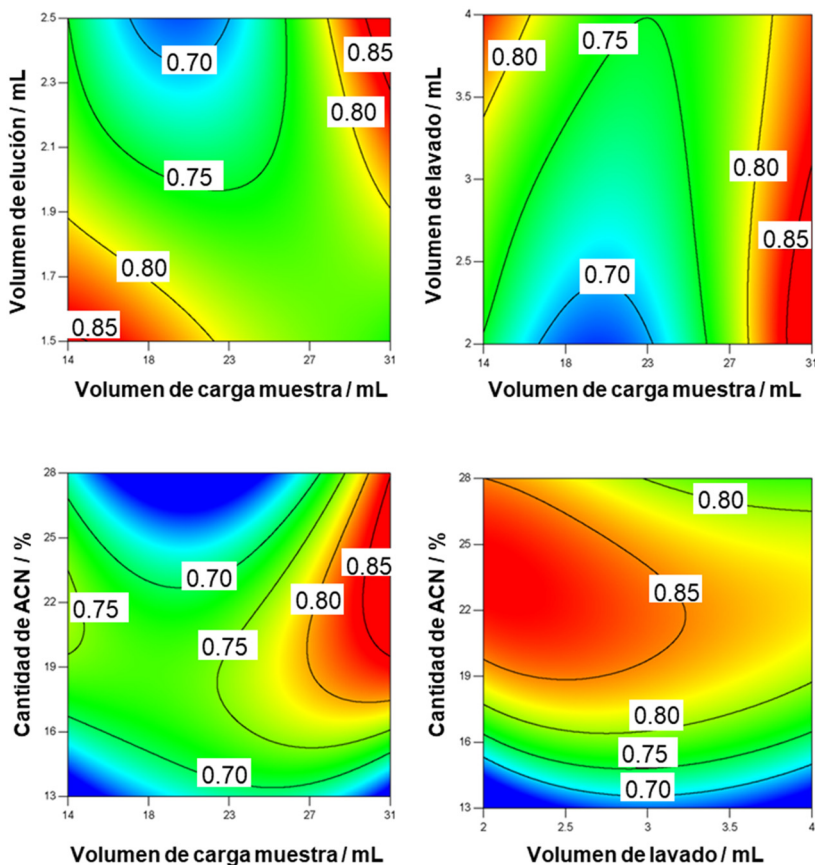
El factor más significativo en la recuperación de ZON, tanto en el MISPE como en el NISPE, fue la cantidad de acetonitrilo presente en la disolución de lavado, mostrando un efecto negativo. Para AOH, se observó un efecto negativo del volumen de la disolución de elución y un efecto positivo de la interacción de la cantidad de acetonitrilo en la disolución de lavado con el volumen de la disolución de lavado en la recuperación de MISPE. En el caso del NISPE, los factores que afectaron significativamente a la recuperación fueron el volumen de lavado y su contenido de acetonitrilo. La recuperación observada de AOH con el NISPE fue menor al 4% en todos los experimentos, lo que atestigua la baja selectividad del polímero sin impronta.

En general, el volumen de carga de la muestra supuso un efecto significativo a través de su término cuadrático y su interacción con los otros factores, mostrando un efecto positivo con el volumen de elución.

Utilizando la función de deseabilidad general, se realizó una optimización de respuesta múltiple, para maximizar la recuperación de extracción de las micotoxinas objetivo en el MISPE y minimizar su recuperación en el NISPE, siendo el objetivo deseado para cada factor dentro del rango estudiado. Sin embargo, dado que la recuperación de AOH fue menor al 4% en el dominio experimental del NISPE, esta variable de respuesta no se consideró en la optimización. Por otro lado, dado que la recuperación observada de AOH fue mayor que la de ZON en el MISPE, se le dio

mayor importancia a maximizar y minimizar la recuperación de ZON en el MISPE y NISPE, respectivamente.

Los gráficos de contorno (**Figura 27**) de la función de deseabilidad general en el dominio experimental mostraron que las condiciones que maximizaron la deseabilidad general cayeron en dos regiones, ya sea con los volúmenes de carga de muestra y elución en su nivel más bajo y un volumen de lavado relativamente alto, o con los volúmenes de carga de muestra y elución en su nivel más alto y el volumen de lavado en el nivel más bajo en el diseño experimental. En ambos casos, la cantidad óptima de acetonitrilo fue similar. Así, se establecieron las condiciones óptimas de trabajo, la recuperación predicha de micotoxinas en MISPE y NISPE, y el intervalo de predicción para un nivel de confianza del 95% (**Tabla 10**). Las condiciones que predijeron una recuperación de MISPE superior al 87% y recuperaciones de NISPE inferiores al 10% para ZON y AOH fueron 31 mL de volumen de carga de muestra, 2.0 mL de volumen de lavado, 2.5 mL de volumen de elución y 23% de acetonitrilo en la disolución de lavado.



**Figura 27.** Gráficos de contorno de la función de deseabilidad general para la extracción de ZON y AOH basada en MISPE y NISPE.

## Determinación simultánea de ZON y AOH en muestras de aceite

**Tabla 10.** Condiciones experimentales óptimas, recuperación predicha de micotoxinas en MISPE y NISPE, e intervalo de predicción al 95%.

<b>Factor</b>				<b>Deseabilidad global</b>
Volumen de carga muestra (mL)	Volumen de lavado (mL)	Volumen de elución (mL)	Cantidad de acetonitrilo (ACN/H <sub>2</sub> O, v/v)	
31.0	2.0	2.5	23	0.884
	<b>MISPE</b>		<b>NISPE</b>	
	ZON	AOH	ZON	AOH
Recuperación predicha (%)	89	87	11	1.2
Intervalo de predicción (%)	75 – 100	75 – 99	4.9 – 18	0.4 – 3.1

Las conclusiones obtenidas del proceso de optimización se confirmaron mediante pruebas adicionales. Así, se realizaron tres extracciones replicadas de MISPE y NISPE bajo las condiciones de trabajo optimizadas (**Tabla 11**). Las recuperaciones experimentales en el MISPE estuvieron cerca de los valores predichos por los modelos de regresión de superficie de respuesta para ambas micotoxinas, confirmando que los modelos de regresión de superficie de respuesta desarrollados proporcionan una interpretación y predicción correcta de los resultados. Para aumentar al máximo las recuperaciones en el MIP sin afectar significativamente a la unión no específica en el NIP, se decidió usar una disolución de lavado de 20% ACN–H<sub>2</sub>O para experimentos adicionales.

**Tabla 11.** Recuperación de micotoxinas bajo las condiciones óptimas de extracción.<sup>a</sup>

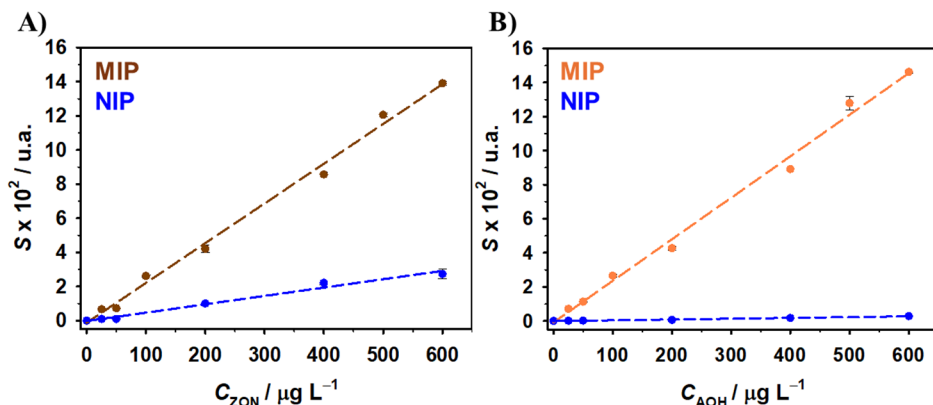
Micotoxina	MISPE (%)	NISPE (%)
ZON	89 ± 7	15 ± 5
AOH	88 ± 2	3.6 ± 0.1

<sup>a</sup> Recuperación ± intervalo de confianza ( $\alpha = 0.05$ ;  $n = 3$ ).

### 2.4.3. Caracterización del procedimiento MISPE

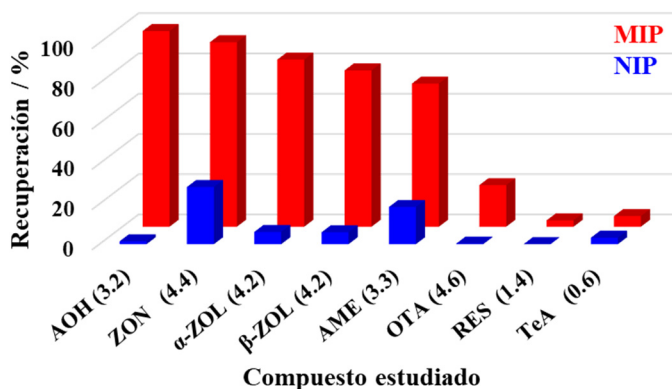
Como se describe en la sección 2.3.5, los cartuchos MIP/NIP se cargaron con 150 mg de polímero y se percolaron 30 mL de disoluciones de muestra que contenían ZON y AOH (25 – 600  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) disueltos en un tampón fosfato (50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 8.2) a un flujo constante de 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ . Los cartuchos se enjuagaron con 2 mL de una mezcla de ACN-agua (20:80 v/v) para eliminar los compuestos retenidos de manera no específica, y las micotoxinas se eluyeron con 2.5 mL de metanol que contenía 5% de

TFA. Las fracciones eluidas se analizaron mediante HPLC-FLD y los resultados se muestran en la **Figura 28**.



**Figura 28.** Rectas de calibrado para A) ZON (MISPE:  $y = 2.33 \times C_{ZON} - 11.47$ ,  $r^2 = 0.995$ ; NISPE:  $y = 0.49 \times C_{ZON} - 1.42$ ,  $r^2 = 0.982$ ) y B) AOH (MISPE:  $y = 2.43 \times C_{AOH} - 8.20$ ,  $r^2 = 0.994$ ; NISPE:  $y = 0.05 \times C_{AOH} - 0.64$ ,  $r^2 = 0.981$ ) utilizando MISPE y NISPE ( $V = 30$  mL en tampón fosfato  $50$  mmol  $L^{-1}$ , pH  $8.2$ ).

Se observó una excelente linealidad para ambas micotoxinas en el MIP ( $r^2 > 0.993$ ), con un factor de preconcentración de 10 veces y factores de impronta (IFs, del inglés *imprinting factors*) de 4.76 y 51.9 para ZON y AOH, respectivamente. Para evaluar la selectividad del método MISPE, los cartuchos se cargaron con disoluciones de 30 mL que contenían  $500 \mu g L^{-1}$  de AOH, AME, ZON,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL, TeA, OTA y RES en tampón fosfato ( $50$  mmol  $L^{-1}$ , pH  $8.2$ ) y se preconcentraron utilizando el método MISPE optimizado. Como se observa en la **Figura 29**, el cartucho MIP mostró una alta afinidad por AOH ( $R = 97\%$ ) y ZON ( $R = 92\%$ ), con una afinidad ligeramente menor por sus metabolitos correspondientes (AME,  $\alpha$ -ZOL y  $\beta$ -ZOL) pese a su similitud estructural. Las recuperaciones en el NIP fueron inferiores al 27% para todas las toxinas, independientemente de su hidrofobicidad (medida como  $\log P$ ).



**Figura 29.** Porcentaje de recuperación en el MISPE (barras rojas) y en el NISPE (barras azules) de AOH, ZON,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL, AME, OCRA, RES y TeA ( $V = 30$  mL en tampón fosfato  $50$  mmol  $L^{-1}$ , pH  $8.2$ ) añadidos a una concentración de  $500 \mu g L^{-1}$  para cada uno de los compuestos ensayados ( $RSD \leq 12\%$ ,  $n = 3$ ), junto con sus correspondientes valores de  $\log P$ .

### Determinación simultánea de ZON y AOH en muestras de aceite

Para comprobar la idoneidad del método en el análisis de AOH y ZON en muestras de aceite, se fortificó un aceite de maíz refinado, que no contenía ninguna de las toxinas en niveles superiores a los límites de detección del método, con AOH y ZON en el rango de 50 – 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , y se extrajo como se describe en la sección 2.3.5. Los cartuchos se cargaron con 9 mL del extracto de la muestra de aceite para aumentar el caudal de la muestra. No se observaron diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de calibrado medidas en la disolución tampón y en el extracto de aceite de maíz refinado, lo que indica que no hubo efecto de la matriz.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) en la matriz de aceite se calcularon según las recomendaciones de la ICH como 3 y 10 veces la relación S/N, respectivamente, para  $n \geq 7$  análisis repetidos cerca del LOD o del LOQ.<sup>127</sup> Los resultados se recogen en la **Tabla 12**. Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos utilizando detección por espectrometría de masas (**Tablas 3 y 4**), pero del mismo orden de magnitud que otros métodos cromatográficos que analizan una sola micotoxina con menor precisión. Los valores del límite de decisión ( $CC_{\alpha}$ ) y la capacidad de detección ( $CC_{\beta}$ ) también se incluyen en la **Tabla 12**. Los cartuchos se reutilizaron más de 100 veces sin perder sus propiedades de preconcentración.

**Tabla 12.** Límite máximo residual (LMR), linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), límite de decisión ( $CC_{\alpha}$ ) y capacidad de detección ( $CC_{\beta}$ ) para la validación del método de análisis de las micotoxinas objetivo.

Micotoxina	LMR en aceite de maíz ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Rango ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC_{\alpha}$ ( $\alpha = 0.05$ ) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC_{\beta}$ ( $\beta = 0.05$ ) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
AOH	-----	50 – 300	0.991	2	7	16	35
ZON	400	100 – 500	0.990	5	16	427	457

El método optimizado para analizar muestras de aceite de maíz se validó en términos de especificidad, linealidad y precisión (repetibilidad,  $RSD_r$ , y reproducibilidad dentro del laboratorio,  $RSD_R$ ) y los resultados se recogen en las **Tablas 12 y 13**. Para este fin, se fortificó aceite de maíz con cada micotoxina en tres niveles de concentración ( $n = 3$ ). Los valores de  $RSD_r$  se calcularon a partir de 3 medidas realizadas el mismo día, mientras que los valores de  $RSD_R$  se obtuvieron a partir de 15 medidas realizadas en tres días diferentes. Según la *Decisión de la Comisión 2002/657/CE* y siguiendo la ecuación de Horwitz-Thompson, los coeficientes de variación de los análisis repetidos de las muestras fortificadas no deben exceder el intervalo del 18 – 22% en el rango de concentración investigado.<sup>126,133</sup> Los valores experimentales de  $RSD_r$  y  $RSD_R$  se encuentran comprendidos entre el 1 y el 5% para AOH y entre el 1 y el 6% para ZON (**Tabla 13**). Por lo tanto, el método propuesto es lo suficientemente preciso para la aplicación prevista.

**Tabla 13.** Valores de repetibilidad ( $RSD_F$ ), precisión intermedia ( $RSD_R$ ) y relación del valor de cantidad recuperada ( $R_A$ ) para AOH y ZON en aceite de maíz refinado.

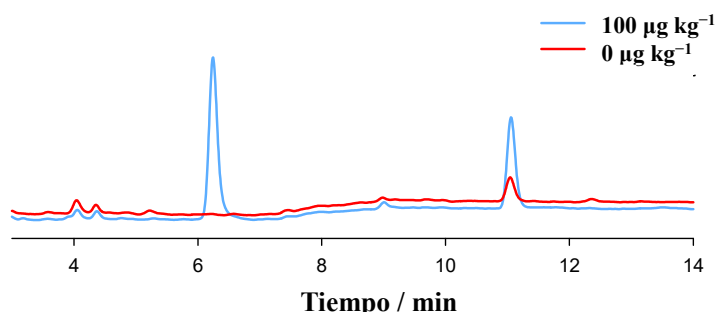
Micotoxina	Conc. añadida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. encontrada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$RSD_F$ (%) ( $n = 3$ )	$RSD_R$ (%) ( $n = 3$ )	$R_A$ (%)
AOH	50	46	2	2	92
	100	103	4	2	103
	150	170	3	3	113
	200	193	5	5	97
	250	254	3	1	102
	300	289	4	1	96
ZON	100	94	2	4	94
	200	188	4	6	94
	300	319	3	1	106
	400	398	4	1	100
	500	497	1	3	99

#### 2.4.4. Análisis de muestras

El método optimizado se aplicó para analizar muestras de aceite de maíz orgánico, aceite de oliva virgen y aceite de girasol. De acuerdo con la legislación de la UE, la cantidad máxima permitida de ZON en aceite de maíz refinado es de  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Se detectó la presencia de ZON en el aceite de maíz orgánico ( $45 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), y el resultado fue validado por HPLC-MS/MS (Tabla 14, Figura 30). Por otra parte, no se detectó la presencia de AOH en estas muestras.

**Tabla 14.** Análisis de micotoxinas en una muestra de aceite de maíz orgánico comercial ( $n = 3$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

Micotoxina	MISPE-HPLC-FLD			HPLC-MS/MS	
	Conc. añadida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. encontrada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSD (%)	Conc. encontrada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSD (%)
AOH	0	0	–	0	–
	100	$105 \pm 10$	5	$115 \pm 37$	13
ZON	0	$45 \pm 3$	3	$46 \pm 12$	10
	100	$136 \pm 10$	3	$150 \pm 46$	12



**Figura 30.** Cromatograma HPLC-FLD del extracto MISPE de una muestra de aceite de maíz infectada naturalmente por *Fusarium* (línea roja) y fortificada con AOH y ZON a una concentración de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (línea azul).

Se analizaron ocho tipos diferentes de aceites vegetales mediante HPLC-FLD. Los aceites que dieron positivo para micotoxinas fueron confirmados por HPLC-MS/MS, aunque no fue posible cuantificar la concentración de las micotoxinas debido a efectos de supresión. Según el documento *SANTE/12089/2016*, para confirmar la presencia de un analito utilizando HPLC-MS/MS, es necesario identificar al menos dos productos iónicos, y su relación en la disolución estándar debe concordar con la de las muestras con una variación de  $\pm 30\%$ .<sup>134</sup> Las concentraciones de AOH en las muestras se evaluaron utilizando el método optimizado (**Tabla 15**), y la presencia de la toxina fue confirmada por HPLC-MS/MS siguiendo la normativa mencionada.

**Tabla 15.** Análisis de micotoxinas en aceites de girasol y oliva ( $n = 3$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

Tipo de aceite	Micotoxina detectada	HPLC-MS/MS	MISPE-HPLC-FLD	RSD (%)
		Desviación de la relación iónica (%)	Conc. encontrada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
Girasol	AOH	-20	$21 \pm 2$	6
Oliva (orgánico)	AOH	-12	$28 \pm 2$	3
Oliva (virgen)	AOH	1	$24 \pm 1$	2

## 2.5. Conclusiones

El uso de cartuchos empaquetados con micropartículas porosas con impronta molecular, selectivas para AOH y ZON, ha posibilitado la extracción simultánea de ambas micotoxinas en muestras de aceite. Los polímeros se sintetizaron utilizando sucedáneos con estructura molecular semejante, diseñados para evitar falsos positivos causados por la extracción del analito durante el proceso MISPE, minimizar el manejo de las micotoxinas durante la preparación del polímero y reducir significativamente el coste de los MIPs. La aplicación de un diseño compuesto central ha permitido optimizar las etapas de MISPE para lograr una retención selectiva máxima de ambas micotoxinas en el MIP, mientras se reduce la unión no específica en el NIP.

Este enfoque ha hecho posible la extracción simultánea de ambas micotoxinas con excelentes recuperaciones y selectividad. Además, los MIPs mixtos ofrecen una alta capacidad de unión en muestras reales en comparación con el uso de MIPs preparados con varias moléculas plantilla. El método se ha validado de acuerdo con los criterios establecidos en la *Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE*<sup>126</sup> y se ha aplicado al análisis de aceites de maíz, oliva y girasol. Los resultados se compararon favorablemente con los obtenidos mediante un método basado en HPLC-MS/MS.



- **Determinación de ácido micofenólico mediante MIPs en formato nanogel**

## **2.6. Introducción**

El ácido micofenólico (MPA) es una micotoxina que posee además carácter inmunosupresor y se utiliza habitualmente como fármaco para evitar el rechazo de órganos trasplantados en combinación con otros principios activos para el mismo fin. Los niveles más elevados de esta micotoxina tienen lugar en uvas,<sup>49</sup> pero hasta la fecha no se han publicado LMRs en ningún alimento. Como se indicó en el capítulo 1, el atractivo de su determinación con MIPs en formato nanogel reside, fundamentalmente, en la rapidez del reconocimiento.

Dado que la síntesis de MIPs en formato nanogel es una técnica compleja que requiere un conocimiento especializado, a principios de mi segundo año de tesis realicé una estancia de investigación en el grupo *Génie Enzymatique et Cellulaire (GEC)*, liderado por el Prof. Karsten Haupt en la Universidad Tecnológica de Compiègne (UTC), uno de los grupos más reconocidos a nivel mundial en el ámbito de los MIPs y en particular, en su síntesis en formato nanogel.




## 2.7. Objetivos

El objetivo **general** de este trabajo es desarrollar un MIP en formato nanogel (MIP-NGs), sintetizado mediante técnicas de polimerización en fase sólida o por precipitación, que permita la detección y cuantificación rápida y selectiva de MPA, con la finalidad de aplicarlo en el análisis de muestras reales.

Los objetivos **específicos** incluyen:

- Evaluar la síntesis de MIPs en formato de nanogel mediante polimerización en fase sólida y por precipitación. Se busca optimizar ambas metodologías para lograr una estructura de MIP adecuada para la cuantificación precisa de MPA.

 - Caracterizar las propiedades de los MIPs en formato de nanogel. Determinar las propiedades fisicoquímicas, tales como tamaño, estabilidad y capacidad de reconocimiento, mediante técnicas avanzadas de caracterización, para asegurar la eficacia y selectividad en la detección de MPA.

- Optimizar estrategias de cuantificación basadas en MIPs en formato nanogel.

- Desarrollar y mejorar métodos de cuantificación específicos para MPA, evaluando distintos enfoques de detección y estableciendo la mejor metodología para el uso de estos MIPs en muestras reales.

## **2.8. Parte experimental**

### **2.8.1. Reactivos y materiales**

Los disolventes acetona, DMF, EtOH, MeOH, ACN y DMSO utilizados fueron de grado HPLC, todos adquiridos a Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.), y el agua ultrapura (tipo I) se obtuvo de un sistema Direct Q-3UV de Merck-Millipore (Bedford, MA, EE.UU.).

Entre los agentes de acoplamiento y activadores, se emplearon *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) al 99% de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), el clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropilo)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) al 98% de Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EE. UU.), 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES, 98%) de Alfa Aesar y *N*-hidroxisulfosuccinimida sódica (Sulfo-NHS) de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE. UU.).

En cuanto a los tampones, surfactantes y disoluciones de bloqueo, se emplearon una disolución salina de fosfato (PBS) y Tween-20 de Sigma-Aldrich; ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-sulfónico (HEPES) y ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), ambos también de Sigma-Aldrich; fosfato disódico dihidratado de Fluka (Buchs, Suiza), fosfato monosódico monohidratado con pureza del 98% de Sigma-Aldrich y el tampón de bloqueo de caseína en PBS de Thermo Fisher Scientific.

Para la síntesis de los polímeros, se utilizaron diversos monómeros como la *N*-fenilacrilamida (PAA, 99%, Sigma-Aldrich), *N*-isopropilacrilamida (NIPAM, 97%, Sigma-Aldrich), *N*-*terc*-butilacrilamida (TBAM, 97%, Acros Organics), *N,N'*-etilenbis(acrilamida) (EbAm, 99%, Alfa Aesar), y *N*-alil-4-(4'-metilpiperazinil)-1,8-naftalimida (AMPN) de síntesis propia. Además, se emplearon el entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol (EDMA, 98%) de Merck (Darmstadt, Alemania), la tetrametiletilendiamina (TEMED) al 99% de Alfa Aesar, y el iniciador de polimerización persulfato de potasio (KPS) de Acros. Como soporte sólido en la síntesis se utilizaron bolas de vidrio (glass beads, GBs) de 0.1 mm de diámetro de BioSpec. También se empleó cloruro de metacriloxietil tiocarbamoil rodamina B (RhB), de Polysciences. Finalmente, el analito objetivo, el ácido micofenólico (MPA, 98%), se adquirió de Thermo Fisher Scientific.

### **2.8.2. Equipos**

Se empleó una bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson), junto con una columna de vidrio con camisa termostatizable modelo XK26/40 (26 mm × 400 mm) y adaptadores XK26, ambos de Cytiva. El circulador termostático utilizado fue un Polystat 5 de Bioblock Scientific. Además, se usó un incubador con agitación modelo KS 4000 i control de IKA. Para medir la absorción UV-vis se empleó un espectrofotómetro Varian Cary 3-Bio, mientras que el sistema de cromatografía HPLC-UV fue un cromatógrafo de alto rendimiento modelo HP-1100 de Agilent Technologies.

### 2.8.3. Síntesis de MIPs-NGs

#### Síntesis en fase sólida

La síntesis de nanogeles en fase sólida consiste en la inmovilización de la molécula plantilla sobre un soporte de vidrio de tamaño de poro controlado (GB), la reacción de polimerización radicalica se controla mediante la duración de la exposición a la luz UV o la temperatura aplicada. Típicamente los nanogeles contienen 1-2 sitios de unión por partícula (90-100 kDa) y presentan buenas afinidades por el analito. El proceso de síntesis puede automatizarse lo que facilita la producción a gran escala.

#### MIP no fluorescente

La síntesis de MIPs en fase sólida se realizó en siete pasos principales:

- *Paso 1. Activación de las GBs*

Se pesaron 100 g de GBs en un matraz de fondo redondo, y se añadieron cuidadosamente 100 mL de una disolución acuosa 4 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. La mezcla se calentó a 138 °C durante 10 min en un baño de silicona. Después, las GBs se filtraron en Büchner y se lavaron con abundante agua pura hasta pH neutro, verificado con papel indicador, y se lavaron finalmente dos veces con acetona. El papel de filtro con las GBs-OH resultantes se colocó en una placa Petri y se introdujo en una estufa a 50 °C durante toda la noche.

- *Paso 2. Silanización de las GBs-OH*

Se pesaron 50 g de GBs-OH en una placa Petri de vidrio (almacenando el resto en refrigeración) y se suspendieron en 50 mL de tolueno anhidro. A continuación, se añadió 1 mL de APTES y se dejó reaccionar la mezcla durante toda la noche, cubierta con papel de aluminio. Al día siguiente, las GBs aminadas se filtraron, se lavaron tres veces con acetona y se secaron nuevamente a 50 °C durante la noche.

- *Paso 3. Inmovilización del analito sobre las GBs aminadas*

En un vial de 24 mL se disolvieron 12 mg de MPA en 12 mL de DMF y se añadieron 63.8 mg de DCC para activar el grupo carboxilo. Seguidamente, se incorporaron 20 g de GBs aminadas, y la mezcla se mantuvo en agitación orbital durante toda la noche. Tras esta etapa, las GBs-MPA se filtraron, se lavaron con agua pura y se empaquetaron directamente en la columna.

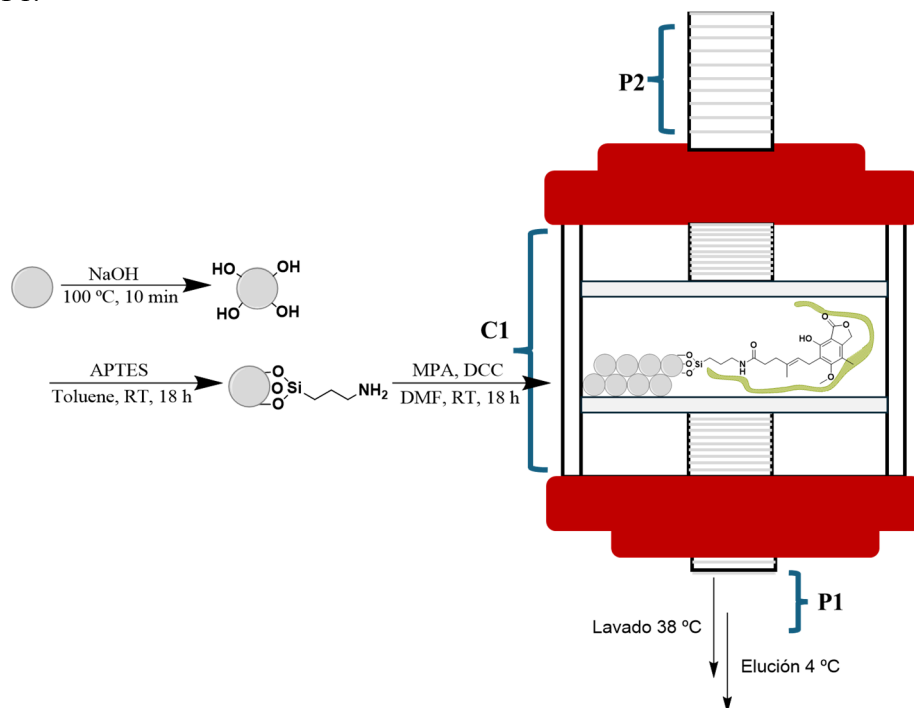
- *Paso 4. Montaje, empaquetamiento y acondicionamiento de la columna*

Antes del empaquetado, se verificó la conexión de los capilares, así como la ausencia de fugas y de aire dentro del sistema. Para comprobar la correcta conexión de los capilares y detectar posibles fugas, se hizo circular agua a través de cada capilar de manera independiente utilizando una bomba peristáltica.

Para garantizar la ausencia de aire en la columna (**Figura 31**), se sostuvo el pistón P1 con una pinza metálica en posición vertical, mientras se hizo pasar agua a través del sistema. Durante esta circulación, se insertó primero el filtro de mayor tamaño de poro y, a continuación, el de menor tamaño de poro que suministra el fabricante de la columna. Una vez colocados los filtros, se enroscó firmemente la pieza C1 y se ajustó la pieza de sujeción negra. Para asegurar que no quedaron burbujas atrapadas en los filtros, se añadió agua por la parte superior de C1 y se vació utilizando el modo de flujo rápido de la bomba peristáltica.

Completada esta verificación, se procedió al empaquetado de la columna, introduciendo las GBs-MPA y arrastrando cualquier residuo con agua pura. Se dejó aproximadamente una columna de agua de 2 cm por encima de las GBs-MPA para facilitar la colocación del pistón P2 sin generar burbujas de aire. La instalación de P2 siguió el mismo procedimiento que P1, colocándolo de forma que quedara aproximadamente 1 cm por encima de las GBs-MPA.

Finalmente, la columna montada y empaquetada se acondicionó utilizando 20 mL de la disolución tampón específica para la síntesis (en este caso, se empleó una disolución de fosfato de 25 mmol L<sup>-1</sup> a pH 7). El flujo de la disolución a través de la columna se estableció de arriba hacia abajo, colocando el capilar de entrada en P2 y el de salida en P1.



**Figura 31.** Esquema del proceso de funcionalización de las bolas de vidrio (GBs) con la molécula plantilla (GBs-MPA) y su posterior empaquetado en la columna de vidrio con camisa termostatzada (C1). Los pistones P1 y P2 ajustan el espacio en la columna, facilitando la formación del MIP en formato nanogel sobre las GBs-MPA mediante la técnica de polimerización en fase sólida.

- *Paso 5. Polimerización*

En primer lugar, se preparó una disolución del monómero funcional principal en 20 mL del tampón previamente indicado, dentro de un matraz Erlenmeyer. En este caso, se utilizaron 7.35 mg de PAA, diluidos previamente en 1 mL de EtOH, representando un 5% del total de monómeros. Antes de añadir el PAA, el capilar de entrada se purgó durante 3 s, invirtiendo la dirección del flujo. Este procedimiento de purga se repitió cada vez que se realizaba un cambio de disolución.

Con el capilar de entrada sumergido en la disolución y el de salida colocado en el mismo Erlenmeyer (sin sumergirlo), el cuello del matraz se selló con Parafilm, activando el flujo con la disolución de PAA durante 1 h. Mientras tanto se diluyeron, según su solubilidad, los demás monómeros en tubos Eppendorf por separado: 90.56 mg (0.81 mmol, 80% del total de monómeros en peso) de NIPAM en 1 mL de tampón, 6.34 mg (0.05 mmol, 5%) de TBAM en 1 mL de EtOH y 15.42 mg (0.1 mmol, 10%) de EbAm en 1 mL de tampón. Por otra parte, se prepararon disoluciones del iniciador y del catalizador justo antes de su incorporación: 13 mg (0.05 mmol) de KPS en 0.5 mL de tampón y 70  $\mu$ L (4.7 nmol) de una disolución de TEMED preparada con 10.0  $\mu$ L de esta amina en 1.0 mL de tampón.

Una vez transcurrida el tiempo de recirculación con el monómero principal, la bomba se detuvo y se añadieron el resto de los monómeros en el mismo Erlenmeyer. Los capilares se mantuvieron sumergidos en la disolución para evitar la entrada de aire. Después, el matraz Erlenmeyer que contenía la mezcla de monómeros, sellado con Parafilm a modo de septum, se desgasificó durante 20 min mediante una corriente de N<sub>2</sub> utilizando para ello una aguja hipodérmica sumergida en la disolución para introducir el gas y una punta de micropipeta perforando el Parafilm para permitir la salida de aire.

Mientras se realizaba la desgasificación, se conectó el refrigerante de la columna al recirculador termostático. Una vez completada la desoxigenación, se incorporaron rápidamente el iniciador y el catalizador a la mezcla desgasificada. El capilar de salida se colocó en un recipiente de desechos, mientras que el capilar de entrada permaneció sumergido en la mezcla. Se purgó nuevamente el capilar de entrada durante 3 s y se introdujo casi toda la mezcla de monómeros, dejando una mínima cantidad para prevenir la entrada de aire en el sistema.

Con la mezcla de monómeros en la columna, se retiraron los capilares de la bomba peristáltica y se bloquearon utilizando puntas de micropipeta reforzadas con Parafilm. Se ajustó el baño termostático a 38 °C, protegiendo la columna con papel de aluminio, y la polimerización se llevó a cabo durante toda la noche.

- *Paso 6. Lavado*

Para eliminar las interacciones no específicas de la columna y manteniendo la temperatura constante en el refrigerante, se calentaron en un baño termostático a 39 °C aproximadamente 50 mL de la disolución tampón junto con 400 mL de agua pura. Estos volúmenes se pasaron a través de la columna en el orden indicado (i.e. primero el tampón y luego el agua pura).

La disolución que procedía del capilar de salida se recogió en tubos cónicos de centrífuga de 50 mL. Aunque los volúmenes de lavado fueron previamente establecidos, se verificó la completa eliminación de los restos de polímero en las fracciones finales. Esta ausencia se confirmó agitando el tubo de centrífuga: la formación de burbujas indica la presencia de nanogeles, mientras que su ausencia confirma un lavado exitoso.



- *Paso 7. Elución*

Para comenzar la elución, se desconectó el refrigerante del baño termostático y se bloquearon los capilares de acuerdo con el procedimiento descrito más arriba. A continuación, la columna con el MIP se colocó en una habitación fría a 4 °C durante 1 h. Después de este tiempo, se realizó la elución del polímero utilizando agua pura, también enfriada previamente a 4 °C. Las fracciones de la elución se recogieron en tubos de centrífuga de 12 mL, descartando las primeras 10 gotas ya que solo contenían agua residual del capilar. Seguidamente se recogieron dos tubos con aproximadamente 10 mL de eluyente cada uno: el primer tubo contenía el MIP de alta afinidad, mientras que el segundo incluía el MIP de baja afinidad. Además, se recogieron dos fracciones adicionales del mismo volumen para su caracterización posterior. El polímero sintetizado se almacenó a 4 °C para evitar posibles agregados.

Para calcular el rendimiento de la síntesis, se tomaron 2 mL de cada fracción y se liofilizaron en viales previamente pesados. Este polímero seco podría reconstituirse en agua siempre que sus características lo permitan; desgraciadamente, esto puede saberse *a posteriori* de manera experimental.

En algunos casos, las columnas pueden reutilizarse con la misma composición de polímero. Para ello, se lavan con unos 600 mL de agua pura a temperatura ambiente, se acondicionan con el tampón específico y se repite el proceso de polimerización descrito más arriba.

Finalmente, para asegurar la limpieza y el mantenimiento de la columna una vez finalizada la síntesis, cada una de las piezas de la columna se limpió cuidadosamente con un poco de etanol y abundante agua. Los capilares se conectaron a la bomba peristáltica para un lavado en dos etapas: primero se pasaron 150 mL de agua pura calentada a 50 °C en un baño y, a continuación, 50 mL de agua pura a temperatura ambiente.

### MIP fluorescente (con co-monómero fluorescente)

El MIP fluorescente (**MIP01**) se sintetizó de manera análoga al procedimiento descrito más arriba, añadiendo 1.7 mg (2.6  $\mu\text{mol}$ ) de la RhB (ver sección **2.8.1**) a la mezcla de prepolimerización.

### Síntesis por precipitación

#### MIP fluorescente (con monómero fluorescente de reconocimiento)

Para la síntesis del MIP por precipitación (**MIP02**) se disolvieron 0.05 mmol de MPA, 0.05 mmol de AMPN, 0.1 mmol de PAA y 1 mmol de EDMA en 4 mL de DMSO en un vial de 7.5 mL. A continuación, se añadió 0.02 mmol de 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrilo) (ABDV) como iniciador, lo que equivale al 1% de la cantidad de dobles enlaces de los monómeros (calculado multiplicando los mmol de cada monómero por el número de dobles enlaces que contienen). La mezcla resultante se purgó con  $\text{N}_2$  durante 10 min antes de iniciar la polimerización, que se llevó a cabo en un baño termostático a 45 °C durante toda la noche. Simultáneamente, se sintetizó un polímero sin impronta molecular (NIP).

Una vez completada la polimerización, se retiró el sobrenadante y el polímero se lavó sucesivamente según el siguiente protocolo: dos lavados con 20 mL de una disolución de amoníaco a 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  en una mezcla MeOH-agua (1:1 v/v), dos lavados con agua pura y, finalmente, tres lavados con 20 mL de MeOH cada uno. En cada lavado, el polímero se incubó con el disolvente a 60 °C durante 10 min y luego se centrifugó a 40000 g durante 30 min. Finalmente, el polímero lavado se secó a vacío durante toda la noche para su conservación y análisis posterior.

A modo de resumen, la **Tabla 16** muestra la composición de los MIPs utilizados para el análisis de MPA.

**Tabla 16.** Tabla comparativa de los polímeros sintetizados para la detección de MPA.

	Tipo de polimerización	Monómeros principales	Monómero entrecruzante	Iniciador	Disolvente
<b>MIP01</b>	En fase sólida	PAA (0.05 mmol), NIPAM (0.81 mmol), TBAM (0.05 mmol) y RhB	EbAm (0.1 mmol)	KPS (0.05 mmol) y TEMED (4.7 mmol)	PB (25 mmol $\text{L}^{-1}$ a pH 7)
<b>MIP02</b>	Por precipitación	PAA (0.1 mmol) y AMPN (0.05 mmol)	EDMA (1 mmol)	ABDV (0.02 mmol)	DMSO

PAA: *N*-fenilacrilamida, NIPAM: *N*-isopropilacrilamida, TBAM: *N*-*terc*-butilacrilamida, RhB: cloruro de metacriloxietil tiocarbamoil rodamina B, EbAm: *N,N'*-etilenbis(acrilamida), KPS: persulfato de potasio, TEMED: tetrametiletildiamina, PB: disolución de tampón fosfato, AMPN: *N*-alil-4-(4'-metil-piperazinil)-1,8-naftalimida, EDMA: dimetacrilato de etilenglicol, ABDV: 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrilo), DMSO: dimetilsulfóxido.

## **2.8.4. Caracterización y funcionalización de materiales**

### **DLS de los MIP-NGs sintetizados en fase sólida**

Los MIPs sintetizados en fase sólida se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Para determinar el tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersidad (PDI) de los MIP-NGs, se utilizó una cubeta desechable de poliestireno de cuatro caras transparentes con capacidad de 2.5 mL, la cual se llenó con 1 mL de muestra. Cada medida se repitió al menos 5 veces para asegurar la suficiente precisión de los resultados.

Por otro lado, el potencial zeta se midió utilizando una celda de dispersión electroforética desechable, con una capacidad total de 1 mL. En este caso, se introdujeron 0.75 mL de la suspensión coloidal en la celda, agregándola lentamente a través de uno de los canales con una jeringa, con el fin de evitar la entrada de aire. Esta medida se repitió 10 veces para garantizar la fiabilidad de los datos obtenidos.

Ambas medidas se realizaron a 38.0 °C utilizando el equipo Zeta-sizer NanoZS de Malvern Instruments. Los datos se analizaron con el paquete de software ZS Xplorer.

### **Cuantificación indirecta de las moléculas de MPA unidas a las GBs**

Para la cuantificación indirecta de las moléculas de MPA unidas a las GBs, se empleó un método colorimétrico basado en la cuantificación de los grupos amino antes y después de la inmovilización del MPA. El colorante utilizado fue el Orange II. El procedimiento descrito a continuación se aplicó a las GBs-OH, GBs aminadas y GBs-MPA.

En primer lugar, se prepararon las disoluciones necesarias para el experimento. Estas incluyeron 1 L de agua a pH 3, ajustada con 1.0 mol L<sup>-1</sup> de HCl, 1 L de agua a pH 12, ajustada con 1.0 mol L<sup>-1</sup> de NaOH y una disolución madre de Orange II a 10 mmol L<sup>-1</sup> en agua a pH 12.

A continuación, se pesaron 250 mg de cada muestra de GBs por triplicado en viales de vidrio de 5 mL. Se añadió 1 mL de la disolución madre de Orange II a cada réplica y se incubaron las partículas a 40 °C durante 40 min bajo agitación magnética. Tras la incubación, las muestras se lavaron cinco veces (hasta que no se observó color naranja en el sobrenadante) con 3 mL de agua a pH 3. Seguidamente, las muestras se secaron en una estufa a 60 °C durante 2 h.

Posteriormente, se añadieron 2 mL de agua a pH 12 a cada muestra. Un volumen igual de cada disolución se transfirió a viales nuevos, a los cuales se incorporaron 60 µL de HCl 1.0 mol L<sup>-1</sup> para ajustar el pH de la disolución a 3.0 (verificado con papel indicador de pH). Finalmente, se midió la absorbancia de cada muestra a 485 nm. Para la cuantificación, se elaboró una curva de calibrado utilizando la disolución madre de

### *Determinación de MPA mediante MIPs en formato nanogel*

Orange II con concentraciones que variaron entre 0.5 y 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  en agua a pH 3.0.

Basándose en la diferente absorción de las muestras (proporcional a la cantidad de grupos amino libres), se calculó indirectamente la cantidad de MPA en  $\mu\text{mol}$  por cada 20 g de GBs, que corresponde a la cantidad utilizada en cada columna de síntesis en fase sólida.

### **Conjugación de mBs aminadas al MPA**

Las mBs aminadas (Dynabeads<sup>®</sup> M-270 de Invitrogen) se suspendieron mediante agitación en vórtex durante al menos 30 min. Se tomó una alícuota de 66.7  $\mu\text{L}$  (equivalente a 2 mg de partículas) y se transfirió a un tubo Eppendorf. Con la ayuda de un imán de alto campo, las partículas se adhirieron completamente a la pared imantada tras 3 min de espera y se eliminó el buffer de almacenamiento. A continuación, se lavaron tres veces con 500  $\mu\text{L}$  de tampón MES (100  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Las mBs aminadas se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de tampón MES y se añadieron 0.8  $\mu\text{mol}$  de MPA, 16.8  $\mu\text{mol}$  de EDC y 35  $\mu\text{mol}$  de sulfo-NHS, alcanzando un volumen final de 1 mL de tampón MES. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 18 h a 1000 rpm en un agitador orbital.

Transcurrido este periodo de incubación, las partículas se lavaron tres veces con 500  $\mu\text{L}$  de MES (100  $\text{mmol L}^{-1}$ ) y, a continuación, se dividió el contenido del tubo Eppendorf en dos partes iguales (250  $\mu\text{L}$  por tubo Eppendorf, equivalente a 1 mg de mBs) para evaluar el efecto del bloqueo en uno de los lotes y determinar si mejoraba el rendimiento del ensayo.

Para obtener las mBs-MPA bloqueadas, se tomó uno de los tubos Eppendorf y se lavó dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de tampón de caseína en PBS. A continuación, se realizó el bloqueo con 500  $\mu\text{L}$  de tampón de caseína a temperatura ambiente durante 1 h, con agitación a 1000 rpm. Posteriormente, las partículas se lavaron tres veces con 500  $\mu\text{L}$  de dicho tampón y se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  del mismo, alcanzando una concentración final de 5  $\text{mg mL}^{-1}$ . El otro lote de mBs-MPA se lavó dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de PBST (1  $\text{mol L}^{-1}$  con 0.05% de Tween-20) y las partículas se suspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de PBST, obteniendo igualmente una concentración final de 5  $\text{mg mL}^{-1}$ . Las dos suspensiones se almacenaron a 4 °C.

### **2.8.5. Ensayos de reconocimiento de MPA por los MIPs**

#### **Ensayos de fluorescencia con el MIP01**

Inicialmente se elaboró una curva de calibrado del MIP fluorescente en el rango de 0 – 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Las medidas de fluorescencia se realizaron en un lector de placas BMG LABTECH CLARIOstar donde se fijó una  $\lambda_{\text{exc}}$  de 540 nm y una  $\lambda_{\text{em}}$  de 577 nm.

Para evaluar la capacidad de unión del MIP al analito, los ensayos se llevaron a cabo con GBs-MPA o mBs-MPA en 1 mL de la disolución indicada en cada caso.

- **Ensayos con GBs-MPA**

Todas las incubaciones se realizaron en PB (25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7) a 38 °C durante 1 h. Tras cada incubación, se midió la fluorescencia del sobrenadante para cuantificar la cantidad de MIP no unido.

En el *primer ensayo*, se incubaron 25 mg de GBs-MPA (equivalentes a 16 nmol de MPA inmovilizado) con diferentes concentraciones de MIP, en el rango de 50 – 300 µg mL<sup>-1</sup>.

En el *segundo experimento*, se estableció la concentración de MIP en 200 µg mL<sup>-1</sup> y se varió la cantidad de GBs-MPA entre 5 y 100 mg. Se incluyeron 25 mg de GBs aminadas como control.

En un *tercer ensayo*, se incubaron 200 µg mL<sup>-1</sup> de MIP con 25 mg de GBs-MPA. Tras la primera incubación, se retiró el sobrenadante y se analizó su fluorescencia. A continuación, las GBs-MPA con MIP adherido se lavaron con dicho disolvente a 38 °C. Finalmente, se añadieron concentraciones de MPA libre en el rango de 0 a 1000 nmol L<sup>-1</sup> y se incubaron nuevamente a 38 °C durante 1 h.

El *cuarto ensayo* fue de tipo competitivo. Se colocaron 25 mg de GBs-MPA (equivalentes a 16000 nmol L<sup>-1</sup>) en un vial junto con distintas concentraciones de MPA libre (0.01, 1, 10, 100 y 1000 nmol L<sup>-1</sup>) y, posteriormente, se añadieron diversas concentraciones de MIP (20, 100 y 200 µg mL<sup>-1</sup>). A diferencia de los ensayos previos, en este caso se midió la fluorescencia del sólido, es decir, del MIP unido a las GBs-MPA.

- **Ensayos con mBs-MPA**

En primer lugar, se optimizó la cantidad de mBs-MPA sin bloquear y la concentración de MIP. Para ello, se utilizaron 6 y 13 µg de estas partículas y se evaluaron concentraciones de 2, 10, 20 y 50 µg mL<sup>-1</sup> de MIP en PB (25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7). La concentración de analito libre para la competición fue de 2 µg mL<sup>-1</sup>. En este ensayo, se midió la fluorescencia del sólido.

A continuación, se estudiaron 6 µg de mBs-MPA no bloqueadas y bloqueadas con caseína, usando 2 µg mL<sup>-1</sup> de MPA libre y concentraciones de 2 y 10 µg mL<sup>-1</sup> de MIP.

En un tercer experimento, se evaluaron cuatro disoluciones tamponadas diferentes a una concentración de 25 mmol L<sup>-1</sup> para incubaciones con 6 µg de mBs-MPA bloqueadas con la disolución de caseína. Para 10 µg mL<sup>-1</sup> de MIP, se emplearon como medio de incubación disoluciones tampones de PB, PBST (con 0.05% de Tween-20), HEPES y MES, todos a una concentración de 25 mmol L<sup>-1</sup> y pH 7.

Finalmente, se realizó un ensayo competitivo en las condiciones seleccionadas en los estudios anteriores, variando la concentración de MPA libre en 0, 0.2 y 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## Ensayos de fluorescencia con el MIP02

Antes del inicio de los ensayos, se obtuvo un espectro de excitación y emisión de una disolución de polímero de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en DMSO, utilizando un espectrómetro Horiba Fluoromax-4TCSPC. El máximo de excitación se encontró en 390 nm y el de emisión en 505 nm.

Para evaluar la interacción del MIP y NIP con MPA, ambos a una concentración de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , se emplearon diversos disolventes, cubriendo un rango de concentración de MPA de 0 a 750  $\text{ng mL}^{-1}$  y un tiempo de incubación de 1 h. Los disolventes evaluados incluyeron ACN y mezclas de ACN-agua (en proporciones de 90:10, 75:25 y 95:5 v/v).

Además, se investigaron tiempos de incubación de 0, 5, 15 y 60 min en ACN-agua (90:10 v/v) con MPA a 250  $\text{ng mL}^{-1}$  y también se evaluaron concentraciones de 0 a 750  $\text{ng mL}^{-1}$  de interferentes como el glucurónido de ácido micofenólico (MPAG) y el glucurónido de ácido acil-micofenólico (acil-MPAG) en ACN-agua (95:5 v/v).

## 2.9. Resultados y discusión

### 2.9.1. Estrategias de síntesis y caracterización de los MIP-NGs

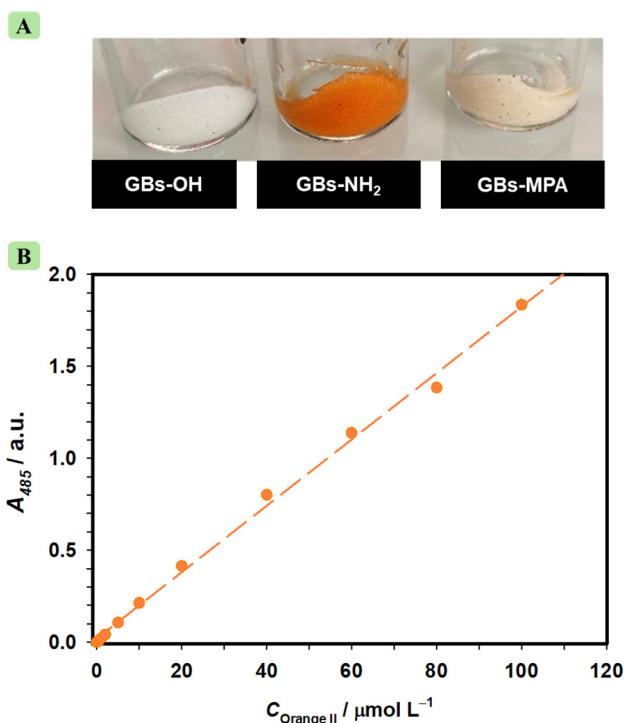
Para llevar a cabo la polimerización en fase sólida, se comenzó optimizando la composición de la mezcla de prepolimerización mediante la evaluación de distintas concentraciones de monómeros e iniciadores. Finalmente, se seleccionó una composición específica para el MIP basada en las características de cada monómero: se eligió PAA para proporcionar interacciones  $\pi$ - $\pi$  con el MPA, TBAM para interacciones hidrofóbicas, NIPAM para proporcionar un polímero de termorrespuesta que reconozca únicamente a 38 °C (temperatura en la cual el nanogel adquiere la morfología adecuada para el reconocimiento del analito) y EbAm para alcanzar un bajo nivel de entrecruzamiento.

En el caso del **MIP01**, se incorporó RhB, ya que cuenta con unas propiedades físicas y ópticas compatibles con el método de detección previsto. Este colorante es estable en las condiciones de medida, presenta una buena solubilidad y emite en la región verde del espectro visible, lo que facilita la detección. La proporción de monómeros utilizada se basó en la experiencia previa del grupo con composiciones similares.<sup>15</sup> La inclusión de NIPAM como monómero de termorrespuesta proporciona una mayor homogeneidad al material final, ya que el control de temperatura permite realizar lavados y eluciones eficientes del polímero. El ciclo activo de 1 h en el *paso 5* de la polimerización en fase sólida se lleva a cabo con

el monómero que se espera que ofrezca la interacción más fuerte o específica. En esta etapa, la interacción con el ácido no se considera, ya que el grupo carboxilo se utiliza para anclar la plantilla al soporte sólido. Aunque el uso de disolventes orgánicos podría mejorar la robustez de las interacciones, estos no son compatibles con el material de la columna, por lo que se trabaja siempre en medio acuoso. Cabe destacar que, en este proceso de polimerización, no es necesario un protocolo de extracción para la molécula plantilla, ya que esta permanece adherida a las GBs, orientando los sitios de reconocimiento y aumentando así la sensibilidad y tiempo de respuesta del polímero al analito.

La **Figura 31** muestra un esquema del proceso de síntesis para los MIPs de tipo nanogel obtenidos en fase sólida. Las dos primeras etapas de funcionalización fueron optimizadas previamente en el grupo del Prof. K. Haupt.<sup>15</sup> La cuantificación indirecta del MPA inmovilizado sobre las GBs aminadas se realizó mediante un ensayo colorimétrico con Orange II, un colorante aniónico que, a pH 3, se une electrostáticamente a los grupos amino primarios disponibles en la superficie del soporte sólido tras una funcionalización.<sup>135</sup> De esta forma, fue posible determinar la cantidad de MPA unido a las GBs tras la inmovilización. La **Figura 32A** ilustra visualmente la disponibilidad de grupos amino en cada muestra; una mayor concentración de grupos amino conduce a una coloración naranja más intensa tras la adsorción del Orange II. Cambiando el pH a 12, desaparece la interacción electrostática entre los grupos amino y el grupo sulfonato del Orange II, liberando el colorante a la disolución. La concentración de Orange II se calcula entonces, tras ajustar a 3 el pH de las disoluciones, midiendo la absorción de las disoluciones a 485 nm e interpolando los datos a la curva de calibrado obtenida que aparece en la **Figura 32B** ( $A = 0.018 \times C_{\text{OrangeII}} + 0.019$ ,  $r^2 = 1.0$ ). Para controlar las interacciones no específicas, se incluyó una muestra de GBs-OH. Como resultado, se determinó que había  $(13.2 \pm 7\%)$   $\mu\text{mol}$  de grupos amino por cada 20 g de GBs. Al comparar este valor con el de las GBs-MPA, se concluyó que había  $(12.9 \pm 5\%)$   $\mu\text{mol}$  de MPA inmovilizado por cada 20 g de GBs, equivalentes a 0.2 mg de MPA por gramo de GBs. Estos resultados son consistentes con datos previos de nuestro grupo en cuanto a la cantidad de grupos amino obtenidos en GBs aminadas con APTES.





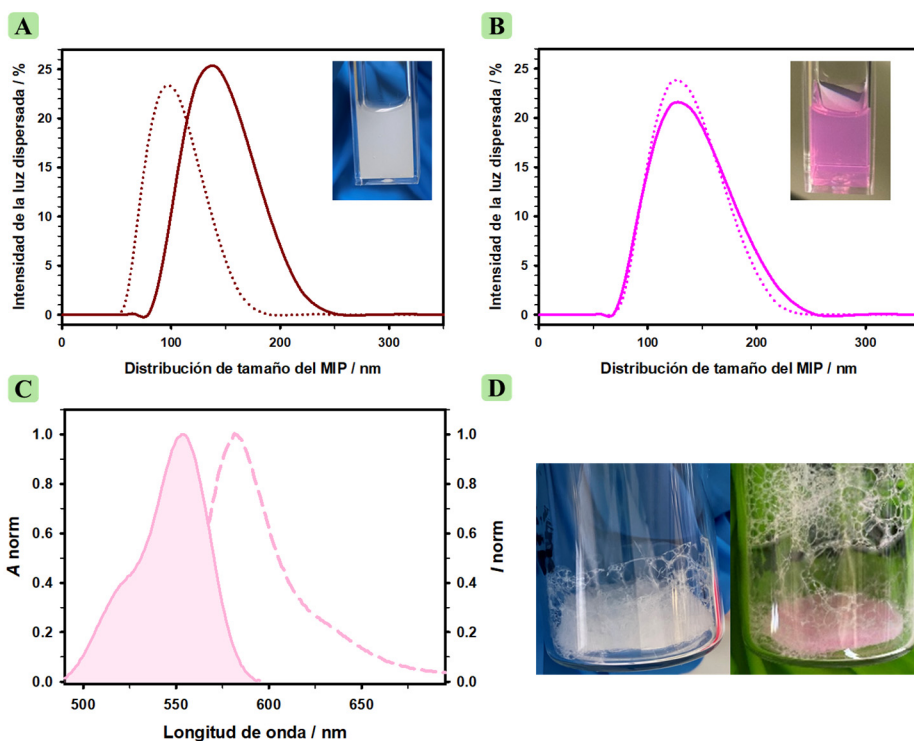
**Figura 32.** A) Imagen comparativa de las GBs-OH, GBs-NH<sub>2</sub> y GBs-MPA tras la adsorción de Orange II. La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad de grupos amino libres superficiales presentes en cada muestra. B) Recta de calibrado ( $A = 0.018 \times C_{\text{Orange II}} + 0.019$ ;  $r^2 = 1.0$ ) del colorante Orange II adsorbido electrostáticamente a pH 3 en partículas aminadas, obtenida por medida de la absorción de luz a 485 nm en agua a pH 3 tras desorción del indicador, utilizada para la cuantificación de los grupos amino en las GBs funcionalizadas.

Una vez realizada la polimerización, se determinó el tamaño de los nanogeles obtenidos mediante la técnica DLS. La **Figura 33A–B** muestran las distribuciones de tamaño de las primeras fracciones recolectadas (fracciones de alta afinidad) en cada síntesis. La línea continua de la **Figura 33A** corresponde al primer lote del MIP no fluorescente, mientras que la línea punteada representa un segundo lote del mismo MIP, reutilizando la columna ya empaquetada. En la **Figura 33B** se observa la curva de intensidad de luz dispersada por el MIP fluorescente sintetizado en el grupo del Prof. K. Haupt (línea continua) junto con la del mismo MIP sintetizado en la Universidad Complutense de Madrid (línea punteada), para evaluar la reproducibilidad entre lotes. En todos los casos se observó un bajo PDI, lo que indica una alta homogeneidad entre los MIPs sintetizados. Por otro lado, la **Figura 33C** detalla las características espectroscópicas del MIP fluorescente, con un máximo de absorción a 540 nm y de emisión a 577 nm.

El rendimiento de la polimerización fue satisfactorio, obteniendo 1.83 mg mL<sup>-1</sup> en el primer lote del MIP no fluorescente, 1.38 mg mL<sup>-1</sup> en el primer lote del MIP fluorescente y 2.21 mg mL<sup>-1</sup> en el segundo lote del MIP fluorescente (**Figura 33D**). Cabe destacar que el MIP incoloro y el segundo lote del mismo MIP preparado

utilizando la misma columna, mostraron diferencias significativas en tamaño. La primera fracción recolectada presentó un tamaño medio de 140 nm y la segunda de 100 nm, lo cual sugiere la necesidad de optimizar el proceso de limpieza para la reutilización de la columna. En cuanto a los lotes del MIP fluorescente, ambos presentaron tamaños similares (136 y 130 nm), confirmando la reproducibilidad de su síntesis.

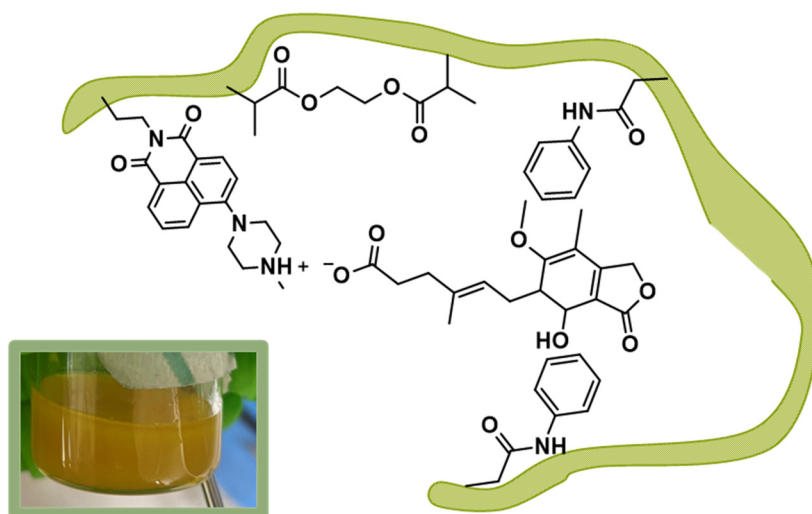
Finalmente, considerando el margen de error del potencial zeta ( $\pm 10$  mV), todos los lotes mostraron un potencial zeta cercano a 0. Este valor sugiere una alta probabilidad de agregación a lo largo del tiempo, aunque la carga superficial neutra reduce las interacciones no específicas con componentes biológicos, lo que sería beneficioso en aplicaciones biomédicas.



**Figura 33.** Caracterización mediante dispersión de luz (A, B) y espectroscopía UV-vis (C) de los MIPs obtenidos en formato nanogel: A) Primer lote de MIP no fluorescente (línea continua) y segundo lote preparado reutilizando el empaquetamiento de la columna con GBs-MPA (línea discontinua). B) MIP fluorescente (MIP01) sintetizado en el grupo del Prof. K. Haupt (línea continua) y el mismo MIP sintetizado en el grupo GSOLFA (línea punteada). Las imágenes en la esquina superior derecha de cada gráfico muestran el aspecto del MIP correspondiente en suspensión. C) Espectros de absorción y emisión del MIP fluorescente suspendido en agua. D) Imágenes de los MIPs tras liofilización utilizados para la cuantificación del rendimiento de polimerización: MIP no fluorescente (izquierda) y MIP fluorescente (derecha).

Como alternativa a la síntesis en columna, se preparó un nanogel mediante **polimerización por precipitación (MIP02)**. Para ello, se emplearon las proporciones de monómeros descritas en la metodología, basándonos en la

experiencia del grupo. Esta técnica ofrece ciertas ventajas, como la posibilidad de utilizar el grupo ácido carboxílico de la molécula plantilla como un punto adicional de interacción, el empleo de disolventes orgánicos en la polimerización y un proceso de síntesis más rápido (permitiendo sintetizar el MIP y el NIP de manera simultánea). Sin embargo, el proceso de lavado en esta técnica es más complejo y la homogeneidad del polímero se reduce notablemente. La **Figura 34** muestra la composición del polímero sintetizado por precipitación para el reconocimiento de MPA y su interacción con los demás componentes. En este estudio, se empleó AMPN, un monómero funcional derivado de la naftalimida. Esta molécula actuaría como una base al extraer el protón del grupo ácido carboxílico del MPA, lo que reduciría la disponibilidad del nitrógeno para ceder electrones. Como consecuencia, se inhibiría la transferencia de electrones fotoinducida (PET), el mecanismo responsable de la desactivación de la fluorescencia.<sup>136</sup> Además, se emplearon PAA para interacciones  $\pi$ - $\pi$  y EDMA como agente entrecruzante.



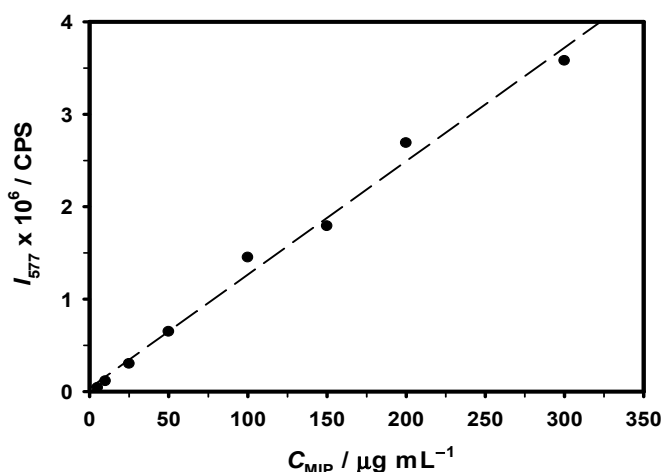
**Figura 34.** Esquema de las interacciones esperadas entre el MPA y el monómero AMPN durante la síntesis del polímero por precipitación (MIP02) en DMSO. En la esquina inferior izquierda se muestra una imagen del polímero sintetizado.

## 2.9.2. Evaluación de la interacción analito-MIP y criterios de la preselección óptima

### Ensayos de fluorescencia con el MIP01

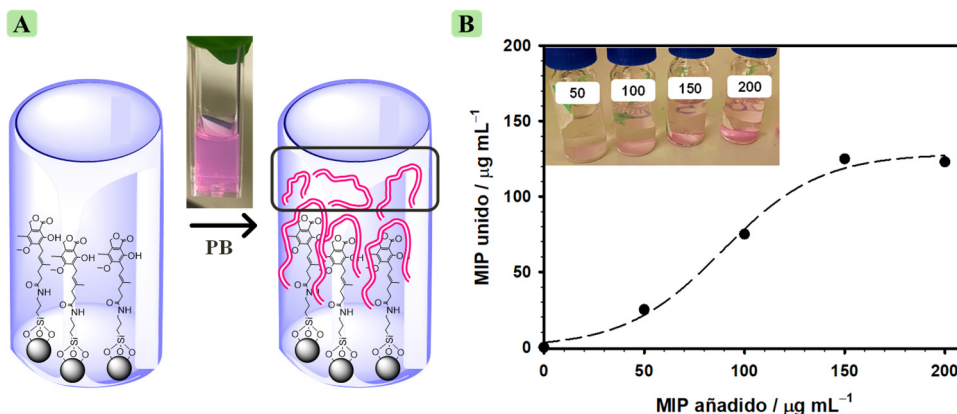
- **Ensayos con GBs-MPA**

Para evaluar la interacción del **MIP01** con el analito, se utilizó una curva de calibrado del MIP (**Figura 35**).



**Figura 35.** Curva de calibrado del MIP01 ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ) en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7) ( $I_{577} = 12000 \times C_{MIP} + 37000$ ,  $r^2 = 0.99$ ).

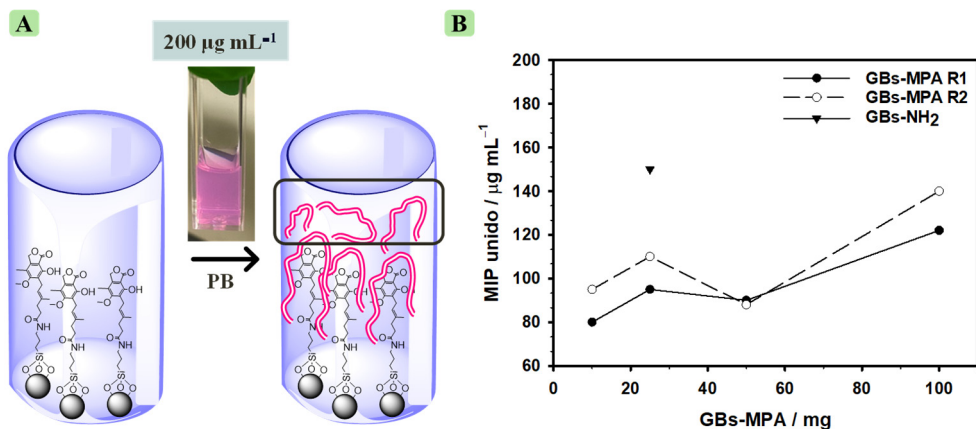
En uno de los ensayos, se varió la concentración de MIP manteniendo constante la cantidad de GBs-MPA, con una concentración de MPA calculada en  $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Tras la incubación, se observó que al aumentar la concentración de MIP, también aumentaba su interacción con las GBs-MPA, alcanzando un punto de saturación en  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 36).



**Figura 36.** A) Esquema del ensayo de unión del MIP fluorescente con una concentración constante de GBs-MPA en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7). El área recuadrada en negro corresponde a la medida directa del MIP no unido. B) Gráfico que representa el MIP unido a las GBs-MPA, obtenido tras la incubación de 25 mg de GBs-MPA ( $= 16 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MPA) con concentraciones de MIP entre 50 y  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante 1 h a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ . El MIP no unido se calcula extrapolando la luminiscencia ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$ ) medida en el sobrenadante a la curva de calibrado del MIP, y el MIP unido se determina por diferencia. La imagen insertada muestra los viales tras la incubación.

En el siguiente ensayo, se fijó esta concentración de MIP y se varió la de GBs-MPA. En consecuencia, se observó que una mayor concentración de GBs-MPA se correlacionaba con un modesto aumento del MIP unido. Para confirmar la especificidad, se realizó un único control con 25 mg de GBs aminadas

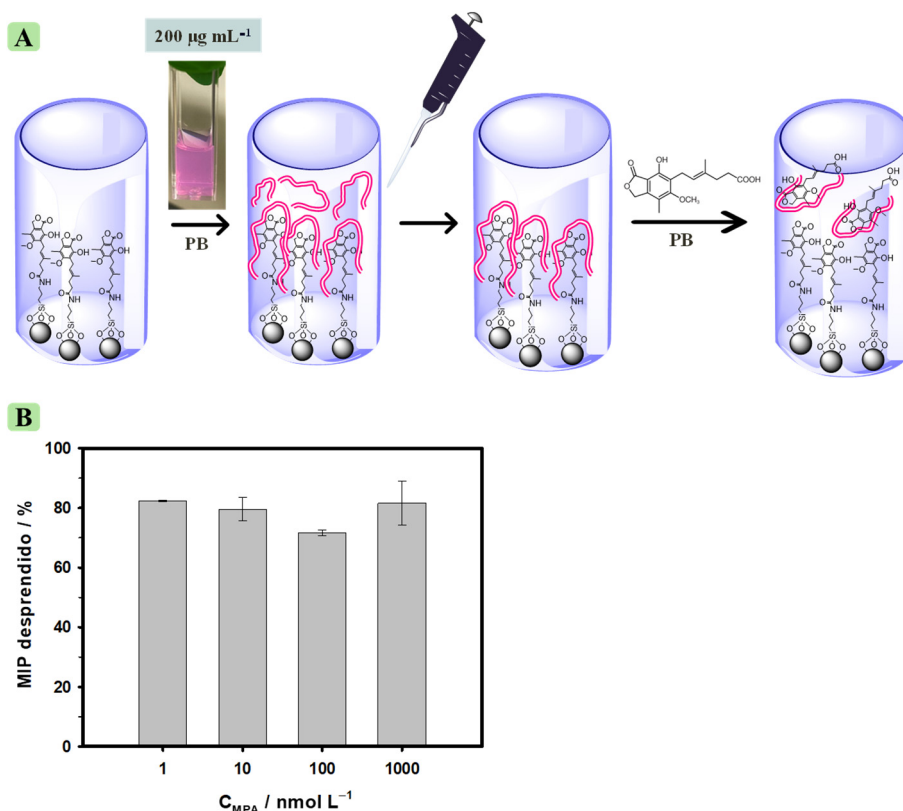
(Figura 37), la cantidad encontrada de MIP unido a éstas, indicó la existencia de interacciones no específicas.



**Figura 37.** Esquema del ensayo de unión de una concentración constante de MIP fluorescente ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) con las GBs-MPA en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7). El área recuadrada en negro corresponde a la medida directa del MIP no unido. B) Gráfico que muestra el MIP no unido a las GBs-MPA, obtenido tras la incubación durante 1 h a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  de 15 a 100 mg de GBs-MPA (puntos), y de 25 mg de GBs-NH<sub>2</sub> (triángulo negro) como control, con una concentración de MIP de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El MIP no unido se calcula extrapolando la luminiscencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 577 \text{ nm}$ ) medida en el sobrenadante a la curva de calibrado del MIP, y el MIP unido se determina por diferencia.

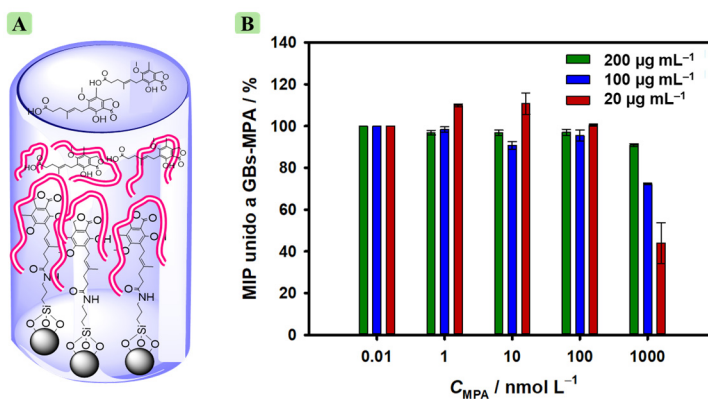
A continuación, se llevó a cabo un ensayo por desplazamiento en el que, en primer lugar, el MIP se incubó inicialmente con las GBs-MPA, permitiendo su unión al analito inmobilizado. Tras la primera incubación, se eliminaron los restos de MIP no unidos mediante lavados. Posteriormente, las GBs-MPA con MIP adherido se incubaron a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h en presencia de MPA libre, favoreciendo la competencia por los sitios de reconocimiento del MIP y, por tanto, el desplazamiento de éste hacia el sobrenadante.

La **Figura 38** muestra que aproximadamente el 80% del MIP retenido en las GBs-MPA pasó al sobrenadante cuando se añadió MPA libre a  $1 \text{ nmol L}^{-1}$ , sin observarse un aumento significativo en la liberación con concentraciones superiores. Adicionalmente, se evaluó la desorción inespecífica del MIP desde las GBs-MPA en ausencia de analito, incubando únicamente con disolvente. En este caso, aproximadamente el 30% del MIP se desplazó al sobrenadante, lo que indica que sigue habiendo interacciones no específicas, aunque el desplazamiento observado en presencia de MPA libre parece estar asociado principalmente a la competencia por el reconocimiento específico.



**Figura 38.** A) Esquema del ensayo de unión para una concentración constante de MIP fluorescente de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  con  $25 \text{ mg}$  de GBs-MPA en PB ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7), seguido de la eliminación del MIP no unido y la adición de MPA libre en el mismo disolvente inicial. B) Gráfico que muestra el porcentaje de MIP desprendido según la luminiscencia hallada en el sobrenadante ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$ ) tras la adición de distintas concentraciones de MPA ( $1, 10, 100$  y  $1000 \text{ nmol L}^{-1}$ ) e incubación durante  $1 \text{ h}$  a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  (último paso del ensayo descrito anteriormente).

Como alternativa, se propuso un ensayo competitivo en el que se añadieron simultáneamente MPA libre y GBs-MPA y, posteriormente, distintas concentraciones de MIP para verificar si así mejoraba la especificidad. Los resultados de la **Figura 39** sugieren cierta competición entre el MPA inmovilizado en las GBs y el MPA libre por los sitios de unión del MIP que se encuentra a una concentración de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Finalmente, se optó por el uso de partículas magnéticas comerciales de menor tamaño ( $3 \mu\text{m}$ ) con MPA anclado, con el propósito de optimizar la capacidad de detección, mejorar la eficiencia en los procesos de lavado del MIP no unido y asegurar una medida más reproducible de la fluorescencia del MIP adsorbido en la fase sólida, promoviendo así la detección específica sobre la inespecífica.



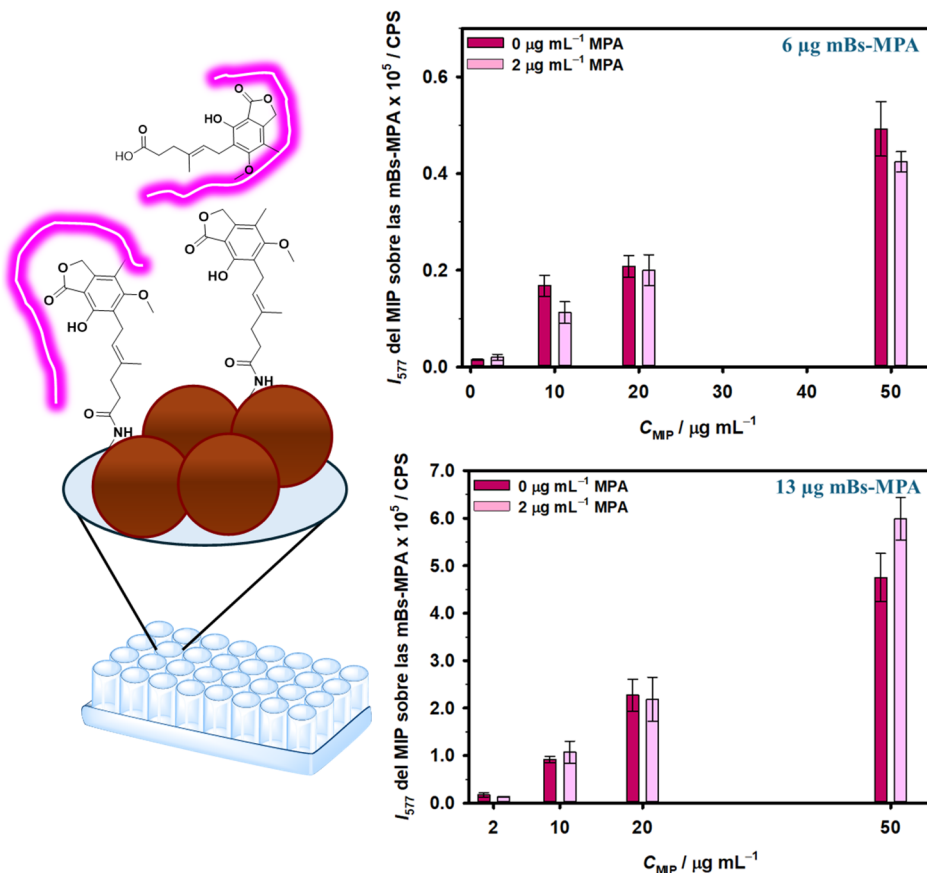
**Figura 39.** A) Esquema del ensayo competitivo de unión al MIP fluorescente en presencia de GBS-MPA y MPA libre en PB (25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7). B) Gráfico que muestra el porcentaje de MIP unido ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$ ), medido directamente sobre el sólido, tras la adición de 25 mg de GBS-MPA (equivalentes a 16 mmol L<sup>-1</sup> de MPA) y diferentes concentraciones de MPA libre (0.01, 1, 10, 100 y 1000 nmol L<sup>-1</sup>) y de MIP (20, 100 y 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), después de 1 h de incubación a 38 °C.

### • Ensayos con mBs-MPA

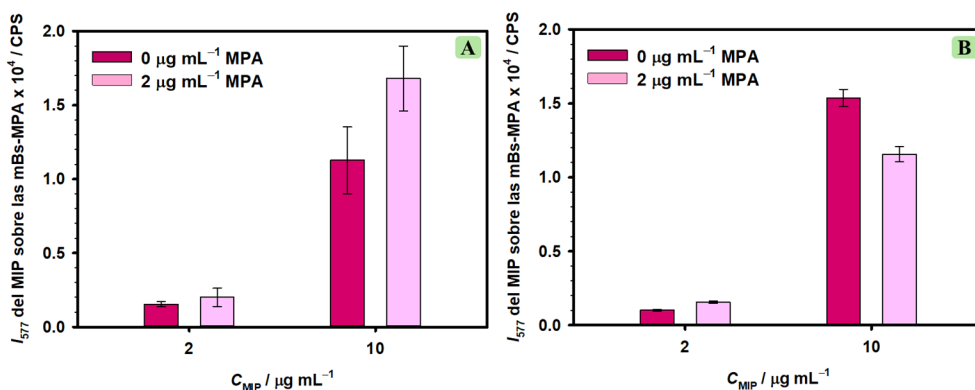
Tras la inmovilización del MPA en las partículas magnéticas (mBs-MPA), se llevaron a cabo ensayos competitivos evaluando distintas concentraciones de MIP y mBs-MPA, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.8.5. En estos ensayos, se esperaba que un aumento en la concentración de MPA libre en la muestra favoreciera su unión al MIP, reduciendo así la interacción de este con las mBs-MPA. Como consecuencia, se produciría una disminución en la señal de luminiscencia registrada sobre las partículas.

A partir de los experimentos realizados, se determinaron como condiciones óptimas el uso de 6  $\mu\text{g}$  de mBs-MPA y concentraciones de MIP de 2 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ya que estos valores generaron las menores desviaciones estándar, lo que refleja una mayor consistencia en las medidas (Figura 40).

A continuación, se evaluó la influencia del bloqueo con caseína en comparación con partículas no bloqueadas, con el objetivo de minimizar las interacciones no específicas, utilizando para ello las dos concentraciones óptimas de MIP. Se seleccionó la caseína como agente bloqueante debido a su alta disponibilidad y bajo coste, lo que la convierte en la opción más empleada en este tipo de ensayos. La Figura 41 muestra que las mBs-MPA bloqueadas presentaron menores desviaciones estándar y una mayor diferencia de la luminiscencia en presencia y en ausencia de MPA libre.



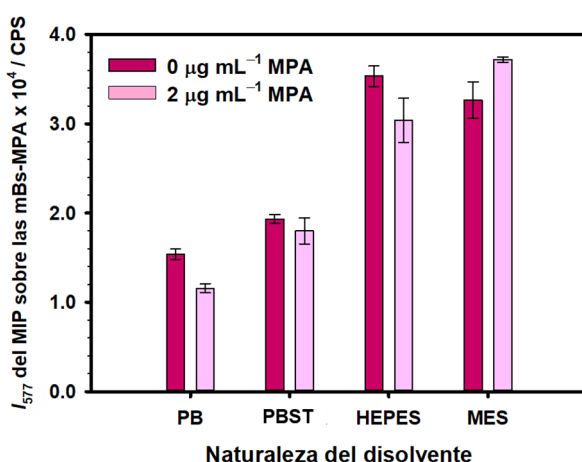
**Figura 40.** (Izq.) Esquema del ensayo competitivo con partículas magnéticas (mBs) no bloqueadas en PB (25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7). (Dcha.) Gráficos que muestran la correlación entre la cantidad de mBs (6 y 13 µg), la concentración de MIP (2, 10, 20 y 50 µg mL<sup>-1</sup>) y la intensidad de luminiscencia del MIP a 577 nm ( $\lambda_{exc} = 540$  nm) en las mBs (proporcional al MIP unido), en presencia de 2 µg mL<sup>-1</sup> de MPA (barras rosas) y en su ausencia (barras granates) tras 1 h de incubación a 38 °C (dcha.).



**Figura 41.** Ensayo competitivo con 6 µg de partículas magnéticas (mBs) en PB (25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7). Se muestra la correlación entre la naturaleza de las mBs. A) No bloqueadas. B) Bloqueadas con una disolución de caseína en PBS. La concentración de MIP (2 y 10 µg mL<sup>-1</sup>) y la intensidad de fluorescencia del MIP a 577 nm ( $\lambda_{exc} = 540$  nm) en las mBs, en presencia (barras rosas) y en ausencia (barras granates) de 2 µg mL<sup>-1</sup> de MPA tras 1 h de incubación a 38 °C.

### Determinación de MPA mediante MIPs en formato nanogel

Posteriormente se analizó el efecto del medio de incubación (**Figura 42**). Con mBs-MPA *bloqueadas con caseína* y empleando la concentración de MIP seleccionada previamente ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), se observó que el PB proporcionó la mayor sensibilidad a la presencia del analito y el menor error experimental. Aunque todos los medios generaron respuestas comparables tanto en la presencia como en la ausencia de MPA libre, la disolución tamponada con MES mostró un comportamiento inverso, mostrando una mayor cantidad de MIP en las mBs-MPA cuando se encontraba MPA libre. Este fenómeno puede atribuirse a las características estructurales del MES, que, al poseer un grupo sulfonato y un anillo morfolino, favorece interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno con el MPA libre, alterando el entorno del MIP y, en consecuencia, su respuesta luminiscente.

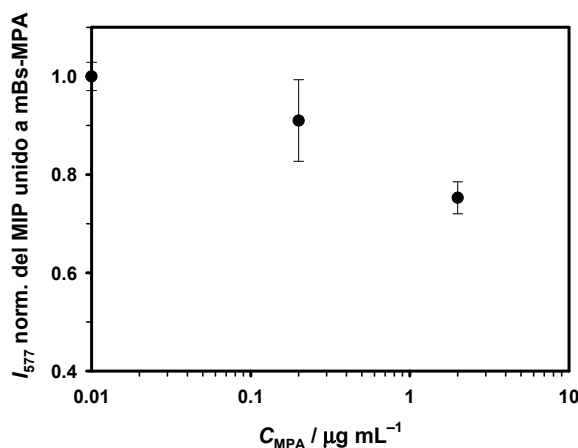


**Figura 42.** Ensayo competitivo con 6  $\mu\text{g}$  de partículas magnéticas (mBs) bloqueadas con una disolución de caseína en PBS. Se muestra la correlación entre la concentración de MIP ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la intensidad de luminiscencia del MIP a 577 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ ) en las mBs, en presencia (barras rosas) y ausencia (barras granates) de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MPA, tras 1 h de incubación a  $38^\circ\text{C}$  en diferentes disoluciones tampón a una concentración de  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  y pH 7 (PB, PBST, HEPES y MES).

Para evaluar la respuesta del sistema frente a diferentes concentraciones de MPA libre, se llevó a cabo un ensayo empleando los cuatro parámetros óptimos previamente establecidos: 6  $\mu\text{g}$  de mBs bloqueadas, en una *disolución de tampón fosfato* ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7) con  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MIP.

Los resultados obtenidos (**Figura 43**) mostraron diferencias significativas en la fluorescencia medida en el sólido para las concentraciones de MPA libre evaluadas. Finalmente, el MIP01 se descartó debido a su escasa sensibilidad. En su lugar, se optó por continuar con el MIP sintetizado por precipitación (MIP02), que presenta un grupo funcional adicional para favorecer la interacción, lo cual podría mejorar la especificidad del polímero. Además, este enfoque elimina la necesidad de un control estricto de temperatura durante las incubaciones, lo que

contribuye a minimizar posibles errores de manipulación y mejora la fiabilidad del proceso experimental.



**Figura 43.** Ensayo competitivo bajo las condiciones seleccionadas previamente: 6  $\mu\text{g}$  de mBs bloqueadas, en PB (25  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7) con 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de MIP, incubado durante 1 h a 38  $^{\circ}\text{C}$ . Se muestra la correlación entre la presencia de MPA (0.2 y 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y su ausencia, y la intensidad de luminiscencia del MIP a 577 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ ) medida directamente sobre las mBs.

### Ensayos de fluorescencia y optimización de la unión del analito al MIP02

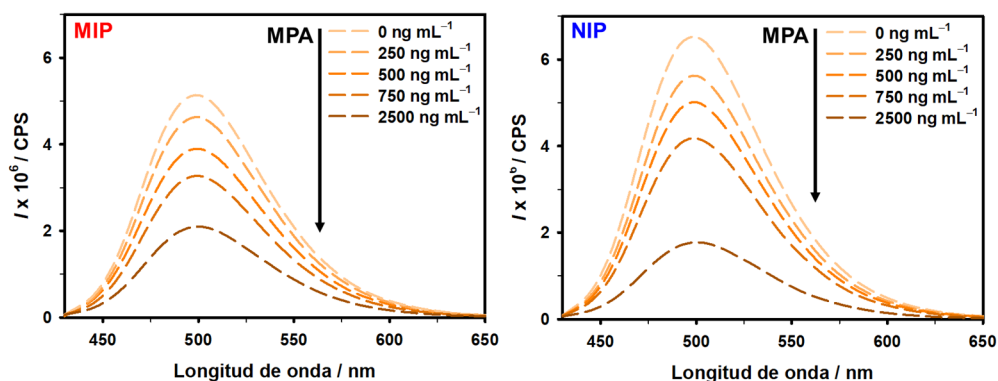
En estos ensayos se evaluó inicialmente la respuesta del MIP02 a diferentes concentraciones de MPA. Cuando se observaba un cambio significativo en la luminiscencia de éste, se procedía a estudiar también el comportamiento del NIP bajo las mismas condiciones.

#### Proporción de agua en el disolvente de unión y tiempos de incubación

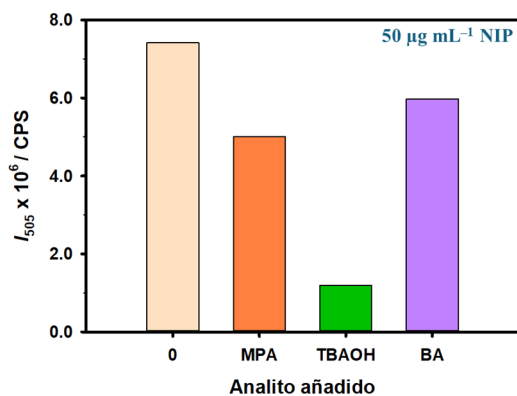
La señal de fluorescencia del MIP02 en ACN disminuyó proporcionalmente a la cantidad de MPA añadido, comportamiento que también mostró el NIP, como se observa en la **Figura 44**. Este fenómeno no coincidía con lo esperado: de acuerdo con lo descrito en literatura, debería observarse un aumento de la luminiscencia debido a la interacción del nitrógeno de la piperazina con el grupo ácido carboxílico del analito, formando un par iónico ácido-base que bloqueara la PET.

Ante este resultado, se planteó que el monómero fluorescente podría encontrarse inicialmente protonado. Las pruebas posteriores se realizaron con el NIP para conservar la mayor cantidad posible de MIP. Por tanto, se añadió TBAOH al NIP, lo que redujo la intensidad de su fluorescencia, confirmando la suposición de que el monómero estaba, al menos parcialmente, protonado (**Figura 45**, barra verde). Finalmente, se añadió ácido benzoico, con un  $pK_a$  similar al del MPA (4.2 vs. 5.6), y la intensidad de su fluorescencia disminuyó nuevamente (**Figura 45**, barra violeta).

## Determinación de MPA mediante MIPs en formato nanogel

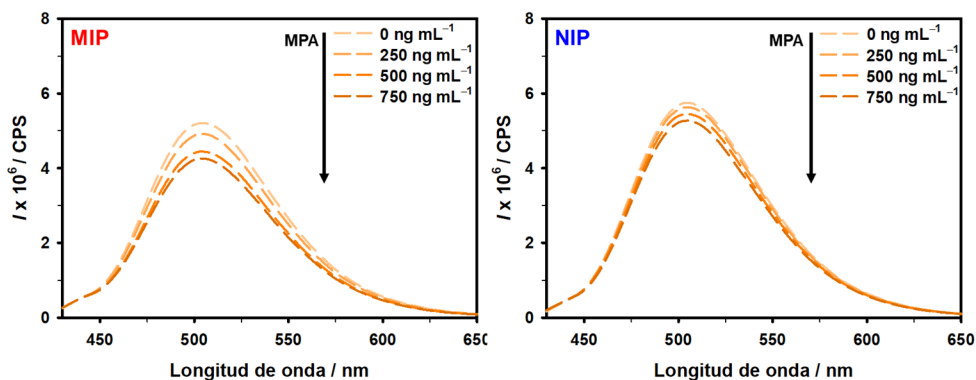


**Figura 44.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 390$  nm) de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  del MIP02 (izquierda) y del NIP (derecha) en ACN tras incubar con distintas concentraciones de MPA durante 1 h.



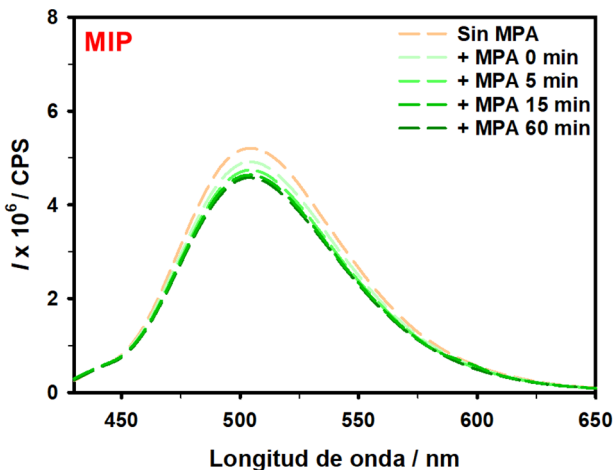
**Figura 45.** Intensidad de fluorescencia a 505 nm ( $\lambda_{exc} = 390$  nm) de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  del NIP en ACN (barra cárnica) en ausencia y presencia de  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  de MPA (barra marrón), TBAOH (barra verde) y Ácido benzoico (BA, barra violeta). El NIP se incubó con el respectivo analito durante 1 h.

A continuación, decidimos añadir un pequeño porcentaje de agua (10%) al disolvente para reducir las interacciones no específicas. Los espectros de fluorescencia obtenidos (**Figura 46**) mostraron una desactivación más pronunciada en el MIP que en el NIP, proporcional a la cantidad de MPA añadida. La mayor diferencia entre MIP y NIP se observó a una concentración de  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  de MPA, con una diferencia de ca. 10%.



**Figura 46.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 390$  nm) del MIP y del NIP tras incubar con diferentes concentraciones de MPA en ACN con un 10% de agua durante 1 h.

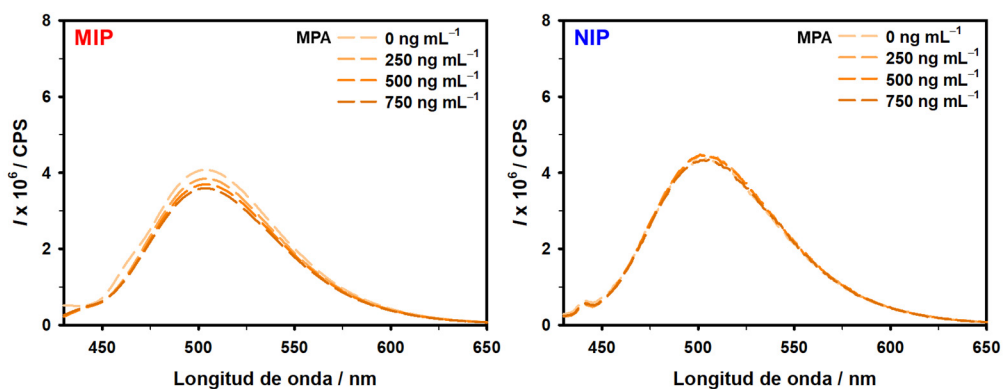
Para incrementar la diferencia entre MIP y NIP a las distintas concentraciones de MPA añadidas se realizaron pruebas con distintos tiempos de incubación en ACN con un 10% de agua. La **Figura 47** muestra que no hay diferencias significativas entre incubaciones de 250 ng mL<sup>-1</sup> de MPA durante 15 y 60 min, por lo que se optó por continuar con un tiempo de incubación de 15 min en los siguientes ensayos.



**Figura 47.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) del MIP tras incubar con 250 ng mL<sup>-1</sup> de MPA en ACN con un 10% de agua durante 0, 5, 15 y 60 min.

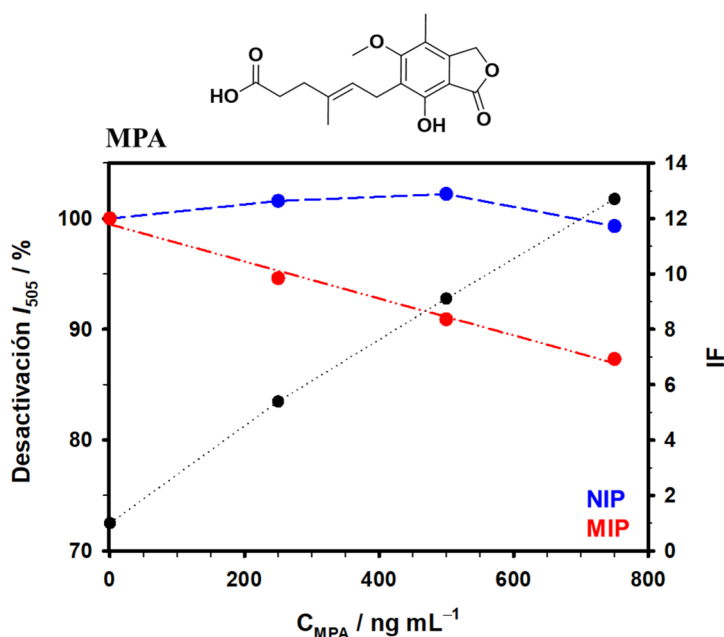
A continuación, incrementamos el contenido de agua al 25% para evaluar si se lograba potenciar la diferencia entre las respuestas del MIP y del NIP; sin embargo, no se observaron diferencias significativas.

Dado que el aumento del porcentaje de agua en el medio resultó ser desfavorable, decidimos reducir el porcentaje de agua al 5% (**Figura 48**). En este medio, los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de MPA mostraron diferencias ligeramente significativas en la intensidad del MIP, mientras que en el NIP fueron despreciables.



**Figura 48.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ) de MIP y NIP tras incubar durante 15 min con distintas concentraciones de MPA en ACN con un 5% de agua.

Finalmente, en la **Figura 49** se representan los valores del máximo de fluorescencia de MIP y NIP a 505 nm ( $\lambda_{exc} = 390$  nm), obtenidos en el ensayo de la **Figura 48**, en función de la concentración de MPA añadida, para mostrar mejor la diferencia entre ambos. Con una concentración de  $750 \text{ ng mL}^{-1}$  de MPA se observó una diferencia de ca. 12% entre las señales de fluorescencia del MIP y del NIP. Además, bajo estas condiciones, se alcanzó un factor de impronta (IF, del inglés *imprinting factor*) de 13, lo que indica una elevada selectividad del polímero con impronta hacia el MPA en comparación con el polímero sin impronta.



**Figura 49.** Porcentaje de desactivación de la fluorescencia del NIP (círculos azules) y del MIP (círculos rojos) a 505 nm ( $\lambda_{exc} = 390$  nm) en ACN con un 5% de agua, en presencia de MPA. Los factores de impronta (IFs) para cada concentración de MPA se representan con puntos negros. La estructura del MPA se muestra sobre la gráfica. La recta de ajuste para el MIP (línea discontinua roja) responde a la siguiente ecuación:  $I_{505} = -0.02 \times C_{MPA} + 99.5$ ,  $r^2 = 0.99$ .

### Estudio de potenciales interferentes

Una vez confirmada la capacidad del MIP para discriminar frente al NIP a distintas concentraciones del analito objetivo, se evaluaron como potenciales interferentes el MPAG y el acil-MPAG (metabolitos del MPA comúnmente presentes en suero) utilizando un medio de incubación de ACN con un 5% de agua (**Figura 50**). En el caso del MPAG, se observó una mayor desactivación de la fluorescencia con el NIP que con el MIP, lo que indica una respuesta inespecífica atribuible a interacciones débiles no dirigidas. Por otra parte, el MIP mostró una respuesta más pronunciada frente al acil-MPAG (la mayor desactivación en su fluorescencia corresponde ca. 27%) en comparación con el MPAG (ca. 11%).

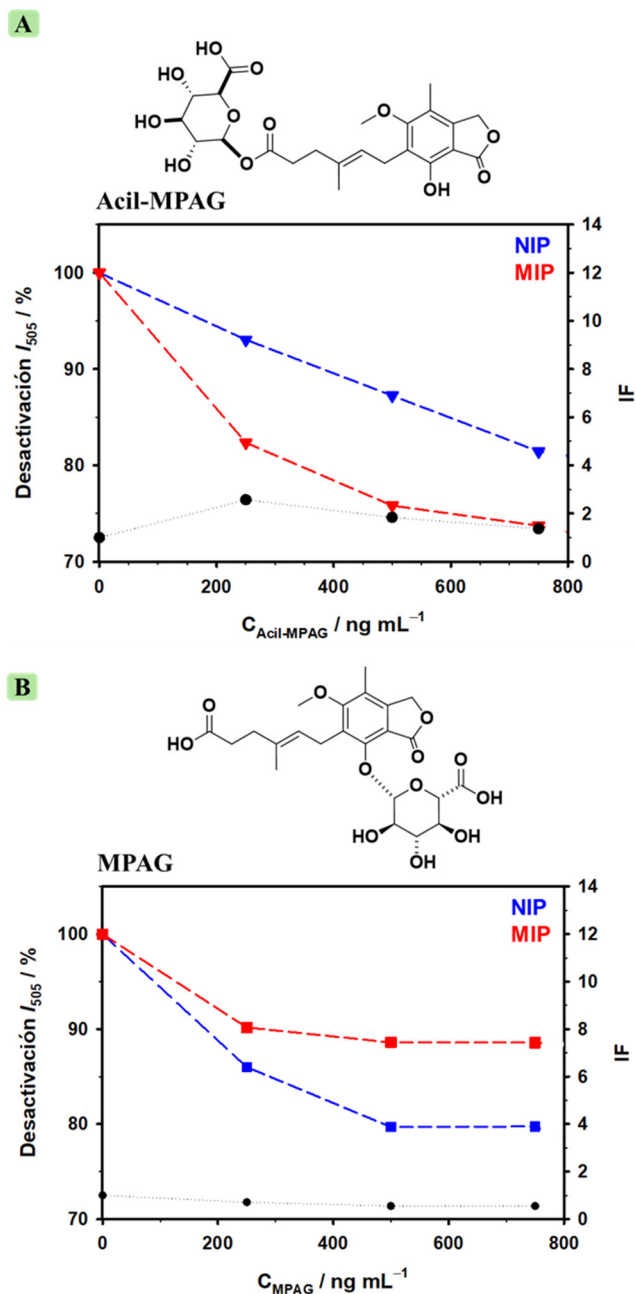
Este comportamiento puede explicarse considerando tanto el impedimento estérico como las propiedades fisicoquímicas de los compuestos. La conjugación con ácido glucurónico en ambos metabolitos incrementa notablemente su polaridad y reduce su  $\log P$  (1.58 para el acil-MPAG y 0.93 para el MPAG)<sup>a</sup> en comparación con el MPA ( $\log P = 3.7$ ),<sup>137</sup> lo que implica una mayor hidrofilia y, en principio, una menor afinidad por el entorno de las cavidades del MIP. Además, el MPAG presenta un mayor impedimento estérico en la región fenólica, lo que dificultaría su inserción en las cavidades específicas del MIP.

Sin embargo, el acil-MPAG, aunque también es más polar que el MPA, presenta una conformación más compatible con la cavidad de reconocimiento creada, ya que el grupo acilo enlazado al glucurónido puede imitar parcialmente la distribución electrónica y espacial del MPA, permitiéndole interactuar más eficazmente con estos sitios. Esto podría explicar la desactivación de la fluorescencia observada. En cualquier caso, el *IF* calculado para el acil-MPAG fue despreciable frente al obtenido para el MPA, lo que indica que esta interacción no es selectiva, y, por tanto, el MIP no reconoce específicamente al acil-MPAG, sino que su respuesta podría deberse a interacciones no específicas o a cierta complementariedad estructural.



---

<sup>a</sup> Valores calculados con el programa Marvin Sketch v.15.1.12.



**Figura 50.** Porcentaje de desactivación de la fluorescencia del polímero a 505 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 390$  nm) en ACN con un 5% de agua de: A) NIP (triángulos azules) y MIP (triángulos rojos) en presencia de acil-MPAG; y B) NIP (cuadrados azules) y MIP (cuadrados rojos) en presencia de MPAG. Los factores de impronta (IFs) para cada concentración de MPA se representan con puntos negros. Las estructuras de ambos interferentes se muestran sobre su gráfica.

## **2.10. Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este estudio indican que, aunque se lograron sintetizar múltiples nanogeles con diferentes composiciones y caracterizarlos mediante dispersión de luz dinámica (DLS), la capacidad de los mismos para el reconocimiento selectivo de ácido micofenólico (MPA) no alcanzó la intensidad esperada. Este resultado subraya la necesidad de optimizar la composición del MIP, considerando la inclusión de monómeros más específicos para la molécula objetivo o el reemplazo del MPA por una molécula plantilla con un grupo ácido carboxílico disponible que permita establecer interacciones más robustas durante la síntesis en fase sólida.

A pesar de las limitaciones encontradas, esta experiencia ha sido crucial para la adquisición de competencias avanzadas en la síntesis y optimización de MIPs en formato nanogel. En futuras investigaciones este conocimiento podrá aplicarse en el diseño de MIPs para el reconocimiento de micotoxinas que posean un mayor número de grupos funcionales para la interacción específica con los monómeros seleccionados.





## **CAPÍTULO 3**



## Capítulo 3. Nuevas estrategias de polimerización y desarrollo de un sensor basado en electroquímica bipolar combinada con MIPs

- *Desarrollo de un sensor basado en electroquímica bipolar combinada con MIPs*

### 3.1. Introducción

#### Fundamentos de la BE

La electroquímica bipolar (BPE) es una técnica que se basa en la diferencia de polarización ( $\Delta V$ ) de un material conductor o semiconductor aislado, conocido como electrodo bipolar (BPE), bajo la influencia de un campo eléctrico externo ( $E$ ).<sup>138-140</sup> A diferencia de los métodos electroquímicos tradicionales, donde los electrodos están físicamente conectados a una fuente de alimentación, en la electroquímica bipolar esta conexión directa no es necesaria. El campo eléctrico genera un gradiente de potencial sobre el electrodo bipolar, permitiendo que ocurran reacciones de oxidación en un extremo y de reducción en el otro, de manera simultánea.

La polarización del BPE genera dos polos electroquímicos, donde los procesos de oxidación y reducción están intrínsecamente acoplados. Los electrones generados en el extremo anódico son transportados a través del material conductor hacia el extremo catódico, donde participan en las reacciones de reducción.<sup>141</sup> De este modo, la cantidad de electrones involucrados en ambos procesos es idéntica, garantizando un equilibrio electroquímico directo y eficiente entre las reacciones redox, lo que simplifica el diseño experimental y amplía las posibilidades de aplicación. Esta característica hace posible que un polo actúe como sensor, mientras que el otro se utiliza como reportero, diseñado para ofrecer una señal visible, como un cambio de color o emisión de luz.

En la electroquímica bipolar, las sondas redox son esenciales para medir los potenciales electroquímicos en las distintas regiones del electrodo bipolar. Estas sondas, ubicadas estratégicamente en el BPE, permiten monitorizar la diferencia de potencial durante las reacciones de oxidación y reducción en los extremos del electrodo. Además, son cruciales para controlar las condiciones experimentales, como la intensidad del campo eléctrico y la polarización. El par redox ferro/ferricianuro ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) es el más utilizado por su estabilidad y rapidez en las reacciones redox, facilitando la observación precisa de las reacciones en ambos extremos del BPE.

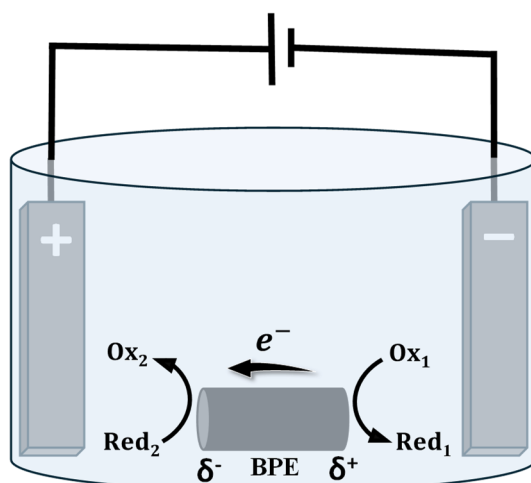
La BE también destaca por su versatilidad. Permite operar simultáneamente múltiples BPEs con un solo par de electrodos de alimentación,<sup>142</sup> lo que simplifica la configuración del experimento y abre un abanico de aplicaciones en áreas como la

microfluidica, el diseño de sensores avanzados y la fabricación de materiales funcionales en micro y nanoescala.

El concepto de electroquímica bipolar tiene sus orígenes en los años 60, cuando Fleischmann investigó partículas de cobre en sistemas fluidizados.<sup>143</sup> Décadas después, Manz y su equipo combinaron este enfoque con electroquimioluminiscencia (ECL),<sup>144</sup> mientras que Crooks y colaboradores ampliaron la comprensión teórica, analizando cómo afectan a las señales observadas factores tales como la longitud del electrodo bipolar y la distribución del potencial a lo largo del mismo.<sup>145,146</sup> Estos avances han permitido aplicaciones innovadoras, desde el análisis químico multiplexado hasta el enriquecimiento iónico en sistemas miniaturizados, consolidando la BPE como una herramienta fundamental en áreas como la ciencia de materiales, el almacenamiento de energía y la detección química avanzada.<sup>147,148</sup>

### Configuración abierta en BE

En la configuración abierta, el objeto conductor (BPE) se encuentra completamente sumergido en la disolución electrolítica entre los electrodos de alimentación (**Figura 51**).<sup>149</sup> El gradiente de potencial que se genera a lo largo del objeto depende tanto del campo eléctrico aplicado como de las dimensiones del propio objeto. Este gradiente debe ser lo suficientemente grande para permitir que ocurran reacciones redox en los extremos del BPE.



**Figura 51.** Esquema de un sistema de BE en configuración abierta. Las flechas indican las reacciones redox inducidas en los polos catódico y anódico, respectivamente.

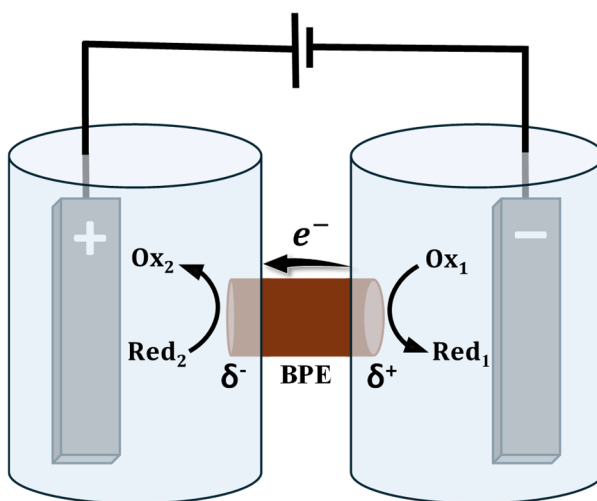
La corriente fluye a través del objeto conductor y también a través del electrolito circundante, lo que da lugar a la formación de corrientes de desvío.<sup>150</sup> Para mitigar este efecto, es esencial emplear disoluciones electrolíticas con alta resistencia en comparación con la resistencia del BPE, lo que se logra mediante una baja concentración iónica. Este enfoque no solo optimiza el flujo de corriente a través del

BPE, mejorando el control de las reacciones redox y la eficiencia del sistema, sino que también minimiza interferencias en aplicaciones sensibles como sensores electroquímicos. En estos casos, una baja concentración iónica reduce la competencia de los iones por los sitios de unión en materiales funcionalizados, como polímeros diseñados para reconocimiento molecular, mejorando la selectividad y sensibilidad del sistema.<sup>151</sup>

Además, la configuración abierta destaca por su simplicidad y versatilidad. Su diseño sin barreras permite ajustar el gradiente de potencial mediante cambios en las dimensiones del BPE o en la intensidad del campo eléctrico aplicado, ofreciendo flexibilidad para adaptarse a diversas necesidades. Al no requerir compartimentos aislados, admite el uso de electrodos bipolares de diferentes materiales y geometrías. Estas características la hacen ideal para aplicaciones como síntesis de materiales, procesos catalíticos y sensores electroquímicos, donde su diseño simple y eficiente maximiza el desempeño del sistema.

### Configuración cerrada en BE

En la configuración cerrada, el BPE actúa como un puente conductor entre dos compartimentos separados por una barrera, típicamente un material aislante eléctrico (**Figura 52**).<sup>149</sup> Este diseño permite que cada extremo del BPE esté en contacto con disoluciones distintas, creando un sistema donde la corriente fluye exclusivamente a través del BPE, conectando ambos compartimentos. A diferencia de la configuración abierta, donde el gradiente de potencial se distribuye a lo largo del BPE, en la configuración cerrada la diferencia de potencial se concentra casi exclusivamente en los extremos inducidos del BPE.



**Figura 52.** Esquema de un sistema de BE en configuración cerrada. Las flechas indican las reacciones redox inducidas en los polos catódico y anódico, respectivamente.

Este enfoque ofrece ventajas significativas. En primer lugar, permite trabajar con disoluciones de composiciones incompatibles, como aquellas con diferentes potenciales redox o niveles de pH, ya que están físicamente separadas. Además, al aislar las semirreacciones en compartimentos distintos, se facilita la separación de los productos de reacción y los reactivos iniciales, mejorando la eficiencia del proceso.

Otra ventaja es que este diseño no depende de la longitud del BPE, ya que la fuerza motriz es la diferencia de potencial entre las disoluciones, no el gradiente de potencial a lo largo del electrodo. Esto permite aplicar potenciales externos más bajos y lograr un control más preciso de las reacciones redox, reduciendo la interferencia de corrientes de desviación. Estas características hacen que la configuración cerrada sea ideal para aplicaciones avanzadas, tales como sensores electroquímicos, micro/nanoelectrodos y la síntesis de partículas con propiedades asimétricas.<sup>152</sup>

### **Diseño de celdas en BE**

Los experimentos de BE requieren un diseño de celda que varía según la aplicación deseada, desde configuraciones simples con dos electrodos en una disolución acuosa hasta diseños complejos con múltiples compartimentos y electrodos especializados. Los dos parámetros más importantes que determinan la capacidad de un objeto conductor para comportarse como un BPE son su tamaño o longitud y la intensidad del campo eléctrico aplicado. La ubicación del BPE dentro de la celda electroquímica no influye en la polarización interfacial, lo que permite que un solo par de electrodos de alimentación pueda dirigir múltiples BPEs simultáneamente.<sup>153</sup> Esto facilita la gestión de matrices grandes de (micro)electrodos con patrones específicos, ya sean depositados o impresos en un soporte aislante.

Históricamente, las celdas bipolares se han construido mediante el apilamiento de placas de BPEs entre electrodos alimentadores, que pueden ser planas, perforadas o incluso membranas porosas conductoras,<sup>154</sup> generando configuraciones abiertas o cerradas. Para evitar reacciones no deseadas en los electrodos, tales como pérdidas de reactivos o la formación de burbujas, se pueden incorporar membranas que separan los electrodos alimentadores del compartimento donde se lleva a cabo el proceso bipolar. Este diseño también ayuda a reducir problemas como la evaporación del disolvente o la convección provocada por el calentamiento óhmico.<sup>149</sup>

Cuando se requieren altos campos eléctricos, e.g. en la modificación de objetos a escala nanométrica, se puede emplear un sistema de electroforesis capilar como plataforma para llevar a cabo procesos de BE.<sup>155</sup> Esta configuración permite aplicar grandes diferencias de potencial sin que las reacciones no deseadas en los electrodos interfieran con el proceso bipolar, lo que proporciona un control más preciso y eficiente.

## Electroanálisis bipolar

### Principios de los sensores basados en BE

La configuración experimental típica en BE consiste en disolver una especie química electroactiva en una disolución electrolítica y aplicar un campo eléctrico lo suficientemente intenso a través de ella. Este campo provoca la reducción electroquímica de la especie en el polo catódico del BPE, mientras que, de manera simultánea, ocurre una reacción de oxidación en el polo anódico. Ambas reacciones están intrínsecamente acopladas, ya que los electrones involucrados en un extremo del BPE deben equilibrarse con los procesos del otro extremo, generando una señal electroquímica correlacionada.

Sin embargo, si el analito presente en la disolución no es electroactivo, las reacciones redox no pueden acoplarse, lo que impide la generación de una señal electroquímica. En este caso, es necesario introducir *una sonda redox* que actúe como intermediaria, permitiendo la generación de especies redox en ambos extremos del BPE. La corriente generada por las reacciones de esta sonda puede correlacionarse con el analito no electroactivo, proporcionando una medida indirecta de su concentración o actividad.

Una de las características intrínsecas de los BPEs es su naturaleza *inalámbrica*, lo que significa que la información electroquímica, como la corriente faradaica o el potencial, no se pueden medir de manera tan directa como en la electroquímica clásica. Este aspecto no representa un problema significativo en áreas como la ciencia de materiales o la catálisis,<sup>156</sup> donde se trabaja con reacciones que no requieren una cuantificación precisa. Sin embargo, en la química analítica, donde es fundamental obtener parámetros cuantitativos, esta característica limita su aplicación. Durante un tiempo, este obstáculo fue crucial, restringiendo el desarrollo de aplicaciones analíticas basadas en BE.

Para superar esta limitación, es necesario acoplar al menos una de las reacciones redox que ocurren en los BPEs con técnicas adicionales que permitan traducir la respuesta electroquímica, por ejemplo, en una señal óptica. Esto consiste en convertir la corriente faradaica que fluye a través del BPE en una señal óptica proporcional y detectable. Entre los métodos de transducción más comunes se incluyen técnicas como colorimetría, fluorescencia, electrocromismo, emisión de luz mediante diodos emisores de luz (LEDs) y ECL.<sup>157-163</sup> Estas técnicas generan señales ópticas observables que pueden correlacionarse directamente con la corriente faradaica y, por tanto, con la concentración del analito de interés. Esto ofrece ventajas significativas, como alta sensibilidad, amplio rango dinámico, tiempos de respuesta rápidos y bajo coste operativo, lo que las convierte en herramientas ideales para aplicaciones analíticas avanzadas.<sup>164-166</sup>

## Transducción óptica

El uso de dispositivos optoelectrónicos, en particular los LEDs, ha cobrado relevancia en aplicaciones electroanalíticas debido a sus numerosas ventajas. A diferencia de técnicas tradicionales de emisión de luz, como la fluorescencia o la ECL, los LEDs no requieren fuentes de luz externas ni productos químicos adicionales, lo que los convierte en alternativas más seguras, accesibles y sostenibles para el análisis químico.<sup>167-171</sup>

En el contexto de la BE, la información química asociada a las reacciones redox se codifica en el flujo de electrones que viajan entre el ánodo y el cátodo del BPE. Los LEDs, como fuentes de luz estables y altamente controlables, tienen la capacidad de convertir esta información electroquímica en señales ópticas. Estas señales son especialmente útiles para detectar eventos de reconocimiento molecular, donde la respuesta lumínica de los LEDs está directamente relacionada con la actividad electroquímica subyacente. Además, a diferencia de las señales electroquímicas, la emisión de luz en los LEDs está relacionada con la movilidad de los portadores de carga (electrones y huecos), activada por un estímulo eléctrico externo; por lo tanto, pequeñas variaciones en la corriente generan grandes cambios en la intensidad luminosa. Asimismo, la transducción mediante LED podría utilizarse fácilmente como una alarma óptica para alertar, por ejemplo, cuando el nivel de micotoxinas en la muestra supera un umbral predefinido. Gracias a su capacidad para transformar datos electroquímicos en señales ópticas claras y observables, los LEDs se han integrado en una amplia variedad de plataformas sensoras.<sup>172</sup>

## Aplicaciones

La BE ha demostrado ser una técnica versátil y eficaz para el electroanálisis de diversos analitos en múltiples campos.

En el ámbito biomédico, la BE se ha empleado para la detección de glucosa utilizando sistemas enzimáticos y para el análisis de biomoléculas como ADN y proteínas, integrando reacciones redox con señales ópticas o eléctricas.<sup>166,173</sup>

En el área ambiental, la BE ha sido útil para identificar y eliminar contaminantes como metales pesados (plomo, cadmio y mercurio) y compuestos orgánicos en agua.<sup>174,175</sup> Su capacidad para realizar análisis rápidos portátiles y sin necesidad de sistemas eléctricos complejos la posiciona como una herramienta idónea para el monitoreo ambiental en tiempo real. De igual forma, en el ámbito alimentario, la BE ha permitido la detección de aditivos y antioxidantes,<sup>176</sup> mejorando el control de calidad y la seguridad alimentaria.

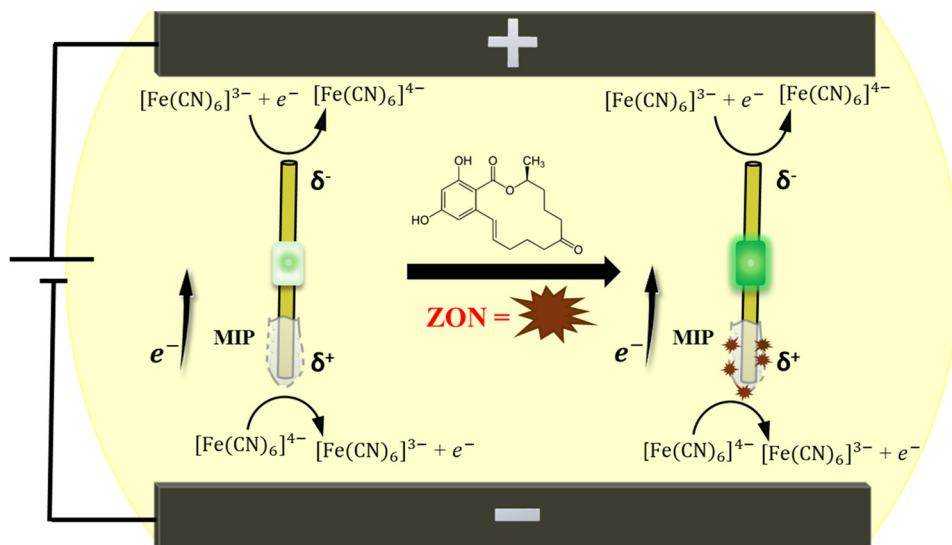
Un avance significativo ha sido el trabajo de Zhao *et al.*,<sup>177</sup> que constituye el único estudio conocido que combina BE con MIPs. En este estudio, se desarrolló un sensor de dopamina utilizando ácido 3-aminofenilbórico como monómero funcional y

dopamina como molécula plantilla. Este diseño, basado en una configuración cerrada de BE, emplea el MIP modificado como electrodo de detección, mientras que la reacción de ECL actúa como transductor de señal. Con un límite de detección de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  y un amplio rango lineal, este sistema demuestra el potencial de integrar MIPs con BPE para la detección de moléculas específicas.

Es particularmente notable que, hasta la fecha, la BE no ha sido explorada para el *diseño de sensores* destinados a la detección de micotoxinas, un campo crítico para la seguridad alimentaria. Dado que la técnica combina simplicidad y eficiencia, esta área representa una oportunidad de innovación significativa. La aplicación de BE en el análisis rápido y preciso de micotoxinas podría abrir nuevas perspectivas en la mejora del control de calidad en alimentos, ofreciendo disoluciones efectivas para un problema de impacto global.

En este capítulo se presenta una estrategia innovadora que combina las capacidades de reconocimiento molecular de los MIPs con un sistema optoelectrónico inalámbrico basado en BE de configuración abierta para la cuantificación sensible de ZON. El MIP se ha sintetizado mediante polimerización térmica sobre un alambre de oro funcionalizado, utilizando *N*-(2-aminoetil)metacrilamida (EAMA) como monómero funcional y 2,4-dihidroxibenzoato de ciclododecilo (CDHB), un análogo de ZON, como molécula plantilla. El uso de un análogo en lugar del analito objetivo ha demostrado ser muy útil para el análisis de trazas, ya que cualquier liberación no específica por parte del MIP no afecta al límite inferior de detección. Además, el uso de una molécula plantilla resulta imprescindible en aquellos casos en los que el analito no puede utilizarse como plantilla debido a su toxicidad, alto coste y/o disponibilidad limitada, como ocurre con la ZON. Esta elección permitió la formación de cavidades específicas para el reconocimiento selectivo de ZON, mejorando la precisión del sensor.

El sensor híbrido BPE combina tres componentes principales: un MIP para el reconocimiento químico selectivo, un micro-LED como transductor de señal lumínica, y alambres de oro conectados a los terminales del LED, donde ocurren las reacciones redox (**Figura 53**). Uno de los alambres se recubre de una fina capa de MIP selectivo a ZON. Cuando se aplica un campo eléctrico suficientemente alto en disolución, las especies  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  actúan como pares redox auxiliares, generando un flujo de electrones que alimenta la emisión del LED. La presencia de ZON unida al MIP facilita las reacciones de transferencia electrónica, actuando como un interruptor químico y modulando la emisión del LED.



**Figura 53.** Ilustración del sistema híbrido MIP–bipolar en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de ZON, con una representación de las reacciones redox asociadas, los alambres de oro polarizados anódica y catódicamente ( $\delta^+$  y  $\delta^-$ , respectivamente), y la emisión resultante del LED verde en presencia de la micotoxina cuando se aplica un campo eléctrico adecuado entre los electrodos de alimentación. Reproducido de la referencia [178] con permiso.

La combinación de MIPs con LEDs en un sistema basado en BE representa un avance prometedor para desarrollar sensores altamente sensibles y específicos, con lecturas directas y sencillas. Este enfoque tiene el potencial de convertirse en una herramienta accesible para el análisis *in situ* de alimentos, gracias a la sinergia entre la selectividad de los MIPs y las ventajas analíticas de la BE. Con este estudio, se busca no solo avanzar en la detección de micotoxinas, sino también explorar nuevas posibilidades para el desarrollo de sensores versátiles y económicos aplicables en una variedad de contextos.

### 3.2. Objetivos

El trabajo llevado a cabo persiguió desarrollar una estrategia innovadora para la cuantificación precisa y sensible de ZON, combinando la capacidad de reconocimiento molecular de los MIPs con un sistema de lectura optoelectrónica inalámbrica basado en electroquímica bipolar (BE). Esta aproximación busca avanzar en el campo de la detección de micotoxinas y explorar nuevas posibilidades para el diseño de sensores simplificados y versátiles, con aplicaciones en diversos contextos.

Para lograrlo, se han definido objetivos específicos que abordan los aspectos esenciales del diseño y la implementación del sistema, asegurando su selectividad, precisión y eficacia, desde la síntesis del polímero hasta su aplicación como sensor analítico avanzado. A continuación, se presentan los **objetivos específicos**:

- Sintetizar un MIP mediante polimerización térmica en la superficie de un alambre de oro funcionalizado, utilizando *N*-(2-aminoetil) metacrilamida (EAMA) como monómero funcional y 2,4-dihidroxibenzoato de ciclododecilo (CDHB) como molécula plantilla, para crear cavidades altamente específicas para el reconocimiento de ZON.
- Diseñar y fabricar un electrodo bipolar híbrido (BPE) que integre un MIP selectivo para el reconocimiento del analito objetivo, un micro-LED como transductor de la señal electroquímica y alambres de oro conectados a los terminales del LED para las reacciones redox “testigo”, estableciendo un sistema de detección optoelectroquímica inalámbrica en el que las reacciones redox en la disolución impulsan la emisión de luz del LED, permitiendo la cuantificación de ZON.
- Implementar dos sistemas de lectura optoelectrónica para la captura y análisis de la señal LED obtenida: uno utilizando una cámara fotográfica digital para registrar la emisión de luz y otro empleando una fibra óptica acoplada a un espectrómetro CCD lineal.
- Diseñar y fabricar celdas específicas adaptadas para cada uno de los sistemas de lectura utilizados, con el objetivo de minimizar las interacciones no específicas que puedan coexistir.

### 3.3. Parte experimental

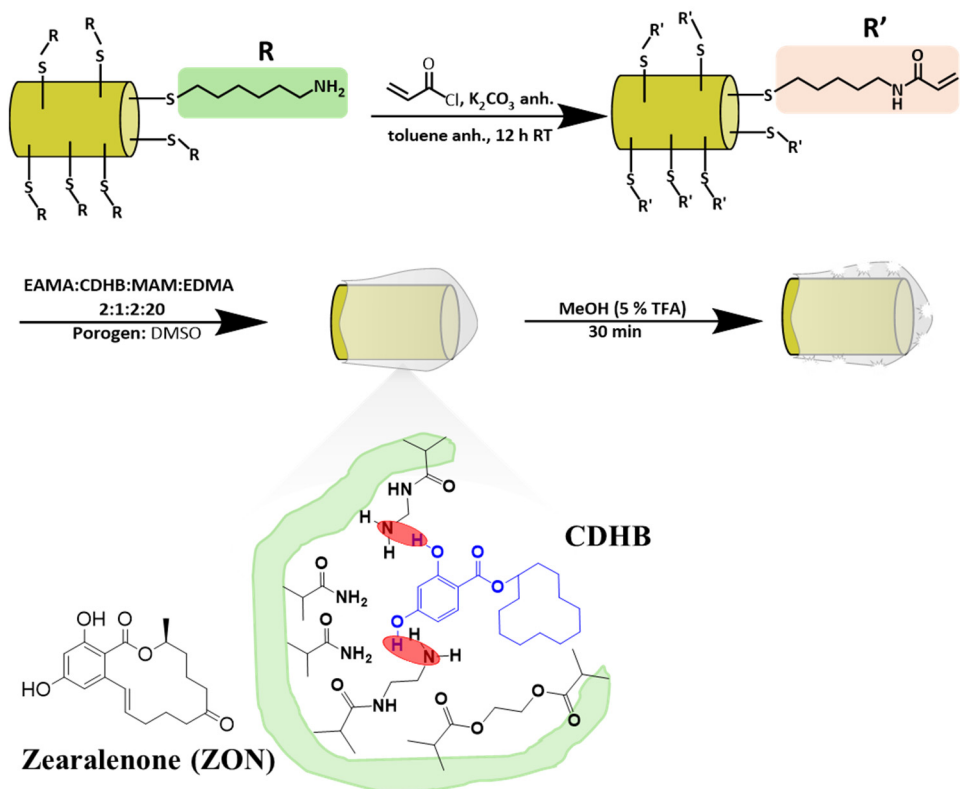
#### 3.3.1. Reactivos y disolventes

Se utilizaron metanol (MeOH, grado HPLC, Fisher Scientific), etanol absoluto (grado HPLC, VWR), acetonitrilo (ACN, grado HPLC, Fisher Scientific), dimetilsulfóxido (DMSO, grado HPLC, VWR), tolueno anhidro (grado HPLC, Thermo Scientific), ácido trifluoroacético (TFA, 99.9%, Fluorochem), fosfato monosódico (99%, Merck), hidróxido de tetrabutilamonio metanólico (TBAOH, 10% w/w, TCI), zearalenona (ZON, 96%, ABCR), deoxinivalenol (DON, 98%, Merck),  $K_3[Fe(CN)_6]$  y  $K_4[Fe(CN)_6]$  (99.9%, Merck-Millipore), alambres de oro (0.25 mm dia., 99.9%, Thermo Scientific), y elastómero de silicona SYLGARD™ 184 (polidimetilsiloxano de dos componentes, PDMS; Dow Chemical Europe GmbH) tal como se recibieron. Todas las disoluciones acuosas se prepararon con agua tipo I (DirectQ3-UV, Merck). Los monómeros metacrilamida (MAM, 98%), dimetacrilato de etilenglicol (EDMA, 98%), clorhidrato de *N*-(2-aminoetil)metacrilamida (EAMA, 98%), y el iniciador azobisisobutironitrilo (AIBN, 98%) fueron adquiridos a Merck. La sal de EAMA se neutralizó con una cantidad estequiométrica de TBAOH en MeOH, y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor. El sólido resultante se disolvió en DMSO anhidro, previamente purgado con Ar (99.95%, Carburos Metálicos). Cuando fue necesario, los monómeros se purificaron utilizando una columna para eliminar inhibidores (Sigma-Aldrich). El análogo estructural de la ZON, 2,4-dihidroxibenzoato de ciclododecilo (CDHB), se sintetizó en nuestro laboratorio siguiendo protocolos previamente optimizados.<sup>97</sup>

#### 3.3.2. Modificación química de la superficie del electrodo de oro

La funcionalización del alambre de Au se llevó a cabo mediante un procedimiento en dos etapas (**Figura 54**). En primer lugar, la superficie metálica se funcionalizó con grupos amino sumergiendo un segmento de 1.0 cm de longitud del alambre en una disolución de 6-amino-1-hexanotiol (Indagoo, 95%) 3 mmol L<sup>-1</sup> en etanol absoluto, colocado en un vial de vidrio para HPLC. La cantidad de disolución controla la altura del segmento funcionalizado, ya que el alambre de oro se mantiene firmemente sujeto dentro de un tubo de PFA insertado en un septum de goma, mientras un segmento del alambre sobresale del tubo. El alambre se dejó reaccionar toda la noche a 5 °C en la disolución y luego se lavó cuidadosamente con etanol absoluto y tolueno.

En una segunda etapa, el alambre activado se transfirió a un vial de vidrio de 12 mL con septum, que contenía tolueno anhidro y 14 mg de carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ , Scharlau) previamente secado en estufa. El vial se purgó con Ar durante 15 min antes de añadir 240 μmol de cloruro de acrililo (Merck, 96%), disuelto en un pequeño volumen de tolueno anhidro, mediante una jeringa y gota a gota. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche bajo atmósfera inerte.



**Figura 54.** Ilustración del procedimiento experimental para preparar los electrodos de oro recubiertos con MIP. Los dos primeros pasos implican la funcionalización de los alambres para garantizar la formación del polímero en la superficie metálica, seguida de la polimerización radicalaria. En el paso final se elimina la molécula plantilla, dejando los sitios de reconocimiento para la unión del MIP a la micotoxina.

El MIP se preparó a partir de una mezcla de EAMA neutralizado (8  $\mu$ mol), MAM (8  $\mu$ mol), CDHB (4  $\mu$ mol), EDMA (14  $\mu$ mol), y AIBN (5% del peso total de los monómeros) en 5 mL de DMSO. El alambre de oro, funcionalizado con grupos acrilamida, se sumergió en esta mezcla de prepolimerización. La disolución se desoxigenó purgándola con Ar durante 30 min y la polimerización se llevó a cabo en un baño termostático utilizando el siguiente perfil de temperatura: 50 °C durante 2 h, 65 °C durante toda la noche y 80 °C durante 2 h. Después de la polimerización, el alambre de oro recubierto con MIP (Au@MIP) se enjuagó minuciosamente con DMSO para eliminar el exceso de monómeros. Para eliminar la molécula plantilla, el alambre se lavó durante 30 min en 2 mL de una mezcla de metanol y ácido trifluoroacético (TFA; 95:5 v/v) con agitación, seguido de un lavado con 2 mL de metanol durante otros 30 min. Los polímeros sin impronta molecular (NIPs) se prepararon de manera similar, pero en ausencia de la molécula plantilla (Au@NIP). Estos procedimientos de funcionalización y polimerización también se emplearon para modificar electrodos de disco de oro (3 mm de diámetro, Autolab). La morfología de los polímeros resultantes se caracterizó mediante microscopía electrónica de

barrido (SEM; JEOL JSM 7600F) operando a 20 kV (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, UCM).

### 3.3.3. Medidas electroquímicas

Las medidas de BE se realizaron en una disolución tampón de fosfato de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 8.2 que contenía  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ( $0.8 \text{ mmol L}^{-1}$  de cada uno) como sonda redox. Se utilizó esta disolución electrolítica para todas las medidas, salvo indicación contraria. En todos los experimentos de BE se empleó una fuente de alimentación Manson EP-613 acoplada a un regulador electrónico de voltaje ARCELI ARC-1001.

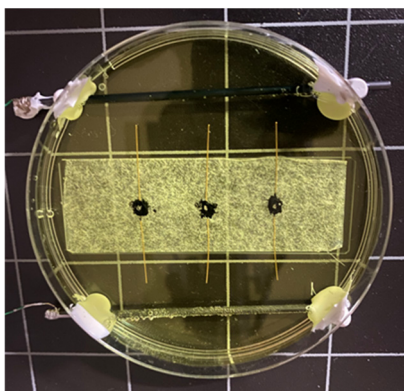
### 3.3.4. Fabricación de celdas BPE

El BPE híbrido se fabricó conectando un alambre de Au sin recubrimiento al cátodo y un alambre de Au recubierto con polímero al ánodo de un micro-LED verde (RS 654-4304, que consiste en un LED verde de tipo SMD 0603 sobre una base de  $1.7 \text{ mm} \times 0.8 \text{ mm} \times 0.65 \text{ mm}$ ). Se empleó una pequeña cantidad de pintura plateada (Electrode Microscopy Sciences) para establecer la conexión eléctrica entre los alambres de Au y los terminales del LED.

## Plataforma clásica

La celda electroquímica bipolar clásica estaba formada por el BPE híbrido, ya sea el Au/LED/Au@MIP o el Au/LED/Au@NIP, colocados entre dos electrodos de grafito de  $2 \text{ mm}$  dia.  $\times 8.5 \text{ cm}$  de longitud (Staedtler, 2H) (**Figura 55**). En esta celda, se aplica un campo eléctrico constante de  $1.16 \text{ V cm}^{-1}$  entre los dos electrodos de alimentación paralelos, ubicados a  $5.5 \text{ cm}$  de distancia en una placa Petri de plástico de  $9 \text{ cm}$  de diámetro. Se añadieron varias alícuotas de  $1 - 27 \mu\text{L}$  de disoluciones madre de ZON para proporcionar concentraciones de  $0 - 100 \text{ ng mL}^{-1}$  de la micotoxina en  $30 \text{ mL}$  de la disolución electrolítica de trabajo. Tras cada adición, el medio se homogeneizó con ayuda de una micropipeta de  $5 \text{ mL}$  y luego se dejó incubar durante  $5 \text{ min}$  para permitir la difusión del analito en el interior de los recubrimientos de MIP y NIP de los respectivos BPEs.

La emisión del LED verde se registró con una cámara Fujifilm X-H2-1050 provista de un objetivo Fujinon XF16-80 mm F4-R-OIS-WR. Se capturaron imágenes digitales del LED después del periodo de incubación, a intervalos de  $0.5 \text{ s}$  durante un total de  $20 \text{ s}$ , permitiendo la determinación de la intensidad de emisión del LED una vez que se estabilizó (la intensidad estable de la luz verde ocurría alrededor de la foto número 30). Las imágenes obtenidas se procesaron con el software Image J 1.54.

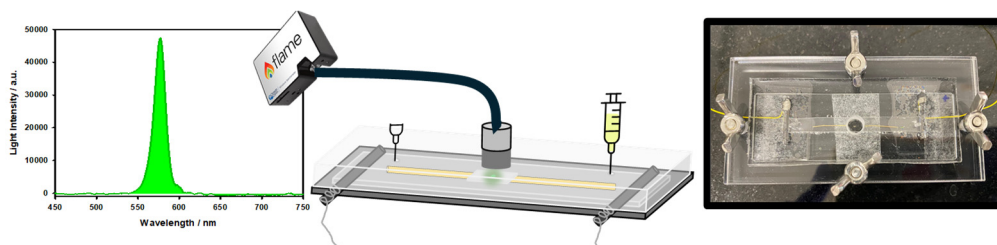


**Figura 55.** Celda electroquímica bipolar clásica compuesta por tres LEDs conectados por alambres de oro, donde la parte anódica consiste en oro, MIP y polímero sin impronta (NIP), respectivamente.

### Plataforma microfluídica

La celda microfluídica se construyó de la siguiente manera: se diseñó y fabricó en los talleres de apoyo a la investigación de la UCM un molde de PVC (poli(cloruro de vinilo)) para formar un canal microfluídico de 55 mm × 6 mm × 2 mm, en el cual se colocó el BPE híbrido. A continuación, se fijaron dos barras de metacrilato (17 mm × 2 mm × 2 mm) al molde de PVC, con el fin de crear las cavidades necesarias para los electrodos de alimentación al desmoldar. El molde se adhirió al fondo de una placa de Petri de plástico de 9 cm, y se añadieron cuidadosamente 27.4 g de la mezcla de SYLGARD™ 184 (elastómero PDMS y agente de curado en una proporción 9:1 p/p), previamente centrifugada para eliminar el aire disuelto. Tras una curación de 48 h a 40 °C, el elastómero sólido se retiró de la placa Petri y se cortó en una forma rectangular (77 mm × 32 mm × 5 mm), insertando mecánicamente los electrodos de grafito en las cavidades formadas.

El canal de BE de PDMS resultante se fijó a un portaobjetos de microscopio estándar, al que se unió el dispositivo Au/LED/Au@MIP mediante cinta adhesiva de doble cara (Kapton). El conjunto de PDMS/portaobjetos de vidrio se colocó entre dos placas perforadas de PMMA (poli(metacrilato de metilo)) (89 mm × 45 mm × 8 mm) y se ajustó con cuatro tuercas mariposa (**Figura 56**). La placa superior de PMMA presenta una abertura roscada para conectar un cable de fibra óptica terminada en conectores SMA905 (StellarNet F1000-UV-vis-SR 1000- $\mu$ m 1-m de fibra de sílice recubierta de camisa de PVC), que transporta la luz del LED al espectrómetro. Este último es un espectrómetro de fibra óptica Ocean Optics FLAME-S-VIS-NIR-ES alimentado por USB, equipado con una rendija de entrada de 200  $\mu$ m, una red de difracción de 600 líneas  $\text{mm}^{-1}$  de 350 a 1000 nm y un sensor CCD lineal Sony ILX511B de 2048 píxeles. Las medidas se realizaron en presencia de luz ambiente.



**Figura 56.** Ilustración de una celda microfluídica para electroquímica bipolar (izquierda) y la realización final de la celda (derecha), con un LED conectado mediante alambres de oro. La región anódica contiene la capa MIP.

Las medidas microfluídicas se realizaron inyectando 600  $\mu\text{L}$  de la disolución electrolítica de trabajo, que contenía la concentración deseada del analito ( $0 \leq [\text{ZON}] \leq 2000 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $0 \leq [\text{DON}] \leq 100 \text{ ng mL}^{-1}$ ), en la cámara mediante una jeringa de plástico de 1 mL perforando con la aguja hipodérmica el PDMS entre el cátodo del electrodo de alimentación y el alambre de Au desnudo. Además, se colocó otro barril de jeringa de plástico con aguja entre el ánodo del electrodo de alimentación y el alambre Au@MIP para permitir la salida de la muestra líquida. La disolución inyectada se incubó durante 5 min antes de aplicar un campo eléctrico constante de  $1.8 \text{ V cm}^{-1}$  entre los electrodos de alimentación, situados a 4.9 cm de distancia (**Figura 56**). El registro del espectro de la luz del LED mediante el espectrómetro (con un tiempo de integración de 15 s, un *boxcar* de 10 puntos y el “modo eléctrico oscuro” seleccionado) se inició 5 s después de que se aplicara el campo eléctrico a los electrodos de alimentación. El espectro de emisión se analizó con el software SSPS SigmaPlot 14.0.

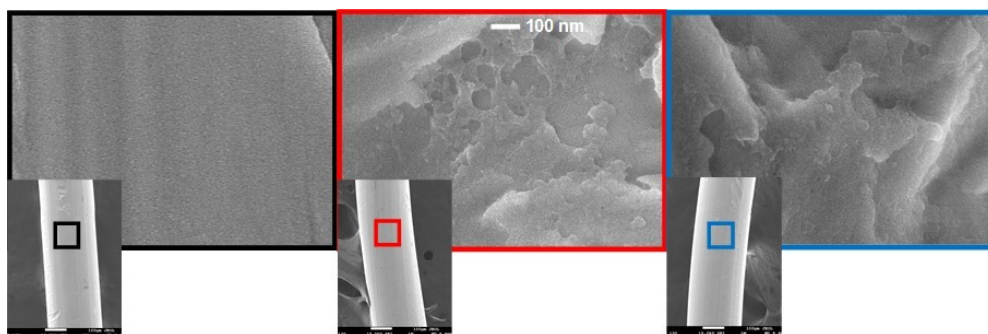
### 3.4. Resultados y discusión

#### 3.4.1. Síntesis, caracterización morfológica y comportamiento electroquímico del alambre de oro recubierto con MIP

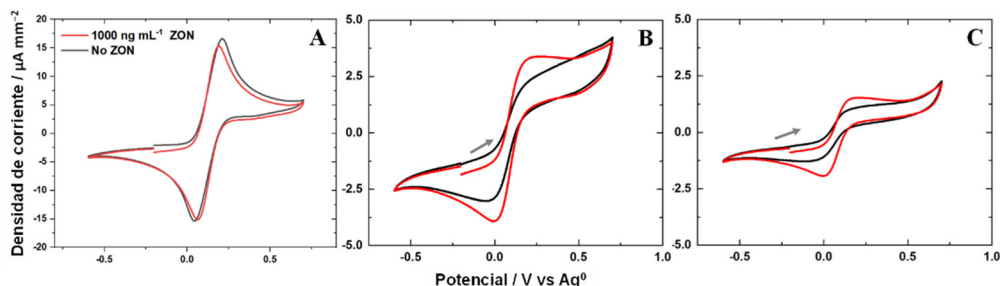
El MIP selectivo para ZON se preparó siguiendo un procedimiento previamente reportado.<sup>179</sup> Por lo tanto, no hemos realizado ninguna optimización adicional de la composición del monómero, la relación monómeros/plantilla o las condiciones de reacción. En resumen, el MIP se sintetizó mediante polimerización térmica de una mezcla de monómeros EAMA/CDHB/MAM/EDMA en una relación molar de 2:1:2:20 en DMSO, sobre la superficie de un electrodo de disco de oro previamente funcionalizado con grupos acrilamida (**Figura 54**). Como primera prueba de la modificación química, se examinó la morfología de las superficies recubiertas con MIP, NIP y de los electrodos de Au vírgenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (**Figura 57**). Las micrografías obtenidas por SEM muestran una superficie homogénea y lisa en el alambre de oro sin modificar, mientras que las superficies modificadas con polímero presentan una morfología rugosa, corroborando

su recubrimiento polimérico. Es importante resaltar que, debido a las limitaciones en la ampliación del microscopio, no fue posible distinguir claramente las diferencias morfológicas entre las superficies recubiertas con MIP y NIP.

Tras la caracterización de la superficie del alambre de Au, se estudió el comportamiento electroquímico del recubrimiento polimérico sobre un electrodo de disco de oro convencional (**Figura 58**). En este contexto, el MIP y el NIP se comportan como aislantes clásicos, limitando así las constantes de velocidad de transferencia electrónica entre la superficie de Au y las sondas electroactivas ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ).



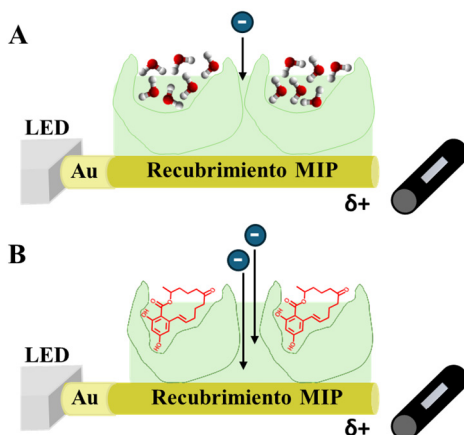
**Figura 57.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) del alambre de Au virgen (negro) y de los electrodos modificados con MIP (rojo) y NIP (azul). Reproducido de la referencia [178] con permiso.



**Figura 58.** Estudio voltamperométrico del sistema redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) en la superficie de un electrodo de disco de oro (A) virgen, (B) recubierto con MIP y (C) recubierto con NIP, en una disolución tampón de fosfato de  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8.2 ( $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ), en ausencia (línea negra) y presencia (línea roja) de ZON ( $1000 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

En el caso del alambre de Au recubierto por la capa MIP, este fenómeno da lugar a una disminución de la corriente que pasa a través del LED, con la consiguiente emisión de luz más tenue. Sin embargo, la unión de la micotoxina objetivo a los sitios del polímero probablemente induce una reconfiguración de la red MIP, facilitando así la transferencia electrónica interfacial. Esta propuesta se encuentra en concordancia con el denominado “efecto compuerta” (*gate effect*),<sup>180</sup> el cual plantea que la interacción del analito objetivo con los sitios de reconocimiento del MIP provoca cambios estructurales significativos en la matriz polimérica. La naturaleza del MIP juega un papel crucial en la determinación de los cambios específicos que pueden

ocurrir. Un posible mecanismo implica la contracción de la red polimérica debido al intercambio entre las moléculas del disolvente y el analito. A medida que los grupos funcionales en las cavidades selectivas del MIP interactúan estrechamente con el analito, se produce una ligera contracción de la columna vertebral del polímero. Este estrechamiento facilita la formación de caminos que permiten que la sonda redox llegue más fácilmente a la superficie del electrodo, lo que aumenta finalmente la señal de corriente (**Figura 59**). Este efecto resalta la importancia de la reconfiguración estructural en los MIPs durante la detección del analito, como se ha enfatizado en diversos estudios.<sup>181,182</sup>



**Figura 59.** Ilustración del “efecto compuerta” de un MIP sobre un alambre de Au conectado al ánodo de un LED. A) El MIP se hincha debido a la presencia de moléculas de agua, dificultando el acceso de las sondas redox ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) al electrodo bipolar. B) El MIP se contrae cuando el analito se une a los sitios de reconocimiento, facilitando el acceso de la sonda al electrodo. Las barras grises representan el ánodo de electrodo de alimentación para el fenómeno electroquímico bipolar inalámbrico.

Para respaldar esta explicación, se investigó el comportamiento voltamperométrico del par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  en tres tipos de electrodos: un electrodo de disco de Au virgen, un electrodo recubierto con MIP y un electrodo recubierto con NIP. El estudio se llevó a cabo en una celda electroquímica clásica de tres electrodos, utilizando una disolución que contenía  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampón fosfato (pH 8.2),  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de cada uno), en ausencia y en presencia de ZON ( $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Como se puede observar en la **Figura 58A**, se midió un proceso cuasi-reversible limitado por difusión, con un  $\Delta E \sim 180 \text{ mV}$  con el electrodo de Au virgen, tanto en ausencia como en presencia de ZON. Esto demuestra que la micotoxina de interés no es electroactiva a esas concentraciones dentro del rango de potencial seleccionado, lo cual es compatible con el comportamiento descrito de la ZON en condiciones experimentales similares.<sup>183</sup> Por lo tanto, el analito no contribuye significativamente a la corriente faradaica cuantificada por nuestro sistema electroquímico.

Sin embargo, en ausencia de la micotoxina, la corriente asociada con el proceso redox disminuye aproximadamente cuatro veces después de recubrir la superficie del

electrodo de oro con el MIP o el NIP (**Figura 58B** y **58C**). No obstante, en presencia de ZON, se observó un aumento en la densidad de corriente del proceso redox (**Figura 58B** y **58C**), siendo este aumento más pronunciado en el caso del electrodo recubierto con MIP (**Figura 58B**). Este hecho sugiere que la presencia de ZON dentro de la matriz MIP facilita la difusión de la sonda redox electroactiva hacia la superficie del electrodo y, por lo tanto, las reacciones de transferencia de electrones. Este efecto es similar al “efecto compuerta” mencionado anteriormente, donde la permeabilidad de ciertos tipos de MIPs se modula mediante interacciones específicas con sus moléculas objetivo. Además, se ha demostrado que la presencia del analito objetivo altera significativamente la rugosidad de la superficie de los MIPs, lo que indica cambios en la estructura del polímero.<sup>184</sup> Dichas alteraciones pueden llevar a una expansión de los poros, mejorando así la difusión de las sondas redox a través del polímero hacia la superficie del electrodo. Este efecto finalmente aumenta la respuesta de corriente faradaica, como se observó aquí en presencia del analito objetivo. Además, se observó una mayor densidad de corriente con el electrodo recubierto con MIP que con el electrodo recubierto con NIP, tanto en ausencia como en presencia de ZON. Esta diferencia puede atribuirse a la distinta porosidad local y área de superficie accesible del MIP, que está influida por la incorporación de la molécula plantilla durante su síntesis.<sup>185,186</sup>

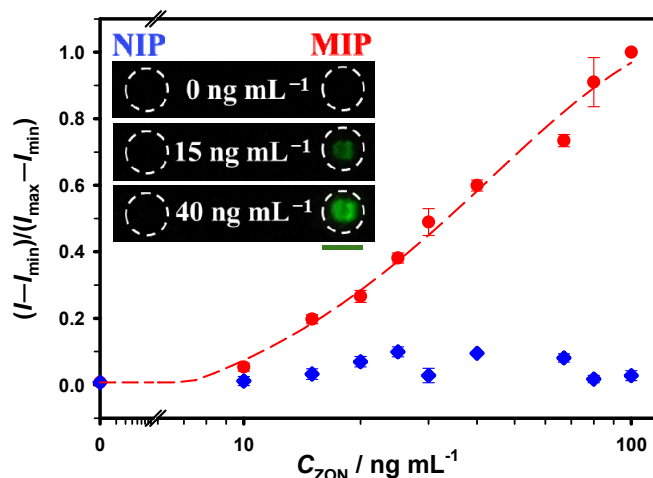
### **3.4.2. Plataforma clásica de BE para la cuantificación inalámbrica de ZON**

Tras demostrar el efecto de la micotoxina sobre las características de transferencia electrónica del electrodo modificado con MIP, se adaptó este proceso dependiente del analito al formato de BE inalámbrico con transducción LED. Para ambos BPE híbridos, Au@MIP y Au@NIP, se fabricaron electrodos de alambre de Au recubiertos con polímero, los cuales se conectaron a los ánodos de los pequeños LEDs verdes (ver sección **3.3.2**), mientras que un alambre de Au sin recubrimiento se conectó a cada cátodo del LED. Considerando el potencial umbral intrínseco del LED verde, aproximadamente 2.1 V según el fabricante, y la longitud total de los BPEs ( $l = 4$  cm), se requerirían valores de campo eléctrico superiores a  $0.52 \text{ V cm}^{-1}$  para encender el LED (ecuación 5).

$$\Delta V = E \times l \quad (5)$$

En principio, bajo estas condiciones, la diferencia de potencial de polarización ( $\Delta V$ ) del BPE híbrido permitiría la oxidación y reducción de una sonda redox en los extremos anódico y catódico del dispositivo, respectivamente. Como resultado, el flujo concomitante de electrones debería generar una corriente lo suficientemente alta como para activar la emisión del LED. Sin embargo, en la práctica, se requieren valores de campo eléctrico mayores debido a la baja conductividad intrínseca de la disolución y la contribución resistiva interfacial de la capa de polímero. Esto se puede

abordar fácilmente utilizando sondas redox que requieran un  $\Delta V$  pequeño, como el par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ( $\sim 0.18$  V, **Figura 58A**). De este modo, al aplicar un campo eléctrico adecuado entre los electrodos de alimentación, se podrá inducir la emisión del LED en presencia de la micotoxina, ya que las reacciones redox se llevarán a cabo. En cambio, en ausencia de la micotoxina, la emisión no ocurrirá debido a la inhibición del proceso redox (**Figura 60**).

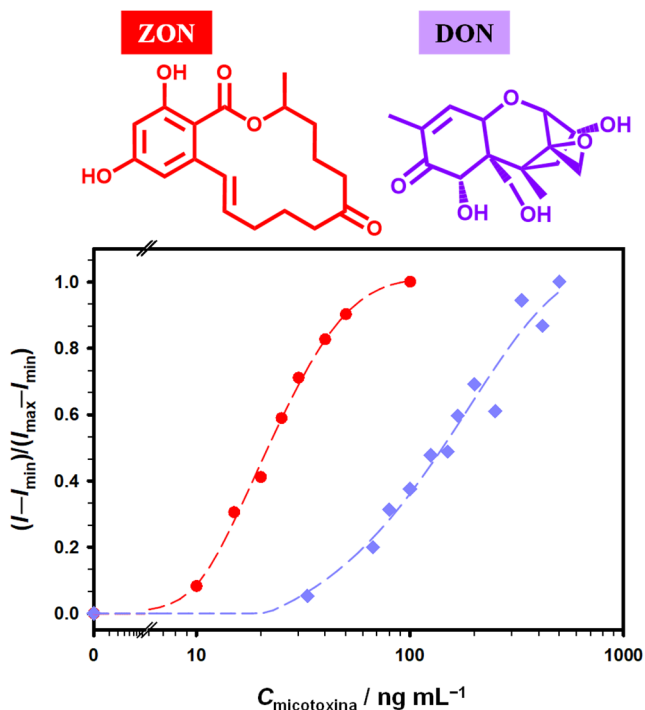


**Figura 60.** Emisión normalizada del microLED en función de la concentración de ZON en una disolución acuosa  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  en tampón fosfato (pH 8.2) en presencia del par  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ( $0.8 \text{ mmol L}^{-1}$  de cada uno), sometida a un campo eléctrico constante de  $1.16 \text{ V cm}^{-1}$  para los BPE híbridos Au@MIP (puntos rojos) y Au@NIP (rombos azules). Inserto: fotografías de la luz verde del LED generada por los BPE Au@MIP y Au@NIP bajo dichas condiciones, a las concentraciones de ZON indicadas. La barra verde debajo del LED indica la escala, correspondiente a  $1.7 \text{ mm}$ . Reproducido de la referencia [178] con permiso.

Como se mencionó anteriormente, la unión de la micotoxina al MIP facilita el acceso de la sonda redox al alambre de Au debido a la contracción del polímero, lo que provoca la expansión de los poros (**Figura 59**). Además, es razonable suponer que dicha expansión de los poros pueda estar relacionada con la cantidad de micotoxina unida al MIP. Para corroborar esta hipótesis, se evaluó la potencia radiante de los LEDs conectados a los BPEs híbridos Au@MIP o Au@NIP en función de la concentración de ZON (**Figura 60**). Cada conjunto se colocó en el centro de una celda BE (**Figura 55**) que contenía la disolución electrolítica de trabajo. Bajo estas condiciones, el LED en cada BPE permanece apagado en ausencia de ZON (**Figura 60**, inserto). Sin embargo, después de la primera adición del analito ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ), el LED conectado al Au@MIP se enciende, mientras que el LED conectado al Au@NIP permanece apagado. Estos resultados son coherentes con las medidas voltamperométricas, proporcionando un apoyo adicional al “efecto compuerta” del polímero causado por la unión de ZON, lo que facilita el acceso de la sonda redox a la superficie del electrodo, permitiendo los procesos de transferencia electrónica.

La intensidad de la emisión del LED en función de la concentración de ZON se muestra en la **Figura 60**. Se observó una correlación entre la intensidad de luz normalizada y la cantidad de analito presente en la disolución para el BPE Au@MIP (**Figura 60**, puntos rojos). Por el contrario, el BPE Au@NIP permaneció apagado en todo el rango de concentraciones probadas (**Figura 60**, rombos azules), corroborando el papel fundamental del elemento de reconocimiento selectivo.

Habiendo demostrado la función esencial del MIP en el proceso electroquímico bipolar, se estudió la especificidad del sistema, evaluando el comportamiento de la emisión de luz del dispositivo en presencia de una especie potencialmente interferente, como el deoxinivalenol (DON), otra micotoxina habitual. ZON y DON son actualmente las micotoxinas más prevalentes en alimentos contaminados a nivel mundial.<sup>59</sup> Además, ambas micotoxinas provienen del mismo hongo, comparten grupos funcionales similares y un tamaño molecular comparable (**Figura 61**).



**Figura 61.** Estructuras químicas de las toxinas ZON y DON (arriba). Intensidad de luz del LED normalizada en función de la concentración de ZON (puntos rojos) o DON (rombos morados), en una disolución acuosa de fosfato a 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8.2) en presencia de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> y [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> (0.8 mmol L<sup>-1</sup> cada uno), con un campo eléctrico constante de 1.16 V cm<sup>-1</sup> utilizando un BPE híbrido Au@MIP (abajo). Reproducido de la referencia [178] con permiso.

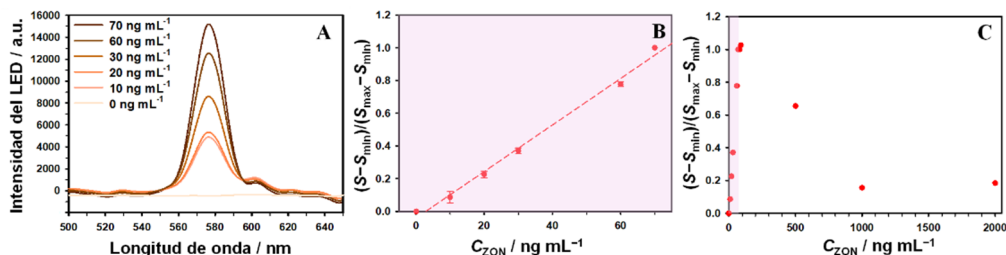
Por tanto, la cuantificación selectiva de ZON en presencia de otras moléculas, es muy deseable. El efecto del DON sobre el electrodo compuesto Au@MIP se evaluó bajo las mismas condiciones que las utilizadas para el análisis de ZON. El rango de concentración seleccionado para las micotoxinas ( $0 \leq [\text{ZON}] \leq 100 \text{ ng mL}^{-1}$ ;

$0 \leq [\text{DON}] \leq 500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) se basa en los límites máximos residuales (LMR) establecidos por el Reglamento de la Comisión Europea (UE) 2023/915 para cada micotoxina en diferentes alimentos. Como se observa en la **Figura 61**, el LED en el BPE permanece apagado en ausencia de ZON y DON. Sorprendentemente, también se observó un aumento gradual de la intensidad del LED en función de la concentración de DON. Este comportamiento sugiere la existencia de interacciones no específicas entre el polímero con impronta para ZON y el DON durante el periodo de incubación. A pesar de ello, se requieren concentraciones 6 veces más altas de DON ( $> 30 \text{ ng mL}^{-1}$ ) que de ZON ( $> 5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) para activar la emisión del LED (**Figura 61**). Además, se observó un aumento más pronunciado de esta emisión con las adiciones de ZON en comparación con el patrón de DON. La pendiente de la sección lineal de los gráficos de intensidad de luz vs. concentración está relacionada con la constante de unión del analito al recubrimiento MIP. En este sentido, es evidente que la unión de ZON al MIP es más eficiente que la interacción de DON, ya que la pendiente del gráfico para la primera micotoxina ( $2 \times 10^{-2} \text{ mL ng}^{-1}$ ) es un orden de magnitud mayor que la pendiente que genera el interferente potencial ( $3 \times 10^{-3} \text{ mL ng}^{-1}$ ). No obstante, la interferencia de DON solo ocurriría a concentraciones superiores a aproximadamente  $30 \text{ ng mL}^{-1}$ , de acuerdo con el efecto de activación del LED de esta micotoxina (**Figura 61**). Basándonos en estos resultados, se desarrolló un nuevo diseño de celda que permitiera reducir las interacciones no específicas, disminuir los volúmenes de muestra de trabajo y optimizar la monitorización de la intensidad del LED, mejorando así la detección de ZON en presencia de potenciales interferentes.

### **3.4.3. Plataforma microfluídica para la cuantificación inalámbrica de ZON**

Tras identificar diferencias significativas en la respuesta del sensor Au@MIP a micotoxinas relacionadas, se decidió diseñar una configuración microfluídica para cumplir con los objetivos planteados. Para este fin, se fabricó una celda microfluídica en PDMS, equipada con un canal para colocar el BPE Au/LED/Au@MIP y dos barras de grafito incrustadas en sus extremos como electrodos de alimentación; pueden encontrarse más detalles en la sección 3.3.4 y en la **Figura 56**. Para realizar una medida, la disolución electrolítica que contenía el analito se inyectó en la cámara de PDMS, se incubó y se sometió después a un campo eléctrico, tras lo cual se registró el espectro de emisión del LED utilizando un espectrómetro de fibra óptica. Bajo estas condiciones, la inyección/evacuación sucesiva de las disoluciones simula un enfoque dinámico que minimiza las interacciones no específicas. La **Figura 62** ilustra las medidas de BE de disoluciones de ZON tomadas en la celda microfluídica. Cabe destacar que el campo eléctrico aplicado fue más alto en la configuración microfluídica que en el sistema clásico debido a consideraciones geométricas. El uso de un espectrómetro en lugar de una cámara permite recolectar un espectro completo

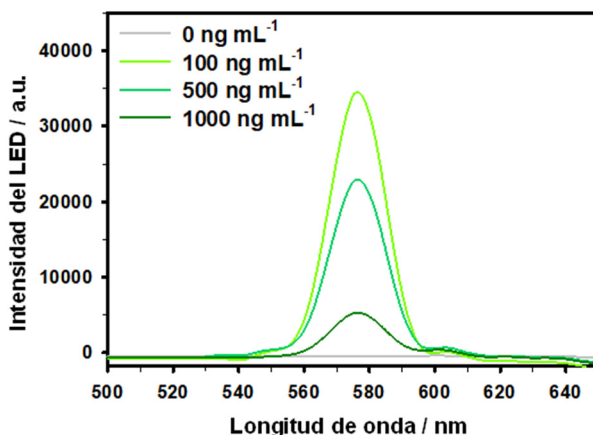
de la luz verde emitida por el LED transductor (**Figura 62A**). Este espectro está centrado en  $(577 \pm 1)$  nm y su intensidad máxima y área dependen de la concentración de la micotoxina. A partir de estos espectros, se construyó un gráfico del área normalizada bajo la curva de emisión  $((S - S_{\min})/(S_{\max} - S_{\min}))$  en función de la concentración de ZON (**Figura 62B**).



**Figura 62.** (A) Espectros de intensidad del LED medidos en el espectrómetro CCD en función de la concentración de ZON (0 – 70 ng mL<sup>-1</sup>) en una disolución acuosa de tampón fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8.2), en presencia de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> y [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> (0.8 mmol L<sup>-1</sup> de cada uno), aplicando un campo eléctrico constante de 1.8 V cm<sup>-1</sup> con una celda BE microfluidica Au/LED/Au@MIP. (B) Área normalizada bajo el espectro de emisión en función de la concentración de ZON obtenida de los datos espectrales en la **Figura 62A**. La línea discontinua roja representa el mejor ajuste a la ecuación  $y = 0.01 \times C_{ZON} - 0.04$ . (C) Área normalizada bajo el espectro de emisión en función de la concentración de ZON en el rango de concentración 0 – 2000 ng mL<sup>-1</sup>. Reproducido de la referencia [178] con permiso.

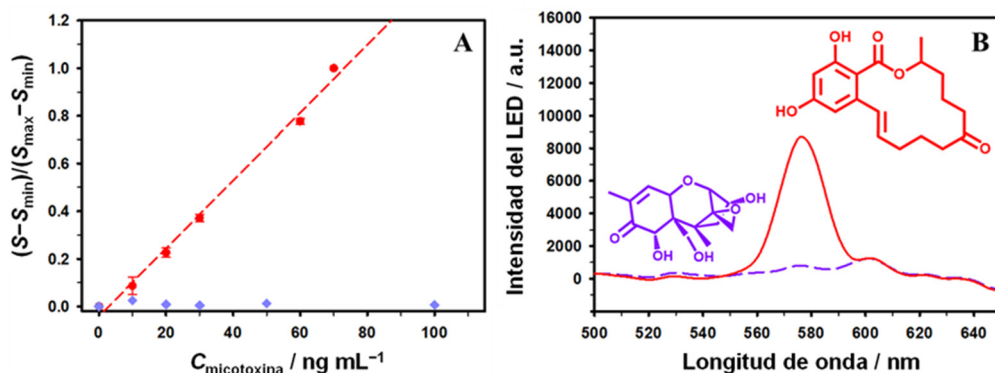
De la misma manera que se observó en la celda BE clásica, el LED permaneció apagado en ausencia de la micotoxina, mientras que comenzó a emitir a partir de la primera adición de ZON (10 ng mL<sup>-1</sup>). Se observó una correlación lineal entre el área normalizada de emisión y la concentración de ZON en el rango de concentraciones de 10 a 70 ng mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.993$ ) (**Figura 62B**), con un límite de detección inferior (LLOD) de 3 ng mL<sup>-1</sup>. A concentraciones altas de ZON ( $> 100$  ng mL<sup>-1</sup>), se produjo una disminución de la emisión del LED (**Figura 62C** y **Figura 63**). Tal disminución sugiere que el MIP ha alcanzado la saturación de sus sitios de unión y el exceso de micotoxina se une de manera no específica a la superficie del polímero. Esta unión no específica a alta concentración de ZON interfiere con el proceso de transferencia de electrones, lo que lleva a un agotamiento del flujo de electrones a través del LED y, por consiguiente, disminuye su emisión. Naturalmente, esta unión inespecífica debería afectar una o más propiedades del MIP; de lo contrario, la señal se estabilizaría y no disminuiría.

Teniendo en cuenta que el límite superior de detección depende de la saturación de los sitios de unión del MIP, la manera de aumentar el rango dinámico sería incrementar el número de estos sitios aumentando la cantidad de MIP en el alambre de oro. Para mantener el tiempo de respuesta actual del sensor, este objetivo podría lograrse utilizando un alambre de oro más grueso (ya que el campo eléctrico necesario para inducir la oxidación y reducción en cada extremo del electrodo bipolar no depende del grosor del electrodo (ecuación 5) o bien nanoestructurando el alambre de oro antes de aplicar el recubrimiento con MIP.



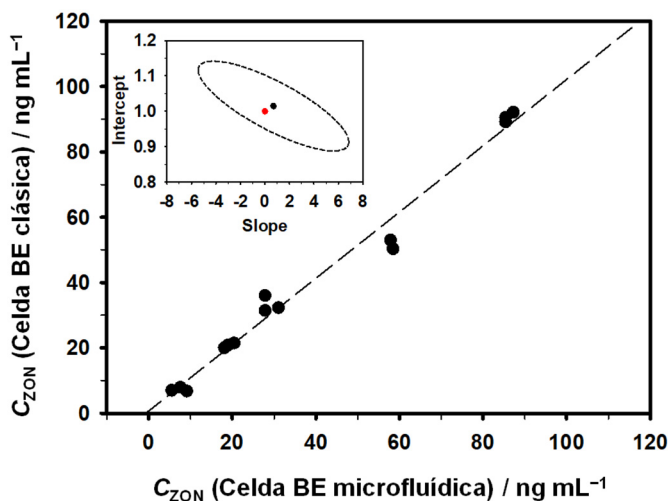
**Figura 63.** Espectros de intensidad del LED en función de la concentración de ZON (indicada en la figura), obtenidos en una disolución acuosa de tampón fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8.2) en presencia de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> y [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> (0.8 mmol L<sup>-1</sup> de cada uno), aplicando un campo eléctrico constante (1.8 V cm<sup>-1</sup>) con un BPE híbrido Au@MIP.

Tras demostrar la funcionalidad y simplicidad del sistema microfluídico para medidas BE basadas en MIP, se investigó el efecto del DON en esta configuración. El comportamiento óptico del dispositivo Au/LED/Au@MIP se evaluó bajo las mismas condiciones experimentales a diferentes concentraciones de DON. En el rango de 0 a 70 ng mL<sup>-1</sup>, se observó una respuesta lineal del dispositivo a ZON. Curiosamente, no se distinguió ninguna emisión del LED tras agregar DON en ese rango de concentración (**Figura 64**). Las pendientes de la respuesta del sensor a ZON ( $1.4 \times 10^{-2}$  mL ng<sup>-1</sup>) y DON ( $4.3 \times 10^{-5}$  mL ng<sup>-1</sup>) evidencian que el dispositivo microfluídico minimiza eficazmente las interacciones no específicas del analito con el MIP, mejorando la selectividad del método en tres órdenes de magnitud respecto al sistema BE clásico. Además, la reutilización de los electrodos se demostró realizando medidas repetidas con el dispositivo al menos tres veces durante un mes, sin pérdida de la señal analítica. Es importante señalar que, antes de cada serie de experimentos, los cables recubiertos de polímero almacenados a 5 °C en ACN, se lavaron durante 30 min con una disolución de MeOH-TFA (95:5 v/v), seguida de otros 30 min con MeOH para eliminar el TFA residual.



**Figura 64.** (A) Área de emisión normalizada en función de las concentraciones de ZON (puntos rojos) y DON (rombos morados), medida en una disolución acuosa de tampón fosfato  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 8.2) en presencia de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ( $0.8 \text{ mmol L}^{-1}$  de cada uno) a un campo eléctrico constante ( $1.8 \text{ V cm}^{-1}$ ) con un BPE híbrido Au@MIP. (B) Espectros de intensidad del LED registrados a una concentración de ZON de  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  (línea roja) y una concentración de DON de  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  (línea discontinua morada) bajo las mismas condiciones experimentales. Reproducido de la referencia [178] con permiso.

Finalmente, los resultados obtenidos con la plataforma microfluídica y la configuración clásica de BE se compararon con éxito utilizando el gráfico de la región de confianza conjunta elíptica (EJCR), derivado del análisis de regresión por mínimos cuadrados ordinarios (Figura 65).<sup>187</sup>



**Figura 65.** Gráfico de la región de confianza conjunta elíptica (EJCR) utilizando el método de regresión de mínimos cuadrados ordinarios (OLS) para las concentraciones de ZON medidas con la plataforma microfluídica y con el dispositivo electroquímico bipolar clásico. El inserto muestra el EJCR para la pendiente y la ordenada en el origen en el ajuste de regresión de las concentraciones obtenidas experimentalmente frente a los valores de referencia. El caso ideal, con una ordenada en el origen igual a 0 y una pendiente de 1, está marcado con un punto rojo, mientras que el resultado experimental, con una ordenada en el origen de 0.70 y una pendiente de 1.01, está indicado por un punto negro.

### 3.5. Conclusiones

Por primera vez, se ha fabricado con éxito un dispositivo emisor de luz basado en un material híbrido de polímero con impronta (MIP)-Au para el análisis electroquímico inalámbrico de ZON, una micotoxina ampliamente encontrada como contaminante de multitud de alimentos. Este novedoso sistema aprovecha la capacidad de reconocimiento molecular del MIP y su transducción electroquímica a través de un “efecto compuerta” mediado por el analito. Además, gracias a la lectura óptica proporcionada por un micro-LED, la integración de la microfluídica y los principios fundamentales de la BE, el dispositivo optosensor es compacto, rápido y versátil.

La plataforma microfluídica permitirá fácilmente la automatización a través de un sistema de inyección de flujo analítico (FIA). Este último haría posible introducir pasos de lavado después de la incubación del electrodo recubierto con MIP con la muestra, con el fin de minimizar aún más las interacciones no específicas entre el analito y el elemento de reconocimiento. En cuanto a los componentes del dispositivo, la celda de PDMS podría reemplazarse por materiales alternativos como el elastómero termoplástico Flexdym™, un copolímero multibloque de poliestireno/etileno-butileno/poliestireno para mejorar la flexibilidad, el moldeo y la unión. El LED verde podría ser sustituido por un LED rojo para aprovechar su mayor poder de radiación y la mayor sensibilidad de los detectores de estado sólido en esta región. Además, un simple fotodiodo con un circuito de amplificación podría sustituir al actual espectrómetro compacto y la fibra óptica para reducir el coste del dispositivo basado en BE. Actualmente, se están llevando a cabo trabajos adicionales para utilizar el novedoso dispositivo Au/LED/Au@MIP en el análisis optoelectroquímico inalámbrico de otras micotoxinas en muestras de alimentos, abordando así un importante problema de carácter global que afecta a la salud.

- *Nuevas estrategias de polimerización*

### 3.6. Introducción

#### Concepto y principios básicos de la ECL

La electroquimioluminiscencia (ECL), también conocida como quimioluminiscencia electrogenerada, es un fenómeno mediante el cual la energía eléctrica se convierte en energía radiante.<sup>188</sup> Este proceso ocurre a través de la generación de especies reactivas a partir de precursores estables en la superficie de un electrodo, las cuales reaccionan bajo ciertas condiciones químicas, produciendo estados excitados electrónicamente. Cuando estos estados excitados retornan a su nivel fundamental, emiten luz como resultado de su desactivación radiante.

La ECL es una forma específica de luminiscencia, fenómeno en el que una sustancia emite luz al regresar a su estado fundamental tras haber sido excitada. Según la fuente de excitación, la luminiscencia puede clasificarse en distintos tipos: en la fotoluminiscencia (PL), la excitación es provocada por la absorción de fotones, mientras que en la quimioluminiscencia (QL), proviene de reacciones químicas. Cuando estas reacciones químicas son impulsadas electroquímicamente, se genera el fenómeno de ECL.

Una de las características distintivas de la ECL es la capacidad de generar especies reactivas de manera controlada mediante la aplicación de un potencial eléctrico. La luminiscencia permite la producción de señales ópticas con alta sensibilidad y especificidad, lo que la convierte en una herramienta esencial en aplicaciones analíticas, como la detección de biomoléculas (proteínas, hormonas, anticuerpos), en las que los luminóforos actúan como etiquetas emisoras.<sup>189</sup> Adicionalmente, la ECL destaca por su flexibilidad, ya que puede generar emisión de luz en diferentes medios, sin necesidad de fuentes externas intensas, que van desde disoluciones acuosas<sup>190</sup> hasta entornos orgánicos,<sup>191</sup> lo que amplía su rango de aplicaciones. Desde su primera descripción en la década de 1960, ha experimentado un notable desarrollo, integrando disciplinas como química, biología y ciencia de materiales, y desempeñando un papel clave en la innovación de tecnologías avanzadas para la detección.<sup>192-194</sup>

#### Luminóforos en ECL

Los luminóforos son componentes fundamentales en los sistemas de ECL debido a su capacidad para emitir luz tras ser excitados electroquímicamente. Este apartado se centra en los complejos de rutenio(II), y en los puntos cuánticos (QDs) de ZnS dopados con manganeso (II), dos tipos de luminóforos que han demostrado un gran potencial en ECL en los últimos años.<sup>195-197</sup>

## **Complejos de rutenio(II)**

Los complejos de rutenio(II), en particular el  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  y el  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  (bpy = 2,2'-bipiridina; phen = 1,10-fenantrolina), son luminóforos de gran relevancia en ECL debido a su alta eficiencia en la generación de luz y su notable estabilidad electroquímica.<sup>198-201</sup> Estos compuestos se utilizan ampliamente tanto en medios acuosos como orgánicos, gracias a su capacidad para producir emisión de luz mediante reacciones de transferencia electrónica con correactantes como la tripropilamina (TPA) o el peróxido de hidrógeno. El  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , en particular, es uno de los luminóforos más estudiados, mostrando una alta eficiencia en la emisión de luz en la región visible, especialmente en el rojo. Además, su estructura permite una interacción eficaz con otros reactivos electroquímicos, y su estabilidad facilita su reutilización en múltiples ciclos de emisión, lo que mejora su rendimiento en aplicaciones analíticas. El  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  presenta propiedades similares al  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , con una eficiencia comparable en la producción de luz.<sup>202</sup> Sin embargo, en algunos sistemas, el  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  ha mostrado ser hasta 5 veces más sensible.<sup>203</sup>

En el caso de complejos de rutenio(II) adsorbidos, absorbidos o anclados a la superficie de partículas, la interacción con la matriz sólida normalmente mejora la estabilidad y amplifica la intensidad de la emisión ECL.<sup>204</sup> Por ejemplo, cuando se integran con nanopartículas metálicas o de sílice, los complejos de rutenio(II) muestran un mejor rendimiento electroquímico debido a la mayor área superficial activa y la reducción de interferencias.

## **Puntos cuánticos de ZnS dopados con manganeso(II)**

Los QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$  han despertado un creciente interés debido a su alta eficiencia en ECL. La energía necesaria para inducir ECL se suministra mediante la inyección eléctrica de pares electrón-hueco. En estudios previos,<sup>196</sup> se ha demostrado la ECL de estos QDs en medio acuoso, utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  y aplicando potenciales negativos. Se observan así dos emisiones de ECL, un pico a  $-2.38$  V, relacionado con los QDs de ZnS puro y otro entre  $-1.20$  V y  $-1.50$  V, asociado a los iones  $\text{Mn}^{2+}$ , evidenciando su potencial como luminóforos eficaces para ECL.

Cuando se combinan con complejos de rutenio(II) como los mencionados, los sistemas híbridos experimentan efectos sinérgicos que mejoran sus propiedades de emisión, como una mayor eficiencia en la transferencia de energía. Un ejemplo de esto es el acoplamiento entre QDs de CdTe y el complejo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ,<sup>205</sup> donde los QDs transfieren electrones al complejo de rutenio, modulando tanto la intensidad como la longitud de onda de emisión.

Aunque los estudios más recientes de ECL han avanzado hacia disoluciones acuosas por su relevancia en sistemas biológicos, los experimentos en medios orgánicos mantienen importancia para aplicaciones específicas. Estos medios requieren condiciones muy controladas, como entornos libres de oxígeno, celdas herméticas y

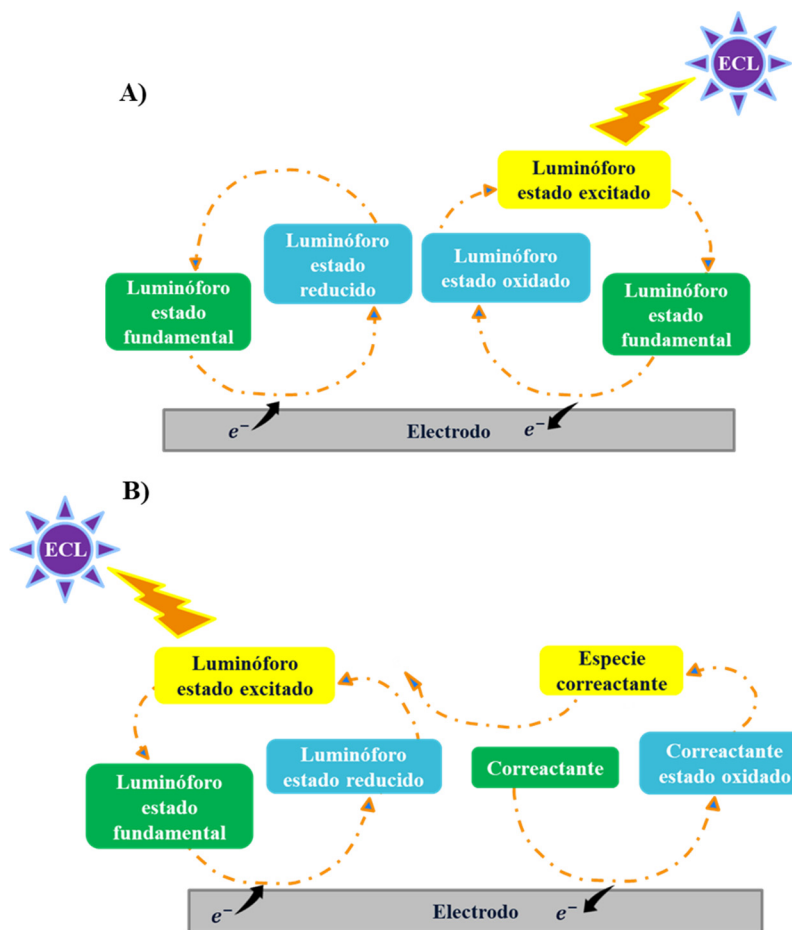
el uso de disolventes y electrolitos purificados y secos, ya que incluso pequeñas impurezas pueden interferir en la generación de las especies precursoras necesarias o desactivar los estados excitados responsables de la emisión lumínica.<sup>206</sup>

### Mecanismos de ECL

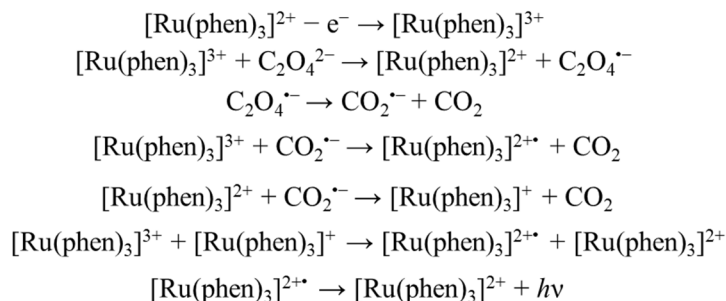
Según el mecanismo de *aniquilación* en ECL, el luminóforo experimenta alternativamente ciclos rápidos de oxidación y reducción en la superficie del electrodo, lo que genera especies aniónicas y catiónicas reactivas.<sup>207</sup> La recombinación de estas especies da lugar a la formación del estado excitado del luminóforo, responsable de la emisión de luz (**Figura 66A**). En contraste, en el mecanismo de correactantes, tanto el luminóforo como el correactante se oxidan o reducen simultáneamente en el electrodo, generando especies que, mediante reacciones de transferencia electrónica, generan el estado excitado del luminóforo (**Figura 66B**).

El mecanismo de aniquilación exige condiciones más estrictas, como una amplia ventana de potencial (entre 3.1 y 1.8 eV), así como entornos controlados con disolventes orgánicos purificados o líquidos iónicos en atmósferas inertes, para evitar la interferencia del agua y del oxígeno.<sup>208</sup> Estas exigencias limitan su aplicabilidad. En cambio, el mecanismo de correactantes destaca por su versatilidad, ya que opera eficazmente tanto en medios acuosos como no acuosos, adaptándose a múltiples aplicaciones. Reductores como el oxalato y las aminas alifáticas terciarias (e.g. TPA), y oxidantes como el peróxido de hidrógeno, participan activamente en este mecanismo. El **esquema 2, 3 y 4** ilustran detalladamente las rutas más representativas de sus mecanismos, permitiendo comprender mejor las etapas fundamentales de las reacciones y su vinculación con los estados excitados responsables de la emisión lumínica.

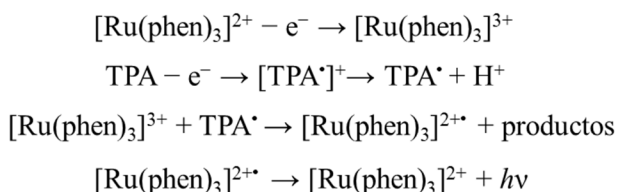




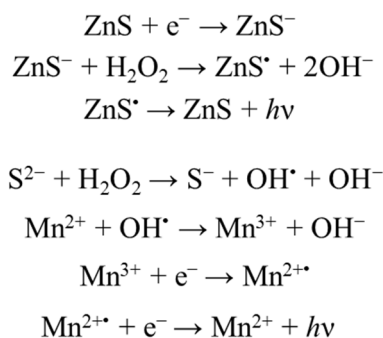
**Figura 66.** Representación de los mecanismos principales de generación de ECL. A) En el mecanismo de aniquilación, el luminóforo se somete a procesos alternos de oxidación y reducción en el electrodo, generando especies reactivas. La interacción de estas produce un estado excitado que emite luz al relajarse. B) En el mecanismo de correactantes, tanto el luminóforo como el correactante reaccionan simultáneamente en el electrodo, creando especies intermedias que, mediante transferencias de electrones, activan el estado excitado del luminóforo, desencadenando la emisión de luz.



**Esquema 2.** Mecanismo de la ECL del  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  con oxalato como correactante: a la oxidación del luminóforo en la superficie del electrodo, le sigue la reducción del luminóforo oxidado por el radical derivado del correactante, posibilitando la emisión de luz.



**Esquema 3.** Mecanismo de la ECL de  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  con TPA como correactante: a la oxidación del luminóforo en la superficie del electrodo, le sigue la reducción del luminóforo oxidado por el radical derivado del correactante, posibilitando la emisión de luz.



**Esquema 4.** Mecanismo de la ECL de QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como correactante: a la reducción de ZnS en la superficie del electrodo, le sigue la oxidación de los átomos de azufre con el correactante. Los radicales generados derivados del correactante oxidan el  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$ , posibilitando la emisión de luz.



### Factores que afectan a la intensidad de la señal ECL

Además de la naturaleza del medio y la presencia de oxígeno, la intensidad de la señal de ECL también está influida por otros factores.

La **concentración de luminóforo y correactante**, ya que determina la cantidad de especies reactivas generadas y la probabilidad de que estas interactúen para formar el estado excitado.<sup>209</sup> A mayor concentración de estos compuestos, mayor será la intensidad de la emisión lumínica, siempre y cuando no se alcance un límite en el que ocurran procesos de desactivación bimolecular del estado excitado emisor (*quenching*).

El **electrolito soporte** también juega un papel fundamental, ya que debe permitir el transporte de iones en la celda electroquímica sin interferir con las reacciones de ECL.<sup>209</sup> Un electrolito con una conductividad adecuada ayuda a mantener el equilibrio de la reacción y a evitar caídas de potencial que puedan afectar la formación de especies excitadas.

La **naturaleza del electrodo** es otro factor determinante.<sup>210</sup> Los electrodos con alta conductividad, como el platino o el oro, tienden a mejorar la eficiencia de la transferencia de electrones, lo que favorece la formación de las especies activas.

### *Nuevas estrategias de polimerización*

Además, la superficie del electrodo debe ser adecuada para facilitar la adsorción del luminóforo y el correactante sin generar reacciones secundarias no deseadas.

La **velocidad de barrido** del potencial aplicado también afecta a la intensidad de la ECL.<sup>211</sup> A velocidades de barrido más altas, las reacciones pueden no tener tiempo suficiente para llevarse a cabo de manera eficiente, lo que puede reducir la intensidad de la señal. Por el contrario, a velocidades más bajas, las especies reactivas pueden formarse más eficientemente, lo que mejora la intensidad de la ECL, aunque en algunos casos esto también puede dar lugar a la formación de especies no deseadas.

El **número de ciclos** en ECL tiene un impacto significativo en la intensidad y estabilidad de la señal luminosa.<sup>212,213</sup> Generalmente, con el aumento del número de ciclos de aplicación de potencial se observa una disminución en la eficiencia de la emisión de luz. Este descenso se debe principalmente a que las especies reactivas generadas en cada ciclo, como los radicales e iones, pueden descomponerse o reaccionar de forma no deseada, reduciendo la transferencia de energía al luminóforo. Además, la superficie del electrodo puede modificarse debido a la acumulación de productos de reacción, lo que afecta a su capacidad para transferir electrones eficientemente. No obstante, algunos estudios sugieren que la optimización del número de ciclos puede mejorar la reproducibilidad de la señal ECL, especialmente cuando se utilizan luminóforos con alta estabilidad o cuando se emplean técnicas para regenerar los electrodos entre los ciclos.

Estos factores interactúan de manera compleja, y su optimización es crucial para maximizar la intensidad de la señal de ECL en aplicaciones analíticas y de detección.

### 3.7. Objetivos

El objetivo general de esta parte de la tesis doctoral es desarrollar un sensor óptico basado en partículas recubiertas con una fina capa de MIP selectivo para alternariol (AOH), que permita su detección mediante un ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, del inglés *Förster Resonance Energy Transfer*). Para ello, se exploraron nuevas estrategias de polimerización específicas para este fin, como la fotopolimerización, y otras metodologías innovadoras aún no aplicadas en este contexto, como la polimerización inducida por ECL.

Los objetivos específicos incluyen:

- Sintetizar partículas luminiscentes capaces de generar señal ECL en un medio orgánico.
- Caracterizar los materiales sintetizados mediante diversas técnicas (espectroscopía, microscopía, análisis electroquímico, entre otras) para evaluar su idoneidad en las estrategias propuestas.
- Desarrollar un sistema experimental para la detección de ECL con los medios disponibles en el laboratorio.
- Evaluar la reproducibilidad de las medidas de ECL, utilizando distintos generadores de ECL como puntos cuánticos y complejos de rutenio, diferentes formas de inmovilización de las partículas sobre el electrodo, y diversos correactantes.
- Sintetizar una monocapa de polímero alrededor de las partículas para optimizar los parámetros de detección del alternariol en el sensor.

Este enfoque integral pretende no solo avanzar en la creación de un sensor selectivo para AOH, sino también explorar nuevas rutas de polimerización que podrían tener aplicaciones más amplias en el desarrollo de sensores ópticos basados en ECL y FRET.



## 3.8. Parte experimental

### 3.8.1. Reactivos y materiales

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de diversas casas comerciales, y se detallan a continuación, agrupados por proveedor.

Merck suministró varios reactivos clave, entre ellos el azul de metileno (MB), el cloruro de manganeso (II) tetrahidratado ( $\geq 99\%$ ) y, el clorhidrato de L-cisteína monohidratado ( $\geq 99\%$ ). Además, suministró hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) en metanol ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ), cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) ( $99\%$ ), y metacrilamida (MAM). También proporcionó dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) y tetraetilortosilicato (TEOS) ( $99\%$ ), así como el complejo de dicloruro de tris(2,2'-bipiridina) rutenio(II) hexahidratado ( $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ) ( $\geq 99\%$ ). De Fisher Scientific se adquirieron reactivos como trietilamina (TEA), etanol absoluto, ciclohexano, 2-propanol, dimetilsulfóxido (DMSO), y acetonitrilo (ACN). De este proveedor también se obtuvo el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 30%, el monohidrógenofosfato sódico y el dihidrógeno fosfato sódico anhidros. Alfa Aesar suministró el cloruro de zinc al 98% y el clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) al 98%. Panreac proporcionó sulfuro de sodio noahidratado (95%). De Polysciences se adquirió la *N*-(2-aminoetil) metacrilamida (EAMA) en forma de clorhidrato, mientras que Scharlau suministró NaOH en pellets extra puro e hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) al 28%. El proveedor VWR proporcionó cloruro de hierro (II) ( $\text{FeCl}_2$ ) tetrahidratado ( $\geq 98\%$ ), mientras que Fluka suministró hexafluorofosfato de tetrabutilamonio ( $\text{TBAPF}_6$ ) ( $98\%$ ) y el surfactante Triton X-100. De TCI se adquirieron reactivos como tripropilamina (TPA) ( $> 98\%$ ), 2-yodo-2-metilpropionitrilo (CP-I) ( $> 96\%$ ), y 1',3'-dihidro-8-metoxi-1',3',3'-trimetil-6-nitrospiro[2*H*-1-benzopirán-2,2'-[2*H*]indol] (DHMI) ( $> 98\%$ ). Finalmente, Invitrogen proporcionó las partículas magnéticas Dynabeads<sup>®</sup> M-270 amina y el agua tipo I se obtuvo de un sistema de purificación Merck-Millipore Direct Q-3UV.

### 3.8.2. Equipos

Los equipos utilizados se describen en detalle junto con los procedimientos correspondientes en los siguientes apartados de la parte experimental de este bloque.

### 3.8.3. Fotopolimerización

#### Diseño del sistema

Para la iniciación de la polimerización, se empleó un sistema basado en azul de metileno (MB) como iniciador, junto con trietilendiamina (TEA) como co-iniciador. El proceso consistió en intentar crear una fina capa polimérica sobre la superficie de los QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$  mediante fotopolimerización. Los QDs, que emitían a 590 nm, se excitaron con un transiluminador de lámpara de mercurio

(5 × 8 W) Vilber Lormat ECX-15.M de 312 nm. La luz naranja emitida por los QDs solapa con la banda de absorción del MB, lo que generaría la fotopolimerización en forma de capa fina.

### Síntesis de puntos cuánticos (QDs) de ZnS dopados con Mn<sup>2+</sup>

- *Paso 1. Preparación del montaje de síntesis*

Se colocó un matraz de tres bocas para alojar una sonda de temperatura, una aguja para el flujo continuo de argón (Ar) y un septum destinado a la adición controlada de reactivos. Dentro del matraz, se colocó un imán para permitir una agitación magnética eficiente. Antes de la preparación de las disoluciones, se inició un flujo elevado de argón para purgar el matraz y eliminar cualquier presencia de oxígeno, garantizando un entorno inerte durante el proceso.

- *Paso 2. Preparación de las disoluciones acuosas de los reactivos*

Para garantizar la frescura de los reactivos, las disoluciones se prepararon el mismo día de la síntesis utilizando agua tipo I. Las concentraciones y volúmenes empleados fueron los siguientes: 136 mg de ZnCl<sub>2</sub> (0.1 mol L<sup>-1</sup>) disueltos en 10 mL de agua, 240 mg de Na<sub>2</sub>S · 9 H<sub>2</sub>O (0.1 mol L<sup>-1</sup>) disueltos en 10 mL, 98.96 mg de MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O (0.1 mol L<sup>-1</sup>) disueltos en 5 mL, 175.63 mg de L-cisteína (HCl) · H<sub>2</sub>O (0.02 mol L<sup>-1</sup>) disueltos en 50 mL y 0.5 g de NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) disueltos en 10 mL.

- *Paso 3. Preparación de la mezcla inicial*

En un vaso de precipitados, se preparó la mezcla inicial con los siguientes componentes: 50 mL de L-cisteína 0.02 mol L<sup>-1</sup>, 1.35 mL de agua tipo I, 5 mL de ZnCl<sub>2</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup> y 0.15 mL de MnCl<sub>2</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>. La mezcla se agitó manualmente para homogenizar los reactivos. El pH de la disolución se ajustó gradualmente a 11 mediante la adición controlada de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>. Se prestó especial atención al proceso de ajuste para evitar un incremento abrupto del pH, añadiendo la base lentamente al observar que la disolución comenzaba a volverse turbia.

- *Paso 4. Desoxigenación y agitación*

La mezcla se transfirió al matraz de tres bocas, previamente configurado, colocado sobre una manta calefactora-agitadora equipada con un termopar y un controlador de temperatura para un control preciso del proceso. El sistema se sometió a agitación constante mientras se mantuvo un flujo continuo de Ar durante 30 min.

- *Paso 5. Reacción inicial para la formación de los QDs*

Utilizando una jeringa, se añadieron cuidadosamente 5 mL de Na<sub>2</sub>S 0.1 mol L<sup>-1</sup> en el centro de la mezcla contenida en el matraz de tres bocas. La mezcla se mantuvo bajo agitación continua y un flujo constante de Ar durante 20 min. Este procedimiento permitió el inicio del proceso de formación de los QDs.

## Nuevas estrategias de polimerización

- *Paso 6. Proceso de envejecimiento*

La temperatura de la disolución se incrementó hasta 50 °C usando la manta calefactora. La mezcla se mantuvo bajo agitación continua y en contacto con el aire durante 2 h. Este tratamiento térmico permitió el envejecimiento de los QDs, un proceso esencial para mejorar su cristalinidad y estabilizar sus propiedades ópticas y estructurales.

- *Paso 7. Separación y purificación*

Tras completar el envejecimiento, se apagó la manta calefactora y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Para diluir ésta, se añadieron aproximadamente 60 mL de etanol, logrando un volumen total de 120 mL. La mezcla resultante se dividió equitativamente en cuatro tubos de centrifuga de 50 mL. Cada tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min a 4 °C, lo que permitió separar los QDs formados. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregaron 30 mL adicionales de la mezcla al sedimento. Este proceso se repitió una vez más, descartando el sobrenadante tras cada ciclo. Finalmente, se añadieron 40 mL de etanol a uno de los tubos para resuspender el pellet, que luego se combinó con el contenido del segundo tubo. La mezcla combinada se sometió a dos ciclos adicionales de centrifugación de 5 min, descartando el sobrenadante tras cada ciclo, aislando así los QDs lavados.

- *Paso 8. Secado y almacenamiento*

El pellet obtenido tras la última centrifugación se transfirió cuidadosamente a un tubo pequeño, utilizando una espátula de plástico en caso de que fuera necesario determinar la concentración molar de los QDs. El material se secó bajo una corriente controlada de N<sub>2</sub> hasta que se obtuvo un polvo suelto de color parduzco. Para preservar su solubilidad y estabilidad, los QDs se almacenaron en un vial herméticamente cerrado bajo una atmósfera inerte, lo que garantiza su integridad a largo plazo.

## Síntesis del polímero

Para la síntesis del MIP selectivo al alternariol (AOH), se utilizó una relación previamente optimizada por un miembro del grupo en otro formato y las concentraciones de monómeros de un trabajo similar previamente publicado.<sup>214</sup> En primer lugar, se neutralizó el clorhidrato de *N*-(2-aminoetil) metacrilamida (EAMA.HCl) mediante la adición de TBAOH en una proporción molar 1:1, con el fin de obtener el monómero funcional básico. Para ello, se eliminó el disolvente de la disolución comercial de TBAOH mediante rotaevaporación.

A continuación, en una cubeta de fluorescencia provista de septum, se mezclaron 22 μmol de EAMA con 22 μmol de MAM en 0.60 mL de DMSO, junto con 11 μmol de la molécula plantilla S2. Se añadieron 1.4 mL de ACN, alcanzando un volumen

total de disolvente de 2 mL. Posteriormente, se incorporaron 220  $\mu\text{mol}$  de EDMA, 500  $\mu\text{g}$  de los QDs y 5  $\mu\text{L}$  de una disolución stock de 1.56  $\text{mmol L}^{-1}$  de MB, junto con 10  $\mu\text{L}$  de una disolución stock de 2.8  $\text{mmol L}^{-1}$  de TEA, ambos necesarios para iniciar la polimerización. La mezcla de prepolimerización se dejó desoxigenar durante 30 min mediante purga con  $\text{N}_2$  puro.

Una vez desoxigenada la mezcla, se colocó la cubeta sobre el transiluminador de 312 nm junto con un pequeño agitador en la parte inferior de la cubeta. Para maximizar la exposición a la radiación, se cubrió la cubeta con un recipiente troncocónico de acero inoxidable que actuó como reflector. La polimerización se llevó a cabo durante 15 min bajo estas condiciones. Al finalizar, el polímero obtenido se lavó tres veces con DMSO y tres veces con ACN, realizando centrifugaciones entre cada lavado. Posteriormente, se secó mediante una corriente de  $\text{N}_2$  hasta obtener un material seco.

Como control experimental, se llevó a cabo un procedimiento paralelo sin incluir el sistema iniciador, con el objetivo de confirmar que la polimerización no ocurriera de forma espontánea. Este control es crucial, dado que algunos monómeros pueden polimerizar de manera no controlada bajo irradiación UV.

### **3.8.4. Polimerización mediante ECL**

#### **Diseño del sistema**



El sistema experimental para la polimerización mediante ECL se diseñó utilizando partículas funcionalizadas con un generador de ECL seleccionado para emitir en la región amarillo-naranja del espectro visible. Al aplicar un potencial a un electrodo en un medio orgánico que contenía un correactante específico, se esperaba que estas partículas emitieran ECL en la longitud de onda deseada.

Para aprovechar esta emisión lumínica, el diseño incorporó un catalizador con capacidad de absorber luz en dicha región espectral y generar radicales a partir del iniciador de polimerización. Estos radicales debían activar la formación de especies radicalarias en los monómeros cercanos, desencadenando la polimerización.

El objetivo principal de este diseño era lograr que la reacción de polimerización se limitara a las inmediaciones de las partículas emisoras de ECL. Esto permitiría la formación controlada y precisa de una delgada capa polimérica alrededor de cada partícula, asegurando tanto la uniformidad como la funcionalidad del polímero resultante.

### **Síntesis de partículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>**

Para la síntesis de partículas de óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), se preparó una disolución de cloruro de hierro (III) (FeCl<sub>3</sub>) en concentración de 1 mol L<sup>-1</sup> en 50 mL de agua tipo I. Paralelamente, se preparó una segunda disolución de cloruro de hierro (II) (FeCl<sub>2</sub>) a 2 mol L<sup>-1</sup> en 10 mL de agua, que contenía HCl en una concentración de 2 mol L<sup>-1</sup>. Ambas disoluciones se mezclaron cuidadosamente y se añadieron gota a gota a una disolución de NH<sub>4</sub>OH a 0.7 mol L<sup>-1</sup> en 500 mL de agua destilada. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en atmósfera inerte, con agitación continua durante 30 min.

Al finalizar la reacción, las partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> se separaron del medio de reacción mediante un imán de neodimio. Posteriormente, se realizaron varios ciclos de lavado con agua destilada hasta que el pH del sobrenadante alcanzó valores neutros. Como resultado, se obtuvo una concentración final de partículas de 415 mg mL<sup>-1</sup>.

### **Síntesis del correactante oxalato de tetrabutilamonio (TBA<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)**

Se preparó una mezcla de 22.66 mL (22.2 mmol) de hidróxido de tetrabutilamonio y 1 g (11.1 mmol) de oxalato de cesio en 8 mL de MeOH. El intercambio iónico tuvo lugar a temperatura ambiente durante 2 h. Tras completar la reacción, el crudo se rotaevaporó, observándose al menos dos productos diferenciados, un aceite amarillo y un sólido blanco. El aceite se disolvió en ACN y se centrifugó para eliminar el sólido blanco precipitado. Posteriormente, el aceite purificado se rotaevaporó nuevamente y se dejó en un desecador de vacío durante 72 h para garantizar su completa desecación y obtención del producto final.

### **Evaluación de potenciales generadores de ECL en medio orgánico**

Para la evaluación de los potenciales generadores de ECL en medio orgánico, las muestras se desoxigenaron previamente durante 30 min con Ar. Este procedimiento se realizó con un volumen de 1 mL para garantizar el llenado completo de la celda de ECL.

El sistema de ECL utilizado (**Figura 67**) consistió en una celda óptica de fabricación propia equipada con canales de entrada y salida, que permitieron el flujo continuo de la muestra hacia y desde la superficie del electrodo de carbono serigrafiado ubicado dentro de la celda. Para este análisis, se empleó un electrodo Metrohm DRP-110-U75, el cual se conectó a un potencióstato PGZ 402 Dynamic EIS VoltaLab.

La celda óptica estaba diseñada con una ventana que se acopló a una fibra óptica Lumatec de núcleo líquido ( $2\alpha = 72^\circ$ , 3000  $\mu\text{m}$ , 1 m). El extremo distal de la fibra fue conectado al adaptador de fibra óptica del espectrofluorímetro Horiba Fluoromax-4TCSPC. Para la captura de la señal, las rendijas del espectrofluorímetro se ajustaron

a una apertura de 29 nm, optimizando así la medida de la emisión lumínica generada durante los procesos electroquímicos.



Figura 67. Imagen del sistema ECL utilizado.

### QDs inmovilizados sobre electrodos de carbono serigrafado (SPCE)

Inicialmente, se realizó un voltamperograma cíclico con el sistema descrito más arriba, utilizando una mezcla de ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ TBAPF}_6$ )/DMSO (70/30). El rango de potencial aplicado fue de  $-1.5$  a  $0 \text{ V}$ , tanto en presencia como en ausencia de  $\text{O}_2$ , para evaluar la respuesta electroquímica del sistema.

Los electrodos funcionalizados con QDs, preparados según se detalla más adelante, se integraron en la celda del sistema ECL. Estos electrodos se sumergieron en una disolución compuesta por  $1.4 \text{ mL}$  de ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ TBAPF}_6$ ),  $0.6 \text{ mL}$  de DMSO y una concentración específica del correctante. La emisión de ECL se midió a  $590 \text{ nm}$ , aplicando un barrido de potencial entre  $0$  y  $1.4 \text{ V}$  a una velocidad de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Antes de la medida, la mezcla se purgó con Ar durante  $30 \text{ min}$  en un vial de  $5 \text{ mL}$  sellado con un septum.

- *Inmovilización covalente de QDs sobre SPCE*

La inmovilización de QDs sobre el SPCE se realizó utilizando 4-nitrobenzenodiazonio como agente de acoplamiento. Para ello, se disolvieron  $10.6 \mu\text{mol}$  de tetrafluoroborato de 4-nitrobenzenodiazonio en  $5 \text{ mL}$  de una disolución de  $\text{TBAPF}_6$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) en ACN anhidro. El electrodo se sumergió en esta disolución, sometándolo a dos ciclos de voltamperometría cíclica en un rango de potencial de  $0.6$  a  $-0.6 \text{ V}$ , con una velocidad de barrido de  $200 \text{ mV s}^{-1}$ . Tras el proceso, el electrodo se enjuagó sucesivamente en ACN y agua. Dado que el 4-nitrobenzenodiazonio es altamente inestable, su manipulación se realizó bajo una corriente positiva de argón, añadiendo el disolvente directamente al vial para alcanzar la concentración requerida.

## Nuevas estrategias de polimerización

En la siguiente etapa se preparó una disolución madre de QDs a una concentración de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  en una disolución tampón de ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6). Sobre la superficie del electrodo se depositaron  $5 \text{ }\mu\text{L}$  de esta disolución madre junto con  $5.5 \text{ }\mu\text{L}$  de una disolución de EDC ( $40 \text{ mmol L}^{-1}$  en MES), ajustando los volúmenes según las necesidades experimentales, pero respetando un máximo de  $15 \text{ }\mu\text{L}$  para evitar el desbordamiento del electrodo de trabajo. En otros ensayos, se utilizaron  $9.5 \text{ }\mu\text{L}$  de la misma disolución madre de QDs y  $9.5 \text{ }\mu\text{L}$  de una disolución más concentrada ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo durante 2 h a temperatura ambiente, protegiendo el electrodo con un tubo Eppendorf para evitar la evaporación del disolvente. A continuación, el electrodo funcionalizado se lavó sumergiéndolo en tampón MES durante 10 min, con agitación constante para eliminar restos de reactivos no acoplados.

Finalmente, la señal ECL del electrodo funcionalizado se evaluó bajo condiciones previamente descritas en este apartado. En un ensayo se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  como correactante ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ), empleando un volumen de  $1.6 \text{ }\mu\text{L}$ . En otro experimento, se inmovilizaron  $9.5 \text{ }\mu\text{L}$  de otra disolución madre de QDs más diluida ( $580 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se utilizó TPA ( $30 \text{ mmol L}^{-1}$ ) como correactante.

- *Inmovilización de QDs sobre partículas magnéticas*

Para este proceso, las cisteínas de los QDs se intercambiaron por ácido mercaptopropiónico. De acuerdo con el protocolo descrito más arriba (modificado para alcanzar una concentración de QDs de aproximadamente  $6.24 \text{ mmol L}^{-1}$ ), se añadieron  $256 \text{ }\mu\text{L}$  de una disolución madre de QDs de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  funcionalizados con ácido mercaptopropiónico, junto con  $25 \text{ }\mu\text{L}$  de EDC y  $47 \text{ }\mu\text{L}$  de sulfo-NHS, en  $672 \text{ }\mu\text{L}$  de MES y con  $4 \text{ mg}$  de partículas magnéticas Dynabeads de  $3 \text{ }\mu\text{m}$  de diámetro. La reacción se llevó a cabo durante 18 h a temperatura ambiente, bajo agitación constante a  $1000 \text{ rpm}$ . Finalmente, las partículas se lavaron tres veces con  $500 \text{ }\mu\text{L}$  de MES a pH 6. Las condiciones de medida fueron las mismas descritas anteriormente, utilizando TPA como correactante; sin embargo, en esta ocasión, se colocó un imán bajo la celda del sistema ECL para concentrar las partículas magnéticas en la superficie del electrodo de trabajo.

## Complejos de rutenio(II)

### Complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$

- *Con oxalato como correactante.* Se preparó una disolución de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  en tampón fosfato (PB) a pH 6.2, empleando oxalato  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  como correactante. La señal se midió en un SPCE, aplicando un barrido de potencial entre 0 y  $1.5 \text{ V}$  a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  y registrando la emisión a  $620 \text{ nm}$ .

- *Con QDs inmovilizados como correactante.* Se usó la misma concentración de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  en PB a pH 6.2. Se evaluó la señal ECL en tres condiciones: (1) en el SPCE modificado con grupos amino covalentemente enlazados a QDs funcionalizados con cisteínas, (2) en el SPCE modificado solo con grupos amino y (3) en el SPCE sin modificar. Para cada medida, se aplicó un barrido de 0 a 1.4 V a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### Complejo RD3

- *En disolución.* Se preparó una disolución de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de RD3 en ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{TBAPF}_6$ ), usando oxalato a  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  como correactante. La señal de ECL se midió en un SPCE con el complejo tanto en disolución como adsorbido al 14% (p/p) en sílice pirogénica, aplicando un barrido de 0 a 1.4 V a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  y recogiendo la emisión a 600 nm.
- *Adsorbido en mNBs recubiertas de sílice (mNBs@SiO<sub>2</sub>).* Se añadieron 80 mL de MeOH, 20 mL de agua y 2.5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28% a 1 g de fluido magnético de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$  en agua). La mezcla se sometió a ultrasonidos durante 5 min, y tras 1 h de reacción, se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de una disolución de  $500 \text{ mg mL}^{-1}$  del complejo RD3. La mezcla se agitó a 400 rpm hasta completar las 2 h de reacción. Las condiciones de medida fueron las mismas que para el RD3 en disolución.

### $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ (RP3)

- *En disolución*

Para hacer soluble el RP3 en una mezcla ACN/DMSO (70/30) es necesario realizar previamente un intercambio iónico. Para ello, se disolvió el complejo en un pequeño volumen de agua a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  y se añadió, gota a gota, una disolución saturada de hexafluorofosfato de amonio bajo agitación magnética, hasta observar un precipitado rojizo y sobrenadante incoloro. Tras dejar la suspensión unos 10 min en frío para promover la precipitación, se filtró y se lavó con abundante agua, eliminando los restos de agua en una estufa de vacío (Heraeus).

Las medidas de ECL se realizaron aplicando un barrido de potencial de 0 a 1.4 V a una velocidad de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , utilizando una disolución de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  de RP3 en una mezcla ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{TBAPF}_6$ )/DMSO (70/30), y  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA como correactante. En otros ensayos también se usaron  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{TBA}_2\text{C}_2\text{O}_4$  como correactante, evaluando distintas regiones de potencial: 0 – 1.45 V, 0 – 1.6 V y 0 – 2 V, con controles adicionales sin correactante (0 – 2 V y –1.6 – 2 V).

- *Adsorbido en mNBs recubiertas de sílice (mNBs@SiO<sub>2</sub>)*

#### Procedimiento A

Se preparó una mezcla inicial añadiendo 160 mL de EtOH absoluto, 40 mL de agua y 5 mL de NH<sub>4</sub>OH al 28% a 2 g de fluido magnético de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (20 mg mL<sup>-1</sup> en agua). En los lotes 1, 3 y 4, la mezcla fue sometida a ultrasonidos durante 5 min, mientras que en el lote 2 no se realizó este paso. Posteriormente se incorporaron 500 µL de una disolución acuosa de RP3 a 2 mg mL<sup>-1</sup> en los lotes 1, 2 y 3. Sin embargo, en el lote 4, se añadieron 500 µL de una disolución acuosa de 1 mg mL<sup>-1</sup> de RP3. La secuencia de adición del complejo varió entre lotes: en los lotes 1 y 4 se añadió después de 1 h, mientras que en los lotes 2 y 3 se incorporó junto con el resto de los reactivos. A continuación, se agregó 1.0 g de TEOS de manera gradual bajo ultrasonidos. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 h con agitación mecánica a 400 rpm. Las concentraciones finales obtenidas fueron 1.7 mg mL<sup>-1</sup> para el lote 1, 2.2 mg mL<sup>-1</sup> para el lote 2 y 0.8 mg mL<sup>-1</sup> para el lote 3. Las medidas de ECL se llevaron a cabo aplicando un barrido de 0 a 1.4 V a 100 mV s<sup>-1</sup> en una mezcla ACN (0.1 mol L<sup>-1</sup> TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70/30) con TPA a 30 mmol L<sup>-1</sup> como correactante.

A modo de resumen, la **Tabla 17** muestra las condiciones de reacción y las concentraciones finales correspondientes a los lotes de partículas previamente descritos.

**Tabla 17.** Condiciones experimentales y concentraciones finales obtenidas para cada uno de los lotes de partículas sintetizados.

	Ultrasonidos a t = 0	Momento de la adición de RP3	Disolución madre de RP3 añadida (V = 500 µL)	C <sub>final</sub> de partículas (mg mL <sup>-1</sup> )
<b>Lote 1</b>	X	t = 1 h	2 mg mL <sup>-1</sup>	1.7
<b>Lote 2</b>	-----	t = 0	2 mg mL <sup>-1</sup>	2.2
<b>Lote 3</b>	X	t = 0	2 mg mL <sup>-1</sup>	0.8
<b>Lote 4</b>	X	t = 1 h	1 mg mL <sup>-1</sup>	-----

#### Procedimiento B

Se mezclaron 200 µL de fluido magnético de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (5 mg mL<sup>-1</sup>) con 1.3 g de Triton X-100 y 20 mL de ciclohexano, aplicando ultrasonidos durante 5 min. A continuación, se añadieron 140 µL de NH<sub>4</sub>OH al 28% y, bajo ultrasonidos, se adicionaron 80 µL de TEOS. La mezcla se agitó durante 16 h. Tras finalizar este periodo, las partículas magnéticas se lavaron tres veces con EtOH, utilizando un imán para separarlas en cada lavado, y se resuspendieron en 10 mL de EtOH.

Seguidamente, se preparó una disolución de 2 mg de RP3 en 10 mL de EtOH/2-propanol (1:9 v/v) y se combinó con la suspensión etanólica obtenida previamente. La mezcla resultante se mantuvo a reflujó durante toda la noche

bajo agitación constante. Al día siguiente, se lavó tres veces con EtOH/2-propanol (1:9 v/v) y se resuspendieron en 10 mL de EtOH.

Para formar una segunda capa de sílice, se añadieron 2 mL de EtOH, 20  $\mu\text{L}$  de TEOS, 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28%, 10  $\mu\text{L}$  de agua y la suspensión obtenida en un vial de 24 mL. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 10 h bajo agitación constante.

Finalmente, las medidas de ECL se realizaron utilizando el mismo procedimiento descrito en el procedimiento A.

### *Complejo RP2PSi*

La síntesis detallada de este complejo se encuentra en la sección experimental del capítulo 4. Para obtener una cantidad suficiente de partículas recubiertas de sílice para los ensayos posteriores, se siguió el primer paso del procedimiento B, repitiendo este ocho veces en paralelo.

De uno de estos lotes, se tomaron aproximadamente 200  $\mu\text{g}$  de partículas de  $\text{mNBs@SiO}_2$  y se suspendieron en 10 mL de etanol anhidro. Estas partículas se sometieron a ultrasonidos durante 5 min junto con 4 mg del complejo RP2PSi, previamente disuelto en otros 10 mL de etanol anhidro. La mezcla se desoxigenó mediante una purga de Ar durante 10 min y luego se mantuvo a reflujo durante toda la noche, con una agitación de 600 rpm. Al día siguiente, las partículas se lavaron tres veces con etanol, centrifugándolas a 11000 rpm durante 5 min entre cada lavado para, finalmente, suspenderlas en 10 mL de EtOH.

Para crear una segunda capa de sílice sobre las partículas funcionalizadas con RP2PSi, se tomaron 5 mL de la suspensión preparada y se colocaron en un vial de 12 mL. A esta suspensión se le añadieron 10  $\mu\text{L}$  de TEOS disueltos en 1 mL de etanol absoluto, 7.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28%, y 5  $\mu\text{L}$  de agua. La reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 10 h bajo agitación mecánica a 400 rpm. Las partículas con la segunda capa siguieron el mismo protocolo de lavado descrito anteriormente, utilizando tres lavados con etanol y centrifugación en cada paso.

Las medidas de ECL para las partículas con una y dos capas de sílice se realizaron bajo las mismas condiciones descritas para el procedimiento A en el apartado anterior.

### **Estudio electroquímico de los componentes del sistema de polimerización**

Se realizó un estudio electroquímico de cada especie involucrada en el proceso de polimerización utilizando voltamperometría cíclica (CV). Los experimentos se realizaron en un rango de potencial de  $-1.0$  a  $1.5$  V, con una velocidad de barrido de  $50$   $\text{mV s}^{-1}$ . El estudio se efectuó en un vial de 3 mL empleando un sistema clásico de tres electrodos, compuesto por un electrodo de trabajo de carbono vítreo (GCE) con


## Nuevas estrategias de polimerización

un diámetro de 3 mm, un hilo de platino como contraelectrodo y un hilo de plata como electrodo de referencia.

El medio electrolítico utilizado fue una mezcla de ACN (0.1 mmol L<sup>-1</sup> de TBAPF<sub>6</sub>)–DMSO (70:30 v/v). Las especies estudiadas se prepararon a una concentración de 5 mmol L<sup>-1</sup>. Este enfoque permitió obtener información detallada sobre el comportamiento redox de cada componente y evaluar su reactividad en el proceso de polimerización.

### Controles en la síntesis del polímero

Para maximizar la conversión de dobles enlaces en radicales, se utilizó una relación molar de [monómeros]:[CP-I]:[DHMI] de 800:8:4, basada en estudios previos de fotopolimerización.<sup>215</sup> La síntesis descrita no incluye las partículas con el generador de ECL. En la preparación del NIP, se mezclaron 7.7 μmol de EAMA con 8.2 μmol de MAM, seguidos de la adición de 74.2 μmol de EDMA en 1.5 mL de DMSO. Posteriormente, se incorporaron 3.5 mL de ACN (0.1 mol L<sup>-1</sup> TBAPF<sub>6</sub>). Con un total de 90.1 μmol de monómeros, se añadieron 0.9 μmol de CP-I y 0.45 μmol de DHMI, junto con TBA<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> como correactante a una concentración final de 13 mmol L<sup>-1</sup>. Antes de iniciar la polimerización, la mezcla se desoxigenó con Ar durante 25 min.

 **Control de electropolimerización.** Para descartar la posibilidad de que ocurriera una electropolimerización en ausencia de las partículas con RP3 adsorbido, se aplicó un barrido de potencial entre 0 y 1.5 V, con una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup> durante 8 ciclos. Este ensayo se llevó a cabo utilizando la mezcla previamente descrita, un electrodo de trabajo GCE, un contraelectrodo de platino y un electrodo de referencia de plata.

**Control de fotopolimerización.** Para confirmar que el sistema de polimerización podía activarse mediante la ECL generada por el RP3 en condiciones óptimas, se simuló una señal ECL elevada empleando un láser rojo de 642 nm. La mezcla de prepolimerización, junto con el correactante, se introdujo en una cubeta de fluorescencia de sílice fundida y, bajo agitación magnética, se irradió durante 8 min, simulando el tiempo total de los ciclos de corriente aplicados. Este control se repitió añadiendo un 5% extra de CP-I y DHMI para garantizar que la relación [CP-I]:[DHMI] fuera adecuada para activar la fotopolimerización.

Los polímeros resultantes de estos controles se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para evaluar su estructura y confirmar la presencia o ausencia de polímero en las condiciones específicas de cada experimento.

### 3.8.5. Caracterización por TEM

Todas las partículas y polímeros sintetizados en este apartado se analizaron mediante un microscopio de transmisión electrónica (TEM) JEOL JEM 2100HT que trabaja a 200 kV (Centro Nacional de Microscopía Electrónica UCM).

### 3.8.6. Caracterización espectroscópica y por SPT

La caracterización espectroscópica se llevó a cabo utilizando principalmente dos espectrofluorímetros. El primero, un Fluoromax-4TCSPC de Horiba, equipado con un fotomultiplicador R928 sensible al rojo y una lámpara de xenón de 150 W. Las longitudes de onda de excitación y emisión variaron según el compuesto analizado, encontrándose generalmente en torno a 450 nm para excitación y 600 nm para emisión. Este fluorímetro se empleó principalmente para registrar los espectros de emisión de las moléculas estudiadas. Además, permitió realizar medidas de ECL al operar con la lámpara apagada y acoplar el sistema de espejos dirigidos hacia el detector Horiba para medida con fibra óptica, conectado al extremo distal de la fibra óptica proveniente de la celda electroquímica, para recoger y cuantificar la señal ECL transmitida.

El segundo espectrofluorímetro utilizado fue un Varian Cary Eclipse, equipado con una lámpara de xenón pulsada de 75 W, utilizado principalmente para medir la fosforescencia de los QDs, empleando una longitud de onda de excitación de 290 nm.

Las medidas del tiempo de vida de emisión se llevaron a cabo mediante técnicas de cronometraje de fotón único (SPT), utilizando el espectrómetro Edinburgh Instruments FLS980-Xd2-T. Para la excitación se utilizó un láser de diodo Horiba 470LH (463 nm, con un ancho de pulso inferior a 1 ns) y un filtro de interferencia de paso de banda centrado en 467 nm. La ruta de emisión estaba equipada con un monocromador doble de máxima transmisión a 500 nm, y la señal fue detectada con un fotomultiplicador Hamamatsu R928P refrigerado termoelectricamente a  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 3.9. Resultados y discusión

### 3.9.1. Descripción de los sistemas

En el diseño desarrollado para la *fotopolimerización* se usaron QDs capaces de experimentar excitación a 312 nm y emitir a 590 nm, activando así el sistema de MB y TEA como co-iniciador. Este enfoque se fundamentó en investigaciones previas que demostraron la eficacia de la combinación de MB y TEA para iniciar procesos de polimerización bajo iluminación específica, permitiendo la generación controlada de radicales.<sup>214</sup>

La luz emitida por los QDs activa el MB (**Figura 68**), que, en presencia de TEA, genera los radicales necesarios para iniciar la polimerización de los monómeros. Este

proceso permite la formación de finas capas de polímero alrededor de los QDs, restringiendo la polimerización a la región cercana a las partículas emisoras.

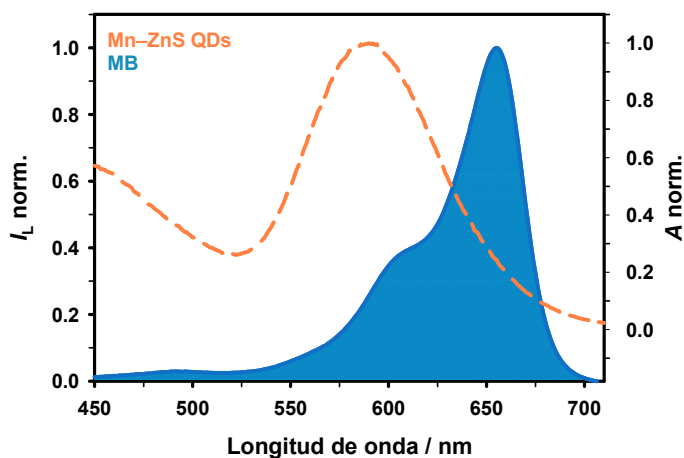


Figura 68. Espectro de emisión de los QDs Mn-ZnS (línea naranja) y espectro de absorción del MB (en azul) en ACN.

La novedad de este trabajo reside en la síntesis de un polímero selectivo diseñado para el análisis de AOH, utilizando este método de fotopolimerización controlada.

En cuanto a la *polimerización mediada por ECL*, se plantearon dos retos principales, primero, identificar un sistema iniciador que pudiera absorber a la longitud de onda emitida por las partículas ECL y, a su vez, activar de manera eficiente el sistema de polimerización; segundo, garantizar que las partículas generaran una señal ECL suficientemente intensa para activar el sistema.

Para superar estos desafíos, se seleccionó un sistema de polimerización mediado por complejación reversible (RCMP), utilizando DHMI como catalizador y CP-I como iniciador, siguiendo el modelo descrito en trabajos previos.<sup>215</sup> Este sistema se ha demostrado capaz de alcanzar altos porcentajes de conversión de monómeros. Con este sistema, el DHMI forma un complejo con el CP-I, permitiendo que el enlace C-I se rompa bajo una radiación específica y genere radicales para iniciar la polimerización. Este proceso parece adecuado para el diseño experimental, ya que las partículas de ECL emiten luz a 600 nm, activando el DHMI sin necesidad de calor. Además, el sistema proporciona control espacial al restringir la reacción a las regiones cercanas a las partículas emisoras.

Aunque los estudios previos utilizaron principalmente metacrilatos como monómeros, el uso de metacrilamidas en este trabajo es comparable. Esto sugiere que el sistema RCMP podría facilitar la obtención de polímeros bien definidos, controlando el proceso de polimerización mediante estímulos de luz electrogenerada. Ambos tipos de monómeros permiten la formación de radicales relativamente estables, necesarios para controlar la propagación radicalaria. Estos radicales son suficientemente

reactivos para funcionar en sistemas mediadores de complejación reversible, como el RCMP, lo que sugiere que el comportamiento del sistema de polimerización debería ser similar al ya descrito.

### **3.9.2. Elección y síntesis de los generadores de ECL**

#### **QDs de ZnS dopados con Mn(II)**

Para el desarrollo de este proyecto, se seleccionaron los QDs de sulfuro de zinc dopados con manganeso(II), debido a sus múltiples ventajas.<sup>216</sup> En primer lugar, estos QDs destacan por su baja toxicidad, lo que los convierte en una opción ideal para aplicaciones en sistemas biológicos y sensores. Además, poseen propiedades fosforescentes, lo que reduce el ruido de fondo y mejora la selectividad de la señal, favoreciendo una detección más sensible. Estos QDs también exhiben una alta resistencia a perturbaciones térmicas, químicas y fotoquímicas, lo que garantiza su estabilidad en diversas condiciones experimentales. Asimismo, su ECL ha sido estudiada previamente,<sup>196</sup> lo que respalda su aplicación en este tipo de sistemas.

Para la síntesis de estos QDs, se utilizó cloruro de zinc y sulfuro de sodio con el fin de formar la estructura cristalina de sulfuro de zinc, mientras que el cloruro de manganeso se empleó como fuente del dopante. El procedimiento descrito incorporó un 3% de manganeso (relación atómica Mn:Zn) en la mezcla de precursores. Finalmente, se añadió cisteína para mejorar la resuspensión de las partículas en medios acuosos, facilitando su manipulación y posterior aplicación en los ensayos experimentales.

#### **Complejos de rutenio(II)**

Los complejos de rutenio(II) se conocen muy bien por sus significativos rendimientos cuánticos de emisión, sus tiempos de vida en estado excitado próximos al microsegundo y su notable capacidad para generar ECL. Estas propiedades los convierten en compuestos muy apreciados para una amplia gama de aplicaciones, incluidas las bioaplicaciones basadas en ECL.

Entre los complejos más utilizados se encuentra el  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ , que destaca por su buena solubilidad en agua, facilitando su integración en sistemas acuosos. No obstante, no es el que presenta las mejores propiedades luminiscentes. Por ejemplo, el complejo similar con 1,10-fenantrolina ofrece un mayor rendimiento cuántico de emisión, lo cual puede ser ventajoso en ciertas aplicaciones.

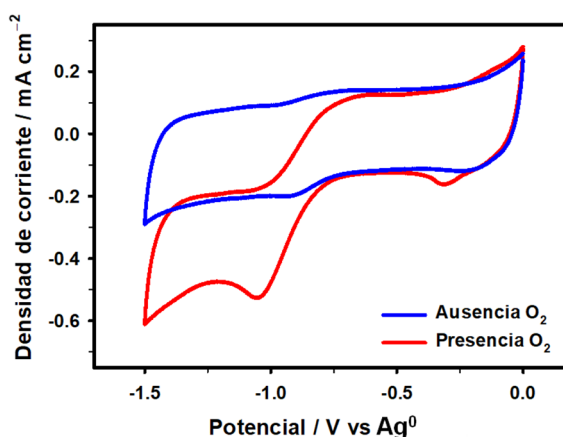
### **3.9.3. Estudio de la ECL**

Para validar el correcto funcionamiento del sistema ECL empleado, se realizó una medida inicial utilizando  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  en disolución acuosa con oxalato como correactante. La señal de ECL se observó satisfactoriamente durante el primer ciclo,

aunque en el segundo ciclo se observó una ligera disminución de intensidad. Tras confirmar que el sistema operaba correctamente en medio acuoso, se procedió a adaptarlo a un medio orgánico. Este cambio implicó la necesidad de desoxigenar la disolución, ya que los disolventes orgánicos disuelven ca. 10 veces más  $O_2$  atmosférico que el agua. La alta concentración de  $O_2$  representa un desafío, dado que este gas actúa como un potente desactivador de los estados excitados responsables de la emisión de luz.

Tal y como se explicó en la introducción de este capítulo, los complejos de rutenio(II) generan especies excitadas mediante transferencia de electrones en los procesos de ECL. Sin embargo, el  $O_2$  disuelto puede capturar fácilmente estos electrones, formando especies reactivas de oxígeno que disipan la energía de los estados excitados sin producir emisión lumínica. Este fenómeno disminuye la eficiencia del proceso de ECL y reduce significativamente la intensidad de la señal. Por ello, la desoxigenación del medio es fundamental para evitar este efecto, permitiendo que los estados excitados regresen a su estado fundamental con la consecuente emisión de luz, optimizando así la señal ECL obtenida.

Para evaluar la señal de fondo, se registró la corriente entre 0 y  $-1.5$  V en presencia y ausencia de  $O_2$ . Como se muestra en el voltamperograma cíclico de la **Figura 69**, la eliminación del oxígeno condujo a una señal mucho más limpia y libre de interferencias. Esta mejora considerablemente la detección de la señal ECL.



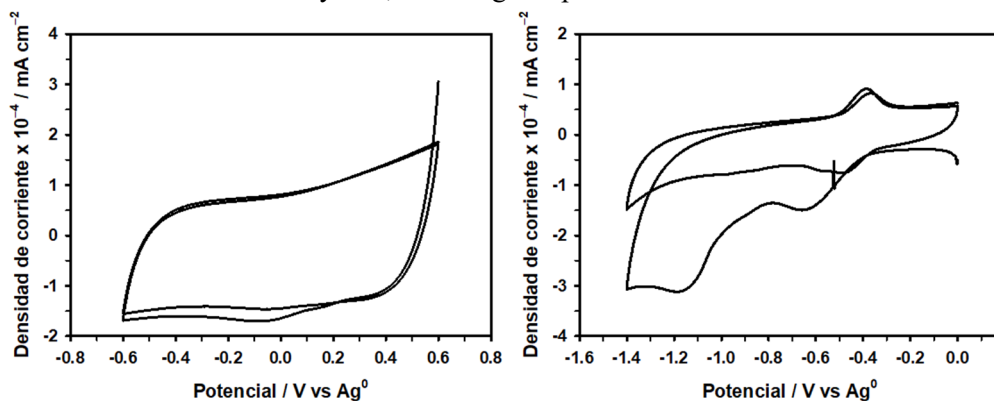
**Figura 69.** Voltamperograma cíclico de una disolución de ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70/30) obtenido entre 0 y  $-1.5$  V en presencia (línea roja) y ausencia (línea azul) de  $O_2$ , con una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### Evaluación de los QDs como generadores de ECL

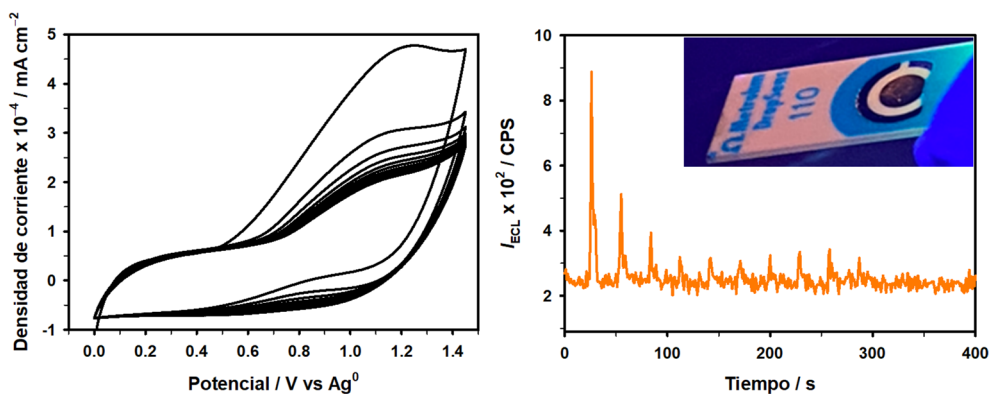
En un primer intento, se evaluó la emisión de ECL de los QDs inmovilizados mediante *dropcasting* sobre SPCE. Sin embargo, esta estrategia resultó ineficiente debido a la fácil desorción de los QDs al aplicar un potencial. Para mejorar la adherencia de los QDs al SPCE, se optó por un procedimiento de *electrografting* utilizando

4-nitrobenzenodiazonio. La reducción electroquímica del grupo diazonio mediante un potencial ligeramente negativo genera un radical arilo reactivo (**Figura 70**, izquierda), que forma enlaces covalentes con la superficie del electrodo, modificándolo con grupos 4-nitrofenilo. Posteriormente, los grupos nitro se reducen electroquímicamente a grupos amino (**Figura 70**, derecha), lo que permite la inmovilización de los QDs funcionalizados con grupos cisteína mediante un activador de ácidos.

En los experimentos iniciales, ninguna concentración de QDs generó una señal de ECL significativa usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como correactante. Además, a concentraciones elevadas, se observó la decantación del exceso de QDs durante el primer ciclo. En cambio, con TPA como correactante, una concentración más baja de QDs inmovilizados logró generar una señal de ECL, coincidiendo con el pico de oxidación observado aproximadamente a 1.2 V en el voltamperograma cíclico (**Figura 71**, izquierda). No obstante, la intensidad de la ECL disminuyó progresivamente con cada ciclo (**Figura 71**, derecha), lo que podría atribuirse a la pasivación del electrodo. En otras concentraciones ensayadas, no se logró reproducir esta señal.



**Figura 70.** Funcionalización del SPCE mediante ciclovoltamperometría: *electrografting* de 4-nitrobenzenodiazonio en la superficie del electrodo (izquierda), y electroreducción del grupo nitro a grupo amino, permitiendo la inmovilización de los QDs (derecha).

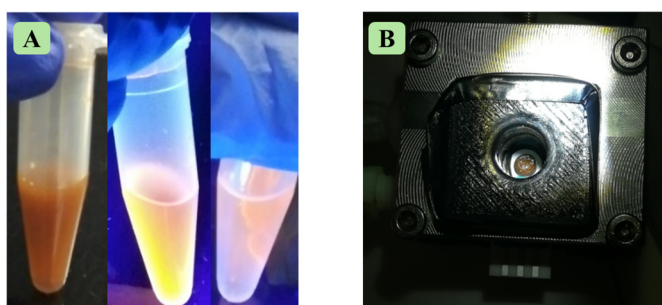


**Figura 71.** Voltamperograma de los QDs funcionalizados en una disolución de ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) con  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA (izquierda), y señal ECL emitida por los QDs unidos al electrodo a 590 nm durante 10 barridos de potencial de 0 a 1.4 V (derecha) en una disolución libre de  $\text{O}_2$ . A la derecha, se muestra también una imagen del electrodo con los QDs inmovilizados.

### Nuevas estrategias de polimerización

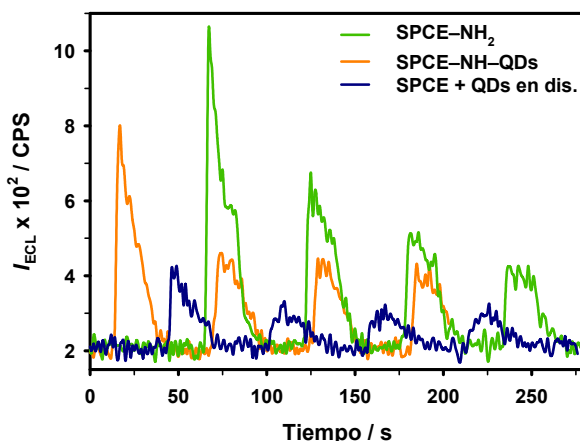
Debido a la limitada estabilidad de los QDs sobre el SPCE, se optó por inmovilizarlos en partículas magnéticas. Este enfoque buscaba aumentar la densidad de QDs cercanos al electrodo y minimizar su desorción durante los ciclos electroquímicos. Para mejorar la unión entre las partículas magnéticas aminadas comerciales y los QDs, se reemplazaron los grupos cisteína por ácido mercaptopropiónico, eliminando así la competencia entre los grupos amino de las cisteínas y las partículas magnéticas. Este procedimiento fue exitoso, ya que, tras varios lavados con retención por un imán de neodimio, se confirmó la presencia de QDs mediante su emisión naranja característica al ser excitados con luz UV a 312 nm (**Figura 72A**). Además, las partículas magnéticas pudieron posicionarse eficazmente sobre el electrodo de trabajo gracias al uso del imán (**Figura 72B**).

Sin embargo, este sistema tampoco generó una señal de ECL detectable, posiblemente debido a que las partículas magnéticas, al ser de mayor tamaño, absorbían la emisión lumínica de los QDs.



**Figura 72.** QDs inmovilizados sobre partículas magnéticas aminadas Dynabeads. A) Bajo iluminación con luz ambiente, bajo luz UV (312 nm) y bajo luz UV con atracción por un imán. B) Celda de ECL con Dynabeads-QDs dispuestos sobre el electrodo de trabajo con la ayuda de un imán.

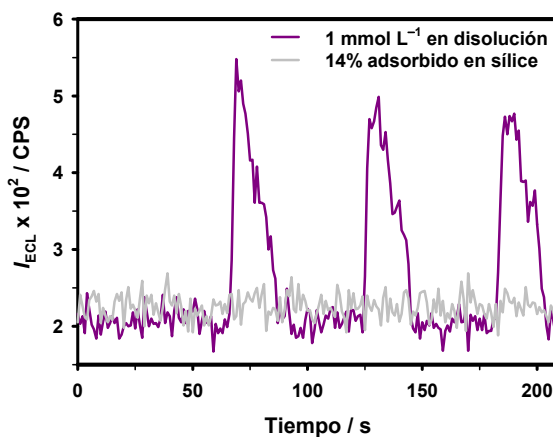
Finalmente, se evaluó el comportamiento de los QDs inmovilizados en el SPCE como correactantes en un medio acuoso. Para ello, se utilizó  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  como luminóforo y un medio similar al empleado en las pruebas iniciales de este complejo en disolución. Como controles, se incluyeron un SPCE modificado con grupos amino y un SPCE sin modificar. En todos los casos se generó señal de ECL, con intensidades ordenadas de menor a mayor: SPCE sin modificar, SPCE modificado con QDs y SPCE modificado con grupos amino (**Figura 73**). Este aumento en la señal ECL se correlaciona cualitativamente con la cantidad de grupos amino libres en la superficie del electrodo, lo que sugiere que los grupos amino, y no los QDs, actúan como verdaderos correactantes en este sistema.



**Figura 73.** ECL de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  en tampón fosfato (pH 6.2) tras aplicar 4 barridos de potencial ( $0 - 1.4 \text{ V}$ ; velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) en diferentes electrodos: sin modificar (línea azul), modificados con grupos amino e inmovilización de QDs (línea naranja) y modificados solo con grupos amino (línea verde).

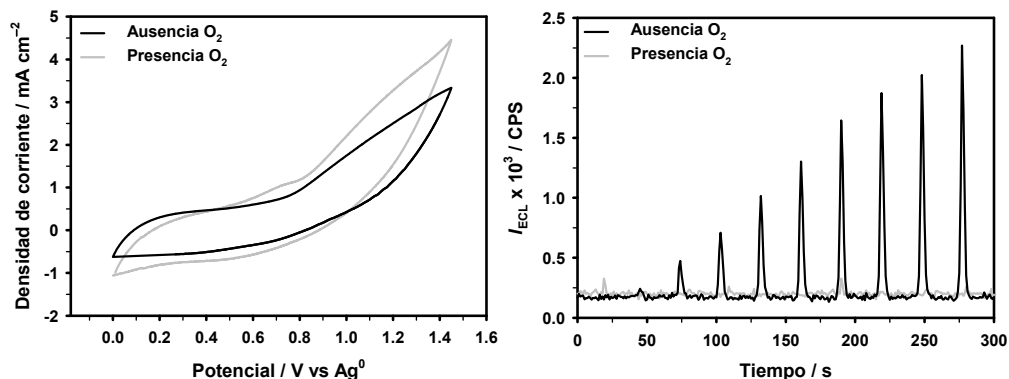
### Evaluación de los complejos de rutenio(II) como generadores de ECL

Para comparar la intensidad de la emisión de ECL entre el RD3 y el complejo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  en disolución, se emplearon  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de oxalato en ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{TBAPF}_6$ ). Los resultados mostraron que la señal ECL del RD3 era significativamente más débil que la del  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  (**Figura 74**), probablemente por el menor tiempo de vida del estado excitado del primero respecto al segundo, en ACN equilibrado al aire. Posteriormente, se intentó adsorber RD3 en partículas de sílice con núcleo magnético; sin embargo, este procedimiento no tuvo éxito, ya que no se evidenció la incorporación del complejo en la capa de sílice, lo que resultó en una ausencia completa de señal ECL.



**Figura 74.** ECL de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  RD3 (línea morada), y de partículas de sílice pirogénica con 14% de RD3 adsorbido (línea gris). En ambos casos, se utilizaron  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de oxalato en disolución y se realizaron 3 barridos de potencial ( $0 - 1.4 \text{ V}$ ; velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) en ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{TBAPF}_6$ ).

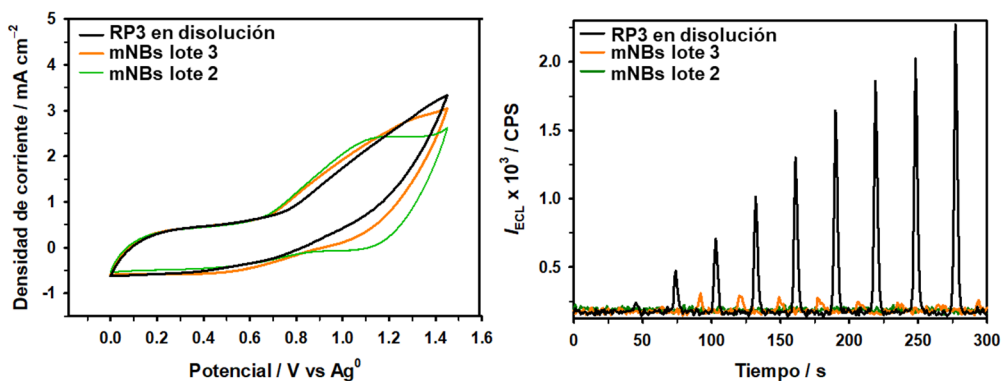
El siguiente complejo investigado fue el RP3, con una concentración de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Se utilizó una mezcla de ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70/30) y se midió la señal de ECL en presencia y ausencia de O<sub>2</sub>. Los resultados mostraron una desactivación (*quenching*) completa de la ECL en condiciones aeróbicas, mientras que, en condiciones anaeróbicas, la señal de ECL fue destacable (**Figura 75**, derecha).



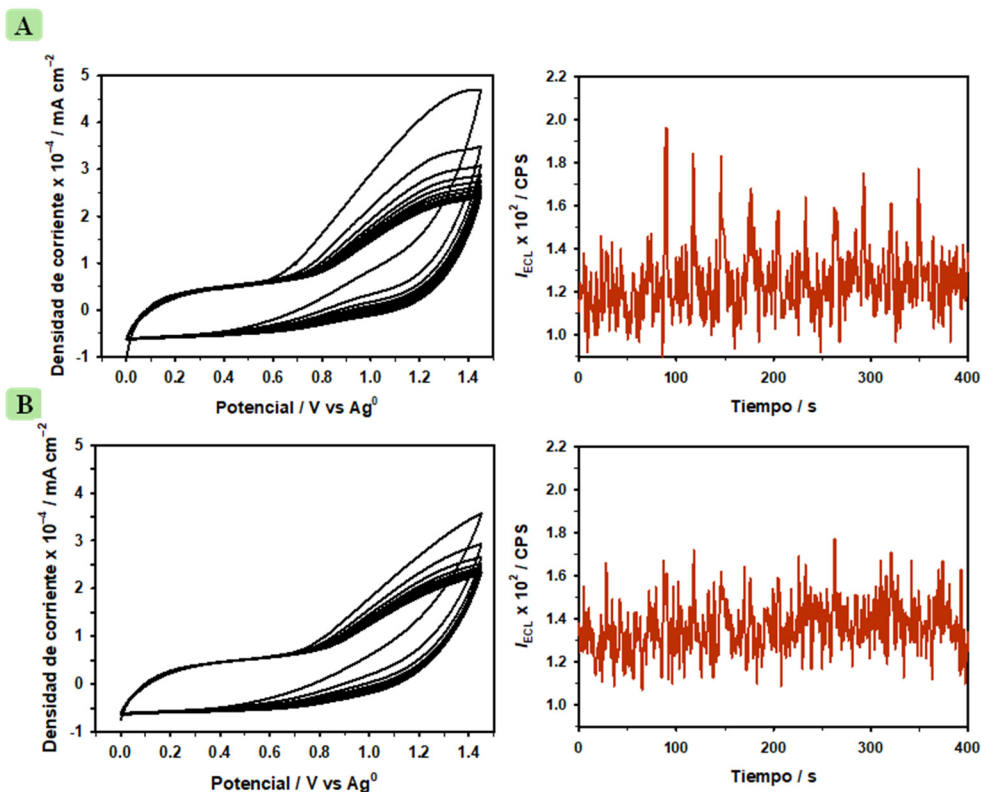
**Figura 75.** Voltamperograma cíclico de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$   $[\text{Ru}(\text{phen})_3](\text{PF}_6)_2$  en ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA como correactante, en aire (línea gris) y bajo Ar (línea negra) (izquierda). Señal de ECL a  $588 \text{ nm}$  de  $[\text{Ru}(\text{phen})_3](\text{PF}_6)_2$  en aire (línea gris) y bajo Ar (línea negra) tras 9 barridos de potencial de 0 a  $1.4 \text{ V}$  (derecha).

Una vez comprobada la emisión de ECL del RP3 en disolución y en condiciones anaeróbicas, se analizaron partículas de los lotes 2 y 3 (ver sección 3.8.4). Las diferencias entre estos lotes radicaban en el tratamiento de los núcleos magnéticos: los del lote 2 no fueron sometidos a ultrasonidos antes de la adición de la capa sol-gel, mientras que los del lote 3 sí lo fueron. Los CVs del RP3 en disolución y las partículas del lote 3 mostraron perfiles similares, mientras que las del lote 2 exhibieron un comportamiento electroquímico diferente (**Figura 76**, izquierda). Respecto a la ECL, solo las partículas del lote 3 generaron una señal, aunque fue significativamente más débil que la obtenida en disolución (**Figura 76**, derecha). Además, la intensidad de la señal disminuyó con el número de ciclos, y un ensayo repetido con el lote 3 no logró reproducir la señal de ECL. En los lotes 1 y 4 no se detectó emisión ECL en ninguna de las medidas.

Se continuó con el análisis de las partículas fabricadas mediante el procedimiento B. En la primera medida se distinguió una señal de ECL (**Figura 77A**, derecha), mientras que en la segunda medida de la misma muestra (**Figura 77B**, derecha) esta señal desapareció, lo que sugiere una posible desorción del RP3 al aplicar el barrido de potencial.

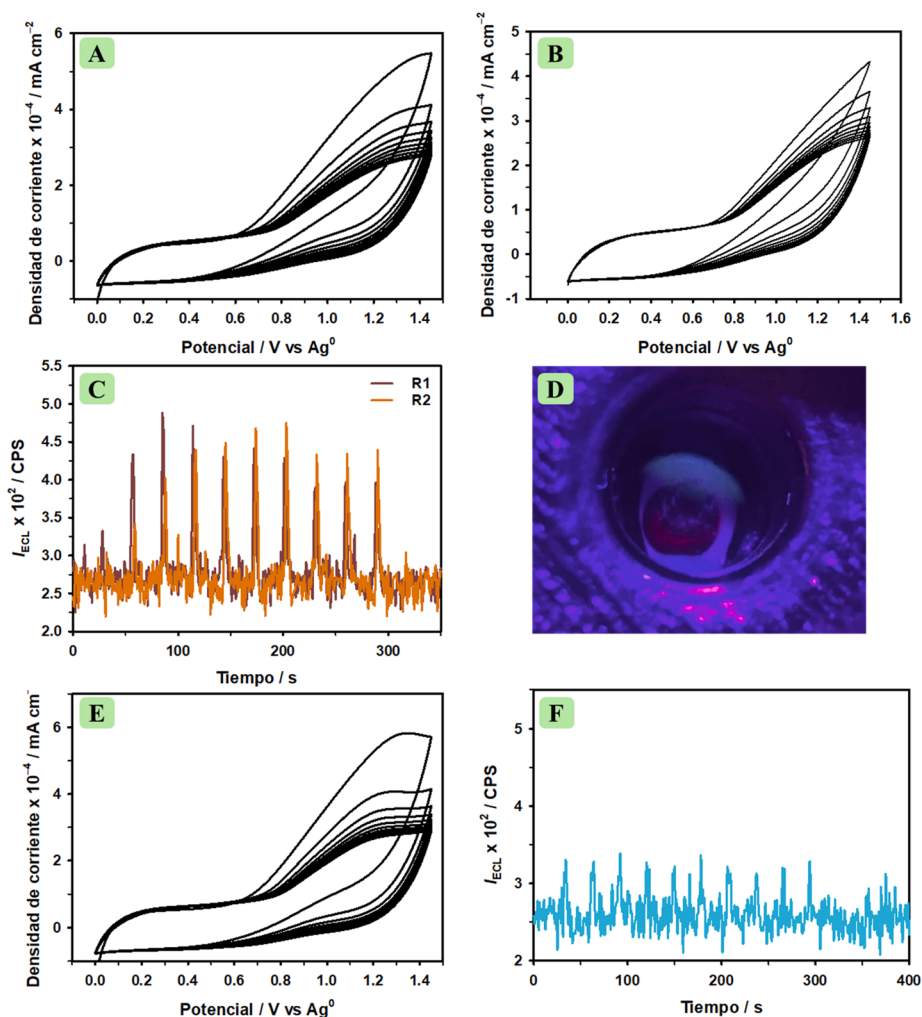


**Figura 76.** Voltamperogramas cíclicos de  $[\text{Ru}(\text{phen})_3](\text{PF}_6)_2$  en disolución, adsorbido en mNBs sonicadas (línea naranja, corresponde al lote 3) y sin tratar con ultrasonidos (línea verde, corresponde al lote 2) en ACN ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA como correctante, bajo atmósfera de Ar (izquierda). Señal de ECL a 588 nm de  $[\text{Ru}(\text{phen})_3](\text{PF}_6)_2$  en disolución, adsorbido en mNBs tratadas con ultrasonidos y sin tratar, en el mismo medio, tras 9 barridos de potencial en el rango de 0 a 1.4 V (derecha).



**Figura 77.** Voltamperogramas cíclicos (izquierda) y sus señales de ECL correspondientes (derecha) de partículas funcionalizadas con RP3, obtenidas mediante el procedimiento B: A) primera medida y B) segunda réplica. Experimentos realizados en ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPA como correctante, bajo atmósfera de Ar tras 9 barridos de potencial en el rango de 0 a 1.4 V.

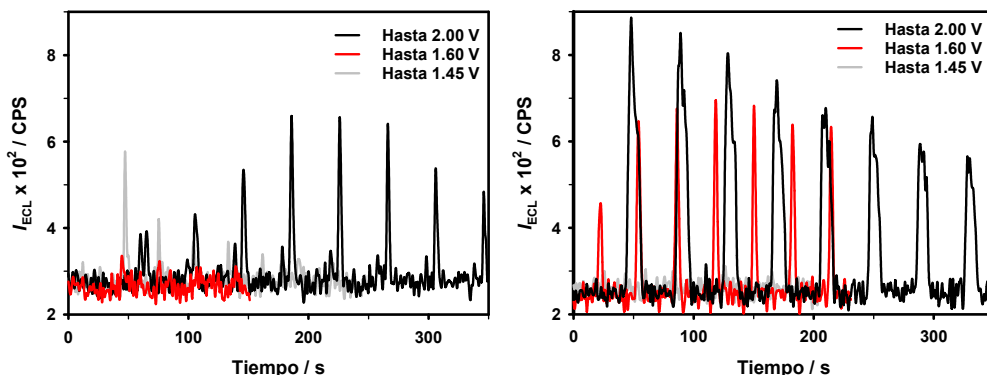
Para abordar este problema, se evaluaron partículas en las que el complejo RP2PSi se inmovilizó covalentemente sobre sílice magnética con una y dos capas de sol-gel. La segunda capa se incorporó con el objetivo de prevenir la oxidación directa del RP2PSi. En las partículas con una sola capa de sol-gel, los CVs de las dos réplicas fueron similares (**Figura 78A y 78B**), mostrando señales de ECL comparables (**Figura 78C**). Sin embargo, en las partículas con dos capas de sol-gel, la señal ECL fue mucho más débil (**Figura 78F**). En ambos casos, se observó una distribución irregular de las partículas sobre el electrodo, incluso con la ayuda del imán (**Figura 78D**). Al repetir la inmovilización sobre otro electrodo, no se obtuvo señal ECL en ninguna de las muestras.



**Figura 78.** A) y B) Voltamperogramas cíclicos (dos réplicas) de partículas con una capa de sol-gel, con sus señales de ECL correspondientes en C). D) Imagen de la celda electroquímica mostrando la distribución irregular de las partículas sobre el electrodo, incluso con la ayuda de un imán. E) Voltamperogramas cíclicos de partículas con dos capas de sol-gel y F) sus señales de ECL correspondientes, significativamente más débiles en comparación con las partículas con una sola capa. Los experimentos se realizaron en ACN (con 0.1 mol L<sup>-1</sup> TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y 30 mmol L<sup>-1</sup> de TPA como correctante, bajo atmósfera de Ar, tras 9 barridos de potencial en el rango de 0 a 1.4 V.

Dado el objetivo principal del trabajo, se investigó la capacidad del TPA para iniciar la polimerización. Se confirmó que, al aplicar un potencial, los radicales generados por la amina terciaria del TPA podían iniciar la polimerización debido a su alta reactividad. Para evitar este efecto, se optó por utilizar oxalato como correactante, una molécula menos eficiente en la generación de radicales. Sin embargo, las sales de oxalato solubles en medios orgánicos adecuados son costosas y poco comunes, por lo que se sintetizó  $\text{TBA}_2\text{C}_2\text{O}_4$  a partir de ácido oxálico y TBAOH.

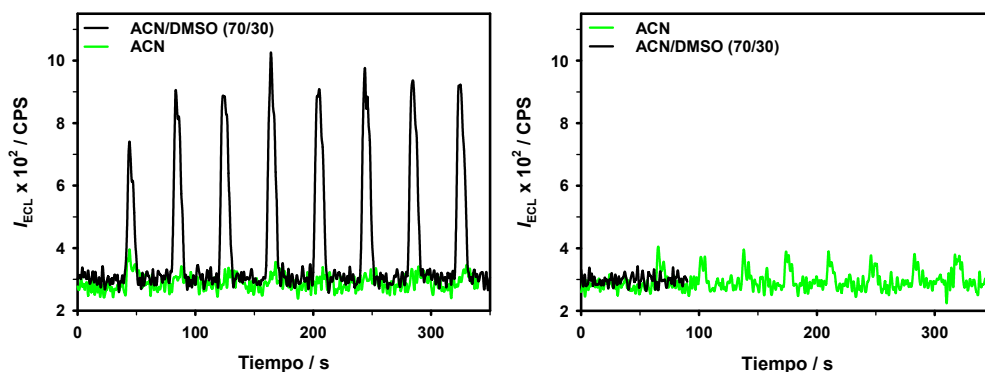
El comportamiento del RP3 se estudió en disolución utilizando una mezcla de ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v), tanto en presencia como en ausencia de  $\text{TBA}_2\text{C}_2\text{O}_4$  como correactante, aplicando diferentes ventanas de potencial. Se emplearon concentraciones de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  de RP3 y  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{TBA}_2\text{C}_2\text{O}_4$ . En ausencia del correactante, se observó emisión de ECL en las ventanas de potencial que se extendían hasta 1.6 V y 2 V, siendo esta última la que generó la mayor intensidad de señal (**Figura 79**, derecha). En cambio, en presencia de  $\text{TBA}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , la señal de ECL solo apareció en las ventanas de potencial que alcanzaban 1.45 V y 2 V, mientras que no se detectó emisión alguna en la ventana de 1.6 V (**Figura 79**, izquierda). Es importante destacar que, en la ventana de 1.45 V, la señal ECL decayó progresivamente con cada ciclo de barrido, desapareciendo completamente tras el cuarto ciclo. Además, no se detectó emisión de ECL a 1.45 V en ausencia de correactante, lo que refuerza la relevancia de  $\text{TBA}_2\text{C}_2\text{O}_4$  en la generación de señal en este rango.



**Figura 79.** Señales de ECL de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  RP3 en disolución en una mezcla de ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v), en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{TBA}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , utilizando diferentes ventanas de potencial: hasta 1.45 V (línea gris), 1.60 V (línea roja) y 2.00 V (línea negra).

Estos resultados sugirieron que el mecanismo inicialmente propuesto, basado en la coexistencia de Ru(I), Ru(II) y Ru(III), no era el predominante. Esto se debe a que, en ausencia de correactante, no se esperaba la formación de Ru(I) a partir de Ru(II) únicamente mediante la aplicación de potenciales positivos. Dado el comportamiento observado, se consideró que el DMSO podría estar desempeñando un papel activo como correactante al oxidarse a sulfona bajo potenciales positivos. Para validar esta

hipótesis, se llevaron a cabo experimentos aplicando ventanas de potencial de 0 – 2 V y de –1.6 V – 2 V en la mezcla de disolventes y en ACN puro, ambas sin TBA<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (**Figura 80**). Los resultados confirmaron que, efectivamente, la señal de ECL solo se generaba en la mezcla que contenía DMSO bajo la ventana de 0 – 2 V, mientras que en ACN puro la señal era mucho más débil o inexistente. Esto respalda la propuesta de que el DMSO actúa como correactante en estas condiciones específicas.



**Figura 80.** Señales de ECL obtenidas en diferentes medios y ventanas de potencial para evaluar el papel del DMSO como correactante: 0 a 2 V (izquierda) y –1.6 a 2 V (derecha). Los experimentos realizados en una mezcla de ACN (con 0.1 mol L<sup>-1</sup> TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) (línea negra) y ACN puro (línea verde), ambas sin TBA<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

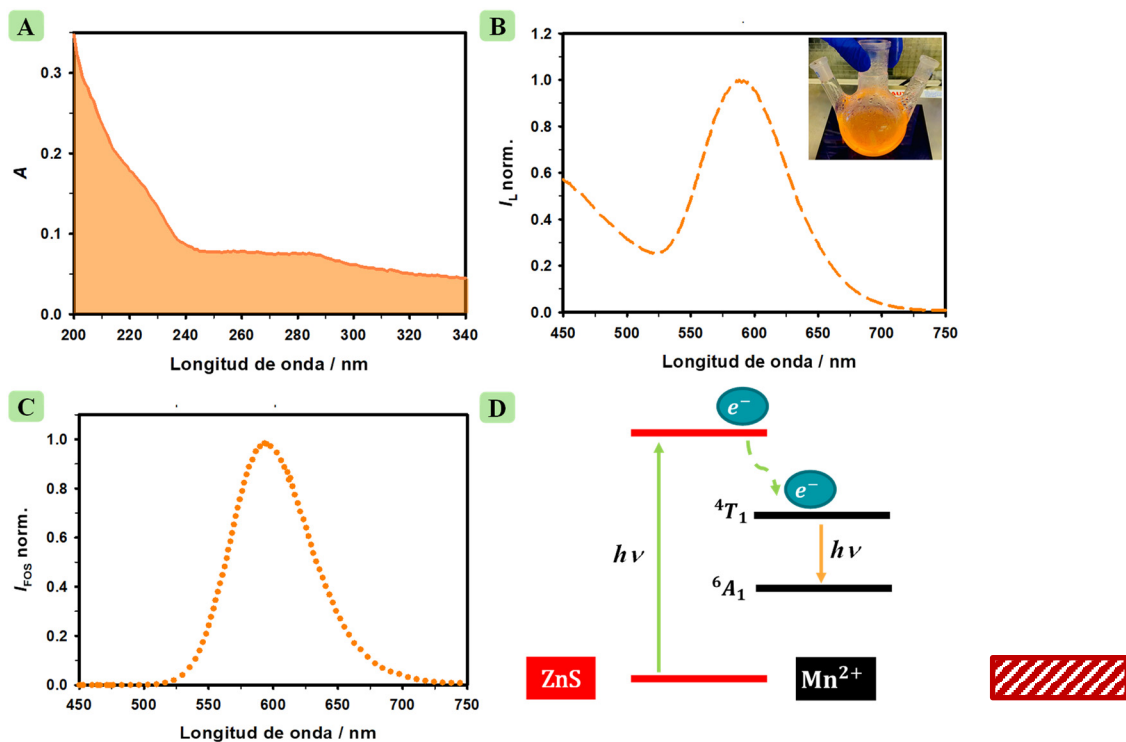
### 3.9.4. Caracterización de los materiales

#### QDs de ZnS dopados con Mn<sup>2+</sup>

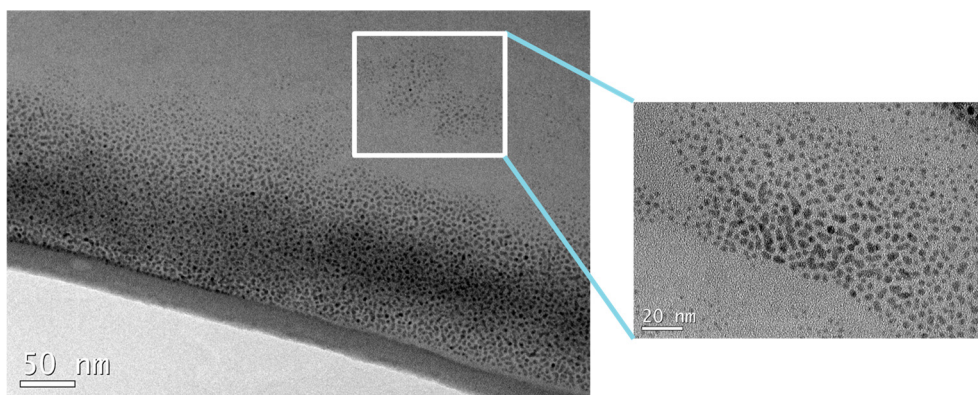
La **Figura 81** presenta la caracterización espectroscópica de los QDs. En la **Figura 81A**, se observa una absorción continua en el UV, con un máximo débil alrededor de 290 nm, característica de los QDs. Por otro lado, en la **Figura 81B** se muestra el espectro de luminiscencia del material, en el que se distinguen dos bandas: una correspondiente a los núcleos del sulfuro de zinc sin dopar, con una emisión máxima en 430 nm,<sup>217</sup> y otra asociada al manganeso(II), a 590 nm. Con el objetivo de obtener una señal más limpia y sensible, se midió exclusivamente la fosforescencia de los QDs,<sup>216</sup> como se observa en la **Figura 81C**.

El sulfuro de zinc, un semiconductor ideal, al ser dopado con iones Mn<sup>2+</sup> crea niveles de energía adicionales a la banda de valencia del semiconductor. Estos niveles resultantes del dopaje permiten que, tras la excitación de los nanocristales, la desactivación del estado excitado ocurra a través de los niveles de energía proporcionados por el dopante (**Figura 81D**). La emisión característica en el rango de 590 nm, observada en los QDs, se debe a la transición desde el estado triplete al estado fundamental del Mn<sup>2+</sup>. Este proceso de transición de espín es responsable de los largos tiempos de luminiscencia, que alcanzan milisegundos, en estos QDs.<sup>216</sup>

En cuanto a la caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), la **Figura 82** muestra que el tamaño de los QDs varía entre 1.5 y 3 nm.



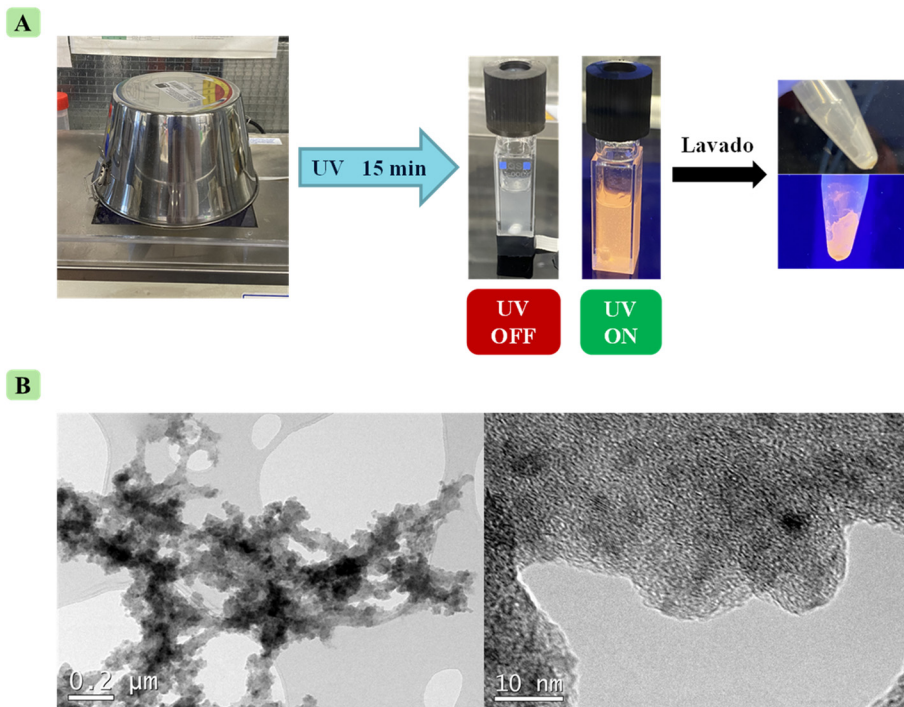
**Figura 81.** Caracterización espectroscópica de los QDs de ZnS dopados con Mn(II) en ACN. A) Espectro de absorción. B) Espectro de fluorescencia (incluye el de fosforescencia) excitando a 290 nm. C) Espectro de fosforescencia ( $\lambda_{exc} = 290$  nm). D) Esquema de los niveles electrónicos del ZnS dopado con Mn<sup>2+</sup>, que explica la emisión fosforescente a 590 nm.



**Figura 82.** Micrografía TEM de los QDs de ZnS dopados con Mn<sup>2+</sup>.

## Polímero sintetizado por irradiación

El proceso experimental utilizado se resume en la **Figura 83A**. Las micrografías obtenidas por TEM, mostradas en la **Figura 83B**, corresponden al polímero resultante tras el proceso de lavado. En la primera micrografía se pueden distinguir, por contraste, los QDs dispersos dentro de la red polimérica. Al ampliar una de estas regiones, se observan claramente los planos cristalinos asociados a los QDs. Aunque el polímero se forma alrededor de los QDs, la capa resultante es bastante gruesa en lugar de ser una capa fina como se habría esperado.



**Figura 83.** A) Esquema del proceso experimental utilizado para sintetizar el polímero por irradiación. B) Micrografías TEM del polímero después del proceso de lavado: a la izquierda, dispersión de los QDs en la red polimérica y, a la derecha, ampliación de la zona que muestra los detalles de la estructura.

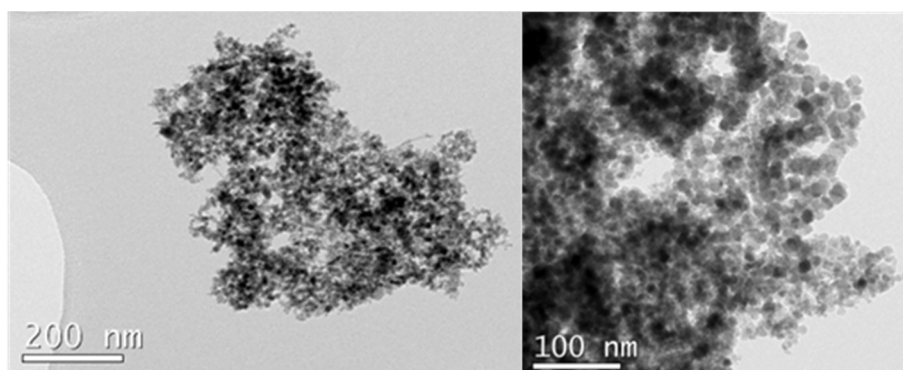
Además, se observó que, al irradiar la mezcla de prepolimerización sin los iniciadores, también se formó polímero, aunque en menor cantidad. Esto probablemente se debió a la alta energía de la radiación asociada con las bajas longitudes de onda. Por esta razón, se decidió explorar la polimerización por precipitación mediante ECL, con la esperanza de obtener una formación de polímero más controlada y adecuada para nuestro objetivo final.

## Partículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ recubiertas de sílice para ECL

El uso de partículas magnéticas en este proyecto tiene el objetivo de posicionar el generador de ECL cerca del electrodo, optimizando la transferencia electrónica entre especies y, en consecuencia, mejorar la señal de ECL. La **Figura 84** presenta una

micrografía TEM de partículas magnéticas sin recubrimiento. En estado seco, estas partículas tienden a agregarse y presentan un tamaño promedio de entre 12 y 20 nm, principalmente en forma de polígonos y esferas. Estas partículas se utilizaron como núcleo para la síntesis de las partículas sensoras, incorporando el generador de ECL en su estructura mediante una capa de sílice que adsorbe o enlaza covalentemente el complejo de rutenio(II).

La elección del complejo RP3, en lugar del RD3, se debió a su mejor solubilidad en el medio de reacción y a su mayor rendimiento cuántico de emisión en disolventes orgánicos, en comparación con el  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ .



**Figura 84.** Micrografías TEM de las mNBs sintetizadas (izquierda) y detalles más ampliados de las mismas (derecha).

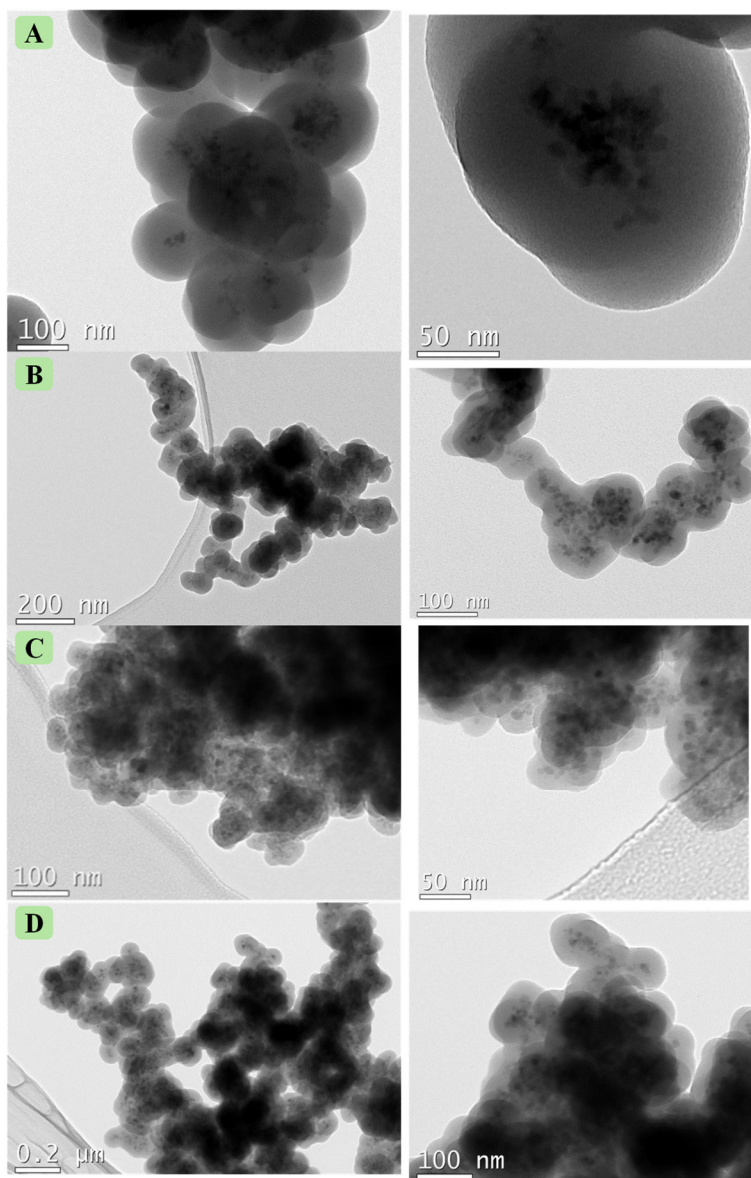
En los lotes sintetizados mediante el procedimiento A, se variaron tres parámetros: la aplicación de ultrasonidos previa del núcleo magnético, el momento de la adición del complejo de RP3 durante la síntesis de la capa de sílice y la concentración de este complejo. El segundo parámetro se estudió debido a que se ha reportado que el complejo de rutenio(II) se inmoviliza, en los polímeros de siloxano formados durante el crecimiento de la capa de sílice, a través de una interacción electrostática entre el complejo cargado positivamente y la sílice cargada negativamente, lo cual influye directamente en la morfología de las partículas y, en consecuencia, en las propiedades finales del material sintetizado.<sup>198</sup>

Las micrografías TEM revelaron que todas las partículas contenían núcleos magnéticos aglomerados en su interior, pero presentaron diferencias en el grosor y la homogeneidad de la capa sol-gel. Las partículas del lote 2, que no fueron sometidas a ultrasonidos, alcanzaron un tamaño promedio mayor (cerca a los 200 nm) debido a la formación de una capa de sílice más gruesa (**Figura 85A**). En el lote 3, donde el complejo RP3 se incorporó junto con los demás reactivos desde el inicio de la reacción, se obtuvo una capa de sílice más delgada que en el lote 2, aunque algo menos homogénea (**Figura 85B**). En contraste, en el lote 1, donde el RP3 se añadió tras una hora de reacción, se observó una capa de sílice aún más delgada y uniforme (**Figura 85C**), lo que sugiere que al añadir RP3 después de una hora, la capa de sílice ya había

### Nuevas estrategias de polimerización

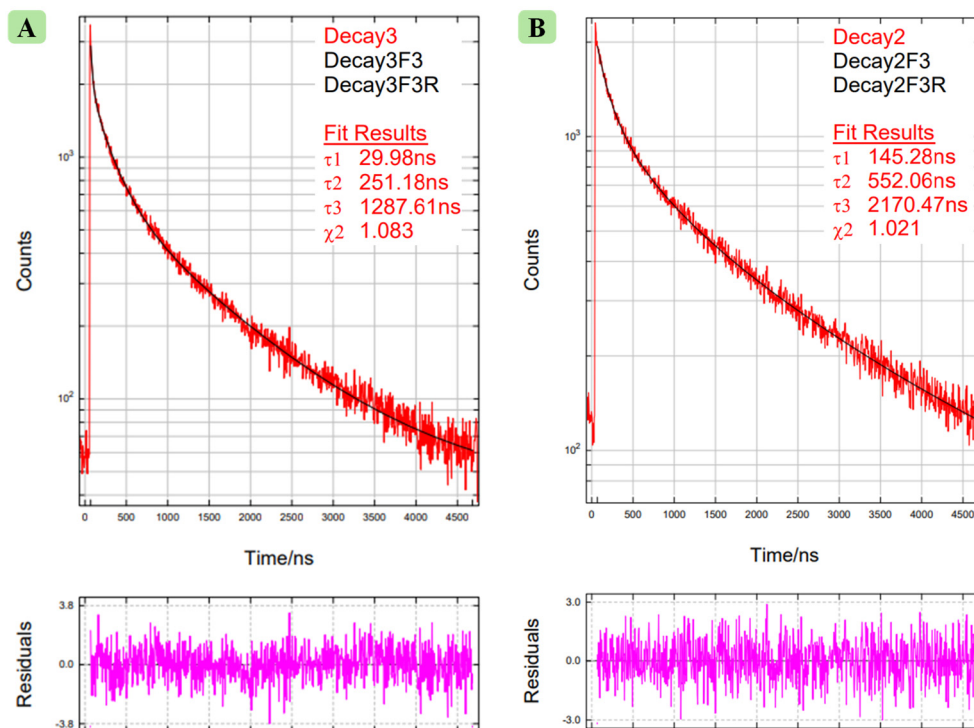
comenzado a formarse, permitiendo un crecimiento más ordenado y homogéneo. En ambos casos, las partículas presentaron un tamaño aproximado de 50 nm y contenían varios núcleos de mNBs en su interior.

En el lote 4 (**Figura 85D**), se empleó una cantidad menor de RP3 añadido después de una hora de reacción, lo que condujo a partículas de morfología más esférica y una capa de sílice algo mayor que en el lote 1, sugiriendo una posible relación entre la concentración del complejo y la estructura final de la capa de sílice.



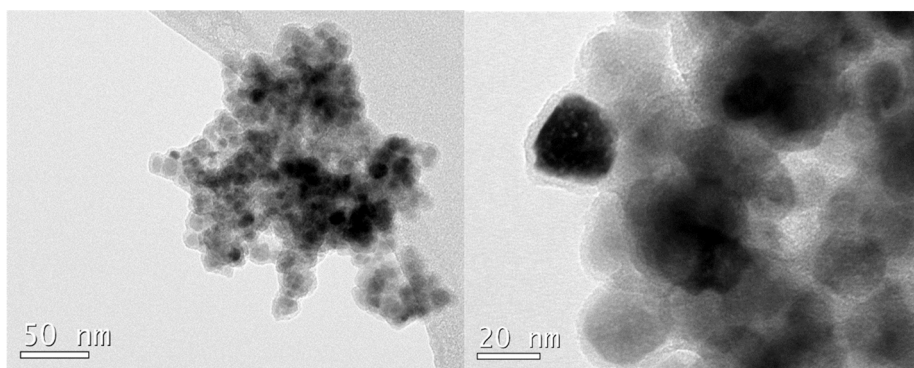
**Figura 85.** Micrografías TEM de las partículas obtenidas en diferentes lotes: A) Lote 2, sin aplicación previa de ultrasonidos y con RP3 añadido al inicio de la reacción. B)–D) Lotes sometidos previamente a ultrasonidos. B) Lote 3, con RP3 incorporado desde el inicio. C) Lote 1, con RP3 agregado tras 1 h de reacción. D) Lote 4, con menor cantidad de RP3 añadido tras 1 h de reacción.

En cuanto a las propiedades ópticas, las medidas del tiempo de vida de emisión ( $\tau$ ) mostradas en la **Figura 86**, revelaron que las partículas del lote 3 presentaban un tiempo de vida de luminiscencia más corto que las del lote 1, probablemente debido a una desactivación parcial de la luminiscencia del RP3 al estar en contacto directo con los núcleos magnéticos. Este resultado sugiere que, en el lote 1, la capa de sol-gel actúa como una barrera que separa al complejo de rutenio de los núcleos magnéticos, reduciendo la desactivación de su estado excitado y aumentando con ello el tiempo de vida de emisión del complejo.



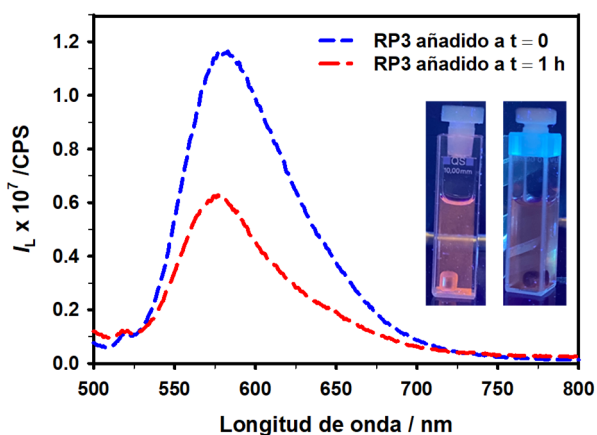
**Figura 86.** Perfiles cinéticos de extinción de la luminiscencia del complejo fotoexcitado  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  adsorbido en  $\text{mNBs@SiO}_2$ . A) Cuando se incorpora al inicio de la síntesis (lote 3). B) Cuando se añade tras 1 h de reacción (lote 1). Ambos se midieron en ACN equilibrado al aire, con excitación a 463 nm ( $\lambda_{\text{em}} = 588$  nm).

Además, al emplear el complejo RD3 en lugar de RP3 y sustituir EtOH por MeOH, se observó una mayor dispersión de los núcleos magnéticos y un mejor control en la homogeneidad de la capa sol-gel (**Figura 87**). Sin embargo, los análisis espectroscópicos indicaron que el RD3 no se mantenía adsorbido en la capa sol-gel. En todos los lotes, la reacción se dejó un tiempo total de 2 h para evitar la formación de una capa excesivamente gruesa que pudiera dificultar la transferencia de electrones entre el complejo y el correactante, y, en consecuencia, la emisión de ECL.



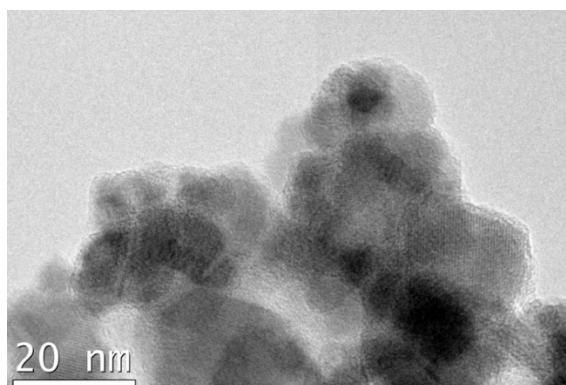
**Figura 87.** Micrografías TEM de las partículas previamente sometidas a ultrasonidos, sintetizadas utilizando MeOH en lugar de EtOH y añadiendo desde el inicio el complejo RD3 en lugar de RP3.

Los resultados espectroscópicos confirmaron la emisión de todas las partículas, excepto en las del lote 2, de mayor tamaño, y en las que contenían RD3. La **Figura 88** muestra que el lote 3 presentó la emisión más intensa, con un máximo en 596 nm, mientras que el lote 1 presentó una emisión más débil, con un máximo a 590 nm.



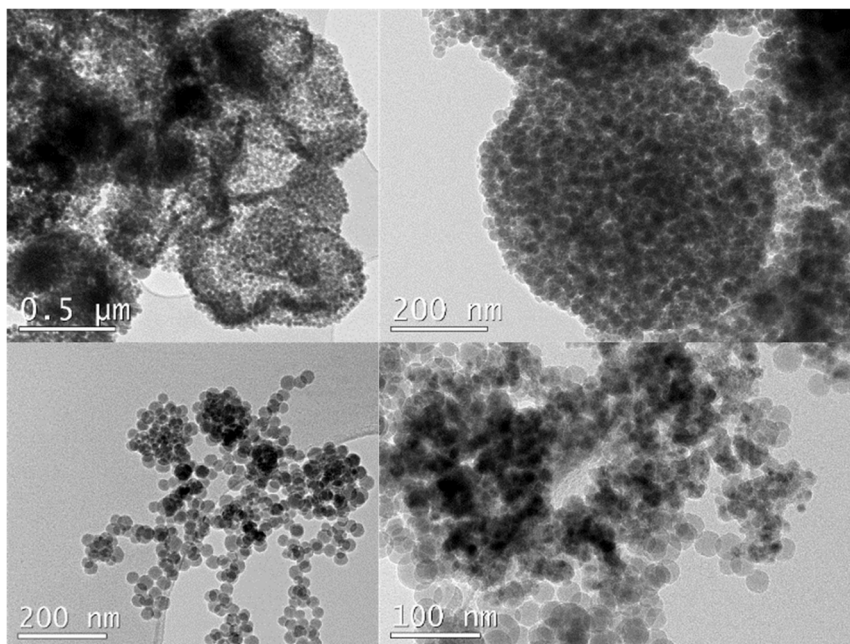
**Figura 88.** Espectros de luminiscencia ( $\lambda_{exc} = 447$  nm) en ACN de las partículas magnéticas recubiertas de sílice con RP3 adsorbido. El lote 3 presenta un máximo de emisión a 596 nm (línea discontinua azul) y el lote 1 a 590 nm (línea discontinua roja). Las imágenes de las cubetas con las partículas correspondientes, ubicadas en el lado derecho de la figura, muestran una mayor luminiscencia en las del lote 3, observadas bajo luz UV.

Para lograr partículas más homogéneas y dispersas, se optó por una síntesis sol-gel alternativa, utilizando el surfactante Triton X-100, siguiendo el procedimiento B de la sección experimental. Sin embargo, la concentración final de partículas fue considerablemente menor, y las micrografías (**Figura 89**) mostraron una muestra poco homogénea, con núcleos magnéticos rodeados de sílice, así como esferas de sílice sin núcleo magnético. Además, no se observó la característica emisión naranja bajo la lámpara UV, lo que sugirió la ausencia de ECL en estas partículas.



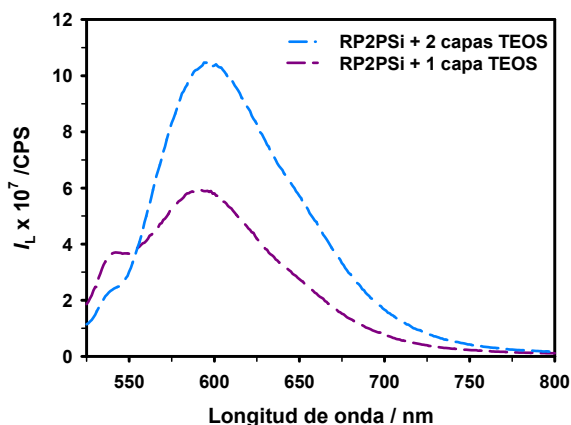
**Figura 89.** Micrografía de las partículas obtenidas mediante una síntesis sol-gel alternativa utilizando Triton X-100 como surfactante, siguiendo el procedimiento B de la sección experimental.

Ante estos resultados, se procedió a sintetizar un complejo de rutenio(II) con un ligando que permitiera la unión covalente a partículas Stöber previamente sintetizadas. Estas partículas Stöber son muy homogéneas en cuanto a tamaño y forma, con aproximadamente 20 nm de diámetro y una forma esférica (**Figura 90**). A pesar de realizar múltiples lavados usando un imán de neodimio para retener solo las partículas con núcleos magnéticos, algunas partículas Stöber permanecieron sin núcleo. Aunque no presentaban las características ideales, fueron seleccionadas por su alta reproducibilidad para unir covalentemente el complejo RP2PSi, dispersándolas previamente con ultrasonidos.



**Figura 90.** Micrografías de las partículas obtenidas mediante la síntesis sol-gel alternativa utilizando Triton X-100 como surfactante, siguiendo el procedimiento B con algunas modificaciones descritas en la sección experimental.

Después de la síntesis, la muestra se dividió en dos alícuotas: en una de ellas se añadió una segunda capa sol-gel, siguiendo la recomendación de estudios previos,<sup>218</sup> que sugieren que esta capa puede prevenir la oxidación directa del complejo de rutenio y mejorar la señal ECL. Los resultados espectroscópicos mostrados en la **Figura 91** indicaron que ambas fracciones eran luminiscentes; las partículas con una sola capa sol-gel presentaron una emisión máxima a 590 nm, mientras que las partículas con dos capas mostraron un máximo a 596 nm.

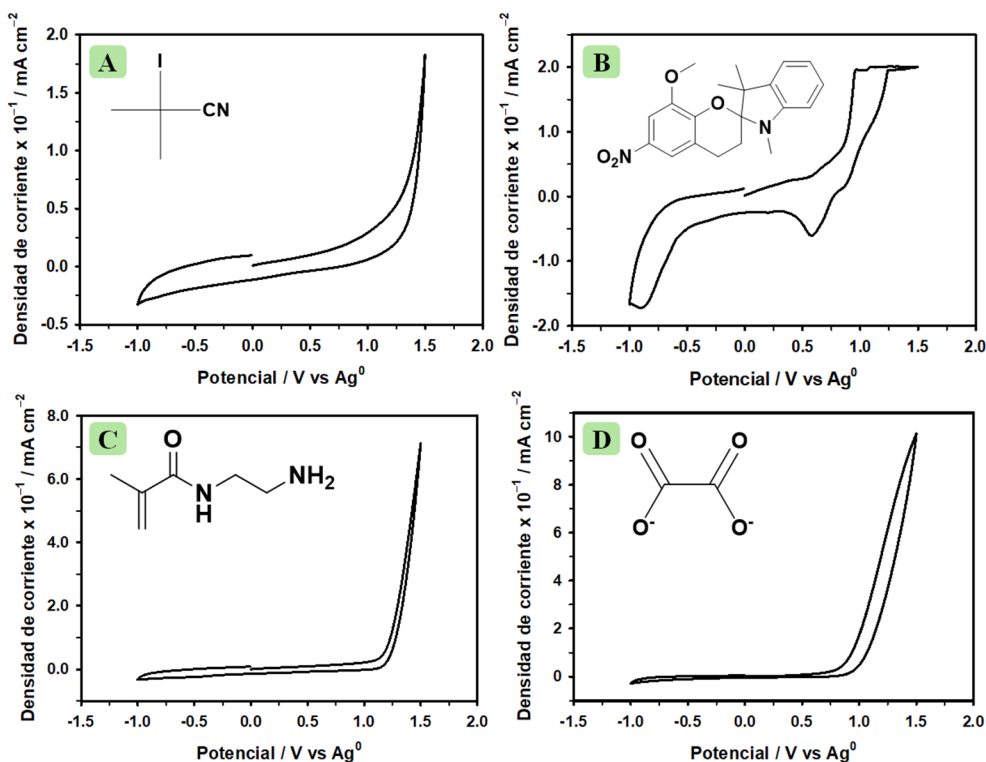


**Figura 91.** Espectros de luminiscencia ( $\lambda_{exc} = 447$  nm) de las partículas magnéticas recubiertas de sílice con RP2PSi enlazado covalentemente. Las partículas con una sola capa sol-gel muestran un máximo de emisión a 590 nm (línea discontinua morada), mientras que las partículas con dos capas sol-gel presentan un máximo a 596 nm (línea discontinua azul clara).

### Electroquímica de los componentes del sistema de polimerización y sus controles

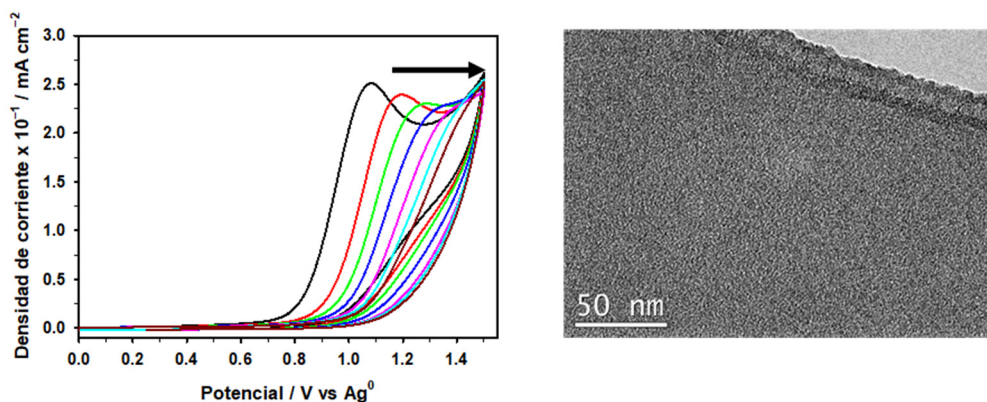
Se estudió el comportamiento electroquímico de los componentes antes de emplearlos en la polimerización mediada por ECL, con el fin de asegurar que sus propiedades en la mezcla de disolventes fueran compatibles con los objetivos del proyecto. Para ello, se analizaron cada uno de los componentes en las condiciones especificadas en la sección experimental (**Figura 92**), utilizando concentraciones superiores a las requeridas para la polimerización. Aunque esta se realizaría aplicando 8 ciclos en un rango de 0 a 1.5 V, también se evaluó el comportamiento de los componentes en condiciones de reducción.

Los resultados mostraron que los monómeros, el iniciador CP-I y el TBA<sub>2</sub>Ox no presentaron picos de oxidación o reducción de forma independiente. Sin embargo, el DHMI mostró un pico de reducción, probablemente asociado a la reducción del grupo nitro en su estructura, lo cual podría afectar a su comportamiento durante la polimerización.



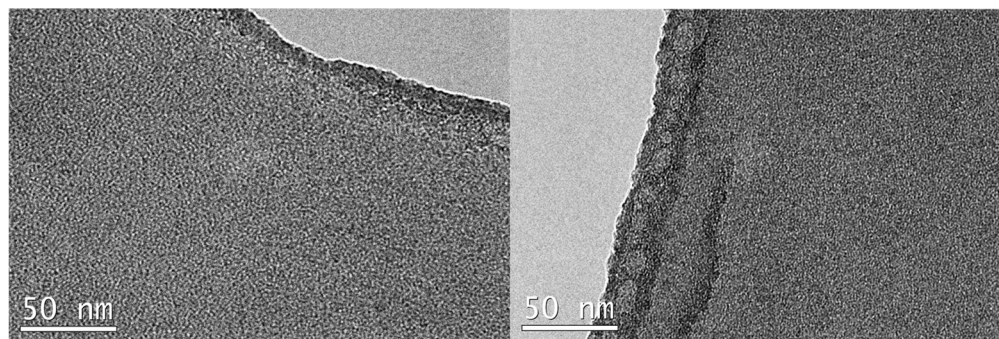
**Figura 92.** CVs y estructuras de algunos de los componentes para la polimerización ECL: A) CP-I. B) DHMI, C) EAMA.HCl y D) TBA<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Los compuestos se prepararon a una concentración de 5 mmol L<sup>-1</sup> en una mezcla de ACN (con 0.1 mol L<sup>-1</sup> TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) y se midieron bajo atmósfera de Ar, en el rango de -1 a 1.5 V a 50 mV s<sup>-1</sup>. El sistema de electrodos utilizado para las medidas estaba compuesto por GCE como electrodo de trabajo, Ag<sup>0</sup> como electrodo de referencia y platino como contraelectrodo.

En segundo lugar, se probó si la mezcla de los monómeros con el correactante podría sufrir una **electropolimerización**. Para ello, se desoxigenó la disolución durante 30 min con nitrógeno y se aplicaron las condiciones mencionadas. Los CVs recogidos tras cada ciclo en la **Figura 93** mostraron un pico de oxidación a 1.1 V que iba desplazándose a la derecha con cada ciclo, signo de que la interfaz del electrodo estaba cambiando con cada uno. Aparentemente, se formó polímero en el primer ciclo y se fue despegando de la superficie del electrodo con cada uno de los ciclos. Las micrografías TEM no mostraron polímero en suspensión, lo que podría deberse a que en realidad estaba disuelto.



**Figura 93.** CVs de la mezcla de prepolimerización en una disolución de ACN (con  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  TBAPF<sub>6</sub>)/DMSO (70:30 v/v) bajo atmósfera de Ar, tras aplicar 8 ciclos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  en el rango de 0 a 1.5 V (izquierda). Micrografía TEM de la disolución resultante (derecha).

En una tercera prueba, se realizó una **fotopolimerización** utilizando un láser de 642 nm en lugar de las partículas con complejos de rutenio(II). La mezcla se irradió durante 8 min, tiempo equivalente al de los 8 ciclos de barrido de potencial. Si no se observaba formación de polímero en estas condiciones, se confirmaría que el sistema propuesto no era efectivo para la polimerización mediada por ECL. Además, se aumentó la relación [CP-I] con respecto a la [DHMI] en un 5%. En ninguno de los casos las micrografías TEM (**Figura 94**) mostraron diferencias entre la mezcla de prepolimerización inicial y la supuesta formación de polímero tras los 8 min, lo que invalida el sistema de polimerización propuesto.



**Figura 94.** Micrografías TEM de la mezcla de prepolimerización (antes de la irradiación izquierda) y tras la exposición a una radiación de 642 nm (derecha).

### 3.10. Conclusiones

Para mejorar los resultados obtenidos y superar las limitaciones identificadas en el proyecto, se proponen diversas estrategias. Respecto a la **polimerización por irradiación**, sería recomendable utilizar un material nanoparticulado que posea una longitud de onda de excitación menos energética para minimizar la conversión no deseada de monómeros sin la intervención del material emisor, reduciendo así la formación incontrolada de polímero y permitiendo obtener capas más uniformes. En cuanto a la **polimerización por ECL**, sería beneficioso explorar otros complejos de rutenio o sistemas iniciadores alternativos con mayor eficiencia, especialmente a concentraciones bajas. Asimismo, debe evaluarse el papel del DMSO como correctante y considerar su sustitución por un porógeno inerte o menos reactivo. Adicionalmente, sería conveniente optimizar el sistema iniciador, considerando alternativas más estables en la ventana de potencial aplicada y examinando las condiciones experimentales de la iluminación con láser para verificar su impacto en la formación del polímero. Estos ajustes podrían acercar los resultados al objetivo inicial y mejorar significativamente la eficiencia y reproducibilidad del proceso.





## **CAPÍTULO 4**



## FINAL CONCLUSIONS

The results described in this thesis demonstrate that the primary objectives of the research project have been successfully achieved. Specifically, we have designed, developed and, when time has permitted, analytically validated advanced methods and functional devices based on molecularly imprinted polymers (MIPs) for the sensitive and selective detection of mycotoxins. Our work has included the development of *dual-analyte* methodology, the synthesis and characterization of MIPs in *nanogel* format, the integration of MIPs into hybrid *opto-electrochemical sensor* platforms and pioneering *photocatalytic amplification* of the analytical signal strategies to enhance mycotoxin detection.

### Chapter 2 – Synthesis of MIPs in different formats and their application

#### 1. Simultaneous determination of zearalenone and alternariol in vegetable oils with mixed MIP particles.

A robust method for the simultaneous detection of zearalenone (ZON) and alternariol (AOH) was developed and optimized using a 50:50 (w/w) mixture of two tailored MIP beads. Low detection limits of  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  for ZON and  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  for AOH were achieved by optimizing the washing and elution conditions through a chemometric design of experiments. The method was successfully validated for vegetable oil matrices with recoveries ranging from 92% to 113% (RSD < 6%) and its reliability was confirmed by HPLC- MS/MS, highlighting the usefulness of artificial polymer materials as synthetic antibody mimics.

#### 2. Determination of mycophenolic acid by MIPs in nanogel format.

Complementary studies involving the synthesis of MIPs in nanogel format using both solid phase polymerization and precipitation methods for selective detection of mycophenolic acid (MPA) have been carried out. Although structural and physicochemical characterization (including size, stability and recognition capacity) was successfully achieved, the resulting nanogels showed limited affinity for MPA. This result indicates the need for future improvements, such as the incorporation of more specific *functional monomers* or the selection of alternative *template* molecules to increase the affinity for the target analyte.

### **Chapter 3 - New polymerization strategies and development of a sensor based on bipolar electrochemistry combined with MIPs**

#### **1. Development of a sensor based on bipolar electrochemistry combined with MIPs.**

A novel hybrid sensor has been developed by integrating MIPs with bipolar electrochemistry (BE) and optical transduction. In this system, a MIP-coated bipolar electrode—with an anode selective for ZON—was coupled to a gold wire cathode connected to a LED, enabling wireless electroanalysis when feeder electrodes were powered. Molecular recognition of ZON facilitated redox reactions of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  couple at the gold electrode ends, producing an electroluminescent signal directly proportional to the ZON concentration. When integrated into a microfluidic platform, the device exhibited a linear response over the range  $10 - 70 \text{ ng mL}^{-1}$ , demonstrating its potential for portable monitoring and visual alert of food contaminants above a set value.

#### **2. Novel polymerization strategies.**

Innovative optical sensing approaches were explored by preparing MIP-based sensor layers via photopolymerization and electrochemiluminescence (ECL)-induced polymerization. The aim was to generate functional luminescent monolayers for a FRET-type assay targeting AOH. Although the synthesis of luminescent particles and the evaluation of different initiator systems and porogens were achieved, several technical challenges were encountered, including low monomer conversion, low ECL efficiency of immobilized Ru complexes, DMSO interference as a co-reactant, and overall instability of the initiator system. However, the knowledge gained provides a clearer roadmap for further optimization of MIP-based chemiluminescent optical sensors.

### **Chapter 4 -**





## BIBLIOGRAFÍA

- (1) BelBruno, J. J. Molecularly Imprinted Polymers. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (1), 94–119. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>.
- (2) Lowdon, J. W.; Diliën, H.; Singla, P.; Peeters, M.; Cleij, T. J.; van Grinsven, B.; Eersels, K. MIPs for Commercial Application in Low-Cost Sensors and Assays – An Overview of the Current Status Quo. *Sens. Actuators B: Chem.* **2020**, *325*, 128973. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128973>.
- (3) Kupai, J.; Razali, M.; Buyuktiryaki, S.; Kecili, R.; Szekely, G. Long-Term Stability and Reusability of Molecularly Imprinted Polymers. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (4), 666–673. <https://doi.org/10.1039/C6PY01853J>.
- (4) Włoch, M.; Datta, J. Synthesis and Polymerisation Techniques of Molecularly Imprinted Polymers. In *Compr. Anal. Chem.*; Elsevier, 2019; Vol. 86, pp 17–40. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.05.011>.
- (5) Zeng, H.; Yu, X.; Wan, J.; Cao, X. Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers Based on Boronate Affinity for Diol-Containing Macrolide Antibiotics with Hydrophobicity-Balanced and pH-Responsive Cavities. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1642*, 461969. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461969>.
- (6) Qi, P.; Wang, J.; Wang, L.; Li, Y.; Jin, J.; Su, F.; Tian, Y.; Chen, J. Molecularly Imprinted Polymers Synthesized via Semi-Covalent Imprinting with Sacrificial Spacer for Imprinting Phenols. *Polymer* **2010**, *51* (23), 5417–5423. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.09.037>.
- (7) Mayes, A. G.; Whitcombe, M. J. Synthetic Strategies for the Generation of Molecularly Imprinted Organic Polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (12), 1742–1778. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.011>.
- (8) Hasanah, A. N.; Soni, D.; Pratiwi, R.; Rahayu, D.; Megantara, S.; Mutakin. Synthesis of Diazepam-Imprinted Polymers with Two Functional Monomers in Chloroform Using a Bulk Polymerization Method. *J. Chem.* **2020**, *2020* (1), 7282415. <https://doi.org/10.1155/2020/7282415>.
- (9) Shi, Y.; Yang, J.; Yang, J.; Wang, Z.; Chen, Z.; Xu, Y. Quinone-Amine Polymer Nanoparticles Prepared through Facile Precipitation Polymerization as Ultrafast and Ultralong Cycle Life Cathode Materials for Lithium-Ion Batteries. *Adv. Funct. Mater.* **2022**, *32* (21), 2111307. <https://doi.org/10.1002/adfm.202111307>.
- (10) Mayes, A. G.; Mosbach, K. Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (21), 3769–3774. <https://doi.org/10.1021/ac960363a>.
- (11) Dvorakova, G.; Haschick, R.; Chiad, K.; Klapper, M.; Müllen, K.; Biffis, A. Molecularly Imprinted Nanospheres by Nonaqueous Emulsion Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31* (23), 2035–2040. <https://doi.org/10.1002/marc.201000406>.
- (12) Li, P.; Rong, F.; Yuan, C. Morphologies and Binding Characteristics of Molecularly Imprinted Polymers Prepared by Precipitation Polymerization. *Polym. Int.* **2003**, *52* (12), 1799–1806. <https://doi.org/10.1002/pi.1381>.

- (13) Sergeeva, T. A.; Matuschewski, H.; Piletsky, S. A.; Bendig, J.; Schedler, U.; Ulbricht, M. Molecularly Imprinted Polymer Membranes for Substance-Selective Solid-Phase Extraction from Water by Surface Photo-Grafting Polymerization. *J. Chromatogr. A* **2001**, *907* (1), 89–99. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01053-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01053-0).
- (14) Patel, K. D.; Kim, H.-W.; Knowles, J. C.; Poma, A. Molecularly Imprinted Polymers and Electrospinning: Manufacturing Convergence for Next-Level Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (32), 2001955. <https://doi.org/10.1002/adfm.202001955>.
- (15) Mier, A.; Maffucci, I.; Merlier, F.; Prost, E.; Montagna, V.; Ruiz-Esparza, G. U.; Bonventre, J. V.; Dhal, P. K.; Tse Sum Bui, B.; Sakhaii, P.; Haupt, K. Molecularly Imprinted Polymer Nanogels for Protein Recognition: Direct Proof of Specific Binding Sites by Solution STD and WaterLOGSY NMR Spectroscopies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (38), 20849–20857. <https://doi.org/10.1002/anie.202106507>.
- (16) Moreno-Bondi, M. C.; Benito-Peña, E.; Moya-Cavas, T. D.; Ruiz, J. U. Molecularly Imprinted Polymer-Based Biomimetic Sensors for Food Analysis. In *Encyclopedia of Sensors and Biosensors*; Elsevier, 2023; pp 568–598. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822548-6.00105-9>.
- (17) Alanazi, K.; Garcia Cruz, A.; Di Masi, S.; Voorhaar, A.; Ahmad, O. S.; Cowen, T.; Piletska, E.; Langford, N.; Coats, T. J.; Sims, M. R.; Piletsky, S. A. Disposable Paracetamol Sensor Based on Electroactive Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Plasma Monitoring. *Sens. Actuators B: Chem.* **2021**, *329*, 129128. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129128>.
- (18) Turco, A.; Corvaglia, S.; Mazzotta, E. Electrochemical Sensor for Sulfadimethoxine Based on Molecularly Imprinted Polypyrrole: Study of Imprinting Parameters. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.045>.
- (19) González, G. P.; Hernando, P. F.; Alegría, J. S. D. A Morphological Study of Molecularly Imprinted Polymers Using the Scanning Electron Microscope. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *557* (1), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.034>.
- (20) Calahorra-Rio, L.; Guadaño-Sánchez, M.; Moya-Cavas, T.; Urraca, J. L. Magnetic Core-Shell Nanoparticles Using Molecularly Imprinted Polymers for Zearalenone Determination. *Molecules* **2022**, *27* (23), 8166. <https://doi.org/10.3390/molecules27238166>.
- (21) Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation. *J. Chromatogr. B* **2004**, *804* (1), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>.
- (22) Song, R.; Hu, X.; Guan, P.; Li, J.; Qian, L.; Wang, C.; Wang, Q. Synthesis of Porous Molecularly Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Glutathione. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *332*, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.01.165>.
- (23) Boventi, M.; Mauri, M.; Golker, K.; Wiklander, J. G.; Nicholls, I. A.; Simonutti, R. Porosity of Molecularly Imprinted Polymers Investigated by <sup>129</sup>Xe NMR Spectroscopy. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2022**, *4* (12), 8740–8749. <https://doi.org/10.1021/acsapm.2c01084>.

- (24) Quílez-Alburquerque, J.; Descalzo, A. B.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Luminescent Molecularly Imprinted Polymer Nanocomposites for Emission Intensity and Lifetime Rapid Sensing of Tenuazonic Acid Mycotoxin. *Polymer* **2021**, *230*, 124041. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124041>.
- (25) Medina Rangel, P. X.; Laclef, S.; Xu, J.; Panagiotopoulou, M.; Kovensky, J.; Tse Sum Bui, B.; Haupt, K. Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanolabels: Affinity Tools for Cellular Bioimaging of Glycans. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 3923. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40348-5>.
- (26) Ji, S.; Li, T.; Yang, W.; Shu, C.; Li, D.; Wang, Y.; Ding, L. A Hollow Porous Molecularly Imprinted Polymer as a Sorbent for the Extraction of 7 Macrolide Antibiotics Prior to Their Determination by HPLC-MS/MS. *Microchim. Acta* **2018**, *185* (3), 203. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2728-3>.
- (27) Huang, X.; Zou, H.; Chen, X.; Luo, Q.; Kong, L. Molecularly Imprinted Monolithic Stationary Phases for Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers and Diastereomers. *J. Chromatogr. A* **2003**, *984* (2), 273–282. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01768-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01768-5).
- (28) Cheong, W. J.; Yang, S. H.; Ali, F. Molecular Imprinted Polymers for Separation Science: A Review of Reviews. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36* (3), 609–628. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200784>.
- (29) Parisi, O. I.; Ruffo, M.; Scrivano, L.; Malivindi, R.; Vassallo, A.; Puoci, F. Smart Bandage Based on Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) for Diclofenac Controlled Release. *Pharmaceuticals* **2018**, *11* (4), 92. <https://doi.org/10.3390/ph11040092>.
- (30) Shi, H.; Wan, Y.; Tian, X.; Wang, L.; Shan, L.; Zhang, C.; Wu, M.-Y.; Feng, S. Synergistically Enhancing Tumor Chemotherapy Using an Aggregation-Induced Emission Photosensitizer on Covalently Conjugated Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14* (51), 56585–56596. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c17731>.
- (31) Chen, W.; Ma, Y.; Pan, J.; Meng, Z.; Pan, G.; Sellergren, B. Molecularly Imprinted Polymers with Stimuli-Responsive Affinity: Progress and Perspectives. *Polymers* **2015**, *7* (9), 1689–1715. <https://doi.org/10.3390/polym7091478>.
- (32) Piletska, E. V.; Turner, N. W.; Turner, A. P. F.; Piletsky, S. A. Controlled Release of the Herbicide Simazine from Computationally Designed Molecularly Imprinted Polymers. *J. Control. Release* **2005**, *108* (1), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.07.016>.
- (33) Li, Y.; Li, B.; Qi, Y.; Zhang, Z.; Cong, S.; She, Y.; Cao, X. Synthesis of Metal-Organic Framework @molecularly Imprinted Polymer Adsorbents for Solid Phase Extraction of Organophosphorus Pesticides from Agricultural Products. *J. Chromatogr. B* **2022**, *1188*, 123081. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123081>.
- (34) Sharma, G.; Kandasubramanian, B. Molecularly Imprinted Polymers for Selective Recognition and Extraction of Heavy Metal Ions and Toxic Dyes. *J. Chem. Eng. Data* **2020**, *65* (2), 396–418. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00953>.

- (35) Nxumalo, N. L.; Mahlambi, P. N. Molecularly Imprinted Polymer-Based Adsorbents for the Selective Removal of Pharmaceuticals from Wastewater: Adsorption Kinetics, Isotherms, and Thermodynamics Studies. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2023**, *62* (41), 16525–16544. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.3c02096>.
- (36) Suriyanarayanan, S.; Cywinski, P. J.; Moro, A. J.; Mohr, G. J.; Kutner, W. Chemosensors Based on Molecularly Imprinted Polymers. In *Molecular Imprinting*; Haupt, K., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2012; pp 165–265. [https://doi.org/10.1007/128\\_2010\\_92](https://doi.org/10.1007/128_2010_92).
- (37) Al Faysal, A.; Cetinkaya, A.; Kaya, S. I.; Erdoğan, T.; Ozkan, S. A.; Gölcü, A. Development and Fabrication of a Molecularly Imprinted Polymer-Based Electroanalytical Sensor for the Determination of Acyclovir. *ACS Omega* **2024**, *9* (8), 9564–9576. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09399>.
- (38) Carrasco, S.; Benito-Peña, E.; Walt, D. R.; Moreno-Bondi, M. C. Fiber-Optic Array Using Molecularly Imprinted Microspheres for Antibiotic Analysis. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (5), 3139–3147. <https://doi.org/10.1039/C5SC00115C>.
- (39) Wang, X.; Chen, H.; Zhou, T.; Lin, Z.; Zeng, J.; Xie, Z.; Chen, X.; Wong, K.; Chen, G.; Wang, X. Optical Colorimetric Sensor Strip for Direct Readout Glucose Measurement. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (12), 3702–3705. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.05.018>.
- (40) Hendrickson, O. D.; Taranova, N. A.; Zherdev, A. V.; Dzantiev, B. B.; Eremin, S. A. Fluorescence Polarization-Based Bioassays: New Horizons. *Sensors* **2020**, *20* (24), 7132. <https://doi.org/10.3390/s20247132>.
- (41) Moreno-Bondi, M. C.; Benito-Peña, M. E.; Urraca, J. L.; Orellana, G. Immuno-Like Assays and Biomimetic Microchips. In *Molecular Imprinting*; Haupt, K., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2012; pp 111–164. [https://doi.org/10.1007/128\\_2010\\_94](https://doi.org/10.1007/128_2010_94).
- (42) Navarro-Villoslada, F.; Urraca, J. L.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Zearalenone Sensing with Molecularly Imprinted Polymers and Tailored Fluorescent Probes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *121* (1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.09.042>.
- (43) Sergeeva, T.; Yarynka, D.; Piletska, E.; Lynn timer, R.; Zaporozhets, O.; Brovko, O.; Piletsky, S.; El'skaya, A. Fluorescent Sensor Systems Based on Nanostructured Polymeric Membranes for Selective Recognition of Aflatoxin B1. *Talanta* **2017**, *175*, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.030>.
- (44) Xu, J.; Haupt, K.; Tse Sum Bui, B. Core–Shell Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles as Synthetic Antibodies in a Sandwich Fluoroimmunoassay for Trypsin Determination in Human Serum. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (29), 24476–24483. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b05844>.
- (45) Marroquín-Cardona, A. G.; Johnson, N. M.; Phillips, T. D.; Hayes, A. W. Mycotoxins in a Changing Global Environment – A Review. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *69*, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>.
- (46) Taniwaki, M. H.; Pitt, J. I.; Magan, N. *Aspergillus* Species and Mycotoxins: Occurrence and Importance in Major Food Commodities. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *23*, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>.

- (47) Sweeney, M. J.; Dobson, A. D. W. Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *43* (3), 141–158. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00112-3).
- (48) Xu, Z.-N.; Yang, S.-T. Production of Mycophenolic Acid by *Penicillium Brevicompactum* Immobilized in a Rotating Fibrous-Bed Bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40* (4), 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.025>.
- (49) Zhang, B.; Chen, X.; Han, S.-Y.; Li, M.; Ma, T.-Z.; Sheng, W.-J.; Zhu, X. Simultaneous Analysis of 20 Mycotoxins in Grapes and Wines from Hexi Corridor Region (China): Based on a QuEChERS–UHPLC–MS/MS Method. *Molecules* **2018**, *23* (8), 1926. <https://doi.org/10.3390/molecules23081926>.
- (50) Ji, F.; He, D.; Olaniran, A. O.; Mokoena, M. P.; Xu, J.; Shi, J. Occurrence, Toxicity, Production and Detection of Fusarium Mycotoxin: A Review. *Food Prod. Process. Nutr.* **2019**, *1* (1), 6. <https://doi.org/10.1186/s43014-019-0007-2>.
- (51) Chen, A.; Mao, X.; Sun, Q.; Wei, Z.; Li, J.; You, Y.; Zhao, J.; Jiang, G.; Wu, Y.; Wang, L.; Li, Y. Alternaria Mycotoxins: An Overview of Toxicity, Metabolism, and Analysis in Food. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (28), 7817–7830. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03007>.
- (52) Edite Bezerra da Rocha, M.; Freire, F. da C. O.; Erlan Feitosa Maia, F.; Izabel Florindo Guedes, M.; Rondina, D. Mycotoxins and Their Effects on Human and Animal Health. *Food Control* **2014**, *36* (1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>.
- (53) Marin, D. E.; Grosu, I. A.; Pistol, G. C.; Bulgaru, C. V.; Perteau, A. M.; Taranu, I. The Combined Effect of Two Alternaria Mycotoxins (Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether) on Porcine Epithelial Intestinal Cells. *Agriculture* **2024**, *14* (9), 1478. <https://doi.org/10.3390/agriculture14091478>.
- (54) Alassane-Kpembé, I.; Schatzmayr, G.; Taranu, I.; Marin, D.; Puel, O.; Oswald, I. P. Mycotoxins Co-Contamination: Methodological Aspects and Biological Relevance of Combined Toxicity Studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (16), 3489–3507. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>.
- (55) Alassane-Kpembé, I.; Puel, O.; Pinton, P.; Cossalter, A.-M.; Chou, T.-C.; Oswald, I. P. Co-Exposure to Low Doses of the Food Contaminants Deoxynivalenol and Nivalenol Has a Synergistic Inflammatory Effect on Intestinal Explants. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91* (7), 2677–2687. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1902-9>.
- (56) McKean, C.; Tang, L.; Tang, M.; Billam, M.; Wang, Z.; Theodorakis, C. W.; Kendall, R. J.; Wang, J.-S. Comparative Acute and Combinative Toxicity of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 in Animals and Human Cells. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44* (6), 868–876. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.11.011>.
- (57) Thapa, A.; Horgan, K. A.; White, B.; Walls, D. Deoxynivalenol and Zearalenone—Synergistic or Antagonistic Agri-Food Chain Co-Contaminants? *Toxins* **2021**, *13* (8), 561. <https://doi.org/10.3390/toxins13080561>.
- (58) Nji, Q. N.; Babalola, O. O.; Ekwomadu, T. I.; Nleya, N.; Mwanza, M. Six Main Contributing Factors to High Levels of Mycotoxin Contamination in African Foods. *Toxins* **2022**, *14* (5), 318. <https://doi.org/10.3390/toxins14050318>.

- (59) *Mycotoxin Risk Management App*. <https://www.dsm.com/anh/products-and-services/tools/mycotoxin-contamination/mycotoxin-risk-management-app.html> (accessed 2024-08-26).
- (60) DSM Animal Nutrition & Health. *BIOMIN Mycotoxin Survey*. <https://www.dsm.com/anh/products-and-services/tools/mycotoxin-contamination/biomin-mycotoxin-survey.html>.
- (61) *Mycotoxins* | WHO. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/mycotoxins> (accessed 2024-09-17).
- (62) *Mycotoxins* | FAO. <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/en/> (accessed 2024-09-17).
- (63) *Mycotoxins* | EFSA. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins> (accessed 2024-09-17).
- (64) US EPA, O. *Mold Course Chapter 1*: <https://www.epa.gov/mold/mold-course-chapter-1> (accessed 2024-09-17).
- (65) Nutrition, C. for F. S. and A. Mycotoxins. *FDA* **2022**.
- (66) *ISO - Standards*. ISO. <https://www.iso.org/standards.html> (accessed 2024-09-17).
- (67) European Commission. *Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on Maximum Levels for Certain Contaminants in Food and Repealing Regulation (EC) No 1881/2006; L119 2023/915; 2023*. <http://data.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj> (accessed 2024-09-17).
- (68) Fan, K.; Guo, W.; Huang, Q.; Meng, J.; Yao, Q.; Nie, D.; Han, Z.; Zhao, Z. Assessment of Human Exposure to Five *Alternaria* Mycotoxins in China by Biomonitoring Approach. *Toxins* **2021**, *13* (11), 762. <https://doi.org/10.3390/toxins13110762>.
- (69) Pantano, L.; La Scala, L.; Olibrio, F.; Galluzzo, F. G.; Bongiorno, C.; Buscemi, M. D.; Macaluso, A.; Vella, A. QuEChERS LC–MS/MS Screening Method for Mycotoxin Detection in Cereal Products and Spices. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18* (7), 3774. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073774>.
- (70) Zhou, J.; Xu, J.-J.; Huang, B.-F.; Cai, Z.-X.; Ren, Y.-P. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Multi-Mycotoxin in Cereals and Bean Foodstuffs Using Interference-Removal Solid-Phase Extraction Combined with Optimized Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. *Journal of Separation Science* **2017**, *40* (10), 2141–2150. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601326>.
- (71) Rico-Yuste, A.; Walravens, J.; Urraca, J. L.; Abou-Hany, R. A. G.; Descalzo, A. B.; Orellana, G.; Rychlik, M.; De Saeger, S.; Moreno-Bondi, M. C. Analysis of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Foodstuffs by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *243*, 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.125>.
- (72) Cavaliere, C.; D’Ascenzo, G.; Foglia, P.; Pastorini, E.; Samperi, R.; Laganà, A. Determination of Type B Trichothecenes and Macrocyclic Lactone Mycotoxins in Field Contaminated Maize. *Food Chemistry* **2005**, *92* (3), 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.008>.

- (73) Escobar, J.; Lorán, S.; Giménez, I.; Ferruz, E.; Herrera, M.; Herrera, A.; Ariño, A. Occurrence and Exposure Assessment of *Fusarium* Mycotoxins in Maize Germ, Refined Corn Oil and Margarine. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *62*, 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.020>.
- (74) Siegel, D.; Andrae, K.; Proske, M.; Kochan, C.; Koch, M.; Weber, M.; Nehls, I. Dynamic Covalent Hydrazine Chemistry as a Selective Extraction and Cleanup Technique for the Quantification of the *Fusarium* Mycotoxin Zearalenone in Edible Oils. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217* (15), 2206–2215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.019>.
- (75) Qian, M.; Zhang, H.; Wu, L.; Jin, N.; Wang, J.; Jiang, K. Simultaneous Determination of Zearalenone and Its Derivatives in Edible Vegetable Oil by Gel Permeation Chromatography and Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2015**, *166*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.133>.
- (76) Kong, W.-J.; Li, J.-Y.; Qiu, F.; Wei, J.-H.; Xiao, X.-H.; Zheng, Y.; Yang, M.-H. Development of a Sensitive and Reliable High Performance Liquid Chromatography Method with Fluorescence Detection for High-Throughput Analysis of Multi-Class Mycotoxins in Coix Seed. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *799*, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.08.042>.
- (77) Overy, D. P.; Seifert, K. A.; Savard, M. E.; Frisvad, J. C. Spoilage Fungi and Their Mycotoxins in Commercially Marketed Chestnuts. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *88* (1), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00086-2).
- (78) Hendrickson, O. D.; Chertovich, J. O.; Zherdev, A. V.; Sveshnikov, P. G.; Dzantiev, B. B. Ultrasensitive Magnetic ELISA of Zearalenone with Pre-Concentration and Chemiluminescent Detection. *Food Control* **2018**, *84*, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.008>.
- (79) Xing, K.-Y.; Shan, S.; Liu, D.-F.; Lai, W.-H. Recent Advances of Lateral Flow Immunoassay for Mycotoxins Detection. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *133*, 116087. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116087>.
- (80) Song, S.; Liu, N.; Zhao, Z.; Njumbe Ediage, E.; Wu, S.; Sun, C.; De Saeger, S.; Wu, A. Multiplex Lateral Flow Immunoassay for Mycotoxin Determination. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (10), 4995–5001. <https://doi.org/10.1021/ac500540z>.
- (81) Ashley, J.; Shahbazi, M.-A.; Kant, K.; Chidambara, V. A.; Wolff, A.; Bang, D. D.; Sun, Y. Molecularly Imprinted Polymers for Sample Preparation and Biosensing in Food Analysis: Progress and Perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.018>.
- (82) Pérez-Fernández, B.; de la Escosura-Muñiz, A. Electrochemical Biosensors Based on Nanomaterials for Aflatoxins Detection: A Review (2015–2021). *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1212*, 339658. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339658>.
- (83) Pascale, M.; De Girolamo, A.; Visconti, A.; Magan, N.; Chianella, I.; Piletska, E. V.; Piletsky, S. A. Use of Itaconic Acid-Based Polymers for Solid-Phase Extraction of Deoxynivalenol and Application to Pasta Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *609* (2), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.004>.

- (84) Jiang, M.; Braiek, M.; Florea, A.; Chrouda, A.; Farre, C.; Bonhomme, A.; Bessueille, F.; Vocanson, F.; Zhang, A.; Jaffrezic-Renault, N. Aflatoxin B1 Detection Using a Highly-Sensitive Molecularly-Imprinted Electrochemical Sensor Based on an Electropolymerized Metal Organic Framework. *Toxins* **2015**, *7* (9), 3540–3553. <https://doi.org/10.3390/toxins7093540>.
- (85) Jodlbauer, J.; Maier, N. M.; Lindner, W. Towards Ochratoxin A Selective Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Extraction. *J. Chromatogr. A* **2002**, *945* (1–2), 45–63. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01504-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01504-7).
- (86) Bueno, D.; Mishra, R. K.; Hayat, A.; Catanante, G.; Sharma, V.; Muñoz, R.; Marty, J.-L. Portable and Low Cost Fluorescence Set-up for in-Situ Screening of Ochratoxin A. *Talanta* **2016**, *159*, 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.039>.
- (87) Jessy Mercy, D.; Girigoswami, K.; Girigoswami, A. A Mini Review on Biosensor Advancements-Emphasis on Quantum Dots. *Results Chem.* **2024**, *7*, 101271. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101271>.
- (88) Ashley, J.; Shahbazi, M.-A.; Kant, K.; Chidambara, V. A.; Wolff, A.; Bang, D. D.; Sun, Y. Molecularly Imprinted Polymers for Sample Preparation and Biosensing in Food Analysis: Progress and Perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.018>.
- (89) Zhou, B.; Xie, H.; Zhou, S.; Sheng, X.; Chen, L.; Zhong, M. Construction of AuNPs/Reduced Graphene Nanoribbons Co-Modified Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor for the Detection of Zearalenone. *Food Chem.* **2023**, *423*, 136294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136294>.
- (90) Munawar, H.; Garcia-Cruz, A.; Majewska, M.; Karim, K.; Kutner, W.; Piletsky, S. A. Electrochemical Determination of Fumonisin B1 Using a Chemosensor with a Recognition Unit Comprising Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles. *Sens. Actuators B: Chem.* **2020**, *321*, 128552. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128552>.
- (91) Hu, X.; Xia, Y.; Liu, Y.; Zhao, F.; Zeng, B. Determination of Patulin Using Dual-Dummy Templates Imprinted Electrochemical Sensor with PtPd Decorated N-Doped Porous Carbon for Amplification. *Microchim. Acta* **2021**, *188* (5), 148. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04812-2>.
- (92) Abdolmaleki, K.; Khedri, S.; Alizadeh, L.; Javanmardi, F.; Oliveira, C. A. F.; Mousavi Khaneghah, A. The Mycotoxins in Edible Oils: An Overview of Prevalence, Concentration, Toxicity, Detection and Decontamination Techniques. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *115*, 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.057>.
- (93) Hickert, S.; Bergmann, M.; Ersen, S.; Cramer, B.; Humpf, H.-U. Survey of Alternaria Toxin Contamination in Food from the German Market, Using a Rapid HPLC-MS/MS Approach. *Mycotoxin Res* **2016**, *32* (1), 7–18. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0233-7>.
- (94) Puntsher, 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>.

- (95) Qian, M.; Zhang, H.; Wu, L.; Jin, N.; Wang, J.; Jiang, K. Simultaneous Determination of Zearalenone and Its Derivatives in Edible Vegetable Oil by Gel Permeation Chromatography and Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Food Chemistry* **2015**, *166*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.133>.
- (96) Zhao, Y.; Wan, L.-H.; Bai, X.-L.; Liu, Y.-M.; Zhang, F.-P.; Liu, Y.-M.; Liao, X. Quantification of Mycotoxins in Vegetable Oil by UPLC-MS/MS after Magnetic Solid-Phase Extraction. *Food Addit. Contam. Part A* **2017**, *34* (7), 1201–1210. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1319074>.
- (97) Abou-Hany, R. A. G.; Urraca, J. L.; Descalzo, A. B.; Gómez-Arribas, L. N.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Tailoring Molecularly Imprinted Polymer Beads for Alternariol Recognition and Analysis by a Screening with Mycotoxin Surrogates. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1425*, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.055>.
- (98) Lattanzio, V. M. T.; Verdini, E.; Sdogati, S.; Bibi, R.; Ciasca, B.; Pecorelli, I. Monitoring Alternaria Toxins in Italian Food to Support Upcoming Regulation. *Food Addit. Contam. Part B* **2021**, *15* (1), 42–51. <https://doi.org/10.1080/19393210.2021.2000505>.
- (99) Lucci, P.; David, S.; Conchione, C.; Milani, A.; Moret, S.; Pacetti, D.; Conte, L. Molecularly Imprinted Polymer as Selective Sorbent for the Extraction of Zearalenone in Edible Vegetable Oils. *Foods* **2020**, *9* (10), 1439. <https://doi.org/10.3390/foods9101439>.
- (100) Urraca, J. L.; Marazuela, M. D.; Merino, E. R.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C. Molecularly Imprinted Polymers with a Streamlined Mimic for Zearalenone Analysis. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1116* (1), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.032>.
- (101) Urraca, J. L.; Carbajo, M. C.; Torralvo, M. J.; González-Vázquez, J.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C. Effect of the Template and Functional Monomer on the Textural Properties of Molecularly Imprinted Polymers. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24* (1), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.04.004>.
- (102) Zhang, Y.; He, J.; Song, L.; Wang, H.; Huang, Z.; Sun, Q.; Ba, X.; Li, Y.; You, L.; Zhang, S. Application of Surface-Imprinted Polymers Supported by Hydroxyapatite in the Extraction of Zearalenone in Various Cereals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412* (17), 4045–4055. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02610-y>.
- (103) Villa, C. C.; Sánchez, L. T.; Valencia, G. A.; Ahmed, S.; Gutiérrez, T. J. Molecularly Imprinted Polymers for Food Applications: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *111*, 642–669. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.003>.
- (104) Arabi, M.; Ostovan, A.; Bagheri, A. R.; Guo, X.; Wang, L.; Li, J.; Wang, X.; Li, B.; Chen, L. Strategies of Molecular Imprinting-Based Solid-Phase Extraction Prior to Chromatographic Analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *128*, 115923. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115923>.

- (105) Chen, W.-J.; Shang, P.-P.; Fang, S.-B.; Huang, Y.-P.; Liu, Z.-S. Origin of Macromolecular Crowding: Analysis of Recognition Mechanism of Dual-Template Molecularly Imprinted Polymers by in Silico Prediction. *J Chromatogr A* **2022**, *1662*, 462695. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462695>.
- (106) Liu, Y.; Liu, Y.; Liu, Z.; Hill, J. P.; Alowasheer, A.; Xu, Z.; Xu, X.; Yamauchi, Y. Ultra-Durable, Multi-Template Molecularly Imprinted Polymers for Ultrasensitive Monitoring and Multicomponent Quantification of Trace Sulfa Antibiotics. *J Mater Chem B* **2021**, *9* (14), 3192–3199. <https://doi.org/10.1039/d1tb00091h>.
- (107) Qiao, F.; Sun, H.; Yan, H.; Row, K. H. Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction. *Chromatographia* **2006**, *64* (11), 625–634. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0097-2>.
- (108) Lhotská, I.; Gajdošová, B.; Solich, P.; Šatínský, D. Molecularly Imprinted vs. Reversed-Phase Extraction for the Determination of Zearalenone: A Method Development and Critical Comparison of Sample Clean-up Efficiency Achieved in an on-Line Coupled SPE Chromatography System. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410* (14), 3265–3273. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0920-2>.
- (109) Lacina, O.; Zachariasova, M.; Urbanova, J.; Vaclavikova, M.; Cajka, T.; Hajslova, J. Critical Assessment of Extraction Methods for the Simultaneous Determination of Pesticide Residues and Mycotoxins in Fruits, Cereals, Spices and Oil Seeds Employing Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1262*, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.097>.
- (110) Varga, E.; Glauner, T.; Berthiller, F.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; Sulyok, M. Development and Validation of a (Semi-)Quantitative UHPLC-MS/MS Method for the Determination of 191 Mycotoxins and Other Fungal Metabolites in Almonds, Hazelnuts, Peanuts and Pistachios. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (15), 5087–5104. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6831-3>.
- (111) Majerus, P.; Graf, N.; Krämer, M. Rapid Determination of Zearalenone in Edible Oils by HPLC with Fluorescence Detection. *Mycotoxin Res.* **2009**, *25* (3), 117. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0018-y>.
- (112) Dzuman, Z.; Zachariasova, M.; Veprikova, Z.; Godula, M.; Hajslova, J. Multi-Analyte High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Tandem Mass Spectrometry Method for Control of Pesticide Residues, Mycotoxins, and Pyrrolizidine Alkaloids. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *863*, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.021>.
- (113) Rubert, J.; Dzuman, Z.; Vaclavikova, M.; Zachariasova, M.; Soler, C.; Hajslova, J. Analysis of Mycotoxins in Barley Using Ultra High Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of Efficiency and Efficacy of Different Extraction Procedures. *Talanta* **2012**, *99*, 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.010>.

- (114) Adetunji, M.; Atanda, O.; Ezekiel, C. N.; Sulyok, M.; Warth, B.; Beltrán, E.; Krska, R.; Obadina, O.; Bakare, A.; Chilaka, C. A. Fungal and Bacterial Metabolites of Stored Maize (*Zea Mays*, L.) from Five Agro-Ecological Zones of Nigeria. *Mycotoxin Res.* **2014**, *30* (2), 89–102. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0194-2>.
- (115) Hickert, S.; Gerding, J.; Ncube, E.; Hübner, F.; Flett, B.; Cramer, B.; Humpf, H.-U. A New Approach Using Micro HPLC-MS/MS for Multi-Mycotoxin Analysis in Maize Samples. *Mycotoxin Res.* **2015**, *31* (2), 109–115. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0221-y>.
- (116) Abdallah, M. F.; Girgin, G.; Baydar, T.; Krska, R.; Sulyok, M. Occurrence of Multiple Mycotoxins and Other Fungal Metabolites in Animal Feed and Maize Samples from Egypt Using LC-MS/MS. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97* (13), 4419–4428. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8293>.
- (117) Drzymala, S. S.; Weiz, S.; Heinze, J.; Marten, S.; Prinz, C.; Zimathies, A.; Garbe, L.-A.; Koch, M. Automated Solid-Phase Extraction Coupled Online with HPLC-FLD for the Quantification of Zearalenone in Edible Oil. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (12), 3489–3497. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8541-5>.
- (118) Urraca, J. L.; Marazuela, M. D.; Moreno-Bondi, M. C. Molecularly Imprinted Polymers Applied to the Clean-up of Zearalenone and  $\alpha$ -Zearalenol from Cereal and Swine Feed Sample Extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385* (7), 1155–1161. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0343-3>.
- (119) Torres, J. J.; Montejano, H. A.; Chesta, C. A. Characterization of Imprinted Microbeads Synthesized via Minisuspension Polymerization. *Macromol. Mater. Eng.* **2012**, *297* (4), 342–352. <https://doi.org/10.1002/mame.201100237>.
- (120) Cavaliere, C.; Antonelli, M.; Cerrato, A.; La Barbera, G.; Laganà, A.; Laus, M.; Piovesana, S.; Capriotti, A. L. A Novel Magnetic Molecular Imprinted Polymer for Selective Extraction of Zearalenone from Cereal Flours before Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Determination. *Toxins* **2019**, *11* (9), 493. <https://doi.org/10.3390/toxins11090493>.
- (121) Li, G.; Zhang, K.; Fizir, M.; Niu, M.; Sun, C.; Xi, S.; Hui, X.; Shi, J.; He, H. Rational Design, Preparation and Adsorption Study of a Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Using a Dummy Template and a Bifunctional Monomer. *New J. Chem.* **2017**, *41* (15), 7092–7101. <https://doi.org/10.1039/C7NJ00689F>.
- (122) Hu, X.; Wang, C.; Zhang, M.; Zhao, F.; Zeng, B. Ionic Liquid Assisted Molecular Self-Assemble and Molecular Imprinting on Gold Nanoparticles Decorated Boron-Doped Ordered Mesoporous Carbon for the Detection of Zearalenone. *Talanta* **2020**, *217*, 121032. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121032>.
- (123) Choi, S.-W.; Chang, H.-J.; Lee, N.; Kim, J.-H.; Chun, H. S. Detection of Mycoestrogen Zearalenone by a Molecularly Imprinted Polypyrrole-Based Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (4), 1113–1118. <https://doi.org/10.1021/jf804022p>.

- (124) Abou-Hany, R. A. G.; Urraca, J. L.; Descalzo, A. B.; Gómez-Arribas, L. N.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Tailoring Molecularly Imprinted Polymer Beads for Alternariol Recognition and Analysis by a Screening with Mycotoxin Surrogates. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1425*, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.055>.
- (125) Titirici, M. M.; Hall, A. J.; Sellergren, B. Hierarchically Imprinted Stationary Phases: Mesoporous Polymer Beads Containing Surface-Confined Binding Sites for Adenine. *Chem. Mater.* **2002**, *14* (1), 21–23. <https://doi.org/10.1021/cm011207+>.
- (126) 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. <http://data.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj/eng> (accessed 2022-01-17).
- (127) *The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*; 2005. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (accessed 2022-01-23).
- (128) Loock, H.-P.; Wentzell, P. D. Detection Limits of Chemical Sensors: Applications and Misapplications. *Sens. Actuators B: Chem.* **2012**, *173*, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.071>.
- (129) Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A.; Sánchez, M. S. Tutorial on Evaluation of Type I and Type II Errors in Chemical Analyses: From the Analytical Detection to Authentication of Products and Process Control. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *674* (2), 123–142. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.026>.
- (130) Sing, K. S. W. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54* (11), 2201–2218. <https://doi.org/10.1351/pac198254112201>.
- (131) Kim, H.; Spivak, D. A. New Insight into Modeling Non-Covalently Imprinted Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (37), 11269–11275. <https://doi.org/10.1021/ja0361502>.
- (132) Rampey, A. M.; Umpleby, R. J.; Rushton, G. T.; Iseman, J. C.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D. Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution Analysis. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (4), 1123–1133. <https://doi.org/10.1021/ac0345345>.
- (133) Thompson, M. Recent Trends in Inter-Laboratory Precision at Ppb and Sub-Ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing. *Analyst* **2000**, *125* (3), 385–386. <https://doi.org/10.1039/B000282H>.
- (134) SANTE/12089 /2016: *Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed*. [https://ec.europa.eu/food/system/files/2017-05/cs\\_contaminants\\_sampling\\_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf](https://ec.europa.eu/food/system/files/2017-05/cs_contaminants_sampling_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf) (accessed 2022-04-22).
- (135) Noel, S.; Liberelle, B.; Robitaille, L.; De Crescenzo, G. Quantification of Primary Amine Groups Available for Subsequent Biofunctionalization of Polymer Surfaces. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (8), 1690–1699. <https://doi.org/10.1021/bc200259c>.

- (136) Ton, X.-A.; Acha, V.; Bonomi, P.; Tse Sum Bui, B.; Haupt, K. A Disposable Evanescent Wave Fiber Optic Sensor Coated with a Molecularly Imprinted Polymer as a Selective Fluorescence Probe. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.017>.
- (137) Syed, M.; Srinivas, N. R. A Comprehensive Review of the Published Assays for the Quantitation of the Immunosuppressant Drug Mycophenolic Acid and Its Glucuronidated Metabolites in Biological Fluids. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30* (5), 721–748. <https://doi.org/10.1002/bmc.3682>.
- (138) Fosdick, S. E.; Knust, K. N.; Scida, K.; Crooks, R. M. Bipolar Electrochemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (40), 10438–10456. <https://doi.org/10.1002/anie.201300947>.
- (139) Karimian, N.; Hashemi, P.; Afkhami, A.; Bagheri, H. The Principles of Bipolar Electrochemistry and Its Electroanalysis Applications. *Curr. Opin. Electrochem.* **2019**, *17*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.04.015>.
- (140) Koefoed, L.; Pedersen, S. U.; Daasbjerg, K. Bipolar Electrochemistry—A Wireless Approach for Electrode Reactions. *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *2* (1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.02.001>.
- (141) Salinas, G.; Bouffier, L.; Sojic, N.; Kuhn, A. Light-Emitting Bipolar Electrochemistry: A Straightforward Way to Illustrate Thermodynamic Aspects to Students. *J. Solid State Electrochem.* **2024**, *28* (3), 1225–1231. <https://doi.org/10.1007/s10008-023-05690-9>.
- (142) Salinas, G.; Beladi-Mousavi, S. M.; Gerasimova, L.; Bouffier, L.; Kuhn, A. Wireless Imaging of Transient Redox Activity Based on Bipolar Light-Emitting Electrode Arrays. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (41), 14317–14321. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02872>.
- (143) Backhurst, J. R.; Coulson, J. M.; Goodridge, F.; Plimley, R. E.; Fleischmann, M. A Preliminary Investigation of Fluidized Bed Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **1969**, *116* (11), 1600. <https://doi.org/10.1149/1.2411628>.
- (144) Arora, A.; Eijkel, J. C. T.; Morf, W. E.; Andreas Manz\*. A Wireless Electrochemiluminescence Detector Applied to Direct and Indirect Detection for Electrophoresis on a Microfabricated Glass Device. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (22), 5633–5633. <https://doi.org/10.1021/ac011762v>.
- (145) Zhan, W.; Alvarez, J.; Crooks, R. M. Electrochemical Sensing in Microfluidic Systems Using Electrogenenerated Chemiluminescence as a Photonic Reporter of Redox Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (44), 13265–13270. <https://doi.org/10.1021/ja020907s>.
- (146) Anand, R. K.; Sheridan, E.; Hlushkou, D.; Tallarek, U.; Crooks, R. M. Bipolar Electrode Focusing: Tuning the Electric Field Gradient. *Lab Chip* **2011**, *11* (3), 518–527. <https://doi.org/10.1039/C0LC00351D>.
- (147) Shida, N.; Zhou, Y.; Inagi, S. Bipolar Electrochemistry: A Powerful Tool for Electrifying Functional Material Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (9), 2598–2608. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00337>.
- (148) Shida, N.; Villani, E.; Sanuki, M.; Miyamoto, K.; Gotou, A.; Isogai, T.; Yamauchi, A.; Fuchigami, T.; Tomita, I.; Inagi, S. Bipolar Electrochemical Fluorination of Triphenylmethane and Bis(Phenylthio)Diphenylmethane Derivatives in a U-Shaped Cell. *Electrochem.* **2021**, *89* (5), 476–479. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.21-00074>.

- (149) Bouffier, L.; Zigah, D.; Sojic, N.; Kuhn, A. Bipolar Electrochemistry. In *Encyclopedia of Electrochemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2021; pp 1–53. <https://doi.org/10.1002/9783527610426.bard030112>.
- (150) Wodiunig, S.; Bokeloh, F.; Comninellis, Ch. Electrochemical Promotion of Bipolar Electrodes: An Estimation of the Current Bypass. *Electrochim. Acta* **2000**, *46* (2), 357–363. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(00\)00592-2](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(00)00592-2).
- (151) Hua, Z.; Chen, Z.; Li, Y.; Zhao, M. Thermosensitive and Salt-Sensitive Molecularly Imprinted Hydrogel for Bovine Serum Albumin. *Langmuir* **2008**, *24* (11), 5773–5780. <https://doi.org/10.1021/la703963f>.
- (152) Karimian, N.; Hashemi, P.; Afkhami, A.; Bagheri, H. The Principles of Bipolar Electrochemistry and Its Electroanalysis Applications. *Curr. Opin. Electrochem.* **2019**, *17*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.04.015>.
- (153) Liu, Y.; Zhang, N.; Pan, J.-B.; Song, J.; Zhao, W.; Chen, H.-Y.; Xu, J.-J. Bipolar Electrode Array for Multiplexed Detection of Prostate Cancer Biomarkers. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (6), 3005–3012. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05383>.
- (154) Mayerhöfer, B.; McLaughlin, D.; Böhm, T.; Hegelheimer, M.; Seeberger, D.; Thiele, S. Bipolar Membrane Electrode Assemblies for Water Electrolysis. *ACS Appl. Energy Mater.* **2020**, *3* (10), 9635–9644. <https://doi.org/10.1021/acsaem.0c01127>.
- (155) Bouffier, L.; Sojic, N.; Kuhn, A. Capillary-Assisted Bipolar Electrochemistry: A Focused Mini Review. *ELECTROPHORESIS* **2017**, *38* (21), 2687–2694. <https://doi.org/10.1002/elps.201600568>.
- (156) Gao, R.; Beladi-Mousavi, S. M.; Salinas, G.; Garrigue, P.; Zhang, L.; Kuhn, A. Spatial Precision Tailoring the Catalytic Activity of Graphene Monolayers for Designing Janus Swimmers. *Nano Lett.* **2023**, *23* (17), 8180–8185. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c02314>.
- (157) Zhang, X.; Zhang, L.; Zhai, Q.; Gu, W.; Li, J.; Wang, E. Self-Powered Bipolar Electrochromic Electrode Arrays for Direct Displaying Applications. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (5), 2543–2547. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00054>.
- (158) Arnaboldi, S.; Salinas, G.; Bonetti, G.; Cirilli, R.; Benincori, T.; Kuhn, A. Bipolar Electrochemical Rotors for the Direct Transduction of Molecular Chiral Information. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *218*, 114740. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114740>.
- (159) de Poulpiquet, A.; Diez-Buitrago, B.; Milutinovic, M.; Goudeau, B.; Bouffier, L.; Arbault, S.; Kuhn, A.; Sojic, N. Dual-Color Electrogenated Chemiluminescence from Dispersions of Conductive Microbeads Addressed by Bipolar Electrochemistry. *ChemElectroChem* **2016**, *3* (3), 404–409. <https://doi.org/10.1002/celc.201500402>.
- (160) Li, H.; Bouffier, L.; Arbault, S.; Kuhn, A.; Hogan, C. F.; Sojic, N. Spatially-Resolved Multicolor Bipolar Electrochemiluminescence. *Electrochem. Commun.* **2017**, *77*, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.02.006>.
- (161) Dauphin, A. L.; Akchach, A.; Voci, S.; Kuhn, A.; Xu, G.; Bouffier, L.; Sojic, N. Tracking Magnetic Rotating Objects by Bipolar Electrochemiluminescence. *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, *10* (18), 5318–5324. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b02188>.

- (162) Wang, Y.; Jin, R.; Sojic, N.; Jiang, D.; Chen, H. Intracellular Wireless Analysis of Single Cells by Bipolar Electrochemiluminescence Confined in a Nanopipette. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (26), 10416–10420. <https://doi.org/10.1002/anie.202002323>.
- (163) Arias-Aranda, L. R.; Salinas, G.; Li, H.; Hogan, C. F.; Kuhn, A.; Bouffier, L.; Sojic, N. Annihilation Electrochemiluminescence Triggered by Bipolar Electrochemistry. *ChemElectroChem* **2024**, e202400522. <https://doi.org/10.1002/celec.202400522>.
- (164) Salinas, G.; Beladi-Mousavi, S. M.; Gerasimova, L.; Bouffier, L.; Kuhn, A. Wireless Imaging of Transient Redox Activity Based on Bipolar Light-Emitting Electrode Arrays. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (41), 14317–14321. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02872>.
- (165) Qin, X.; Gao, J.; Jin, H.-J.; Li, Z.-Q.; Xia, X.-H. Closed Bipolar Electrode Array for Optical Reporting Reaction-Coupled Electrochemical Sensing and Imaging. *Chem. - Eur. J.* **2023**, *29* (8), e202202687. <https://doi.org/10.1002/chem.202202687>.
- (166) Li, C.; Feng, M.; Stanković, D.; Bouffier, L.; Zhang, F.; Wang, Z.; Sojic, N. Wireless Rotating Bipolar Electrochemiluminescence for Enzymatic Detection. *Analyst* **2024**, *149* (9), 2756–2761. <https://doi.org/10.1039/D4AN00365A>.
- (167) Gupta, B.; Suchomski, P.; Ashwin Melvin, A.; Linfield, S.; Opallo, M.; Nogala, W. Optical Readout of Moisture in Sand Employing Bipolar Electrochemistry. *Electrochem. Commun.* **2022**, *140*, 107329. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2022.107329>.
- (168) Zhang, X.; Chen, C.; Yin, J.; Han, Y.; Li, J.; Wang, E. Portable and Visual Electrochemical Sensor Based on the Bipolar Light Emitting Diode Electrode. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (9), 4612–4616. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01018>.
- (169) Liu, M.; Arias-Aranda, L. R.; Li, H.; Bouffier, L.; Kuhn, A.; Sojic, N.; Salinas, G. Wireless Multimodal Light-Emitting Arrays Operating on the Principles of LEDs and ECL. *ChemPhysChem* **2024**, *25* (12), e202400133. <https://doi.org/10.1002/cphc.202400133>.
- (170) Boukarkour, Y.; Reculosa, S.; Sojic, N.; Kuhn, A.; Salinas, G. Wireless Light-Emitting Electrode Arrays for the Evaluation of Electrocatalytic Activity. *Chem. - Eur. J.* **2024**, *30* (29), e202400078. <https://doi.org/10.1002/chem.202400078>.
- (171) Salinas, G.; Bonetti, G.; Cirilli, R.; Benincori, T.; Kuhn, A.; Arnaboldi, S. Wireless Light-Emitting Device for the Determination of Chirality in Real Samples. *Electrochim. Acta* **2022**, *421*, 140494. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140494>.
- (172) Zhai, J.; Yang, L.; Du, X.; Xie, X. Electrochemical-to-Optical Signal Transduction for Ion-Selective Electrodes with Light-Emitting Diodes. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (21), 12791–12795. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03213>.
- (173) Bouffier, L.; Zigah, D.; Sojic, N.; Kuhn, A. Bipolar (Bio)Electroanalysis. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2021**, *14* (Volume 14, 2021), 65–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-090820-093307>.

- (174) Sopha, H.; Roche, J.; Švancara, I.; Kuhn, A. Wireless Electrosampling of Heavy Metals for Stripping Analysis with Bismuth-Based Janus Particles. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (21), 10515–10519. <https://doi.org/10.1021/ac5033897>.
- (175) Fattah, Z. A. Efficient Removal of Mercury from Polluted Aqueous Solutions Using the Wireless Bipolar Electrochemistry Technique. *ChemistryOpen* **2022**, *11* (12), e202200231. <https://doi.org/10.1002/open.202200231>.
- (176) Arab, N.; Fotouhi, L.; Shokouhi, M.; A. Mehrgardi, M.; Salis, A. A Multichannel Closed Bipolar Platform to Visual Electrochemiluminescence Sensing of Caffeic Acid as a Model: Potential for Multiplex Detection. *Anal. Chim. Acta* **2024**, *1287*, 342087. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342087>.
- (177) Zhao, W.; Ma, Y.; Ye, J. Development of a Novel Sensing Platform Based on Molecularly Imprinted Polymer and Closed Bipolar Electrochemiluminescence for Sensitive Detection of Dopamine. *J. Electroanal. Chem.* **2021**, *888*, 115215. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115215>.
- (178) Moya-Cavas, T.; Arias-Aranda, L. R.; Benito-Peña, E.; Bouffier, L.; Sojic, N.; Salinas, G.; Orellana, G. Wireless Electroanalysis of Mycotoxins with Hybrid Light-Emitting Devices Based on Molecularly Imprinted Polymers. *Sens. Actuators B: Chem.* **2025**, *433*, 137566. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2025.137566>.
- (179) Moya-Cavas, T.; Navarro-Villoslada, F.; Lucas Urraca, J.; Antonio Serrano, L.; Orellana, G.; Cruz Moreno-Bondi, M. Simultaneous Determination of Zearalenone and Alternariol Mycotoxins in Oil Samples Using Mixed Molecularly Imprinted Polymer Beads. *Food Chem.* **2023**, *412*, 135538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135538>.
- (180) Sharma, P. S.; Garcia-Cruz, A.; Cieplak, M.; Noworyta, K. R.; Kutner, W. ‘Gate Effect’ in Molecularly Imprinted Polymers: The Current State of Understanding. *Curr. Opin. Electrochem.* **2019**, *16*, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.04.020>.
- (181) Alizadeh, T.; Akhoundian, M.; Ganjali, M. R. A Ferrocene/Imprinted Polymer Nanomaterial-Modified Carbon Paste Electrode as a New Generation of Gate Effect-Based Voltammetric Sensor. *New J. Chem.* **2018**, *42* (6), 4719–4727. <https://doi.org/10.1039/C7NJ03396F>.
- (182) Yoshimi, Y.; Sato, K.; Ohshima, M.; Piletska, E. Application of the ‘Gate Effect’ of a Molecularly Imprinted Polymer Grafted on an Electrode for the Real-Time Sensing of Heparin in Blood. *Analyst* **2013**, *138* (17), 5121–5128. <https://doi.org/10.1039/C3AN00909B>.
- (183) Radi, A.-E.; Eissa, A.; Wahdan, T. Molecularly Imprinted Impedimetric Sensor for Determination of Mycotoxin Zearalenone. *Electroanalysis* **2020**, *32* (8), 1788–1794. <https://doi.org/10.1002/elan.201900528>.
- (184) Yoshimi, Y.; Ohdaira, R.; Iiyama, C.; Sakai, K. “Gate Effect” of Thin Layer of Molecularly-Imprinted Poly(Methacrylic Acid-Co-Ethyleneglycol Dimethacrylate). *Sens. Actuators B: Chem.* **2001**, *73* (1), 49–53. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00671-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00671-7).
- (185) Neusser, G.; Eppler, S.; Bowen, J.; Allender, C. J.; Walther, P.; Mizaikoff, B.; Kranz, C. FIB and MIP: Understanding Nanoscale Porosity in Molecularly Imprinted Polymers via 3D FIB/SEM Tomography. *Nanoscale* **2017**, *9* (38), 14327–14334. <https://doi.org/10.1039/C7NR05725C>.

- (186) Renkecz, T.; Mistlberger, G.; Pawlak, M.; Horváth, V.; Bakker, E. Molecularly Imprinted Polymer Microspheres Containing Photoswitchable Spiropyran-Based Binding Sites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (17), 8537–8545. <https://doi.org/10.1021/am401958e>.
- (187) Ortiz, M. C.; Sánchez, M. S.; Sarabia, L. A. Quality of Analytical Measurements: Univariate Regression☆. In *Comprehensive Chemometrics (Second Edition)*; Brown, S., Tauler, R., Walczak, B., Eds.; Elsevier: Oxford, 2020; pp 71–105. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14869-3>.
- (188) Li, L.; Chen, Y.; Zhu, J.-J. Recent Advances in Electrochemiluminescence Analysis. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (1), 358–371. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04675>.
- (189) Hao, N.; Wang, K. Recent Development of Electrochemiluminescence Sensors for Food Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (25), 7035–7048. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9548-2>.
- (190) Roop, J.; Nothnagel, M.; Schnuriger, M.; Richter, M. M.; Baker, G. A. Ionic Liquid Adsorbate Enhanced Electrogenerated Chemiluminescence of Ruthenium, Osmium, and Iridium Complexes in Water. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *656* (1–2), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.01.035>.
- (191) Kerr, E.; Doeven, E. H.; Barbante, G. J.; Hogan, C. F.; Bower, D. J.; Donnelly, P. S.; Connell, T. U.; Francis, P. S. Annihilation Electrogenerated Chemiluminescence of Mixed Metal Chelates in Solution: Modulating Emission Colour by Manipulating the Energetics. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (1), 472–479. <https://doi.org/10.1039/C4SC02697G>.
- (192) Ferraraccio, L. S.; Di Lisa, D.; Pastorino, L.; Bertocello, P. Enzymes Encapsulated within Alginate Hydrogels: Bioelectrocatalysis and Electrochemiluminescence Applications. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (46), 16122–16131. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03389>.
- (193) Bhaiyya, M.; Pattnaik, P. K.; Goel, S. A Brief Review on Miniaturized Electrochemiluminescence Devices: From Fabrication to Applications. *Curr. Opin. Electrochem.* **2021**, *30*, 100800. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100800>.
- (194) Han, T.; Cao, Y.; Chen, H.-Y.; Zhu, J.-J. Versatile Porous Nanomaterials for Electrochemiluminescence Biosensing: Recent Advances and Future Perspective. *J. Electroanal. Chem.* **2021**, *902*, 115821. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115821>.
- (195) Hanif, S.; Dong, Z.; John, P.; Abdussalam, A.; Hui, P.; Snizhko, D.; Ibrahim Halawa, M.; Xu, G.; Dong, S. Regenerable Sensor Based on Tris(4,7'-Diphenyl-1,10-Phenanthroline)Ruthenium (II) for Anodic and Cathodic Electrochemiluminescence Applications. *Bioelectrochemistry* **2023**, *149*, 108313. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108313>.
- (196) Wang, X.-F.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. A New Electrochemiluminescence Emission of Mn<sup>2+</sup>-Doped ZnS Nanocrystals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (45), 17581–17585. <https://doi.org/10.1021/jp807136s>.
- (197) Chen, H.; Lin, L.; Li, H.; Lin, J.-M. Quantum Dots-Enhanced Chemiluminescence: Mechanism and Application. *Coordination Chemistry Reviews* **2014**, *263–264*, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.07.013>.

- (198) Zhang, D.; Wu, Z.; Xu, J.; Liang, J.; Li, J.; Yang, W. Tuning the Emission Properties of Ru(Phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> Doped Silica Nanoparticles by Changing the Addition Time of the Dye during the Stöber Process. *Langmuir* **2010**, *26* (9), 6657–6662. <https://doi.org/10.1021/la903995r>.
- (199) Moon, H. C.; Lodge, T. P.; Frisbie, C. D. DC-Driven, Sub-2 V Solid-State Electrochemiluminescent Devices by Incorporating Redox Coreactants into Emissive Ion Gels. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (18), 5358–5364. <https://doi.org/10.1021/cm502491n>.
- (200) Qi, W.; Wu, D.; Zhao, J.; Liu, Z.; Zhang, W.; Zhang, L.; Xu, G. Electrochemiluminescence Resonance Energy Transfer Based on Ru(Phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Doped Silica Nanoparticles and Its Application in “Turn-on” Detection of Ozone. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (6), 3207–3212. <https://doi.org/10.1021/ac303533m>.
- (201) Zhang, L.; Liu, B.; Dong, S. Bifunctional Nanostructure of Magnetic Core Luminescent Shell and Its Application as Solid-State Electrochemiluminescence Sensor Material. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (35), 10448–10452. <https://doi.org/10.1021/jp0734427>.
- (202) Arora, A.; Eijkel, J. C. T.; Morf, W. E.; Andreas Manz\*. A Wireless Electrochemiluminescence Detector Applied to Direct and Indirect Detection for Electrophoresis on a Microfabricated Glass Device. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (22), 5633–5633. <https://doi.org/10.1021/ac011762v>.
- (203) Parveen, S.; Zhang, W.; Yuan, Y.; Hu, L.; Shah Gilani, M. R. H.; Rehman, A. U.; Xu, G. Electrogenerated Chemiluminescence of /2-(Dibutylamino)Ethanol System. *J. Electroanal. Chem.* **2013**, *688*, 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.05.014>.
- (204) Chen, X.; Liu, Y.; Wang, B.; Liu, X.; Lu, C. Understanding Role of Microstructures of Nanomaterials in Electrochemiluminescence Properties and Their Applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2023**, *162*, 117030. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117030>.
- (205) Taokaenchan, N.; Tangkuaram, T.; Pookmanee, P.; Phaisansuthichol, S.; Kuimalee, S.; Satienerakul, S. Enhanced Electrogenerated Chemiluminescence of Tris(2,2'-Bipyridyl)Ruthenium(II) System by l-Cysteine-Capped CdTe Quantum Dots and Its Application for the Determination of Nitrofurantoin Antibiotics. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *66*, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.11.030>.
- (206) Miao, W. Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (7), 2506–2553. <https://doi.org/10.1021/cr068083a>.
- (207) Richter, M. M. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem. Rev.* **2004**, *104* (6), 3003–3036. <https://doi.org/10.1021/cr020373d>.
- (208) Li, H.; Zhang, Z.; Zhou, H.; Zhao, G.; Wang, C. Efficient Annihilation Electrochemiluminescence of [Ru(Bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> within a Deep Eutectic Solvent as Green Electrolyte. *Dyes and Pigments* **2023**, *211*, 111052. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.111052>.
- (209) Bouffier, L.; Sojic, N. Chapter 1. Introduction and Overview of Electrogenerated Chemiluminescence. In *Detection Science*; Sojic, N., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2019; pp 1–28. <https://doi.org/10.1039/9781788015776-00001>.

- (210) Valenti, G.; Fiorani, A.; Li, H.; Sojic, N.; Paolucci, F. Essential Role of Electrode Materials in Electrochemiluminescence Applications. *ChemElectroChem* **2016**, *3* (12), 1990–1997. <https://doi.org/10.1002/celec.201600602>.
- (211) Collinson, M. M.; Novak, B.; Martin, S. A.; Taussig, J. S. Electrochemiluminescence of Ruthenium(II) Tris(Bipyridine) Encapsulated in Sol–Gel Glasses. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (13), 2914–2918. <https://doi.org/10.1021/ac9913208>.
- (212) Zanarini, S.; Rampazzo, E.; Ciana, L. D.; Marcaccio, M.; Marzocchi, E.; Montalti, M.; Paolucci, F.; Prodi, L. Ru(Bpy)<sub>3</sub> Covalently Doped Silica Nanoparticles as Multicenter Tunable Structures for Electrochemiluminescence Amplification. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (6), 2260–2267. <https://doi.org/10.1021/ja8077158>.
- (213) Bruce, D.; McCall, J.; Richter, M. M. Effects of Electron Withdrawing and Donating Groups on the Efficiency of Tris(2,2'-Bipyridyl)Ruthenium(II)/Tri-n-Propylamine Electrochemiluminescence. *Analyst* **2002**, *127* (1), 125–128. <https://doi.org/10.1039/b108072p>.
- (214) Panagiotopoulou, M.; Salinas, Y.; Beyazit, S.; Kunath, S.; Duma, L.; Prost, E.; Mayes, A. G.; Resmini, M.; Tse Sum Bui, B.; Haupt, K. Molecularly Imprinted Polymer Coated Quantum Dots for Multiplexed Cell Targeting and Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (29), 8244–8248. <https://doi.org/10.1002/anie.201601122>.
- (215) Ohtsuki, A.; Lei, L.; Tanishima, M.; Goto, A.; Kaji, H. Photocontrolled Organocatalyzed Living Radical Polymerization Feasible over a Wide Range of Wavelengths. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (16), 5610–5617. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b02617>.
- (216) Garcia-Cortes, M.; Sotelo González, E.; Fernández-Argüelles, M. T.; Encinar, J. R.; Costa-Fernández, J. M.; Sanz-Medel, A. Capping of Mn-Doped ZnS Quantum Dots with DHLA for Their Stabilization in Aqueous Media: Determination of the Nanoparticle Number Concentration and Surface Ligand Density. *Langmuir* **2017**, *33* (25), 6333–6341. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00409>.
- (217) Deng, Z.; Tong, L.; Flores, M.; Lin, S.; Cheng, J.-X.; Yan, H.; Liu, Y. High-Quality Manganese-Doped Zinc Sulfide Quantum Rods with Tunable Dual-Color and Multiphoton Emissions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (14), 5389–5396. <https://doi.org/10.1021/ja110996c>.
- (218) Li, M.-J.; Chen, Z.; Yam, V. W.-W.; Zu, Y. Multifunctional Ruthenium(II) Polypyridine Complex-Based Core–Shell Magnetic Silica Nanocomposites: Magnetism, Luminescence, and Electrochemiluminescence. *ACS Nano* **2008**, *2* (5), 905–912. <https://doi.org/10.1021/nn800123w>.
- (219) Bystryak, S. M.; Mekler, V. M. Photochemical Amplification for Horseradish Peroxidase-Mediated Immunosorbent Assay. *Anal. Biochem.* **1992**, *202* (2), 390–393. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90123-O](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90123-O).