SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-048893- -00000-0000
Fecha: 2012-03-22 16:59:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** ADSORBENTES SINTETICOS DE MITOCOXINA Y METODOS PARA ELABORARLOS Y UTILIZARLOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** ALLTECH, INC.

DOMICILIO NICHOLASVILLE, KENTUCKY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** ALVARO CORREA ORDOÑEZ

22. **BOGOTÁ, D. C.,** Mar 20 22, 2012

(FORMA P-10)

115198-Imprenta Nacional de Colombia-2011

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-048893- -00000-0000
Fecha: 2012-03-22 16:59:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE :

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad
[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: ALLTECH, INC.
Dirección: 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356 , US.
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-Mail

IDENTIFICACION
C.C. [ ] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6
Teléfono: 6341500 Fax: 3762211
E-Mail: office.bogota@bakermckenzie.com

IDENTIFICACION
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número 79.143.366 Usaquén TP 20281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: YIANNIKOURIS, Alexandros; KWIATKOWSKI, Stefan; KUDUPOJE, Manoj, Bojappa; MATNEY, Clayton
Dirección: Alexandros; 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356 (US); 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356 (US); 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356 (US); 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40536 (US)
Nacionalidad o Domicilio: Estados unidos de América

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/047032 Fecha 27-08-2010
Publicación Internacional No. WO 2011/031562 Fecha 17-03-2011

(6) Título (54) ADSORBENTES SINTETICOS DE MICOTOXINA Y METODOS PARA ELABORARLOS Y UTILIZARLOS

(7) Clasificación Internacional (51) G01N 33/00

(8) Prioridad SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	27-08-2009	61/237,549

(9) Comprobante de pago No. 12-0021413 – 12-0015509 – 12-0025458 – 12-0021412 **Fecha** 29-02-12 – 15-02-12 – 12-03-12

(10) ANEXOS

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [x] Poderes, si fuere el caso
- [X] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12 x 12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros: Extractos

(11) FIGURA CARATERISTICA

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

RECIBO DE PAGO

30121005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0021413

Bogotá D.C., Febrero 29 de 2012 - 16:46:18

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411692632	28/02/2012	62.490.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-048893- -00000-0000

Fecha: 2012-03-22 16:59:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

2012/003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0015509

Bogotá D.C., Febrero 15 de 2012 - 16:59:30

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325085342	14/02/2012	98.970.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#O ANTRIOR	5.000.00	5.000.00
				$5.000.00

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-048893- -00000-0000

Fecha: 2012-03-22 16:59:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

5

3012/006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0025458

Bogotá D.C., Marzo 12 de 2012 - 17:30:47

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	10159844	12/03/2012	87.945.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1603 INVOCAR LA NOTORIDAD DENTRO DE UN TRAMITE DE OPOSICION	425.000.00	425.000.00
				$425.000.00

SON: **CUATROCIENTOS VEINTICINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-048893- -00000-0000

Fecha: 2012-03-22 16:59:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

30121005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0021412

Bogotá D.C., Febrero 29 de 2012 - 16:46:18

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411692632	28/02/2012	62.490.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-048893- -00000-0000

Fecha: 2012-03-22 16:59:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

EXTRACTOS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ___ PCT X MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional: G01N 33/00

(71)Solicitante(s): **ALLTECH, INC.**

(72) Inventor(es): YIANNIKOURIS, Alexandros; KWIATKOWSKI, Stefan; KUDUPOJE, Manoj, Bojappa; MATNEY, Clayton

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
	61/237,549	27-08-2009	US

(85) Fecha inicio fase nacional: 27-03-2012

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-2010
No. de solicitud: PCT/US2010/047032

(87) Publicación internacional
Fecha: 17-03-2011
N° publicación: WO 2011/031562

(54) Titulo: **ADSORBENTES SINTETICOS DE MICOTOXINA Y METODOS PARA ELABORARLOS Y UTILIZARLOS**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ___ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:
(51) Clasificación Internacional: G01N 33/00

(71) Solicitante(s) **ALLTECH, INC.**

(72) Inventor(es): YIANNIKOURIS, Alexandros; KWIATKOWSKI, Stefan; KUDUPOJE, Manoj, Bojappa; MATNEY, Clayton

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	(32) *Fecha*	(33) *País*
	61/237,549	27-08-2009	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-03-2012
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-2010
No. de solicitud: PCT/US2010/047032

(87) Publicación internacional:
Fecha: 17-03-2011
No. Publicación: WO 2011/031562

(54) Titulo: **ADSORBENTES SINTETICOS DE MICOTOXINA Y METODOS PARA ELABORARLOS Y UTILIZARLOS**

(57) Resumen: La presente invención se relaciona de manera general con los polímeros de impresión molecular (MIP). En particular, la presente invención se relaciona con MIP ecológicamente amigables, reutilizables que se pueden producir en cantidades relativamente grandes, métodos para producirlos, y métodos para utilizarlos (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber los compuestos objetivos (por ejemplo, micotoxinas). Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones que incluyen aplicaciones terapéuticas dietarias, profilácticas, procesamiento y fabricación de alimentos y bebidas, así como también investigación, control de calidad y trazabilidad.

CONTINUA AL RESPALDO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) ***No.*** 61/237,549 32) ***Fecha*** 27-08-2009 (33) ***País*** US	(51) Int Cl: G01N 33/00 (71)Solicitante(s) **ALLTECH, INC.** (72) Inventor(es) YIANNIKOURIS, Alexandros; KWIATKOWSKI, Stefan; KUDUPOJE, Manoj, Bojappa; MATNEY, Clayton (74) Apoderado: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 27-03-2012 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-2010 No. de solicitud PCT/US2010/047032	(87) Publicación internacional Fecha: 17-03-2011 N° publicación: WO 2011/031562
(54) Titulo: **ADSORBENTES SINTETICOS DE MICOTOXINA Y METODOS PARA ELABORARLOS Y UTILIZARLOS**	

Resumen: La presente invención se relaciona de manera general con los polímeros de impresión molecular (MIP). En particular, la presente invención se relaciona con MIP ecológicamente amigables, reutilizables que se pueden producir en cantidades relativamente grandes, métodos para producirlos, y métodos para utilizarlos (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber los compuestos objetivos (por ejemplo, micotoxinas). Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones que incluyen aplicaciones terapéuticas dietarias, profilácticas, procesamiento y fabricación de alimentos y bebidas, así como también investigación, control de calidad y trazabilidad.

COPIA SOLICITUD
INTERNACIONAL

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
17 March 2011 (17.03.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/031562 A1

(51) International Patent Classification:
G01N 33/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/047032

(22) International Filing Date:
27 August 2010 (27.08.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/237,549 27 August 2009 (27.08.2009) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ALLTECH, INC.** [US/US]; 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, Kentucky 40345 (US). 40356

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **YIANNIKOURIS, Alexandros** [FR/US]; 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, Kentucky 40356 (US). **KWIATKOWSKI, Stefan** [US/US]; 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356 (US). **KUDUPOJE, Manoj, Bojappa** [IN/US]; 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356 (US). **MATNEY, Clayton** [US/US]; 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40536 (US).

(74) Agent: **SISK, Tyler, J.**; Casimir Jones S.C., 2275 Deming Way, Suite 310, Middleton, Wisconsin 53562 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

WO 2011/031562 A1

(54) **Title**: SYNTHETIC MYCOTOXIN ADSORBENTS AND METHODS OF MAKING AND UTILIZING THE SAME

(57) **Abstract**: The present invention relates generally to molecularly imprinted polymers (MIPs). In particular, the present invention relates to reusable, ecologically friendly MIPs that can be produced in relatively large quantities, methods of producing the same, and methods of utilizing the same (e.g., to sequester and/or adsorb target compounds (e.g., mycotoxins)). Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including dietary therapeutic, prophylactic, food and beverage processing and manufacture, as well as research, quality control and traceability applications.

SYNTHETIC MYCOTOXIN ADSORBENTS AND METHODS OF MAKING AND UTILIZING THE SAME

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

The present Application claims priority to U.S. Provisional Application Serial Number 61/237,549 filed August 27, 2009, the entirety of which is herein incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to molecularly imprinted polymers (MIPs). In particular, the present invention relates to reusable, ecologically friendly MIPs, methods of producing the same, and methods of utilizing the same (e.g., to sequester and/or adsorb targets (e.g., mycotoxins)). Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including dietary, therapeutic, prophylactic, food and beverage processing and manufacture, as well as research and quality control applications.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Mycotoxins are secondary metabolites secreted by a variety of fungi, often produced in cereal grains as well as forages before, during and after harvest. Forages and cereals naturally come into contact with fungal spores. The fungal contamination of plants and the bio-synthesis of toxins depend on the state of health of the plant before harvest, meteorological conditions, harvesting techniques, delays and hydrothermal conditions before stabilization for conservation and feed processing. Depending on the fungus, fungal growth is controlled by a number of physico-chemical parameters including the amount of free water (a_w), temperature, presence of oxygen, nature of the substrate, and pH conditions. Mycotoxins proliferate pre-harvest as well as post-harvest in storage.

Some fungi produce toxins only at specific levels of moisture, temperature or oxygen. The effects of mycotoxins vary greatly in their severity. Some mycotoxins are lethal, some cause identifiable diseases or health problems, some weaken the immune system without producing symptoms specific to that mycotoxin, some act as allergens or irritants, and some have no known effect on animals or humans. During World War II Russian soldiers suffered severe

dermal necrosis, hemorrhage and destruction of bone marrow after eating moldy grains that were contaminated with *Fusarium*. However, it was not until the 1960's, when more than 100,000 turkeys of Britain were decimated by a fatal liver disease (Turkey X Disease) that the scientific community recognized the negative effects associated with mycotoxins (See, e.g., Trenholm H.L., Charmley L.L., and Prelusky D.B., 1996. *Mycotoxin binding agents: An update on what we know*. In: Biotechnology in the Feed Industry (Lyons T. P and Jacques K.A eds.) Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK, pp. 327-349.). According to recent United Nation's Food and Agriculture Organization (FAO) reports, approximately 25% of the world's grain supply is contaminated with mycotoxins. Mycotoxin contamination has a negative economic impact on food and feed producers, particularly grain and poultry producers.

Mycotoxins can appear in the food chain as a result of fungal infection of plant products (e.g., forage, grain, plant protein, processed grain by-products, roughage and molasses products), and can either be eaten directly by humans, or introduced by contaminated grains, livestock or other animal feedstuff(s). Mycotoxins greatly resist decomposition during digestion so they remain in the food chain in edible products (e.g., meat, fish, eggs and dairy products) or under the form of metabolites of the parent toxin ingested. Temperature treatments such as cooking and freezing are not adequate methods of decreasing the prevalence of mycotoxins. Thus, there exists a need for compositions and/or methods for reducing the detrimental effects and/or eliminating mycotoxin occurrence in feed and/or food chains.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to molecularly imprinted polymers (MIPs). In particular, the present invention relates to reusable, ecologically friendly MIPs, methods of producing the same, and methods of utilizing the same (e.g., to sequester and/or adsorb targets (e.g., mycotoxins)). Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including dietary, therapeutic, prophylactic, food and beverage processing and manufacture, as well as research and quality control applications.

Accordingly, in some embodiments, the invention provides a composition comprising a molecularly imprinted polymer synthesized using a mycotoxin template. The present invention is not limited to the mycoxin template utilized to generate a molecularly imprinted polymer. Indeed, a variety of mycotoxin templates may be utilized including, but not limited to,

acetoxyscirpenediol, acetyldeoxynivalenol, acetylnivalenol, acetylneosolaniol, acetyl T-2 toxin, aflatoxin, aflatoxin B1, B2, G1 and G2, aflatrem, altenuic acid, alternariol, austdiol, austamide, austocystin, avenacein +1, beauvericin +2, bentenolide, brevianamide, butenolide, calonectrin, chaetoglobosin, chaetocin, chaetomin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasins, cyclopiazonic acid, deacetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diacetate, deoxynivalenol monoacetate, diacetoxyscirpenol, destruxin B, emestrin, enniatins, ergot alkaloids toxins and endophytes such as ergine, ergocornine, ergocristine, ergocryptine, ergometrine, ergonine, ergosine, ergotamine, ergovaline, lysergol, lysergic acid, and related epimers, fructigenin +1, fumagilin, fumonisins, fumonisins A1, A2, B1 and B2 and B3, fusarenon-X, fusarochromanone, fusaric acid, fusarin, gliotoxin, HT-2 toxin, hyalodendrin, ipomeanine, islanditoxin, isofumigaclavines A and B, lateritin +1, leptosin, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzine, moniliformin, monoacetoxyscirpenol, mycophenolic acid, neosolaniol, nivalenol, NT-1 toxin, NT-2 toxin, ochratoxin, oosporein, oxalic acid, paspalitrem A and B, patulin, penicillic acid, penitrem, phomopsins, PR-toxin, roridin E, roquefortine A and B, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxins, F,G,H, scirpentriol, sirodesmin, slaframine, sporidesmin, sterigmatocystin, swainsonine, T-1 toxin, T-2 toxin, tenuazoic acid, triacetoxyscirpendiol, trichothecenes, trichodermin, trichothecin, trichoverrins, trichoverrols, tryptoquivalene, verrucarin, verruculogen, verticillins, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, wortmannin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenols, zearalanones, zearalenone, α, β, zearalanone, α, β, zeranol and subfamilies and/or derivatives of the same, and/or conjugates. In some preferred embodiments, the mycotoxin template is OTA. In other preferred embodiments, the mycotoxin template is sporidesmin or an ergot alkaloid. In some embodiments, the ochratoxin template is N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine. In some embodiments, the sporidesmin template is 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine. However, the present invention is not limited to these ochratoxin or sporidesmin templates. Indeed, a variety of different templates may be utilized including N-tert-butoxycarbonyl-2,3-dimethoxyaniline, 2,3-dimethoxyaniline, ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indolone-3-carboxylate, 6,7-dimethoxyisatine, or 6,7-dimethoxy-1-methylisatine.

In some embodiments, the invention provides a method of making a molecularly imprinted polymer comprising: providing: a mycotoxin template; and one or more monomers and one or more crosslinkers; and contacting the mycotoxin template with the one or more

monomers and the one or more crosslinkers under conditions that permit polymerization of the one or more monomers and the one or more crosslinkers in the presence of the mycotoxin template. In some embodiments, the mycotoxin template is N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine. In some embodiments, the mycotoxin template is 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine. The present invention is not limited to the mycotoxin template utilized. Indeed, a variety of synthetic molecules can be utilized as mycotoxin templates wherein the synthetic molecules mimic one or more of the structures, shapes and/or other chemical characteristics of natural mycotoxins. The present invention is likewise not limited to the types of monomers utilized. For example, a variety of monomers are known to those of ordinary skill in the art and include, but are not limited to, 2-vinylpyridine, 2-hydroxyethylmethacrylate and methacrylic acid. The present invention is likewise not limited to the type of crosslinker utilized. For example, a variety of crosslinkers are known to those of ordinary skill in the art and include, but are not limited to, ethylene glycol dimethacrylate. In some embodiments, the polymerization is initiated by forming free radicals in an organic solvent at a temperature between 55 and 110 degrees Celsius, although lower (e.g., 50, 45, 40, 35, 30 degrees Celsius or lower) and higher (e.g., 115, 120, 125, 130 degrees Celsius or higher) may be utilized. In some embodiments, the free radicals are formed by thermally initiated decomposition of azoisobutyronitrile (AIBN). The present invention is not limited by the type of organic solvent utilized. In some embodiments, the organic solvent is toluene, cyclohexane, acetonitrile, a polyvinyl alcohol (PVA)/ water solution, and a mixture of two or more of toluene, cyclohexane, acetonitrile, and a PVA/ water solution. In some embodiments, the temperature is between 55 and 75 degrees Celsius. In some embodiments, the mycotoxin template is removed from the molecularly imprinted polymer after polymerization of the one or more monomers and the one or more crosslinkers. In some embodiments, one or more washes with a solution is utilized to remove the mycotoxin template from the molecularly imprinted polymer. The present invention is not limited by the type of solution utilized for washing. In some embodiments, the solution is an organic solvent, a buffer, water or a combination thereof. The present invention is not limited by the type of organic solvent utilized. In some embodiments, the organic solvent is ethyl alcohol, methyl alcohol, acetonitrile, toluene, and/or a mixture thereof. In some embodiments, the buffer is a buffer prepared by reacting sodium hydroxide, citric acid, succinic acid and acetic acid. In some embodiments, the water is deionized water. In some embodiments, the molecularly

imprinted polymer is dried after the one or more washes. In some embodiments, exposure of the molecularly imprinted polymer to a temperature between 20 and 90 degrees Celsius (e.g., between 60 and 80 degrees Celsius; between 75 and 80 degrees Celsius) is utilized to dry the molecularly imprinted polymer, although lower or higher temperatures may be utilized.

In some embodiments, the invention provides a method of sequestering a mycotoxin from a material, comprising: providing a material comprising mycotoxins; and a molecularly imprinted polymer generated via polymerization of one or more monomers and one or more crosslinkers in the presence of a mycotoxin template; and contacting the molecularly imprinted polymer with the material comprising mycotoxins under conditions that permit the molecularly imprinted polymer to bind the myotoxin. The present invention is not limited by the type of mycotoxins sequestered (e.g., targeted for sequestration) from the material. Indeed, a variety of mycotoxins may be sequestered including, but not limited to, acetoxyscirpenediol, acetyldeoxynivalenol, acetylnivalenol, acetylneosolaniol, acetyl T-2 toxin, aflatoxin, aflatoxin B1, B2, G1 and G2, aflatrem, altenuic acid, alternariol, austdiol, austamide, austocystin, avenacein +1, beauvericin +2, bentenolide, brevianamide, butenolide, calonectrin, chaetoglobosin, chaetocin, chaetomin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasins, cyclopiazonic acid, deacetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diacetate, deoxynivalenol monoacetate, diacetoxyscirpenol, destruxin B, emestrin, enniatins, ergot alkaloids toxins and endophytes such as ergine, ergocornine, ergocristine, ergocryptine, ergometrine, ergonine, ergosine, ergotamine, ergovaline, lysergol, lysergic acid, and related epimers, fructigenin +1, fumagilin, fumonisins, fumonisins A1, A2, B1 and B2 and B3, fusarenon-X, fusarochromanone, fusaric acid, fusarin, gliotoxin, HT-2 toxin, hyalodendrin, ipomeanine, islanditoxin, isofumigaclavines A and B, lateritin +1, leptosin, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzine, moniliformin, monoacetoxyscirpenol, mycophenolic acid, neosolaniol, nivalenol, NT-1 toxin, NT-2 toxin, ochratoxin, oosporein, oxalic acid, paspalitrem A and B, patulin, penicillic acid, penitrem, phomopsins, PR-toxin, roridin E, roquefortine A and B, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxins, F,G,H, scirpentriol, sirodesmin, slaframine, sporidesmin, sterigmatocystin, swainsonine, T-1 toxin, T-2 toxin, tenuazoic acid, triacetoxyscirpendiol, trichothecenes, trichodermin, trichothecin, trichoverrins, trichoverrols, tryptoquivalene, verrucarin, verruculogen, verticillins, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, wortmannin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenols, zearalanones,

zearalenone, α, β, zearalanone, α, β, zeranol and subfamilies and/or derivatives of the same. In some preferred embodiments, the mycotoxin sequestered form the material is ochratoxin A. In some preferred embodiments, the mycotoxin is sporidesmin. In some embodiments, the material comprising mycotoxins is a beverage, a foodstuff, an animal feed, a pharmaceutical composition, a nutraceutical composition, a cosmetic composition, a substance necessary to sustain life, or other material. In some embodiments, the substance necessary to sustain life is a medium for use in aquaculture and a gaseous sample comprising oxygen. In some embodiments, a molecularly imprinted polymer bound to a mycotoxin is not separated from the material comprising mycotoxins. In some embodiments, the method of sequestering a mycotoxin from a material, further comprises separating molecularly imprinted polymers bound to mycotoxin from the material comprising mycotoxins. In some embodiments, separating comprises extracting, concentrating and isolating the molecularly imprinted polymers bound to mycotoxin from the material comprising mycotoxins. In some embodiments, the separating occurs in a chromatographic or separative column or cartridge. In some embodiments, after separating, mycotoxin bound to the molecularly imprinted polymers are removed from the molecularly imprinted polymers by washing. In some embodiments, the mycotoxins are qualitatively and quantitatively analyzed after removal from the molecularly imprinted polymers. In some embodiments, the quantitative and qualitative analysis is utilized for traceability (e.g., to identify and/or interrelate the chronology, location, and/or application of an item (e.g., the location, type and amount of mycotoxins found) by means of documented recorded identification). In some embodiments, the molecularly imprinted polymer from which mycotoxins has been removed is reused to sequester a mycotoxin from a material comprising mycotoxins. In some embodiments, the molecularly imprinted polymer adsorbs 1 to 10 times more (e.g., 1 to 5 times more, 1 to 2 times more) water than its weight. In some embodiments, two or more different molecularly imprinted polymers are contacted with the material comprising mycotoxins in order to sequester two or more specific mycotoxins from the material.

The invention also provides a method for synthesizing N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine, comprising: converting 3-5 dichlorosalicylic acid into 2-acetoxyacetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid; converting 2-acetoxyacetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid into 2-acetoxyacetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid chloride; reacting 2-acetoxyacetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid chloride with L-phenylalanine ethyl ester to form N-(2-acetoxy-3,5-

dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine; and converting N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine into N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine. In some embodiments, the converting comprises hydrolyzing of ester functions in N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine.

The invention also provides a method for synthesizing 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine, comprising: converting 2,3-dimethoxybenzoic acid into 2,3-dimethoxy-N-tertbutoxycarbonylaniline; converting 2,3-dimethoxy-N-tertbutoxycarbonylaniline into 2,3-dimethoxyaniline; reacting 2,3-dimethoxyaniline with diethylketomalonate to form ethyl 6,7-dimethoxy-3-hydroxy-3-(2-indolone)-carboxylate; converting ethyl 6,7-dimethoxy-3-hydroxy-3-(2-indolone)-carboxylate into 6,7-dimethoxyisatine; converting 6,7-dimethoxyisatine into 6,7-dimethoxy-1-methylisatine; and converting 6,7-dimethoxy-1-methylisatine into 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine.

The invention also provides a method of synthesizing a molecularly imprinted polymer specific for a mycotoxin, comprising: generating a template compound capable of facilitating MIP binding to the mycotoxin; combining the template compound in a reaction comprising a MIP monomer and a cross-linking reagent in a solvent system comprising an apolar, non-protic solvent; and promoting polymerization by an action selected from the group consisting of exposing the reactant vessel to an elevated temperature or exposing the reactant vessel to UV irradiation. In some embodiments, the mycotoxin comprises ochratoxin A, however, the invention is not so limited. Indeed, a variety of molecularly imprinted polymers specific for a mycotoxin can be synthesized as described herein including, but not limited to, MIPs specific for acetoxyscirpenediol, acetyldeoxynivalenol, acetylnivalenol, acetylneosolaniol, acetyl T-2 toxin, aflatoxin, aflatoxin B1, B2, G1 and G2, aflatrem, altenuic acid, alternariol, austdiol, austamide, austocystin, avenacein +1, beauvericin +2, bentenolide, brevianamide, butenolide, calonectrin, chaetoglobosin, chaetocin, chaetomin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasins, cyclopiazonic acid, deacetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diacetate, deoxynivalenol monoacetate, diacetoxyscirpenol, destruxin B, emestrin, enniatins, ergot alkaloids toxins and endophytes such as ergine, ergocornine, ergocristine, ergocryptine, ergometrine, ergonine, ergosine, ergotamine, ergovaline, lysergol, lysergic acid, and related epimers, fructigenin +1, fumagilin, fumonisins, fumonisins A1, A2, B1 and B2 and B3, fusarenon-X, fusarochromanone, fusaric acid, fusarin, gliotoxin, HT-2 toxin, hyalodendrin,

ipomeanine, islanditoxin, isofumigaclavines A and B, lateritin +1, leptosin, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzine, moniliformin, monoacetoxyscirpenol, mycophenolic acid, neosolaniol, nivalenol, NT-1 toxin, NT-2 toxin, ochratoxin, oosporein, oxalic acid, paspalitrem A and B, patulin, penicillic acid, penitrem, phomopsins, PR-toxin, roridin E, roquefortine A and B, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxins, F,G,H, scirpentriol, sirodesmin, slaframine, sporidesmin, sterigmatocystin, swainsonine, T-1 toxin, T-2 toxin, tenuazoic acid, triacetoxyscirpendiol, trichothecenes, trichodermin, trichothecin, trichoverrins, trichoverrols, tryptoquivalene, verrucarin, verruculogen, verticillins, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, wortmannin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenols, zearalanones, zearalenone, α, β, zearalanone, α, β, zeranol and subfamilies and/or derivatives of the same. In some embodiments, the template comprises N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine. In some embodiments, the template comprises 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine. The present invention is not limited to any particular monomer or crosslinker. Indeed, a variety of monomers and crosslinkers may be utilized including those described herein. In some embodiments, the method further comprises washing the molecularly imprinted polymer to remove the template. In some embodiments, washing comprises 1, 2, 3, 4 or more washes with a solution (e.g., a dilute alkali solution, a dilute acid solution, or water) to remove the template.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows ochratoxin A and N-(3,5-dichloro-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanine (OTA template).

Figure 2 shows N-(3,5-dichloro-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanine (OTA template) synthetic pathway.

Figure 3 shows MIP-OTA sequestration efficacy for OTA at several rates of inclusion.

Figure 4 shows MIP-OTA observed on a Hitachi S-4300 scanning electron microscope at ×15,000 of magnification and at 3.0keV.

Figure 5 shows the sequestration affinity of MIPs (synthesized in toluene-cyclohexane mixture) for 5 different levels of inclusion toward 3 different concentrations of OTA.

Figure 6 shows the sequestration activity for OTA by MIPs made of styrene and 2-vinylpyridine as functional monomers and polymerized with either heat-initiation or low temperature and UV-initiation. Values of the initial adsorption and remnant adsorption after citrate buffer wash (pH 4.0) and after 100% methanol wash are reported.

Figure 7 shows the sequestration activity for polyphenols and 3-indol acetic acid by MIPs made of styrene and 2-vinylpyridine as functional monomers and polymerized with low temperature and UV-initiation. Values of the initial adsorption are reported.

Figure 8 shows photos of fiberglass mesh coated with MIP-OTA and used in a 50 mL falcon tube for OTA sequestration in wine.

Figure 9 shows the results of sequestration testing of three levels of MIP-OTA coated on fiberglass mesh using four different polymerization conditions and tested with white wine comprising spiked concentrations of 50, 100, 200 ppb of OTA.

Figure 10 shows the results of the sequestration testing of three levels of NIP coated on fiberglass mesh using 3 three polymerization conditions and tested in white wine for spiked concentrations of 50, 100, 200 ppb of OTA.

Figure 11 shows a chromatographic profile of standard solutions of OTA recorded with a fluorescent detector and gradient selection utilized to optimize the time of retention of the mycotoxin.

Figure 12 shows the sporidesmin and sporidesmin template (5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine) molecular structure.

Figure 13 shows the sporidesmin template pathway synthesis.

Figure 14 shows the sequestration efficacy for the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template by the MIP-sporidesmin and NIP at several rates of inclusion.

Figure 15 shows the sequestration activity for gliotoxin of the MIPs and NIPs synthesized with heat initiated or low temperature/UV initiated polymerization and stability/specificity of the interaction after six successive washes performed with increasing level of methanol.

Figure 16 shows the sequestration activity for 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template of the MIPs and NIPs synthesized with heat initiated or low temperature/UV initiated

polymerization and stability/specificity of the interaction after six successive washes performed with increasing level of methanol.

DEFINITIONS

As used herein, the term "molecularly imprinted polymer" or "MIP" refers to synthetic polymers that selectively bind a particular compound. In a preferred embodiments, molecularly imprinted polymers are synthesized in the presence of target compounds, also referred to as template compounds, creating a MIP with a high degree of affinity for the specific target compound (e.g., mycotoxins). In general, the polymers are constructed with templates (e.g., synthetically constructed molecule/ligand/template (e.g., synthetic mycotoxins template)) that mimic the structure, shape and/or other chemical characteristics of a natural target (e.g., natural mycotoxins) and other components such as monomers and/or cross linking reagents. For example, the template compounds are incorporated into a pre-polymeric mixture and allowed to form associates with the monomers. The mixture is then polymerized with the template compounds in place. Once the polymer has formed, the template compounds are removed, leaving behind complementary cavities with affinity for the template (or other compositions resembling the template (e.g., natural occurring mycotoxins). Such regions (e.g., cavities or other regions) are tailored for binding future target compounds giving rise to a high affinity for such compounds.

It is worthy to note, that while specific target compounds are used to form molecularly imprinted polymers, the polymers may have a high affinity for a class of compounds that is distinct from but similar to the target compound. For example, a molecularly imprinted polymer may bind a number of compounds that are similar in shape, charge density, geometry or other physical or chemical properties to the template compound (e.g., synthetic mycotoxin template).

As used herein, the term "polymer", refers to a molecule (macromolecule) composed of repeating structural units typically connected by covalent chemical bonds forming a network.

As used herein, the term "template compound" or "target compound" refers to a compound that is complexed by ligands (e.g., monomers) that are subsequently polymerized, forming a molecularly imprinted polymer. Template compounds include organic compounds (e.g., mycotoxins, peptides, and proteins) as well as inorganic compounds (e.g., minerals, and heavy metals). As used herein, the term "mycotoxin template" refers to a synthetically

constructed molecule that mimics the structure, shape and/or other chemical characteristic of a natural mycotoxin (e.g., ochrotoxin, sporidesmin, etc.). The present invention is not limited by the type of mycotoxin template utilized. Indeed a variety of mycotoxins may be utilized including, but not limited to, Aflatoxins: aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, sterigmatocystin and subfamilies, aflatoxicol; Trichothecenes: deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, monoacetoxyscirpenol, scirpenetriol, T-2 toxin, HT-2 toxins, T-2 tetraol, fusarenon X, fusarin C, fusaric acid, fusarochromanone, aurofusarin, fusaproliferin, neosolaniol, nivalenol along with metabolites and sub-families; Fumonisins: fumonisin A1, A2, B1, B2, B3 and subfamilies; Ochratoxins: ochratoxin A, B, α, β and metabolites; Zearalenone, zearalenol α, β, zearalanone, zearalanol α, β, zeranol and metabolites; Patulin, gliotoxin, mycophenolic acid, moniliformin cyclopiazonic acid, citrinin, beauvericin, citreoviridin, citochalasin H; Penicillic acid, PR-toxin, roquefortine A, B, rubratoxin and subfamilies; Ergot alkaloids: ergotamine, clavine alkaloids; Isofumigaclavines A, B; paspalitrem A, B, aflatrem, penitrems and subfamilies; Phomopsins: Phomopsin A and subfamilies; Verrucarin A, verruculogen and subfamilies; Sporidesmin and subfamilies; slaframine, swainsonine, tenuazoic acid, alternariol, wortmannin, and other mycotoxins described herein.

As used herein, the term "monomer", refers to a molecule that may become chemically bonded to other monomers to form a polymer.

As used herein, the terms "crosslink" and "crosslinker", refer to molecules that contain two, three or four double-bonds that are capable of attaching to two or more monomers to form a polymer network.

As used herein, the term "structural unit", refers to a building block of a polymer chain, and related to the repeat unit.

As used herein, the term "anionic" or "anion" refers to an ion that has a negative charge.

As used herein, the term "cationic" or "cation" refers to an ion that has a positive charge. This term can refer to polymeric compounds, such as molecularly imprinted polymers, that contain a positive charge.

As used herein, the term "acid" as used herein refers to any chemical compound that can donate proton(s) and/or accept electron(s). As used herein, the term "base" refers to any chemical compound that can accept proton(s) and/or donate electron(s) or hydroxide ions. As

used herein, the term "salt" refers to compounds that may be derived from inorganic or organic acids and bases.

As used herein, the term "bleeding", refers to a remaining fraction of the template still in association with the MIP after several washing stages of the MIP, and that continues to dissociate from the MIP and interfere with its sorption activity.

As used herein, the term "porogenic/porogen", refers to a substance, molecule, buffer, solvent, (e.g., toluene, xylene, ethylbenzene) used to change the size of the cavities on a polymer (e.g., cavities of a MIP), while the polymer to porogen ratio is directly correlated to the amount of porosity of the final structure.

As used herein, the term "porosity", refers to a measure of the void spaces in a material (e.g., a MIP cavity) that can hold a gas or liquid or allow it to pass through.

As used herein, the term "polymerization", refers to a process of reacting monomer molecules together in a chemical reaction to form three-dimensional networks or polymer chains.

As used herein, the term "precipitation", refers to the formation of a solid in a solution during a chemical reaction. When the reaction occurs, the solid formed is called the precipitate, and the liquid remaining above the solid is called the supernatant.

As used herein, the term "centrifugation" refers to the process of separating molecules by size or density using centrifugal forces generated by a spinning rotor that puts an object in rotation around a fixed axis, applying a force perpendicular to the axis. The centrifuge works using the sedimentation principle, where the centripetal acceleration is used to evenly distribute substances of greater and lesser density into different layers of density.

As used herein, the term "concentration" refers to the amount of a substance per defined space. Concentration usually is expressed in terms of mass per unit of volume. To dilute a solution, one must add more solvent, or reduce the amount of solute (e.g., by selective separation, evaporation, spray drying, freeze drying). By contrast, to concentrate a solution, one must reduce the amount of solvent.

As used herein, the term "layer" refers to a usually horizontal deposit organized in stratum of a material forming an overlying part or segment obtained after separation by centrifugation or sedimentation in relation with the density properties of the material.

As used herein, the term "purified" or "to purify" refers to the removal of foreign components from a sample. When used in a chemical context "purified" or "to purify" refers to

the physical separation of a chemical substance of interest from foreign, undesired or contaminating substances. Commonly used methods for purification of organic molecules, include, but are not limited to the following: affinity purification, mechanical filtration, centrifugation, evaporation, extraction of impurity, dissolving in a solvent in which other components are insoluble, crystallization, adsorption, distillation, fractionation, sublimation, smelting, refining, electrolysis and dialysis.

As used herein, the term "drying" refers to any kind of process that reduces or eliminates liquid in a substance.

As used herein, the term "spray drying" refers to a method of drying a substance containing liquid using hot gas to evaporate the liquid to reduce or eliminate liquid in the substance. In other words the material is dried byway of spraying or atomizing into a draft of heated dry air.

As used herein, the term "dry free flowing powder" refers to a free flowing dry powder.

As used herein, the term "grinding" refers to reducing particle size by impact, shearing, or attrition.

As used herein, the term "washing" refers to the removal or cleansing (e.g., using any type of solute (e.g., distilled water, buffer, or solvent, or mixture) of impurities or soluble unwanted component of a preparation (e.g., a MIP may be washed to remove the template components from the sample).

As used herein, the term "analyte" refers to an atom, a molecule, a substance, or a chemical constituent. In general, an analyte, in and of itself is not measured, rather, aspects or properties (physical, chemical, biological, etc.) of the analyte are determined using an analytical procedure, such as High Performance Liquid Chromatography (abbreviated as HPLC). For example, in general one does not measure a "chair" (analyte-component) in and of itself, but, the height, width, etc. of a chair are measured. Likewise, in general one does not measure a mycotoxin but rather measures one or more properties of the mycotoxin (e.g., mycotoxins fluorescence, related for example, to its stability, concentration, or biological activity).

As used herein, the term "sample" is used in a broad sense including a specimen from any source (e.g., synthetic, biological and environmental samples). Synthetic samples include any material that is artificially produced (e.g., MIP). Biological samples may be obtained from animals (including humans) and encompass fluids, solids, tissues, and gases. Biological samples

include blood products, such as plasma, serum and the like. Environmental samples include environmental material such as surface matter, soil, water, crystals and industrial samples.

As used herein, the term "high-performance liquid chromatography" and the term "HPLC" refer to a form of liquid chromatography to separate compounds. The compounds are dissolved in a solution. Compounds are separated by injecting the sample mixture onto a column, through which a solvent or solvent mixture has been flowing, to elute components of the mixture, from the column. HPLC instruments comprise a reservoir of mobile phase, a pump, an injector, a separation column, and a detector. The presence of analytes in the column effluent is recorded by quantitatively detecting a change in refractive index, UV-VIS absorption at a set wavelength, fluorescence after excitation with a suitable wavelength, or electrochemical response.

As used herein, the term "signal" is used generally in reference to any detectable process that indicates that a reaction has occurred (for example, binding of antibody to antigen). Signals can be assessed qualitatively as well as quantitatively. Examples of types of "signals" include, but are not limited to, radioactive signals, fluorometric signals or colorimetric product/reagent signals.

As used herein, the term "scanning electron microscopy" and the term "SEM" refer to a type of electron microscope that images the sample surface by scanning it with a high-energy beam of electrons in a raster scan pattern. The electrons interact with the atoms that make up the sample, producing signals that contain information about the sample's surface topography, composition and other properties such as electrical conductivity.

As used herein, the term "fixation agent" refers to a chemical that is capable of fixing one substance to another in order to "fix", stabilize, or otherwise preserve the substance in its current form to prevent the substance from degrading or otherwise changing. Often, fixation agents are used in scanning electron microscopy (SEM) to prepare the sample.

As used herein, the term "*in vivo*" refers to studies and/or experiments conducted within a living organism, occurring within a biological organism.

As used herein, the term "*in vitro*" refers to an artificial environment outside the living organism and to biological processes or reactions that would normally occur within an organism but are made to occur in an artificial environment. Examples of in vitro environments include test tubes and cell culture.

As used herein, the term "*in situ*" means in the condition of the reaction mixture.

As used herein, the term "*ex vivo*" refers to studies and/or experiments and/or application done in or on living tissue in an artificial environment outside the organism with the minimum alteration of the natural conditions.

As used herein, the term "absorb" refers to the process by which a material "takes in" or "sucks up" another substance. For example, "absorption" may refer to the process of absorbing or assimilating substances into cells or across the tissues and organs through diffusion or osmosis (e.g., absorption of nutrients by the digestive system or absorption of drugs into the blood stream).

As used herein, the terms "adsorb" and "adsorption" refer to a process that occurs when a material is sequestered by, and/or accumulated by (e.g., on the surface of) a composition (sequestrant and/or adsorbent), or to a process in which a composition (e.g., MIP) binds to a target molecule (e.g., a mycotoxins) in a sample (e.g., for removing the target molecule from a sample).

As used herein, the term "sorption" refers to both adsorption and absorption.

As used herein, the term "sequester" and/or the term "sequestration" refers to physical association (e.g., via bonding (e.g., hydrogen boding, ionic bonding, covalent bonding or other type of bonding) of two or more entities that come into contact with one another (e.g., thereby forming a complex). Exemplary forms of associations include, but are not limited to, hydrogen bonding, coordination, and ion pair formation. Sequestration interactions may involve a variable number of chemical interactions (e.g., chemical bonds) depending on the stereochemistry and geometry of each entity (e.g., further defining the specificity of the sequestration). When two or more entities are sequestered they may be sequestered by way of chemical bonds, but may also be associated via charge, dipole-dipole or other type of interactions.

As used herein, the terms "sequestration agent" and/or "sequestering agent", refer to an entity that is capable of forming a complex with a second entity.

As used herein, the term "complex" refers to an entity formed by association between two or more separate entities (e.g., association between two or more entities wherein the entities are the same or different (e.g., same or different chemical species). The association may be via a covalent bond or a non-covalent bond (e.g., via van der Waals, electrostatic, charge interaction,

hydrophobic interaction, dipole interaction, and/or hydrogen bonding forces (e.g., urethane linkages, amide linkages, ester linkages, and combination thereof)).

As used herein, the term "effective amount" refers to the amount of a composition (e.g., MIP) sufficient to accomplish beneficial or desired results. An effective amount can be administered and/or combined with another material in one or more administrations, applications or dosages and is not intended to be limited to a particular formulation or administration route.

As used herein, the term "animal" refers to those of animal kingdom. This includes, but is not limited to livestock, farm animals, domestic animals, pet animals, marine and freshwater animals, and wild animals.

As used herein, the term "feedstuffs" refers to material(s) that are consumed by a subject (e.g., a human and/or animal subject (e.g., that contribute energy and/or nutrients to the subject's diet)). Examples of feedstuffs include, but are not limited to, dairy, juice, grains, fruit, vegetables, meat, Total Mixed Ration (TMR), forage(s), pellet(s), concentrate(s), premix(es) coproduct(s), grain(s), distiller grain(s), molasses, fiber(s), fodder(s), grass(es), hay, kernel(s), leaves, meal, soluble(s), and supplement(s).

As used herein, "digestive system" refers to a system (including gastrointestinal system) in which digestion can or does occur.

As used herein, the term "digest" or "digestion" refers to the conversion of food, feedstuffs, or other organic compounds into absorbable form; to soften, decompose, or break down by heat and moisture or chemical action.

As used herein, the term "bioavailability" refers to the fraction of a molecule or component that is available to an organism or reaches the systemic circulation. When a molecule or component is administered intravenously, its bioavailability is 100%. However, when a molecule or component is administered via other routes (such as orally), its bioavailability decreases (due to incomplete absorption and first-pass metabolism).

As used herein, the terms "administration" and the term "administering" refer to the act of giving a substance, including a drug, prodrug, or other agent, or therapeutic treatment to a subject (e.g., a subject or in vivo, in vitro, or ex vivo cells, tissues, and organs). Exemplary routes of administration can be through the eyes (ophthalmic), mouth (oral), skin (topical or transdermal), nose (nasal), lungs (inhalant), oral mucosa (buccal), ear, rectal, vaginal, by injection (e.g., intravenously, subcutaneously, intratumorally, intraperitoneally, etc.) and the like.

As used herein, the term "co-administration" and the term "co-administering" refer to the administration of at least two agent(s) or therapies to a subject and/or material (e.g., feedstuff). Co-administration of two or more agents or therapies can be concurrent, or a first agent/therapy can be administered prior to a second agent/therapy.

As used herein, the term "treatment" refers to the improvement and/or reversal of a sign or symptom of disease (e.g., mycotoxicosis). The term "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. For example, subjects that may benefit from treatment with compositions and methods of the invention include those already with a disease and/or disorder (e.g., mycotoxicosis) as well as those in which a disease and/or disorder is to be prevented (e.g., using a prophylactic treatment of the present invention).

As used herein, the term "mycotoxin" refers to toxic and/or carcinogenic compound(s) produced by various fungal species.

As used herein, the term "mycotoxicosis" refers to a condition in which mycotoxins pass the resistance barriers of a human or animal body. Mycotoxicosis can be considered either an infection or a disease and may have a deleterious effect on those afflicted.

As used herein, the terms "disease", "infection" and "pathological condition or response" refer to a state, signs, and/or symptoms that are associated with an impairment of the normal state of a living subject (e.g., human and/or animal) or of any of its organs or tissues that interrupts or modifies the performance of normal functions, and may be a response to environmental factors (such as malnutrition, industrial hazards, or climate, including mycotoxicosis), specific infective agents (such as worms, amoeba, bacteria, viruses, prions, etc.), to inherent defect of the organism (such as various genetic anomalies), or combinations of these and other factors.

As used herein, the term "at risk for disease" refers to a subject that is predisposed to experiencing a particular disease. This predisposition may be genetic (e.g., a particular genetic tendency to experience the disease, such as heritable disorders), or due to other factors (e.g., age, weight, environmental conditions, exposures to detrimental compounds (e.g., present in the environment, etc.)).

As used herein, the term "suffering from disease" refers to a subject (e.g., an animal or human subject) that is experiencing a particular disease and is not limited to any particular signs or symptoms, or disease.

As used herein, the term "toxic" refers to any detrimental, deleterious, harmful, or otherwise negative effect(s) on a subject, a cell, or a tissue as compared to the same cell or tissue prior to the contact or administration of the toxin/ toxicant.

As used herein, the term "pharmaceutical composition" refers to the combination of an active agent (e.g., a composition comprising a MIP) with a carrier, inert or active, making the composition especially suitable for diagnostic or therapeutic use in vitro, in vivo or ex vivo.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable" and the term "pharmacologically acceptable" refer to compositions that do not substantially produce more known adverse reactions than known beneficial reactions.

As used herein, the term "traceability" refers to the property of the result of a measurement or the value of a standard whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons, all having stated uncertainties. It is the practical application of general metrology concepts to chemical measurements and provides the terminology, concepts and strategy for ensuring also that analytical chemical measurements are comparable. It measures the uniquely identifiable entities in a way that is verifiable. Traceability measures are utilized, among other things, to interrelate the chronology, location, and/or application of an item by means of documented recorded identification.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Various fungal groups produce mycotoxins that have deleterious effects on animal health. These toxins are mainly produced by the fungal genera of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* when favorable conditions for their formation prevail. No region of the world escapes mycotoxins and their negative impact on animal and human health. The negative effect of mycotoxin contamination upon grain supplies and animal productivity are enormous and the risk to human health is ever-present. Warmer climates tend to succumb to aflatoxins and fumonisins while cooler areas with higher moisture are subject to ochratoxin, sporidesmin, zearalenone, deoxynivalenol, T-2 toxin, and diacetoxyscirpenol.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds and fungi contaminating cereal grains as well as forages, fruits, feed and food products as well as the environment (e.g., soil, water and air through aerosol acquired mycotoxicosis, etc.). Mycotoxins have dangerous effects

on human and animal health. Because mycotoxins are present throughout the food chain, mycotoxins are subject to regulation that limits excessive contamination of feed/food material and the environment based on the toxicological properties of the different groups of toxins (See e.g., Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union (2006/576/EC)). In this respect, different safety agencies around the globe have established limit values and control procedures to test for the level of contamination. These regulations are not yet harmonized between countries and/or continents and are also prone to the political and economical status of the geographical area that is considered. The regulations, where available, are founded on a non-exhaustive number of reports related to acute intoxication cases produced with crystalline forms of mycotoxins on model situations. As an understanding of mycotoxins progresses, the impact of chronic exposure level, the duration of the exposure and the co-occurrence of different mycotoxins naturally contaminated feed/food materials and the environment that can exert synergic toxic effects, might play an important role in the health status of animals and humans and their susceptibility to various other infections and thus immune status. In this perspective, solutions have to be considered to handle the non-regulated levels of toxic compounds that enter the food chain and are present in the environment. Accordingly, in some embodiments of the invention, an economical, large scale method for the preparation of high affinity, synthetic sorbent for the removal of mycotoxins (e.g., including, but not limited to, the entire family of major or minor classes of mycotoxin molecules including: Aflatoxins: aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, sterigmatocystin and subfamilies, aflatoxicol; Trichothecenes: deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, monoacetoxyscirpenol, scirpenetriol, T-2 toxin, HT-2 toxins, T-2 tetraol, fusarenon X, fusarin C, fusaric acid, fusarochromanone, aurofusarin, fusaproliferin, neosolaniol, nivalenol along with metabolites and sub-families; Fumonisins: fumonisin A1, A2, B1, B2, B3 and subfamilies; Ochratoxins: ochratoxin A, B, α, β and metabolites; Zearalenone, zearalenol α, β, zearalanone, zearalanol α, β, zeranol and metabolites; Patulin, gliotoxin, mycophenolic acid, moniliformin cyclopiazonic acid, citrinin, beauvericin, citreoviridin, citochalasin H; Penicillic acid, PR-toxin, roquefortine A, B, rubratoxin and subfamilies; Ergot alkaloids: ergotamine, clavine alkaloids; Isofumigaclavines A, B; paspalitrem A, B, aflatrem, penitrems and subfamilies; Phomopsins: Phomopsin A and subfamilies; Verrucarin A, verruculogen and

subfamilies; Sporidesmin and subfamilies; slaframine, swainsonine, tenuazoic acid, alternariol, and wortmannin).

Ochratoxin A (abbreviated as OTA) is the mycotoxin metabolite principally produced by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* among other mold species which can grow on improperly stored food products (See e.g., Pfohl-Leszkowicz A., and Manderville R.A., 2007. Molecular Nutrition and Food Research, **51**: 61-99), contaminated grain, coffee beans (See e.g., O'Brien E., and Dietrich D.R. 2005. Critical Reviews in Toxicology, **35**: 33-60), wine grapes (See e.g., Blesa J., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J., 2006. Critical Review in Food Science and Nutrition, **46**: 473-478), and might be transferred and contaminate liquids and solids consumed by humans (e.g., grape juice, wine, beer, coffee, cocoa extracts, as well as foods and feeds which utilize contaminated grains and meat and other byproducts from animals (e.g., milk, eggs, etc.) that consume contaminated grains or are otherwise exposed to mycotoxins) which can be detrimental to humans OTA is a carcinogenic (Group 2B; See e.g., Clark H.A., and Snedeker S.M, 2006. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews, **9**: 265-96), nephrotoxic compound and can cause immunosuppression (See e.g., Al-Anati L., and Petzinger E., 2006. Journal of Veterinary Pharmocology and Therapeutics, **29**: 79-90; Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007 as cited previously; O'Brien and Dietrich, 2005 as cited previously). OTA can induce changes in the renal function of pigs including alteration of urine excretion, and increases of the excretion of glucose into urine, which has been characterized as the porcine nephropathy. Chicken, turkeys and ducklings fed with grains containing OTA have poor feed conversion and reduced egg production. In humans, OTA pathology has been clinically described as the Balkan endemic nephropathy (See e.g., Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Grosso F., Nikolov I., Chernozemsky I.N., Castegnaro M., and Dragacci S., 2004. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **52**:2404-2410). Animal studies indicate that due to its similarity to phenylalanine, after its absorption at the level of the gastrointestinal tract, OTA can enter the enterohepatic circulation and bind the albumin fraction in blood and thus persist in animal tissues for extended period of times (See e.g., Creppy E.E., kane A., Dirheimer G., Lafarge-Frayssinet C., Mousset S., and Frayssinet C., 1985. Toxicology Letters, **28**: 29-35.).

Another class of fungal toxins, the epipolythiodioxopiperazines including gliotoxin, hyalodendrin, sirodesmin, chaetomin, chaetocin, verticillins, leptosin, emestrin, and sporidesmin is of particular interest. The latter, generally of high economical impact on animal production,

was found in specific areas of the world, primarily in New Zealand pastoral agriculture (See e.g., Hohenboken W.D., Morris C.A., Munday R., De Nicolo G., Amyes N.C., Towers N.R. and Phua S.H., 2004. New Zealand journal of Agricultural Research, **47**: 119-127) but has also been reported in the Azores Islands of Portugal. Sporidesmin is a hydrophobic molecule synthesized by *Pithomyces chartarum* that is infesting certain grasses. The toxicity is induced by the presence of a disulphide bridge, which can inactivate proteins via the reaction with thiol groups and the generation of reactive oxygen species (superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical). This pathology is better known as facial eczema, a hepatogenous photosensitization resulting from the destruction of bile duct epithelial cells which causes phylloerythin (a metabolite of chlorophyll) to accumulate in the circulating blood and absorbing energy from sunlight, and particularly affecting sheep, cattle, horses, and deer. The clinical signs include decreases in milk production, weight loss, photosensitization, and death (See e.g., Munday R., 1982. Chemico-Biological Interactions, **41**: 361-374). In addition to exposure to mycotoxins in feed, food, pastures and liquids, animals and humans come into contact with, and can become affected by mycotoxins in other ways. For example, animals can come into contact with mycotoxins in their bedding, fish can come into contact with mycotoxins in their water environment, and other organic materials can be affected by mycotoxins.

Mycotoxin contamination is unavoidable, and in order to reduce the negative effects of mycotoxins, inorganic materials such as clays, bentonites and aluminosilicates, or activated charcoal, known for their adsorptive properties, were historically used in agriculture (e.g., admixed with animal feed and/or ingredients, encapsulated forms or as filter devices). Clays used in large quantities sequester some mycotoxins in fluids (e.g., in the gastrointestinal tract of the animal and/or humans) and minimize their toxic effects (See e.g., Ramos A.J., and Hernandez E., 1997. Animal Feed Science and Technology, **65**: 197-206; Grant P.G., and Phillips T.D., 1998. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **46**: 599-605). However, clays hinder the absorption of many beneficial nutrients that are important to animals and humans such as vitamins, minerals and amino acids thereby decreasing the nutrient density of the diet. Moreover, clays are an inert material that must be used (e.g., fed to animals) in large quantities to have a beneficial effect (e.g., reduction of mycotoxin contamination). However, clays fed to animals in large quantities can have a negative effect on the environment when the clays are excreted from the animal. Other broad spectrum mycotoxin adsorbents, which lack specificity

for specific mycotoxins, including the invention described in US patent number 6,045,834, have also been used.

In general, molecular imprinted polymers (abbreviated as MIP's), are polymers that are formed in the presence of a molecule, the template, that is extracted afterwards, thus leaving complementary cavities behind. These polymers show a certain chemical affinity for the original molecule and can be used to fabricate sensors, catalysis or for separation methods. The first imprinted material was sodium silicate based. The first experimental use of these materials was for separation of dyes in 1949 (See e.g., Andersson H.S., and Nicholls I.A., 2001. In: Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry, (Sellergen B., ed.), Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 23 Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 1-19).

The present invention relates generally to molecularly imprinted polymers (MIPs). In particular, the present invention relates to reusable, ecologically friendly MIPs, methods of producing the same, methods of utilizing the same (e.g., to sequester and/or adsorb target compounds (e.g., mycotoxins)), and methods for applying the use in different ways (e.g., to detect presence of mycotoxins for traceability purposes and to remove mycotoxins from a contaminated source). Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including dietary, therapeutic, prophylactic, food and beverage processing and manufacture, liquid filtering as well as research and quality control applications.

Accordingly, in some embodiments, the present invention provides template compounds (e.g., upon which MIP are synthesized) that impact high sorption capacity and selectivity of MIPs for targeted compounds (e.g., mycotoxins). Template compounds are removable from the MIP post MIP synthesis (e.g., thereby "activating" the MIP and enabling it to bind to and adsorb target compounds (e.g., mycotoxins)). Thus, the present invention provides processes (e.g., a synthetic process) and materials that allow large scale production of template and MIP, that is not only economical (e.g., that enables realizable, large scale production in an economically achievable manner), but that also uses reagents that are more readily available than MIP templates historically used. The present invention also provides, in some embodiments, compositions (e.g., template compounds, monomers, cross-linkers as well as MIPs) that are bio-neutral (e.g., are not environmentally harmful). For example, in some embodiments, monomers and cross linkers of the invention are able to form high affinity, reversible complexes with

template (e.g., with functional groups of the template), thereby producing MIPs with high affinity for target compounds (e.g., mycotoxins) and that provide positive effects on the environment (e.g., high water sorption properties whereby the MIP's adsorb up to 10 times more water than their weight thereby benefiting soil hydration by retaining water). Similarly, in some embodiments, the present invention provides MIPs with high affinity toward target compounds (e.g., mycotoxins) that are reusable (e.g., that can be separated from target compounds and reused).

I. Templates used for synthesis of molecularly imprinted polymers (MIPs)

General schemes for MIP synthesis include steps for polymerization and cross-linking of monomers in the presence of template molecules that direct the formation of binding sites within the MIP network. Geometric specificity is imparted to MIP binding sites in steps analogous to the use of wax sculpture copies for the preparation of molds during the artistic technique of lost-wax casting. After the MIP network is formed, the template is removed so that the template-free MIP is available for sequestration of target compound. In some embodiments, removal of template is achieved through a series of washing steps (e.g., using those described in Section IV below).

In some embodiments, a target compound is used as a template. However, this raises the potential problem of template bleeding, or a gradual leaching of residual template into a sample. In analytical applications, template bleeding causes erroneously high background, while in non-analytical (e.g., sequestration) applications, template bleeding can confound sequestration efforts by actually introducing target molecules into the sample. Furthermore, for example when synthesizing MIPs that are directed towards targets with toxic and/or carcinogenic properties (e.g., mycotoxins), utilizing less hazardous template molecules during the MIP synthesis process may be desired from the standpoint of personal safety as well as to minimize hazardous waste. In preferred embodiments, the template molecule is non-hazardous and/or easily degraded, and therefore does not represent a health or environmental risk. In preferred embodiments, the template is reusable upon release from the MIP. In preferred embodiments, the template can be produced in larger quantities and in a safer manner than mycotoxins can be produced.

Therefore, in some embodiments, a template used for MIP synthesis may be the same compound as the desired target compound. In some embodiments, a template used for MIP

synthesis may be different from the desired target compound. In preferred embodiments of the present invention, the desired target compound is a mycotoxin. Examples of mycotoxins include but are not limited to Aflatoxins: aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, sterigmatocystin and subfamilies, aflatoxicol; Trichothecenes: deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, monoacetoxyscirpenol, scirpenetriol, T-2 toxin, HT-2 toxins, T-2 tetraol, fusarenon X, fusarin C, fusaric acid, fusarochromanone, aurofusarin, fusaproliferin, neosoloniol, nivalenol and metabolites and sub-families as well as conjugates; Fumonisins: fumonisin A1, A2, B1, B2, B3 and subfamilies as well as conjugates; Ochratoxins: ochratoxin A, B, α, β and metabolites; Zearalenone, zearalenol, α- and β-zearalanone, zearalanol, α- and β-zeranol and metabolites as well as conjugates; Patulin, mycophenolic acid, moniliformin, cyclopiazonic acid, citrinin, beauvericin, citreoviridin, citochalasin H; gliotoxin, sporidesmin, hyalodendrin, sirodesmin, chaetomin, chaetocin, verticillins, leptosin, emestrin, and subfamilies; Penicillic acid, PR-toxin, roquefortine A, B, rubratoxin and subfamilies; Ergot alkaloids: ergotamine, ergocryptine, ergovaline, ergocristine, ergometrine, ergosine, ergonine, ergocornine, ergine, lysergol, lysergic acid, and epimers clavine alkaloids; Isofumigaclavines A, B; paspalitrem A, B, aflatrem, penitrems and subfamilies; Phomopsins: Phomopsin A and subfamilies; Verrucarin A, verruculogen and subfamilies; slaframine, swainsonine, tenuazoic acid, alternariol, and wortmannin. In certain embodiments, the target compound is OTA, sporidesmin, ergot alkaloids.

In some embodiments, the design and/or determination of a non-target template compound is performed by careful structural analysis of the target molecule, structural minimization, and determination of structural features and functional groups critical for effective MIP binding site formation. Methods for structural minimization are known in the art (See e.g., Baggiani C., Giraudi G., and Vanni A., 2002. Bioconjugation, **10**: 389-394; herein incorporated by reference in its entirety). While the present invention is not limited to any particular mechanism, and an understanding of the mechanism is not necessary to practice the present invention, structural considerations that are taken into account during template design include but are not limited to chirality, planarity, the elimination of structures responsible for undesired properties of the molecule (e.g., elimination of molecular determinants of toxicity), and/or the existence of an appropriate solvent-accessible surface, electrostatic potential surface, and/or lypophilic-hydrophilic surface of the template molecule and its potential interactions with

monomers and crosslinker as well as simplicity of the template synthesis. In some embodiments, ultrafast shape recognition techniques are applied to enable the routine screening for compounds that most closely resemble a molecule according not only to an outperforming two-dimensional structure recognition but preferentially one of the most discriminating pattern, that is to say, the tri-dimensional molecular shape (See, e.g., Balletser P., and Richards W.G., 2007. Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, **463**: 1307-1321.

In one non-limiting example, a template for Ochratoxin A is N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine, as shown in Figure **1**.

In one non-limiting example of a synthesis method for N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine, synthesis begins with reaction of 3,5-dichlorosalicylic acid with acetic anhydride to obtain 2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid which in turn is converted into the acid chloride by the action of oxalyl chloride. The 2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid chloride is then reacted in situ with phenylalanine ethyl ester hydrochloride, in the presence of triethylamine, to yield ethyl ester of N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine. The last step of the synthesis method introduces novel and highly specific hydrolysis of both ester functions of N-(2-acetoxy-3,5-dichloro benzoyl)-L-phenylalanine ethyl ester to obtain the OTA template, N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine (I) with 98% yield. This synthesis reaction is summarized in Figure 2.

Thus, the present invention provides processes and materials for the synthesis of templates (e.g., OTA templates) that are scalable to large quantities in an economically achievable manner.

II. Monomers and cross-linking agents used for polymerization of MIPs

Selection of monomers used in the synthesis of MIPs take into account structural features of the template molecule in order to assess which monomer or combination of monomers is most likely to form interactions (e.g., covalent, non-covalent, ionic, hydrogen bonds, hydrophobic interactions, Van der Waals interactions) with the template. In one non-limiting example, key structural features of the OTA template (I) described herein (e.g., N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine) include (i) the two acidic functional groups (-OH and -CO_2H); (ii) one strongly polar peptide group (-NHCO-); (iii) and several low polarity

hydrocarbon fragments of the template structure (e.g., each of which has the potential to form complexes with the monomers and the cross-linker molecules). U.S. Patent Application No. 10/181435, herein incorporated by reference in its entirety, describes MIP functional monomers and methods of computational monomer selection (See, e.g., Baggiani et al., 2002.as previously cited).

Classes of monomers and specific monomers (e.g., utilized in MIP synthesis methods of the invention) include, but are not limited to, the following classes and derivatives thereof: acrylic acid and derivatives (e.g., 2-bromoacrylic acid, acryloyl chloride, N-acryloyl tyrosine, N-acryoyl pyrrolidinone, trans-2-(3-pyridyl)-acrylic acid), acrylates (e.g., alkyl acrylates, allyl acrylates, hydroxypropyl acrylate), methacrylic acid and derivatives (e.g., itaconic acid, 2-(trifluoromethyl) propenoic acid), methacrylates (e.g., methyl methacrylate, hydroxyethyl methacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate, 3-sulfopropyl methacrylate sodium salt, ethylene glycol monomethacrylate), styrenes (e.g., (2, 3 and 4)-aminostyrene, styrene-4-sulfonic acid, 3-nitrostyrene, 4-ethystyrene), vinyls (e.g., vinyl chloroformate, 4-vinylbenzoic acid, 4-vinylbenzaldehyde, vinyl imidazole, 4-vinylphenol, 4-vinylamine, acrolein), vinylpyridines (e.g., (2, 3, and/or 4)-vinylpyridine, 3-butene 1,2-diol), boronic acids (e.g., 4-vinylboronic acid), sulfonic acids (e.g., 4-vinylsulfonic acid, acrylamido-2-methyl-1-propane-sulphonic acid), metal chelators (e.g., styrene iminodiacetic acid), acrylamides and derivatives (e.g., N-methyl acrylamide), methacrylamides and derivatives (e.g., N,N-dimethyl acrylamide, N-(3-aminoprpoyl) methacrylamide), alkenes (e.g., 4-pentenoic acid, 3-chloro-1-phenyl-1-propene) (meth)acrylic acid anhydride and derivatives (e.g., methacrylic anhydride), silicon-containing monomers (e.g., (3-methacryloxypropyl) trimethoxy silane, tetramethyldisiloxane), polyenes (e.g., isoprene, 3-hydroxy-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene), azides (e.g., 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid), thiols (e.g., allyl mercaptan). Acrylate terminated or otherwise unsaturated urethanes, carbonates and epoxies can also be used in embodiments of the present invention, as can silicon-based monomers.

In preferred embodiments, monomers and the crosslinker used for synthesis of MIPs directed towards a template for OTA (i.e., N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine) comprise 2-vinylpyridine, 2-hydroxyethyl methacrylate and/or ethylene glycol dimethacrylate. While the present invention is not limited to any particular mechanism, and an understanding of the mechanism is not necessary to practice the present invention, 2-vinylpyridine forms ionic

bonds with the acidic groups of the template, and contains the vinyl bond in a close proximity to the basic nitrogen atom of the pyridine ring. This interaction between the template and the 2-vinylpyridine promotes formation of the polymer in very close vicinity of the template molecule and enables a tight bonding between the MIP and OTA in the MIP (e.g., after template compound is removed and the MIP is allowed to interact with target OTA molecules). While the present invention is not limited to any particular mechanism, and an understanding of the mechanism is not necessary to practice the present invention, the hydroxyl group of 2-hydroxyethyl-methacrylate monomer forms additional hydrogen bonds with highly polar peptide bonds of the template. An additional reagent is ethylene glycol dimethacrylate. While the present invention is not limited to any particular mechanism, and an understanding of the mechanism is not necessary to practice the present invention, ethylene glycol dimethacrylate finds use in some embodiments as a cross-linking agent (see below), as an unsaturated diester that interacts with low polarity groups that are present in the OTA template molecule. In some embodiments, individual types of monomers are utilized individually or in combination with other types of monomers.

If utilized, the crosslinking agent or agents will preferably be one or several polymeric or oligomeric compounds, or a compound that provides for cleavage under specific conditions. Crosslinking agents that lend rigidity to the subject polymeric compounds are known to those skilled in the art, and include, but are not limited to, di-, tri-, tetra- and penta-functional acrylates, methacrylates, acrylamides, vinyls, allyls, and styrenes. Specific examples of cross-linking agents include but are not limited to p-divinylbenzene, ethylene glycol dimethacrylate (abbreviated as EGDMA), tetramethylene dimethacrylate (abbreviated as TDMA), N,N'-methylene bisacrylamide (abbreviated as MDAA), N,N'-1,3-phenylenebis(2-methyl-2-propenamide) (PDBMP), 2,6-bisacryloylamidopyridine, 1,4-diacryloyl piperazine (abbreviated as DAP), 1,4-phenylene diacrylamide, and N,O-bisacryloyl-L-phenylalaninol. Examples of reversible, cleavable crosslinkers include, but are not limited to, N,N'-bis-(acryloyl) cystamine, N,N-diallyltartardiamide, N,N-(1,2-dihydroxyethylene) bisacrylamide, N1-((E)-1-(4-vinylphenyl) methylidene)-4-vinylanilene, allyl disulfide, and bis(2-methacryloyloxyethyl))disulfide. In preferred embodiments, ethylene glycol dimethacrylate is used as a cross-linking agent. Although the preferred cross-linking monomer is ethylene glycol dimethacrylate, embodiments of the present invention are not limited to this agent, and other

cross-linking monomers may be used, such as, divinylbenzene and trimethylolpropane trimethacrylate (abbreviated as TRIM).

Any ratio of simple monomers to crosslinking agents can be used that provides a MIP structure of appropriate integrity, e.g., that can be used in the context of the final application (e.g., in food or feed products, in water intended for aquaculture use, in vivo, etc). Those skilled in the art can select suitable ratios of monomers to provide the desired structural integrity, which is intimately related to the nature and structure of the targeted molecule and to the nature and structure of the template used.

In the case of polymeric or oligomeric compounds that are to be utilized in vivo (e.g., as therapeutics or diagnostics, or as consumable sequestration components of animal feed or human foodstuffs), it is important to select monomers that are non-toxic and which exhibit suitable in vivo stability and solubility. Preferred examples include, but are not limited to, acrylamides and methacrylates. Alternatively, the polymer may be treated post-polymerization to enhance the template solubility, e.g., by reaction with suitable organic or inorganic reagents.

Different polymerization methods may be used including free radical, cationic, and anionic polymerization. Polymerization conditions are selected and provided herein that do not adversely affect the active conformation of the compound for which a complementary polymeric compound is to be produced. In particularly preferred embodiments, free radical precipitation polymerization methods are used (see Section III below).

Additionally, polymerization of MIPs is typically begun by the addition of an initiating agent. Initiating agents include but are not limited to azo-bisisobutyronitrile (abbrevioated as AIBN), azo-bisdimethylvaleronitrile (abbreviated as ABDV), dimethylacetal of benzil, benzoylperoxide (abbreviated as BPO), and 4,4'-azo(4-cyanovaleric acid). In preferred embodiments, the initiating agent is azo-bisisobutyronitrile.

In preferred embodiments, monomers, crosslinkers, and/or MIPs have favorable safety and/or environmental properties such as reduced or no toxicity and high water sorption and retention. In preferred embodiments, MIPs can be reusable and economically realizable/producible.

III. Solvents used for synthesis of MIPs

The selection of solvent/ solvent mixture in which the polymerization reaction is carried out has a profound impact on the scope, selectivity and specificity of the binding affinity of a MIP to its target compound. While the present invention is not limited to any particular mechanism, and an understanding of the mechanism is not necessary to practice the present invention, porosity is facilitated or provided by a porogenic solvent or solvent mixture that exhibits the following properties: it dissolves in the monomer mixture, is inactive to the polymerization reaction and does not dissolve the polymer (MIP) produced. Suitable porogenic solvents include, but are not limited to, aromatic hydrocarbons, such as toluene, xylene, ethylbenzene and diethylbenzene; nonpolar solvents, such as cyclohexane; saturated hydrocarbons, such as hexane, heptane, octane and decane; alcohols, such as isopropyl and isoamyl alcohol; aliphatic halogenated hydrocarbons, such as dichloromethane, dichloroethane and trichloroethane; aliphatic or aromatic esters, such as ethyl acetate, butyl acetate, dimethylphthalate. In preferred embodiments, aromatic hydrocarbon solvents are used. In particularly preferred embodiments, toluene is used alone. In some embodiments, a mixture of toluene with another solvent is used. In some embodiments, toluene is used in combination with cyclohexane. The porogenic solvents can be used individually or in combinations of two or more. The amount of the porogenic solvent added can be varied from about 10% to 500% by mass based on the total amount of the monomers. While the present invention is not limited to any particular mechanism, and an understanding of the mechanism is not necessary to practice the present invention, polar solvents (e.g., water, acetonitrile) disrupt tight complexes between monomers and template, thereby lowering MIP specificity for target molecule binding (e.g., as in toluene, etc.

The solvent or the solvent mixture used as a medium for MIP synthesis also has an impact on the swelling properties of MIP and on the size of pores within the tri-dimensional MIP network. In certain embodiments, polar solvents such as acetonitrile are used as a solvent or co-solvent for MIP polymerization when an increase in MIP swelling and increase of MIP pore size is desired; alternatively, such solvents are avoided when an increase in MIP swelling and MIP pore size is not desired (e.g., when MIP is intended for use as a chromatographic column where swelling may impede flow rate and disturb the elution of analytes and the ability of the HPLC instrument to perform).

Judicious choice of solvent system may directly affect MIP pore size. In non-limiting examples, during synthesis of a MIP directed to a template of OTA, the smallest particles (1-20 μm) were formed in low polarity solvents like cyclohexane and/or toluene, while much larger and less size homogenous (10-170 μm) particles were formed in polar solvents like acetonitrile or water. Furthermore, at high concentrations of monomers, the polymerization reaction yields large MIP clusters which are easily dispersed by grinding, without production of very fine particles as occur during grinding of MIP monoliths (see detailed discussion in Section IV below). Very fine particles may be undesirable in applications where, for example, a MIP is intended for use as a column resin (where fine particles may impede flow rate) or when the presence of fine particles impedes or complicates collection of MIPs during centrifugation or filtration or disturbs the appropriate confinement of the MIP in the case of filtration, which is consequently governed by the pore size of the specific mesh filter that incorporates the MIP, if the filter should preserve the amount of MIP enclosed. Dispersed MIP clusters may be sieved to provide products of defined, homogeneous size. Therefore, the choice of polymerization solvent, monomer concentration, and physical handling methods may be chosen to result in an optimal yield of MIPs with desired pore size and particle size, while avoiding formation of fine particles.

The choice of solvent system dictates the physical form of the MIP that is formed during the polymerization process. For example, some solvent systems (including but not limited to low polarity solvents such as cyclohexane and/or toluene) yield, as described above, solid MIP clusters during a process referred to as precipitation polymerization. Other solvent systems (including but not limited to polar solvents such as polyvinyl alcohol in water) promote a kinetically distinct process referred to as emulsion polymerization (Vivaldo-Lima E., Wood P.E., Hamielec A.E., 1997. Industrial and Engineering Chemistry Research, **36**: 939-965). In general, the nature of polymerization affects both the physical form of the MIP network and the ease with which it may be processed further (e.g., the need for grinding; uniformity of particle size; yield; ease of buffer or solvent exchange; stability). Polymerization processes are reviewed in Yan H., and Ho Row K., 2006. International Journal of Molecular Science, **7**: 155-178; herein incorporated by reference in its entirety. In preferred embodiments, precipitation polymerization is used. In certain embodiments, precipitation polymerization results in a MIP product that forms as a powder of uniform and easily manageable particle size. In comparison, other polymerization methods including but not limited to bulk polymerization may yield a large

monolith of MIP that must be crushed prior to further processing or use, and resulting in irregular particle sizes and consequently lower performance.

IV. Methods to remove template from MIP following MIP synthesis and physical processing of MIPs

Techniques used for dissociation of template from newly-synthesized MIP are generally determined by the nature of the template-MIP interaction. For example, when covalent bonds have formed between template and the MIP network, chemical cleavage of the template from MIP is required. In contrast, when interaction between template and the MIP network is non-covalent, solvent extraction may be sufficient to remove the template (See, e.g., Yan H., and Ho Row K., 2006 as previously cited and herein incorporated by reference in its entirety; Sellergren B., 2001. *The non-covalent approach to molecular imprinting.* In: Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry, (Sellergen B., ed.), Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 23 Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 113-184). Post-synthesis processing of MIPs may also be referred to as MIP activation. In preferred embodiments, a first step of MIP activation involves decanting and then evaporating (recycling) the solvent from MIP material, under slightly reduced pressure (e.g., using a rotary evaporator system). A second step involves grinding of the MIP particles to yield a smaller particle size (e.g., using a mortar and pestle or milling equipment). A third step involves multiple washes of the MIP particles, e.g., with 0.2 w/v% sodium hydroxide. In embodiments in which an OTA MIP is synthesized, the thoroughness of washing may be tracked until a negative test is obtained with $FeCl_3$ solution for detection of template (see Example 2 to Example 4). In some embodiments, a single wash with 1% acetic acid and single wash with water is followed by drying of the final MIP product (e.g., at 80°C in a drying oven for 6-8 h) until all traces of solvent are removed. Finally, MIP particles may be sieved to provide product of defined particle size. In preferred embodiments, the physical form of the MIP does not require extensive grinding prior to use, e.g., the MIP does not form monolithic blocks that require crushing or grinding for dispersal. In preferred embodiments, the majority of the MIP forms spheres that form a powder upon drying.

In preferred embodiments, washing steps are sufficient to remove at least 95% of the template molecule from the MIP network. In particularly preferred embodiments, washing steps

are sufficient to remove at least 99% of the template molecule from the MIP network. In most preferred embodiments, washing steps are sufficient to remove at least 99.9% of the template molecule from the MIP network.

V. Application of MIP compositions

Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including dietary, therapeutic, prophylactic, food and beverage processing and manufacture, as well as research and quality control applications. For example, in some embodiments, synthetic templates (e.g., generated using methods described herein) are utilized for MIP synthesis. The present invention is not limited to any particular synthetic template and/or MIP synthesized. Indeed, a variety of synthetic templates can be generated and utilized including, but not limited to, an OTA template (e.g., N-(3,5-dichloro-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanine , See Example 1), template(s) for aflatoxin(s), a trichothecene template (e.g., sesquiterpene alcohol template (e.g., deoxynivalenol (DON) template)), a zearalenone template, a sporidesmin template, a sterigmatocystin template, a fumonisin template, a patulin template, a citrinin template, and/or endophyte related ergot template. In some embodiments, the present invention provides compositions and methods for producing a synthetic template (e.g., for use in MIP OTA synthesis) that comprises exterior functional groups that resemble a mycotoxin (e.g., wherein the template is utilized to generate a MIP in a process of the invention and subsequently removed there from, the MIP displays high affinity for the mycotoxin resembled by the exterior functional groups), wherein the mycotoxin is selected from the group comprising acetoxyscirpenediol, acetyldeoxynivalenol, acetylnivalenol, acetylneosolaniol, acetyl T-2 toxin, extended to all aflatoxins, aflatoxin B1, B2, G1 and G2, aflatrem, altenuic acid, alternariol, austdiol, austamide, austocystin, avenacein +1, beauvericin +2, bentenolide, brevianamide, butenolide, calonectrin, chaetoglobosin, chaetocin, chaetomin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasins, cyclopiazonic acid, deacetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diacetate, deoxynivalenol monoacetate, diacetoxyscirpenol, destruxin B, emestrin, enniatins, extended to all ergot alkaloids toxins and endophytes such as ergine, ergocornine, ergocristine, ergocryptine, ergometrine, ergonine, ergosine, ergotamine, ergovaline, lysergol, lysergic acid, and related epimers, fructigenin +1, fumagilin, fumonisins, fumonisins A1, A2, B1 and B2 and B3, fusarenon-X, fusarochromanone, fusaric acid, fusarin, gliotoxin, HT-2 toxin, hyalodendrin,

ipomeanine, islanditoxin, isofumigaclavines A and B, lateritin +1, leptosin, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzine, moniliformin, monoacetoxyscirpenol, mycophenolic acid, neosolaniol, nivalenol, NT-1 toxin, NT-2 toxin, extended to all ochratoxins, oosporein, oxalic acid, paspalitrem A and B, patulin, penicillic acid, penitrem, phomopsins, PR-toxin, roridin E, roquefortine A and B, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxins, F,G,H, scirpentriol, sirodesmin, slaframine, sporidesmin, sterigmatocystin, swainsonine, T-1 toxin, T-2 toxin, tenuazoic acid, triacetoxyscirpendiol extended to all trichothecenes, trichodermin, trichothecin, trichoverrins, trichoverrols, tryptoquivalene, verrucarin, verruculogen, verticillins, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, wortmannin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenols, zearalanones, zearalenone, α, β, zearalanone, α, β, zeranol and subfamilies and/or derivatives of the same, and/or conjugates. In certain embodiments, the target compound is OTA, sporidesmin, or ergot alkaloids.

Similarly, a variety of MIPs can be generated and utilized including, but not limited to, a MIP generated utilizing any one of the above mentioned synthetic templates or any other organic molecule as a template (e.g., nutrient such as vitamins, drugs, antibiotics, contaminants, hormones, enzymes, proteins, etc.).

MIPs described herein find use in a variety of applications. For example, in some embodiments, MIPs are utilized for purification of liquids. For example, in some embodiments, MIPs are utilized to selectively remove target compounds (e.g., one or more mycotoxins) from a liquid. The present invention is not limited by the target compounds (e.g., one or more mycotoxins) removed from liquid. Indeed, a variety of target compounds may be removed including, but not limited to, mycotoxins described herein. Similarly, the present invention is not limited by the type of liquid from which a target compound is removed. Indeed, a variety of different liquid solutions can have one or more target compounds (e.g., mycotoxins) removed there from (e.g., by administering one or more different types of MIPs to the solution) including, but not limited to, beverages (e.g., consumed by humans (e.g., juice, wine (e.g., white wine, red wine, etc.), water, beer, tea, coffee, etc.)), water (e.g., used in aquaculture, drinking water, etc.), liquids utilized in the production of foodstuffs (e.g., human, animal foodstuffs), biological fluids (e.g., blood, rumen fluid, stomach fluid, etc.), etc.

For example, in some embodiments, compositions and methods described herein provide MIPs that selectively remove target compounds (e.g., mycotoxins) from a liquid. The liquid can

be a beverage, water, biological sample, potable water supply, blood, rumen fluid, or other type of liquid that contains target compounds. Additionally, target compounds can be removed from other types of fluids. In some embodiments, MIPs described herein are contacted with (e.g., mixed with) a liquid for a sufficient amount of time that allows the MIP to interact with and bind to a target compound (e.g., mycotoxin). Although an understanding of the mechanism is not necessary to practice the present invention and the present invention is not limited to any particular mechanism, in some embodiments, after the liquid is allowed to interact with the MIP, complexing/binding cavities contained in the MIP (e.g., cavities remaining after the template molecule is removed from the MIP) bind target compound upon contact, effectively removing the target compound from the liquid. The liquid can then be further processed, packaged, or made ready for consumption (e.g., for human consumption, for animal consumption, or for animal habitats). In some embodiments, MIPs generated and/or provided herein possess a rigid structure that withstands physical and chemical forces associated with the removal/sequestration process. For example, in a preferred embodiment, a MIP provided herein binds selectively to a target compound, thereby removing the target compound from a substance (e.g., liquid, solid surface, biological fluid (e.g., blood, rumen fluid, etc.), necessary to sustain life (e.g., air or aquaculture medium), etc.), and maintains association with the target compound as the MIP-target compound complex is collected and/or removed from the substance (e.g., pumping liquid through a filter, pouring liquid through a filter, dipping a filter into a liquid, coating the MIP on the surface of a container, centrifugations, coating the MIP on the surface of a filter, animal feces excretion, etc.).

In one embodiment, a method of removing target compounds from a liquid is highly selective. For example, a liquid may contain a multitude of target compounds wherein the MIP selectively removes only one specific target compound (e.g., mycotoxin), where "one" refers to the type of target compound and not the number of target compounds removed. In some embodiments, a plurality of MIPs (e.g., a plurality of different populations of MIPs (e.g., wherein one population of MIPs is specific for one type of mycotoxin (e.g., ochratoxin) and a second population of MIPs is specific for a second type of mycotoxin (e.g., aflatoxin) are administered to a liquid and allowed to interact for a sufficient amount of time to selectively remove a plurality of different types of target compounds (e.g., mycotoxins) from the liquid. The present invention is not limited by the number of different types of MIPs that are

administered to a liquid comprising a plurality of different types of target compounds (e.g., mycotoxins). In some embodiments, a liquid comprises 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 or more different types of target compounds (e.g., mycotoxins), to which a composition comprising 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, or more different types of MIPs with specificity for one of the plurality of target compounds are administered to the liquid under conditions such that the MIPs interact with and sequester the target compounds. In some embodiments, a MIP displays specific affinity for a single target molecule/compound. In some embodiments, a MIP displays specific affinity for a group of molecules having a common chemical or physical property. In some embodiments, a MIP possesses a plurality of different complexing/binding cavities for different target compounds such that the MIP is able to selectively bind multiple target compounds, following the use of a plurality of target molecule/compound when processing the MIP.

In some embodiments, the present invention provides a method of removing target compounds from a liquid comprising a plurality of different types of target compounds (e.g., mycotoxins or other organic molecule target molecule/compound (e.g., nutrient such as vitamins, drugs, antibiotics, contaminants, hormones, enzymes, proteins, etc.)). In some embodiments, the method includes a group of different types of MIPs designed to bind different target compounds. For example, in some embodiments, a sample of a liquid is provided wherein an assay is performed to identify the presence of one or more target compounds in the liquid sample. The presence of specific mycotoxins can be detected in order to determine which mycotoxins are present. Upon identification of the one or more types of target compounds present in the liquid sample (e.g., wherein the liquid sample is representative of the characteristics of the liquid from which the sample was taken), one or more MIPs are generated (e.g., according to methods described herein) and/or combined, and then the one or more MIPs are administered to the liquid solution to remove target compounds. In some embodiments, identification of the one or more types of target compounds comprises use of columns and/or filters comprising one or more MIPs specific for target compounds. In some embodiments, once a MIP is utilized for removal of target compound from a sample (e.g., a liquid sample), the target compound is removed from the MIP and the MIP is reused. In some embodiments, the MIP is disposed of in an appropriate manner. For example, target compounds can be removed from a MIP (e.g., in order to make the MIP reusable) via washing with a suitable solvent and/or solution, that can be chosen from the solvents used in the methods to dissociate MIPs from the template following the synthesis

reactions, and physical processing of MIPs (e.g., including but not limited to, acetonitrile, toluene, methanol, sodium hydroxide, acetic acid, etc.), or the like. The recycled MIPs are then returned to use.

Methods of removing target compounds from a liquid can produce high recovery yields because of the selective nature of MIPs. In some embodiments, a removal method recovers from about 25% to about 99% of the target compound present in a liquid. In some embodiments, a removal method recovers from about 35% to about 99% of the target compound present in a liquid. In some embodiments, a removal method recovers from about 50% to about 99% of the target compound present in a liquid. In some embodiments, a removal method recovers from about 75% to about 99% of the target compound present in a liquid. In other embodiments, a removal method lowers the resulting target compound concentration of the liquid to a level on the parts per billion (ppb) (e.g., to a concentration that is appropriate for human and/or animal consumption). Methods of removal can be tailored to provide specific concentration levels as found in current and proposed regulatory schemes known to those skilled in the art. In some embodiment, methods of removal are used on liquids with specific pH levels. For example, compositions and methods of the invention can be utilized with liquids having a pH between about 1 and 13.

In some embodiments, MIPs are utilized to remove target compounds from a surface. For example, certain embodiments of the present invention provide methods for decreasing the presence of target compounds (e.g., mycotoxins) on a surface comprising contacting the surface with a composition comprising a MIP. In specific embodiments, the contacting is performed for a time sufficient for the MIP to bind to and/or sequester target compounds. In other embodiments, the present invention provides a method of decontaminating an environmental surface harboring target compounds. In one such embodiment, the target compound is associated with an environmental surface and the method comprises contacting the environmental surface with an amount of a composition (e.g., comprising a MIP) sufficient for decontaminating the surface. While it may be so desired, decontamination need not result in total elimination of the target compound. In some embodiments, the compositions (e.g., comprising a MIP) and methods further comprise dyes, paints, and other marking and identification compounds so as to ensure that a treated surface has been sufficiently treated with a compositions of the present invention.

In some embodiments, MIP's are utilized to prevent a target compound from coming into contact with a surface or other compound (e.g., soil). For example, certain embodiments of the present invention contemplate methods for making compositions whereby MIP's are combined with other materials (e.g., plastic or starch type product) and applied to vegetation (e.g., growing agricultural vegetation) to protect the vegetation from surface compounds (e.g., mycotoxin) during growth and further preventing the compounds from contaminating other compounds (e.g., soil).

In certain embodiments, a surface (e.g., external or internal surface) of a subject (e.g., human or animal) is treated (e.g., externally or internally) with a composition of the present invention. In other embodiments, the contacting is via oral, nasal, buccal, rectal, vaginal or topical administration. When the present compositions are administered as pharmaceuticals, it is contemplated that the compositions further comprise pharmaceutically acceptable adjutants, excipients, stabilizers, diluents, and the like. In still further embodiments, the present invention provides compositions further comprising additional pharmaceutically acceptable bioactive molecules (*e.g.*, antibodies, antibiotics, means for nucleic acid transfection, vitamins, minerals, co-factors, factors capable of binding to and/or sequestering mycotoxins (e.g., yeast cell wall extracts (e.g., yeast cell wall extracts combined with a clay material, and/or yeast cell wall extract containing clay and/or clay particles integrated and/or interlaced into the yeast cell wall), etc.). In some embodiments, a subject is administered a composition of the invention (e.g., comprising MIPs) in order to therapeutically treat a disease or condition (e.g., athlete's foot). In other embodiments, a subject is administered a composition of the invention (e.g., comprising MIPs) in order to prophylactically treat (e.g., prevent the onset of signs or symptoms of) a disease or condition (e.g., athlete's foot). In some embodiments, compositions (e.g., comprising MIPs) and methods are applied to any type of area or surface. For example, in some embodiments, the area comprises a solid surface (e.g., a medical device), a solution, the surface of an organism (e.g., an external or internal portion of a human), or a food product.

The present invention is not limited by the amount of one or more MIPs administered to (e.g., mixed with) a liquid or solid (e.g., for the removal of target compounds). In some embodiments, about 0.10 mg, 0.50 mg, 1.0 mg, 2.0 mg, 5.0 mg, 10.0 mg. 20.0 mg, 50.0 mg, 100.0 mg, 500.0 mg or more of a MIP is administered per liter of liquid or solid.

In some embodiments, a MIP of the present invention is used for a toxin elimination method such as hemoperfusion. Hemoperfusion is a treatment technique in which large volumes of a subject's blood are passed over an adsorbent substance (e.g., MIP) in order to remove toxic substances from the blood.

Normally, the sorbents most commonly used in hemoperfusion are resins and various forms of activated carbon or charcoal. However, binding specificity of these materials are relatively poor and sometimes they adsorb important blood factors as well as target molecules. Accordingly, in some embodiments, the present invention provides for the use of a MIP of the invention as more specific and high affinity sorbents for target molecules.

Hemoperfusion works by pumping the blood drawn through the arterial catheter into a column or cartridge containing the sorbent material (e.g., in some embodiments, the present invention provides that the sorbent material utilized is a MIP described herein). As the blood passes over the carbon or resin particles in the column, the toxic molecules or particles are drawn to the surfaces of the sorbent particles and trapped within the column. The blood flows out the other end of the column and is returned to the subject through the tubing attached to the venous catheter. Hemoperfusion is able to clear toxins from a larger volume of blood than hemodialysis or other filtration methods; for example, it can process over 300 mL of blood per minute.

A MIP of the present invention may be used for hemoperfusion. In some embodiments, MIPs of the invention are utilized to remove one or more mycotoxins from the blood of a subject using hemoperfusion.

Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic or prophylactic response). For example, a single bolus containing MIP's may be administered to an animal, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. The dosages of the MIPs of the present invention are generally dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic or prophylactic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity to mycotoxins in individuals. The dosage administered will, of course, vary depending upon known factors such as the pharmacodynamic characteristics of the particular agent, and its mode and route of

administration; age, health, and weight of the recipient; nature and extent of symptoms, kind of concurrent treatment, frequency of treatment, and the effect desired.

The MIPs of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration to a subject. For example, the pharmaceutical composition may comprise MIPs and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Examples of pharmaceutically acceptable carriers include one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Pharmaceutically acceptable carriers may further comprise minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the MIPs.

In certain embodiments, the MIPs of the invention may be orally administered, for example, with an inert diluent or an assimilable edible carrier. The compound (and other ingredients, if desired) may also be enclosed in a hard or soft shell gelatin capsule, compressed into tablets, or incorporated directly into the subject's diet. For oral therapeutic administration, the compounds may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, pellets, and the like. To administer a compound of the invention by other than parenteral administration, it may be necessary to coat the compound with, or co-administer the compound with, a material to prevent its inactivation.

Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions. In certain embodiments, MIPs of the invention are co-formulated with and/or co-administered with one or more additional therapeutic agents.

The pharmaceutical compositions of the invention may include a "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of the MIPs of the invention. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the

ability of the imprinted nanoparticle to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the imprinted nanoparticle are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

In some embodiments, when admixed with organic matter (e.g., feedstuffs), and/or liquid (e.g., water, wine or other beverage) and/or fed directly to a subject, compositions of the present invention decrease the absorption or uptake of mycotoxins by the subject (e.g., thereby alleviating reduced performance, increasing health and/or reducing the incidence of mycotoxin-associated diseases or pathological responses in the subject) and reducing and/or preventing deposition of mycotoxins or their metabolites in meat, fish, eggs, milk and the other products destined to enter human food chain.

In some embodiments, the present invention is used to generate separation devices (e.g., solid-phase extraction (abbreviated as SPE)) that are used to remove solid or semi-solid compounds from a mixture of impurities based on their physical and chemical properties that is different from the conventional separation devices available (e.g., normal phase, reverse phase, or ion exchange-solid-phase extraction). In some embodiments, separation devices can be incorporated in a cartridge serving at extracting and consequently purifying the specific corresponding template and template analogs of the MIP produced.

In some embodiments, the present invention can serve for the packing of chromatographic column used with liquid chromatography and enabling the specific elution of corresponding template and template analogs of the MIP used. The MIP columns produced enables a more specific interaction than the available other techniques and materials known in the art (e.g., normal phase, ion exchange, reverse phase silica columns comprising various size of hydrophobic alkyl chains ($-(CH_2)_n-CH_3$ with n equal to 4, 8, 18, but not limited to) that interact with peptides and small molecules) but more specifically directed to the corresponding template and template analogs of the MIP produced. In some embodiment, a plurality of different types of MIPs each dedicated to a specific mycotoxin or group of mycotoxins can be used for the packing of the column.

In some embodiments, the present invention provides materials for separating, and quantifying mycotoxins. The present invention can then be utilized for traceability measurement of the feed/food material, or liquid source for the purpose of measuring the mycotoxins present in sample and its comparison to a commonly accepted referenced compound (e.g., mycotoxin standard material eluted using HPLC hyphenated to UV-, fluorescent detector or mass spectrometry detectors, etc.)

In some embodiments, traceability of the mycotoxin level can be accomplished using single type of MIP or a plurality of different types of MIPs, each tailored to a specific mycotoxin or group of mycotoxins, and applied to the detection in sample materials comprising of a feed or food sample (e.g., samples of grains (e.g., maize, wheat, etc.), fruits (e.g., apple, pears, grapes, etc.), coffee, tea, cocoa, etc.).

In some embodiments, traceability of the mycotoxin level using single MIP or a plurality of different types of MIPs each tailored to target a specific mycotoxin or group of mycotoxins, is applied to analytical investigation (e.g., HPLC) to determine if mycotoxins are present in the sample and if so, which mycotoxin(s) are present and at what levels. In some embodiments the analytical tools used for detecting mycotoxins (e.g., HPLC) can be used to predict danger of mycotoxin contamination in feed. In other embodiments the analytical tools used for detecting mycotoxins can be used to determine which MIP's or combination of MIP's are needed for application to the material from which a sample was taken in order to reduce or eliminate the mycotoxin(s) present.

In some embodiments, traceability of the mycotoxin level using single MIP or a plurality of different types of MIPs each dedicated to a specific mycotoxin or group of mycotoxin, is applied to the detection of the mycotoxin content of liquids used in animal production systems or used as beverages for animal and human consumption (e.g., water, milk, juices, wine, beer, etc.).

In some embodiments, traceability in terms of mycotoxin content can be applied to feed/food processing (meat processing, fresh produce processing) to test for the presence of mycotoxins during the entire production flow to determine where an issue of contamination arises, and a recall is required. Barcodes and other tracking media, all movement of product and steps within the production process should be referenced accordingly to allow the traceability of the sample analyzed.

In some embodiments, traceability of the mycotoxin level using single MIP or a plurality of different types of MIPs each dedicated to a specific mycotoxin or group of mycotoxins, is applied to the detection of the mycotoxin content of blood. For example, the present invention can be used in transfusion practice, to facilitate the continuous audit trail accounting for the whereabouts of a blood product and its current status in terms of processing, testing, storage, etc. at all points from initial collection from a donor right through to either transfusion to a recipient or disposal through the traceability of the mycotoxin level.

In some embodiments, the present invention utilizes MIPs described herein in combination with one or more methods and/or materials described herein for use in compositions and/or methods for the reduction, removal and/or elimination of mycotoxins (e.g., physical, mixing, chemical, microbiological methods described herein (e.g., to adsorb and/or sequester toxins)). For example, in some embodiments, a MIP described herein is utilized with one or more physical, mixing, chemical, or microbiological methods to sequester mycotoxins. A variety of physical means can be used to reduce mycotoxins presence such as mechanical separation (See, e.g., Dickens J.W., and Whitaker T.B., 1975. Peanut Science, **2**: 45-50), density segregation (See, e.g., Huff W.E., and Hagler W.M., 1982. Cereal Chemistry, **59**: 152-153), grain cleaning by washing with water or sodium carbonate to reduce contamination of maize (e.g., with Fusarium toxins), sorting out contaminated grains (e.g., via physical separation or fluorescence to detect the presence of mycotoxins), thermal inactivation (See, e.g., Lee L.S., 1989. Journal of American Oil Chemistry Society, **66**: 1398-1413), UV irradiation , X-rays or microwave irradiation (See, e.g., CAST, 2003. *Mycotoxins: Risk inplant, animal, and human systems*. In: Task Force Report 139 (Niyo K. ed.), Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA: pp. 1-199),, and solvent extraction of toxins (See, e.g., Scott P.M., 1998. Review of Veterinary Medicine, **149**: 543-548). A variety of chemical agents such as acids, bases (e.g., ammonia, caustic soda), oxidants (e.g., hydrogen peroxide, ozone), reducing agents (e.g., bisulphites), chlorinating agents and formaldehyde, have been used to degrade mycotoxins in contaminated feeds, particularly aflatoxins (See, e.g., Hagler W.M, Jr., 1991. In Mycotoxins, Cancer and Health. (Bray G. and Ryan D. eds.) Lousiana State University Press, Baton Rouge, LN, USA; Phillips T.D., Clement B.A., and Park D.L., 1994. *Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds*. In: The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary agriculture significance (Eaton L.D. and Groopman J.D. eds.), Academic Press, New

York, NY, USA: pp. 383-406;). Filters (e.g., filtration columns) and similar devices can likewise be utilized to remove mycotoxins.

The invention also provides systems and methods of providing various aspects of a product (e.g., products and /or components thereof of the invention and/or service utilizing the invention). The invention also provides systems and methods of providing company products to a party outside of the company, for example, a system and method for providing a customer or a product distributor a product of the company such as one or more MIPs (e.g., specific mycotoxin-targeted MIPs). For example, in some embodiments the present invention provides a product management system which can be separate from or combined with a traceability system. For example, samples of materials can be analyzed to determine if mycotoxins are present or absent in the material; if mycotoxins are present, the specific mycotoxins can be identified. This information can be used for traceability (e.g., to demonstrate the absence of all or certain mycotoxins). This information can also be used to provide a system for MIP product management whereby specific combinations of MIP's can be created and combined together to specifically target the mycotoxins present in the sample material.

In some embodiments, the company receives input (e.g., in the form of an order, information, or materials (e.g., biological sample (e.g., liquid sample suspected of comprising target compounds)) from a party outside of the company (e.g., a distributor and/or customer) to an order department; and provides output (e.g., in the form of a product delivered from shipping department (e.g., to a distributor and/or customer) or in the form of data report (e.g., traceability as laboratory analysis service)). In some embodiments, the product management system is organized to optimize receipt of orders and delivery (e.g., in a cost efficient manner) of products (e.g., compositions comprising one or more MIPs (e.g., mycotoxins-specific MIPS)) to a party outside of the company; and to obtain payment for such product from the party. In some embodiments, the product management system is organized to bar-code the samples or materials submitted for analysis and delivery (e.g., in a cost efficient manner) of datasheet reports (e.g., levels of several mycotoxin that were analyzed through the use of MIP-SPE or HPLC-columns made of MIPs (e.g., mycotoxins-specific MIPS)) to a party outside of the company; and to obtain payment for such service from the party.

In some embodiments, the company comprises manufacturing and administration. Compositions of the present invention can be produced in manufacturing and/or by a third party,

and can be stored separately therein such as in materials storage and/or other component storage (e.g., product storage) and/or can be further assembled (e.g., combined (e.g., one or more MIPs can be combined with one or more other types of MIPs and /or with other components (e.g., carriers and/or other bioactive components described herein))) and stored (e.g., in device and/or product storage). In some embodiments, administration includes order department (e.g., that receives input in the form of an order for a product from customer and/or distributor). Order department can then provide output in the form of instructions to shipping department to fill the order (i.e., to forward products as requested to customer or distributor). In some embodiments, the shipping department, in addition to filling an order for the product or for the service, can also provide information/data to billing department. In some embodiments, other component of company may include customer service department (e.g., that can receive input from customer and/or provide output in the form of feedback or information to customer and/or can receive input or provide output to any other component of company). For example customer service department may also receive input from customer in the form of requested technical information, for example, for confirming that products and methods of the invention can be applied to the particular need of customer, and can provide output to customer in the form of a response to the requested technical information.

Thus, in some embodiments, components of company are suitably configured to communicate with each other to facilitate the transfer of materials and parts, devices, other components, products, datasheets and information within and outside of company. For example, a physical path can be utilized to transfer products from product storage to shipping department upon receiving suitable input from order department or from sample storage to analytical department upon the reception of rush analysis request. Order department, in comparison, can be linked electronically with other components within company, for example, by a communication network (e.g., a network (e.g., internet and/or intranet)), and can be further configured to receive input, for example, from customer by a telephone network, by mail or other carrier service, or via the internet.

In some embodiments, a product management system further comprises one or more data collection systems.

In some embodiments, company can utilize a number of software applications to provide components of company with information and/or to provide a party outside of company access to

one or more components of company (e.g., access to order department and/or customer service department and/or data collection/storage). Such software applications may comprise a communication network such as the Internet, a local area network, or an intranet. For example, in an internet-based application, customer can access a suitable website and/or a web server that cooperates with order department such that customer can provide input in the form of an order to order department. In response, order department can communicate with customer to confirm that the order has been received, and can further communicate with shipping department, providing input that products of the invention (e.g., compositions comprising one or more different types of MIPs (e.g., mycotoxins-specific MIPs)) should be shipped to customer or to the analytical department, providing input that the analyses using the products of the invention (e.g., compositions comprising one or more different types of MIPs (e.g., mycotoxins-specific MIPs) packed as separative devices) should be performed. Thus, in this manner, the business of company can proceed in an efficient manner.

Thus, in some embodiments, in a networked arrangement, various subcomponents of a company (e.g., storage, analytical, billing department and shipping department) can communicate with one another by way of respective computer systems. In some embodiments, the present invention provides methods for providing various aspects of a product (e.g., products and/or components thereof of the invention), as well as information regarding various aspects of a product of the present invention (e.g., performance data, usage statistics, etc.), to parties (e.g., customers/users, distributors, third parties (e.g., government agencies (e.g., National Institutes of Health and/or the Centers for Disease Control), etc). In some embodiments, a product is removed from product storage, for example, by shipping department, and sent to a requesting party such as customer or distributor. Typically, such shipping occurs in response to the party placing an order, which is then processed (e.g., forwarded to appropriate party) within the organization and results in the ordered product being sent to the party or service being provided to the party. Data regarding shipment of the product or the datasheets of analytical service to the party can be transmitted further within the organization, for example, from shipping or analytical department to billing department, which, in turn, can transmit a bill to the party, either with the product or datasheet, or at a time after the product or datasheet has been sent The present invention also provides methods of providing technical service to parties using a product and/or components thereof of the invention. While such a function may be performed by individuals

involved in product research and development, inquiries related to technical service can generally be handled, routed, and/or directed by an administrative department of the organization (e.g., customer service department). Technical service (e.g., solving problems related to use of the product or individual components of the product) communications may require exchange of information between a user (e.g., customer) and customer service department.

As mentioned above, any number of variations of a process of providing products (e.g., a products and/or components thereof described herein) and/or service s to a user are possible and within the scope of the invention. Accordingly, the invention includes methods (e.g., business methods) that involve (1) the production of products (e.g., a product and/or components thereof described herein); (2) receiving orders for these products; (3) sending the products to parties placing such orders; (4) sending bills to parties obliged to pay for products sent to such; and/or (5) receiving payment for products sent to parties. For example, methods are provided that comprise two or more of the following steps: (a) obtaining parts, materials, and/or components from a supplier; (b) preparing one or more first products (e.g., one or more components described herein (e.g., a MIP template described herein, and/or one or more different types of MIPs generated utilizing the MIP template)); (c) storing the one or more first products of step (b); (d) combining the one or more first products of step (b) with one or more other components to form one or more second products (e.g., a composition comprising two or more different types of MIPs); (e) storing the one or more first products of step (b) or one or more second products of step (d); (f) obtaining an order for first product of step (b) or a second product of step (d); (g) shipping either the first product of step (b) or the second product of step (d) to the party that placed the order of step (f); (h) tracking data regarding the amount of money owed by the party to which the product is shipped in step (g); (i) sending a bill to the party to which the product is shipped in step (g); (j) obtaining payment for the product shipped in step (g) (generally, but not necessarily, the payment is made by the party to which the product was shipped in step (g)); and (k) exchanging technical information between the organization and a party in possession of a product shipped in step (d) (typically, the party to which the product was shipped in step (g)).

A purchaser may wish to purchase one or a plurality of different types of MIPs. In some embodiments, a composition comprising a plurality of different types of MIPs is customized for the purchaser (e.g., based on information regarding the presence of one or more types of target compounds to be eliminated/sequestered). An advantage of this is that a customer may be able

to customize a particular product to their needs (e.g., purchase a composition comprising a plurality of different types of MIPs specific for each target compound, rather than separately purchasing compositions comprising only a single MIP, and then utilizing each composition in combination with others).

The invention further provides methods associated with the design of custom products. These methods include, for example, (1) taking an order from a customer for product with specific subcomponents and/or methodology for operating the same, (2) preparation of the product with specific subcomponents and/or methodology for operating the same, (3) and providing (e.g., shipping) the product of (b) to the customer.

EXPERIMENTAL

The following examples are provided in order to demonstrate and further illustrate certain preferred embodiments and aspects of the present invention and are not to be construed as limiting the scope thereof.

Example 1

Ochratoxin A template synthesis

Preparation of 2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid. A 1 L, round-bottom, three neck flask equipped with: a mechanical stirrer, a thermometer and a 125 mL dropping funnel with pressure equilibration was placed in a water bath maintained at 65°C. The following reagents were subsequently charged to the flask with an efficient stirring: 250 mL of dry toluene, 2.5 mL of concentrated sulfuric acid and 207 g of well ground, solid 3,5-dichlorosalicylic acid, which forms a mobile suspension. When the temperature of this constantly stirred mixture reached 60°C (with the water bath temperature maintained at 65°C) a drop-wise addition of 108 g (100 mL) of acetic anhydride was initiated and completed within 30 min. During the acetic anhydride addition the temperature of the reaction mixture was not allowed to exceed 75°C. After completing the addition, the mixture was stirred and heated to 70°C for another 4 h. After this time, the agitation was stopped and the mixture cooled over night to room temperature. The white crystals that separated from the mixture were filtered off, washed with 2 × 10 mL of ice-cold toluene and vacuum dried at 50°C to yield 206 g (82.7% yield) of 2-acetoxy-3,5-

dichlorobenzoic acid. An additional 30.6 g (12.3%% yield) of the product was recovered by: concentrating the filtrate to ½ of the original volume, cooling the solution in an ice-water bath, filtering off the crystalline product and vacuum drying it at 50°C.

In situ preparation of 2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid chloride and its use in preparation of N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine ethyl ester (Because of personnel safety the process was carried out under a fume hood).

The production system was made of a 3 L reactor equipped with an efficient mechanical stirrer (Ace Glass Inc, Louisville, KY, cat#13650-12/23) a 250 mL dropping funnel, a reflux condenser with $CaCl_2$ drying tube with the outlet attached to the acidic vapors absorber, a dry nitrogen gas inlet and a thermometer placed in a water bath of 22°C. One liter of dry toluene, 5 mL of dimethylformamide and 103 g of 2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid were charged into the reactor under agitation. A drop by drop addition into the reaction mixture of 217 mL (1.05 equiv.) of 2 M oxalyl chloride solution in methylene dichloride was done under stirring over 2.5 h. A stream of a toxic gasses mixture: HCl, CO and CO_2, which was produced in the reaction was absorbed in 1 L of 10% sodium hydroxide solution placed in a trap cooled with tap water. After completing the addition of oxalyl chloride accompanied by complete dissolution of solids, a strong stream of dry nitrogen was passed through the solution for 1 h to remove most of acidic gasses (HCl, CO_2) that stayed dissolved in the reaction mixture. After this time the content of the flask was cooled below 15°C in an ice-water bath, and 95 g (1.0 equiv.) of solid L-phenylalanine ethyl ester hydrochloride was added into the mixture. A new 500 mL dropping funnel was installed in place of the 250 mL funnel and filled with a solution of 145 mL of triethylamine (2.55 equiv.) in 350 mL of toluene. The triethylamine solution was then added over a 2 hr time period into the ice-water bath cooled and stirred reaction mixture. During the time of addition, the temperature of the mixture was maintained below 25°C. This temperature was maintained for 4 h after the completion of the triethylamine addition and then the triethylamine hydrochloride was filtered off and the white cake washed with two 100 mL portions of toluene. The filtrate was then transferred into a 3 L separatory funnel and washed with two 500 mL portions of water and one 500 mL portion of brine. The toluene layer was then concentrated to a volume of 500 mL and left over night in a refrigerator for crystallization. The white crystals were collected on the filter and washed with one 100 mL of ice-cold toluene, yielding 108.7 g (62%% yield) of ethyl ester of N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-

phenylalanine.

^{1}H NMR (deutereted chloroform (abbreviated as $CDCl_3$), ppm): 7.78 δ, J 2.8, 1H; 7.55 δ, J 2.4, 1H; 7.30-7.27 m, 3H; 7.11 broad δ, J 8.0, 1H; 7.08 δq, J 8.0 and 1.6, 1H; 4.99 q, J 6.0, 1H; 4.24 q, J 7.0, 2H; 3.29 dd, J 5.6 and 14.4, 1H; 3.21 dd, J 9.2 and 14.0, 1H; 2.11 s, 3H; 1.31 t, J 7.2, 3H.

Preparation of N-(3,5-dichloro-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanine (OTA template). One hundred and eight grams of ethyl ester of N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine were dissolved in 1 L of anhydrous ethyl alcohol and placed in a 2 L round bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar and placed in water bath at ambient temperature. Into this mixture a solution of 33.33 g of sodium hydroxide in 37.2 mL of water was added in a single portion and the mixture stirred at ambient temperature for 17 h (overnight). A volume of 68.6 mL of concentrated hydrochloric acid was added under stirring, which was maintained for an additional of 2 h. The precipitated sodium chloride was filtered off and the filtrate evaporated to dryness at 60°C under 30 T of pressure. The residue of 88.9 g (98% yield) solidified after cooling in form of a colorless glassy product, which was well soluble in toluene or acetonitrile, thereby producing an OTA template (e.g., for use in MIP-OTA production). MS: M^+ 354 and 356 ^{1}H NMR ($CDCl_3$, ppm): 12.2 very broad s, 1H; 7.49 d, J 2.4, 1H; 7.35-7.28 m, 3H; 7.20 d, J 2.0, 1H; 7.18-7.16 m, 2H; 6.80 br d, J 6.4, 1H; 6.4 very broad s, 1H; 5.07 dd, 5.2 and 5.2, 1H; 3.34 dd, J 14.0 and 5.2, 1H; 3.27 dd, J 13.6 and 5.2, 1H.

Example 2

MIP-OTA synthesis in toluene-cyclohexane mixture

Five hundred milliliters of toluene, 35.42 g (0.1M) of OTA template, 16.18 mL (0.15 M) of 2-vinylpyridine, 12.13 mL (0.1 M) of 2-hydroxyethylmethacrylate, 235.75 mL (1.25 M) of ethylene glycol dimethacrylate and 2.46 g (15 mM) of AIBN were placed in a 3 L four necks flask equipped with a: mechanical stirrer, reflux condenser, thermometer and nitrogen inlet/outlet. The resulting clear solution was stirred for 1 h at room temperature and a constant stream of nitrogen passed through the vessel (e.g., to remove oxygen that can inhibit polymerization). The flask was then heated to 60°C and the mixture vigorously stirred. Polymerization occurred as long as the temperature of the solution increased to ~55°C (e.g., observed by an increase in the viscosity of the solution). Fifteen minutes after polymerization

began, 600 mL of (1:1) cyclohexane/toluene mixture was added in a single portion to promote polymer sphere separation from the solution. Vigorous agitation of the mixture was maintained and an additional 500 mL of toluene added 30 min later to improve the overall mixing of the still growing volume of solid MIP suspension in a relatively low volume of solvent. A temperature of 60°C and agitation was maintained for an additional 5 h after which the agitation was turned off to let MIP spheres sediment. The supernatant was decanted and the pellet transferred into a 2 L rotary evaporator flask to remove the remnant solvents from the MIP spheres, at 40°C and under a reduced pressure of 30 T. The dried spheres were grinded to approximately 140 mesh and washed 5 times, by stirring with 1.5 L of 0.2 w/v% sodium hydroxide solution for 30 min and decantation. The final portion of the MIP-OTA spheres was mixed with 1.5 L of 0.5 v/v% acetic acid, which was also decanted and 1.5 L of DI water. The resultant template-free wet MIP-OTA spheres (~1.0 L volume) were dried in a laboratory oven at 80°C for 4 h, using four glass trays. The white powder-like MIP-OTA weighed 248 g (93% yield). Various samples identified in Table 1 below were synthesized utilizing this method.

For this and subsequent synthesis procedures, polymerization inhibitors were removed from monomers and cross-linker by vacuum distillation, before being used in polymerization, and the solvents used in polymerization were of ACS purity. The concentration of the template in subsequent washes was obtained by comparing the intensity of the red-orange color of the Fe^{3+}complex of the template at λ_{max} 385 nm with the calibration curve constructed for template concentrations between 10 μg/mL and 1 mg/mL.

Table 1. Identification of the samples synthesized in toluene-cyclohexane mixture

Sample ID	Toluene-cyclohexane (mL)	Final washing	Morphology
523-29/30	45/15	Ethanol	Spheres , white powder
523-31	65/15	Ethanol	Spheres , white powder
523-34	65/35	Ethanol/NaOH	Spheres, white powder
523-35	55/22	Ethanol/NEt_3/H_2O	White powder, clusters
523-36	90/30	NaOH/H_2O	White clusters

Example 3

OTA MIP synthesis in acetonitrile

Five hundred milliliters of acetonitrile, 17.71 g (50 mM) of OTA template, 8.1 mL (75 mM) of 2-vinylpyridine, 6.1 mL (50 mM) of 2-hydroxyethylmethacrylate, 117.9 mL (625 mM) of ethylene glycol dimethacrylate and 1.23 g (15 mM) of AIBN were placed in a 3 L four necks flask equipped with a: mechanical stirrer, a 500 mL dropping funnel with pressure equilibration, a thermometer and nitrogen inlet/outlet and heated with an electric heating mantel. The resulting clear solution was stirred for 1 h at room temperature and a constant stream of nitrogen passed through the vessel (e.g., to remove oxygen that can inhibit polymerization). Afterwards, the flask was heated to 60°C and the mixture vigorously stirred. Polymerization ensued as long as the temperature of the solution increased to ~55°C (e.g., observed by increased viscosity of the solution). Thirty minutes after polymerization started (e.g., when gel-formation is observable), 1.5 L of acetonitrile (pre-heated to 55°C and washed with nitrogen to remove oxygen) was added rapidly, in three portions from a 500 mL dropping funnel to avoid block polymer formation and to promote the polymer spheres separation from the solution. Vigorous agitation and heating of the mixture was maintained for the next 17 h (overnight). Afterwards, heating and agitation was turned off and the MIP spheres allowed to sediment. The supernatant was decanted and the pellet transferred into a 2 L rotary evaporator flask and the rest of the solvent removed from the MIP spheres at 40°C and under reduced pressure of 30 T. The dried spheres were grinded to approximately 140 mesh and washed 5 times, by stirring with 1.5 L of 0.2 w/v% sodium hydroxide solution for 30 min and decantation. The final portion of the MIP-OTA spheres was mixed with 1.5 L of 0.5 v/v% acetic acid, which was also decanted and 1.5 L of DI water. The resultant template-free wet MIP-OTA spheres (~1.2 L volume) were dried in a laboratory oven at 80°C for 6 h, using 4 glass trays. The white powder-like MIP-OTA weighed 115 g (86.2% yield). Various samples identified in Table 2 below were synthesized utilizing this method.

Table 2. Identification of the samples synthesized in acetonitrile

Sample ID	Acetonitrile (mL)	Final washing*	Morphology
523-48	100 (+ toluene 50 mL)	NaOH	Spheres/clusters, yellow
523-49	50 (+ water 150 mL)	NaOH	Spheres, yellow/orange
523-59	225 mL	NaOH	Spheres, white
523-60	190 mL	NaOH	Spheres, white

* after 4x 0.2% NaOH washing, 1x 1%AcOH wash followed with 1x H_2O wash.

Example 4

Large scale MIP-OTA preparation in toluene

The preparation was carried in a 3 L reactor with a four necks lid, equipped with a mechanical stirrer with two propellers installed at the bottom and at halfway up, an electric heating mantel, a thermometer, a 1.5 L dropping funnel with air equilibration and nitrogen gas inlet, and a reflux condenser equipped with a bubble-meter to control nitrogen flow. The following reagents were charged into the reactor: 54.54 g (154 mM) of N-(3,5-dichloro-2-hydroxybenzoyl)-L-phenylalanine (OTA template), 25 mL (231 mM) of 2-vinylpyridine, 18.7 mL (154.0 mM) of ethylene glycol monomethacrylate, 363 g (1.925 M) of ethylene glycol dimethacrylate, 770 mL of toluene and 5.0 g (30.8 mM) of AIBN. An additional 1.5 L of toluene was placed in a dropping funnel. The reaction mixture was vigorously stirred and the dissolved gas removed by passing a strong stream of nitrogen at ambient temperature for 45 min and at first through the toluene that had been placed in the dropping funnel, and later through the void volume of the reactor. A weak nitrogen flow was maintained during the time of polymerization. Polymerization was initiated by heating the reaction mixture up to 55°C. After 15 min, the viscosity of the mixture increased and stirring became less efficient. At this point, an additional volume of toluene (of ambient temperature) was added from the dropping funnel. The addition was set to run fast enough to prevent the overheating of the mixture due to the exothermal properties of the reaction and to keep the viscosity of the reaction mixture low enough to allow efficient agitation during the time of formation and separation of the polymer spheres. The temperature of 60-70°C and stirring were maintained for the next 5 h and then the mixture was left without stirring at ambient temperature until the next day. Then, 1.75 L of the toluene layer was decanted from the MIP particles and toluene wet MIP particles grounded and

transferred to a 2.0 L rotary-evaporator flask. Most of the toluene (~0.45 L) that was trapped inside the MIP particles was distilled off from the MIP spheres under slightly reduced pressure and at a temperature below 70°C. At the end of toluene removal the powder-like product that had been formed displayed a tendency to produce dust. At this point, the evaporation was stopped and MIP particles were washed with 2 portions of ethanol of 500 mL each. Around 0.75 L of ethanol was then decanted from the solids and evaporated to yield 30 g (55%) of regenerated OTA template and 700 mL of regenerated ethanol. The white fine solids were then washed with 4 times 0.5 L portions of 0.2 w/v% NaOH followed by a single wash with 500 mL of 1 v/v% acetic acid and a single 500 mL portion of DI Water. The resultant 'wet' OTA-MIP was then dried for 24 h in a laboratory oven at 80°C. A mass of 411.4 g (96.6% yield) of white powder-like product was obtained and fractionated using standard sieves. This methodology was utilized to synthesize the various samples identified in Table 3. Details of the size repartition are provided in Table 4.

Table 3. Identification of the samples synthesized in toluene or polyvinyl alcohol (abbreviated as PVA)

Sample ID	Toluene or PVA(mL)	Final washing	Morphology
514-37/39	150 mL Toluene	NaOH*	Spheres/clusters, white
523-40	5 mL PVA +100 mL water	NaOH*	Spheres/clusters, white
514-41	5 mL PVA+ 50 mL water	NaOH*	Spheres/clusters, green
514-42/44	388+776 mL toluene	NaOH*	Spheres/clusters, white

*4x wash with 0.2% NaOH was followed with 1x wash with 1% AcOH and 1x water.

Table 4. Size repartition of the MIP-OTA produced.

Fraction size	Fraction weight (g)	w% of MIP-OTA
>106 µm	212.81	51.8
45 µm -106 µm	127.72	31.1
20 µm-45 µm	56.97	13.9
<20 µm	13.28	3.2

Example 5

Low temperature and UV initiated MIP-OTA and NIP polymerization/synthesis.

Photochemical reaction set. Quartz, photochemical UV immersion well (Ace Glass, Catalogue # 7856-10) equipped in 450 Watt UV Lamp (ACE Glass, Catalogue #7825-34) and 450 Watt Cased Power Supply (ACE Glass, Catalogue #7830-58) is attached to a circulation

chiller WKL 230 LAUDA (supplied by Brinkmann Instuments, Inc.), and cooling water of 4°C is run through the well mantle at the time when the UV lamp is on.

Polymerization (Table 5)The monomers, template, initiator (IABN) and a crosslinker are placed in a translucent, polyethylene bottle (Nalgene®style 2105) and a stream of Argon is passed through the mixture for 15 min to remove all of the oxygen, which is known to inhibit free radical polymerization. Than the bottle is closed and attached to the immersion well, at the level of the UV lamp center, and immersed, together with the photochemical reaction set, into an ice-water bath. Cooling water is run through the lamp mantle, when the light is turned on, and the reaction mixture irradiation is maintained for four hours (UV safety glasses are required at the time when the UV lamp is on). Additional ice is supplied to, and excess of water is drained from the bath during the course of the UV polymerization, to maintain cooling bath temperature at 4°C. After completing polymerization the bottle is open, the polymer is crushed and grinded into small pieces which are washed: once with ethanol, ten times with 0.2% sodium hydroxide, one time with 1% acetic acid and three times with ethanol, to remove the template from the polymer and secure maximum activity of MIP which is finally dried in a laboratory oven to remove ethanol residues. The yields of MIP-OTA were of 56.7% and 49% respectively for #555-54A and 555-54B.

Table 5. Identification of the MIP-OTA samples synthesized using low temperature and UV initiation

MIP-OTA	Styrene (mM)	2-Vinyl-Pyridine (mM)	Ethyleneglycol Monomethacrylate (mM)	Ethyleneglycol Dimethacrylate (mM)	IABN (mM)	OTA Template (mM)
555-54A	10.73	-	7.16	89.5	1.07	7.16
555-54B	-	10.73	7.16	89.5	1.07	7.16

Example 6

MIPs' sequestration capabilities toward mycotoxins – applied to OTA

MIP polymers produced either in toluene-cyclohexane, acetonitrile or toluene were tested toward OTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mycotoxin for the removal of the OTA mycotoxin from liquid or semi-liquid media via chemical interactions. The MIP produced was used herein to depict the differences in affinity of sequestration of the OTA mycotoxin and to

evaluate the specificity of the material. An amount of 12.5 mg of MIP was placed into an Amicon ultracentrifuge filter device (5,000 Da). The preparation was made together with a blank sample containing no MIP material and a positive control containing only the OTA toxin to be tested. The sequestration test was performed in citrate buffer 50 mM adjusted to pH 4.0. All samples were incubated during 90 min on an orbital rotary shaker (Brunswick, Champaign, IL, USA) at 150 rpm maintained at a temperature of 37°C. Three final concentrations of OTA were tested with the system, 50, 100, 250 parts per billion (ppb) in a final volume of 12.5 mL. After incubation the microcentrifuge tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected into amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the mycotoxin with the vial, and calculated from HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to fluorometric and diode–array detectors signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered) according to standard methods (See, e.g., Entwisle A.C., Williams A.C., Mann P.J., Slack P.T., Gilbert J., 1995. *Liquid chromatography method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: Collaborative study.* Journal of AOAC, **83**: 1377-1383).

Results (See Table 5) indicated that both MIP prepared with the OTA-template and without the template (NIP) at a concentration of 1.00 g/L had very high affinity for the OTA mycotoxin molecule at pH 4.0. According to the preparation method, the MIP generated after precipitation polymerization (identified as # 523-31 synthesized in toluene; # 523-34, -35, -36 synthesized in toluene-cyclohexane mixture; and # 523-48 synthesized in toluene-acetonitrile mixture) had an sequestration efficacy above 98.8% whereas the MIP generated after emulsion polymerization (identified as # 523-40 and -41 synthesized in water and polyvinyl alcohol; and 49 synthesized in acetonitrile) has a lower affinity below 63%. The NIP molecule is also able to interact with 98.8% sequestration efficacy. At this stage, the precipitation polymerization group exhibited no statistical differences between the NIPs and the MIPs whereas the emulsion polymerization group exhibited significant differences between MIP and NIP and also between MIPs.

Two successive washing steps under 15% ethanol/sodium hydroxide, acetic acid 1% solution were used to evaluate the ability of the two MIPs groups to preserve the interaction and to account for the strength of the sequestration (See Table 6). The emulsion polymerization group showed a robust release of the OTA from the MIP as well as a release of the remnant

template co-eluting with the OTA mycotoxin accounting for the negative percentage adsorbed. Accordingly, the present invention provides that the emulsion polymerization methodology was not suitable at creating efficient adsorbent to OTA molecules. The present invention also provides that the precipitation polymerization group had a significantly high affinity toward OTA allowing a maximum desorption of only 26.3% of the OTA molecule for the MIP synthesized in a mixture of toluene-acetonitrile without any interference with any remnant template.

Table 6. Sequestration activity of the MIPs and NIPs synthesized in toluene, acetonitrile and toluene-cyclohexane mixture for ochratoxin A and stability of the interaction after two successive washes with 15% ethanol/sodium hydroxide.

	Average still adsorbed (%)			Average desorbed (%)		
Sample ID	Initial	1st wash	2nd wash	Initial	1st wash	2nd wash
NIP 523-31#	98.84	92.52	86.66	1.162	7.478	13.342
MIP 523-34#	98.95	93.05	89.50	1.048	6.955	10.500
MIP 523-35#	99.04	90.60	86.09	0.963	9.397	13.915
MIP 523-36#	99.00	86.76	82.83	1.000	13.238	17.175
MIP 523-48#	99.73	85.76	73.71	0.273	14.242	26.293

precipitation polymerization

Example 7

Titration of the amount of MIP for the sequestration of ochratoxin A

A titration experiment was conducted to investigate inclusion rates of MIP, from 0.01 g/L to 1.00 g/L (or 0.001 to 0.1% of inclusion rate). The preparation was made together with a blank sample containing no MIP material and a positive control containing only the OTA toxin to be tested. The sequestration test was performed in citrate buffer 50 mM adjusted to pH 4.0. All samples were incubated during 90 min on an orbital rotary shaker (Brunswick, Champaign, IL, USA) at 150 rpm maintained at a temperature of 37°C. Three final concentrations of OTA were tested with the system, 50, 100, 250 ppb in a final volume of 12.5 mL. After incubation the microcentrifuge tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected into amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the mycotoxin with the vial, and calculated from HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to fluorometric

and diode–array detectors signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered) according to standard methods (See, e.g., Entwisle et al., 2000 as cited previously).

As shown in Figure 3, at 0.05 g/L the optimum efficacy was above 80% of sequestration value and reached an average of 86.4 ± 1.5% of sequestration. The incidence of the level of inclusion of the MIP compounds was evaluated by examining the sequestration activity of 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.50, and 1.00 g/L of the MIP #523-34 (synthesized in toluene-cyclohexane mixture) and #523-60 (synthesized in acetonitrile) on 50, 100, 200 ppb of OTA in acidic buffer condition (pH 4.0). The MIP size was set between 45 and 106 μm of particles diameter since this fraction gave the best sequestering result and represented the highest proportion of size particles in the total MIP product synthesized.

Each MIP, #523-34 and #523-60, was able to adsorb 91.53 ± 10.86 and 81.75 ± 23.67% of OTA, respectively as an average of the total sequestration independently from the level of inclusion. A deflection point was found in the sequestration curve for levels of MIP inclusion of 0.05 and 0.10 g/L respectively for #523-34 and #523-60 samples. The sequestration affinity averages for inclusion of 0.05 to 1.00 and 0.10 to 1.00 g/L for #523-34 were 96.31 ± 2.23 and 97.39 ± 0.70%, respectively. The sequestration affinity averages for inclusion levels between 0.05 and 1.00 g/L and between 0.10 and 1.00 g/L for #523-60 were 94.51 ± 6.54 and 97.76 ± 0.91%, respectively. The present invention thus provides that the synthesized MIP in a mixture of toluene-cyclohexane was favorable to a higher affinity rate for OTA sequestration at 0.01 g/L of inclusion with 72.42 ± 2.58% of affinity rate whereas the sample produced with acetonitrile was less effective with an affinity rate of 47.40 ± 6.08 and 84.77 ± 1.96 respectively at 0.01 and 0.05 g/L of inclusion of product.

Example 8

Affinity of different MIP and NIP and specificity characterization toward ochratoxin A

Experiments were performed during development of embodiments of the invention in order to evaluate the affinity of different NIPs/MIPs synthesized either in acetonitrile or toluene as solvent used for polymerization. The samples #523-31 (toluene) and #523-59 (acetonitrile) were synthesized without any template of OTA (defined as a Non Imprinted Polymer); the samples #523-34 (mixture of toluene-cyclohexane) and #523-60 (acetonitrile) were polymerized around the OTA analog template. The samples were then subjected to sieving using different

cut-off size sieves. The sizes of particle range tested were as described in Example 4. The MIP production predominantly produced size particles between about 45 and 106 μm of diameter (as shown in Figure 4). The preparation was made together with a blank sample containing no MIP material and a positive control containing only the OTA toxin to be tested. The sequestration test was performed in citrate buffer 50 mM adjusted to pH 4.0. All samples were incubated for 90 min on an orbital rotary shaker (Brunswick, Champaign, IL, USA) at 150 rpm maintained at a temperature of 37°C. Three final concentrations of OTA were tested with the system, 50, 100, 250 ppb in a final volume of 12.5 mL. After incubation the microcentrifuge tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected in amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the mycotoxin with the vial, and calculated from HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to fluorimetric and diode–array detectors signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered).

Comparison of the OTA affinity showed only limited difference evaluated on a single sequestration run without successive washing steps on the 3 different concentrations of toxin (50, 100, 250 ppb). Only the sample #523-59 made of NIP without sieving exhibited lower sequestration capabilities at every pH concentration of OTA. Lower sequestration values were also found for the MIP sample #523-34 for 50 ppb concentration values of OTA especially for sizes between 20 and 45 and in a lesser extend 45 to 106 μm of diameter. Thus, in some embodiments, the present invention provides that the size of MIP particles produced according to methods of the present invention have little impact on the total adsorbent affinity for OTA, with an affinity fluctuating in the worst cases between 78 to 99% of sequestration rates. NIPs are less effective in their sequestering properties than MIPs accounting for the specificity of the MIPs to interact with the OTA mycotoxin.

Example 9

Trapping of spiked OTA in wine using MIP and direct filtration of spiked ochratoxin A in wine using MIP Solid Phase Extraction (SPE)-like filtering device

A standard extraction procedure on a sample of white wine (Chardonnay 2005 – California) using an immunoaffinity column was tested. The extraction was made on a pure sample of wine as well as on spiked samples of wine with 5, 10, 20 ppb of pure crystalline OTA. The original concentration average of the wine was 1.676 ± 0.269 ppb of OTA (e.g., as

determined following a standard extraction procedure). Recovery of the 5 ppb spiked sample was 100% and around 77.7% for 10 ppb.

The preparation was made together with a blank sample containing no MIP material and a positive control containing only the OTA toxin to be tested. The sequestration test was performed in citrate buffer 50 mM adjusted to pH 4.0. All samples were incubated for 90 min on an orbital rotary shaker (Brunswick, Champaign, IL, USA) at 150 rpm maintained at a temperature of 37°C. Three final concentrations of OTA were tested with the system, 50, 100, 250 ppb in a final volume of 12.5 mL. After incubation the microcentrifuge tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected in amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the mycotoxin with the vial, and calculated from HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to fluorometric and diode–array detectors signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered).

The sequestration of OTA from wine was evaluated using a standard procedure for sequestration of mycotoxin on the original best performing MIP #523-34 (phenol-cyclohexane mixture. Sequestration varied on average from 43.29 ± 4.08 to 67.15 ± 4.94 to 91.75 ± 1.59 to 95.612 ± 1.201% for a level of inclusion of 0.05, 0.10, 0.50, and 1.00 g/L, respectively. The titration of the MIP determined an optimum affinity when used at a level of inclusion of 0.5 and 1.0 mg/mL (See Figure 5).

Thus, in some embodiments, the present invention provides compositions and methods of using the same for trapping/adsorbing mycotoxins (e.g., OTA) from wine (e.g., MIP particles that are utilized (e.g., under shaking conditions) to effectively bind to and adsorb mycotoxins from the wine).

For example, in some embodiments, the present invention provides MIPs (e.g., generated according to a method described herein) for trapping and/or adsorbing mycotoxins (e.g., one or a plurality of different types of mycotoxins (e.g., present in liquid media or extraction solution from complex matrix (e.g., feed, food, vegetal, animal, etc.)).

Solid Phase Extraction-like (SPE-like) filtering devices were generated for an equivalent of 0.1 g/L of inclusion of the MIP. Silanized glass vials were needed to ensure the stability of OTA in aqueous solvents and to prevent any aspecific interaction between OTA and the glass vials. The method of silanization was applied to nylon and PTFE/PE filters and tubes based on methods generally used in the art (See, e.g., Entwisle et al., 2000 as cited previously). The vials

and filters were prepared by filling them or immersing them with silanizing reagent (SURFASIL). After 1 minute, they were rinsed once with toluene then twice with methanol followed by three times with water and dried. Silanization was performed and generated a dramatic reduction of the interaction of the material with OTA molecule as performed in the field. For example, less than 5% of interference was observed (e.g., in contrast to about 16 to 26% interference without prior silanization of the materials when PE/PTFE filters are used). Nylon was not suitable for silanization. All the polypropylene tubes were replaced with silanized glass tubes.

SPE-like filtering devices were generated to trap OTA from wine after a direct filtration of the sample through the column. The efficacy of the MIP was tested for OTA clearance from wine (Chardonnay 2005 – California) spiked with 5 and 10 ppb of OTA. The results demonstrated for 5 and 10 ppb of spiked OTA, a 55.41 ± 5.542 and 56.937 ± 5.739% instant reduction of the OTA content of the wine, respectively. Accordingly, in some embodiments, the present invention provides mycotoxin-specific MIPs (e.g., generated according to methods described herein) that are utilized with a SPE or SPE-like filtering device for removing mycotoxins from liquid (e.g., wine) comprising mycotoxins.

Example 10

Trapping of ochratoxin A using heat initiated and low temperature UV initiated MIP Solid Phase Extraction (SPE)-like filtering device and selectivity evaluation toward key constituents of wine.

Solid Phase Extraction-like (SPE-like) filtering devices were generated for an equivalent of 0.1 g/L of inclusion of the MIP. Silanized glass vials were needed to ensure the stability of OTA in aqueous solvents and to prevent any aspecific interaction between OTA and the glass vials. The method of silanization was applied to nylon and PTFE/PE filters and tubes based on methods generally used in the art (See, e.g., Entwisle et al., 2000 as cited previously). The vials and filters were prepared by filling them or immersing them with silanizing reagent (SURFASIL). After 1 minute, they were rinsed once with toluene then twice with methanol followed by three times with water and dried. Silanization was performed and generated a dramatic reduction of the interaction of the material with OTA molecule as performed in the field. For example, less than 5% of interference was observed (e.g., in contrast to about 16 to

26% interference without prior silanization of the materials when PE/PTFE filters are used). Nylon was not suitable for silanization. All the polypropylene tubes were replaced with silanized glass tubes.

The stock solutions of twelve compounds including polyphenols: caffeic acid (Caf A), catechin hydrate (CH), epicatechin (ECH), ferulic acid (Fer), trans-3-hydroxycinnamic acid (3-HCA), 2-hydroxycinnamic acid (2-HCA), malvidin-3-galactoside chloride (Mal), myricetin (Myr), quercetin dehydrate (QH), trans-resveratrol (Res), rutin trihydrate (Rut) and indole-3-acetic acid (IAA) (Sigma, St Louis, MO, USA) were prepared by dissolving in methanol (HPLC grade) and adding water and 85% o-phosphoric acid to lower the pH to approximately 3.0. The supernatant was collected in amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the analyte with the vial, and calculated from HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to fluorimetric and diode–array detectors signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered). A C18 reversed-phase HPLC Spherisorb ODS column 5 μm, 4.6 μm x 250 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA) thermostated at 30°C was used. Excitation and emission wavelengths were set to 225 nm and 365 nm, respectively. The UV-photo diode array detector was set to full scan mode from 210 to 799 nm wavelengths. The mobile phases consisted of water/phosphoric acid (99.5%:0.5%; v/v) and (B) acetonitrile (HPLC grade) /water/phosphoric acid (50%/49.5%/0.5%; v/v/v).

All MIPs showed good adsorption of OTA in buffer solution, all over 80% adsorption. MIP 555-52 showed the best adsorption, nearly 100%. Interestingly, OTA stayed adsorbed during the buffer wash of all MIPs, but desorbed during the methanol wash specifically from the heat-initiated MIP #555-52 and #523-34 and significantly at the highest OTA concentration. The OTA stayed adsorbed to the low temperature and UV-initiated MIP #555-54A and #555-54B in the methanol wash better than to the heat-initiated MIPs, with over 50% adsorption on average to the UV-initiated MIPs maintained through the methanol wash (See Figure 6).

Health benefits of antioxidant polyphenol compounds in wine are well documented. In the strategy of filtering mycotoxin in liquid (e.g., wine) such as OTA, it is also primordial to evaluate the impact of the sequestrants material on some of the beneficial compounds such as polyphenols. In some embodiments and as documented herein (See e.g., Example 6 to Example 9) heat-initiated polymerization producing MIP #555-52 and #523-34 were able to interact effectively with OTA mycotoxin present in a liquid media, with adsorption levels above

95% whereas low temperature and UV-initiated polymerization producing MIP #555-54 and #555-54X gave adsorptive efficacy ranking between 80 and 92% of sequestration efficacy (Figure 6).

In some embodiments, the low temperature and UV-initiated MIP compositions of the invention display d specificity for the OTA when evaluated with a mixture of different polyphenols, an anthocyanin, and indole-3-acetic acid. In this case, MIP #555-54A and #555-54B displayed high adsorption of OTA (above 80%) and prevented at the same time the adsorption of the polyphenols or indole-3-acetic acid (e.g., that provide the organoleptic and anti-oxidant characteristics (e.g., of wine)). In the study of the UV-initiated MIPs, the incubation time was eliminated and wine samples and washings were pushed through the MIP or filter immediately. Very little adsorption was observed (Figure 7). Thus, in some embodiments, the invention provides a MIP that displays specificity for a mycotoxin (e.g., OTA) while concurrently displaying little to no binding to (e.g., adsorption of) beneficial compounds (e.g., polyphenols and/or indole-3-acetic acid). The quantification of the myricetin, resveratrol and rutin were prone to uncertainty due to their presence at very low concentration close to the limit of detection and limit of quantification of the HPLC analytical instrument giving as a consequence large standard deviations and negative values. In the present embodiment, the UV-initiated MIPs were thus efficient in the trapping of OTA and were not impairing the polyphenol content of a wine liquid medium demonstrating the specificity of the MIP material generated.

Example 11

Coating of MIP on fiberglass mesh for application as a filtering device

Experiments were conducted during development of embodiments of the invention to test coating of fiberglass mesh with MIP-OTA (See Figure 8). Multiple concentrations of OTA were used to determine the affinity of each preparation. The different MIPs generated are summarized in Table 7 below . Three mesh screens were coated with MIP's with varying concentrations of cross linking reagent, which affects brittleness. (Monomer solutions 1, 2, 3 and 1H). Mesh that was prepared from coated MIPs was cut based on weight before and after the coating of MIP to give 50, 100 and 200 mg of MIP evaluated by differential weighting. Sequestration assays were conducted with MIP coated mesh submerged in a 20 mL falcon tube, with determination of sequestration characteristics to OTA in wine media after 90 min incubation using a rotary shaker.

One mL from the tubes containing the wine solution spiked with three different concentrations of OTA was measured before and after incubation with the MIP-OTA mesh filters. The sample was collected in amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the mycotoxin with the vial, and calculated with HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to fluorometric and diode–array detectors signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered).

Table 7. Description of the polymerization conditions for the coating of MIP on fiberglass mesh.

Parameters	Function	Monomer Solution			
		1	2	3	1H
Ochratoxin A analog (mg)	template	1000	500	250	1000
2-Vinyl pyridine (µl)	Base to form salt with OTA	1000	500	250	1000
Ethylene glycol Dimethacrylate (mL)	Cross linker	5	5	5	5
2-Hydroxy ethyl methacrylate (µl)	Binding molecule	800	400	200	800
Azobisisobutyro-nitrile (mg)	Initiator of polymerization	66	55	50	66
Curing (oven)	For Drying of mesh	65 °C	65 °C	65 °C	80-90 °C
Solvent	Dissolve solids	none	none	none	500 µl toluene

Results indicated that maximum sequestration against OTA was dependent on the level of inclusion of the MIP. The sequestration maximum was obtained with 500 mg of template, 250 mg vinyl-pyridine and 200 mg of hydroxyl ethyl methacrylate that produced a MIP that adsorbed up to 46.5% of OTA of the 100 ppb concentration in wine (See Figure 9). Conversely, the same experiment carried out with identically processed NIP polymer coated on fiberglass showed less than 15% (down to 1%) of sequestration efficacy depending on the preparation procedure (See Figure 10) thereby exemplifying the specificity of the MIP-OTA material for OTA.

Example 12

Chromatographic retention capacity of MIP's

MIP #523-34 (synthesized with toluene-cyclohexane mixture) was used as static phase of a 4.6 × 150 mm HPLC column after packing the material using sonication in a water-bath and

then applying a continuous overnight flow rate of 5.0 mL/min of acetonitrile run through the column (MIP using an HPLC Waters Alliance binary pump (Waters Corp, Milford, MA, USA)). The column pressure was determined to be about 400 psi and was comparable to other HPLC conditions described elsewhere (See, e.g., Baggiani et al., 2002 as previously cited; Jodlbauer J., Maier N.M., and Lindner W. Journal of Chromatography A, **945**: 45-63; Maier N.M., Buttinger G., Welhartizki S., Gavioli E., Lindner W., 2004. Journal of Chromatography B, **804**: 103-11). The column was stabilized under acetonitrile flow rate at 1.0 mL/min over 48 h and extensively washed with methanol 99% and tetraethylamine 1% to remove remaining OTA template from the column. Characterization of frontal HPLC-PDA-FID analysis of OTA using the MIP column was performed.

The survival of the column was evaluated under different mobile phase conditions and under different gradient settings run through the column maintained at a constant temperature of 30°C. Several gradients were tested including 100% water and transitioning to 100% acetonitrile or 100% methanol and vice versa; and also using tetraethylamine 1% in methanol to methanol 100% for 60 min. The column survived without any modification in the static phase after an increase of pressure up to 1600 psi accounting for survival of the column at high pressures. Injection of acetone was used to evaluate the void volume of the column with an elution of the analyte over a period of 2 min. OTA elution was evaluated using the same conditions used for a regular ODS C18 elution profile (85% acetonitrile). The retention of OTA was evaluated at 5 min with the MIP column under isocratic gradient. To increase the retention time of OTA, a gradient was implemented that allowed the retention of OTA to increase to 19.5 min.

The final conditions selected are presented in Figure 11 and the gradient condition detailed in associated table. Two peaks were observed, the principal peak of OTA eluting between 17 and 22 min (at 63% of acetonitrile) and a second peak associated with a remnant highly bound OTA fraction released by the addition of tetraethylamine 1% to the column.

Example 13

Sporidesmin template synthesis

Preparation of N-tert-butoxycarbonyl-2,3-dimethoxyaniline from 2,3-dimethoxybenzoic acid. Three hundred milliliters of anhydrous tert-butyl alcohol, 50.0 g (274 mM) 2,3-dimethoxybenzoic acid and 28.33 g (280 mM, 39 mL) anhydrous triethylethylamine are charged

into a 1 L, round bottom, two necks flask, equipped with a 120 mL dropping funnel with pressure equilibration and gas bubble-meter, heavy magnetic stirring bar and a thermometer. The content of the flask is magnetically stirred and heated to 80°C in an oil bath. An amount of 77.04 g (280 mM, 60.5 mL) of diphenyl phosphorazidate is added drop-by-drop into the mixture with a slow enough rate to control gasses production evolution. Heating to 80°C and magnetic stirring was maintained overnight. The volatile components of the mixture were then rotary evaporated under 30 T vacuum and at a temperature below 55°C. The oily product was transferred into a 1 L separatory funnel and dissolved in a mixture of 500 mL cyclohexane and 200 mL of ethyl acetate. The solution was washed three times with 200 mL DI water and once with 200 mL of saturated aqueous sodium chloride and dried over anhydrous sodium sulphate for 15 min, filtered and concentrated in rotary evaporator under 30 T vacuum at 80°C. N-tert-butoxycarbonyl-2,3-dimethoxyaniline 67.88 g (98% yield) were obtained as colorless oil.

TLC, SiO_2, CH_2Cl_2:cyclohexane (abbreviated as c-Hex) (1:2); R_f=0.66 detection UV, hot 5% $KMnO_4$ bright yellow.

FT-IR film (cm^{-1}): 3319, 2941, 1669, 1601, 1529, 1477, 1459, 1416, 1369 1296, 1258, 1090, 998, 978, 780, 737.

^1H NMR, (400MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 1.53 s, 9H; 3.86 s, 3H; 3.862 s, 3H; 6,593 dd, J=8.4&1.6 Hz, 1H; 7.004 t, J=8.4&8.0, 1H; 7.135 br s, 1H; 7.725 d, J=8.0 Hz.

Preparation of 2,3-dimethoxyaniline from N-tert-butoxycarbonyl-2,3-dimethoxyaniline. A volume of 580 mL of methanol, 67.88 g (268 mM) of N-tert-butoxycarbonyl-2,3-dimethoxyaniline and 66.45 mL of 12.1 M HCl were charged to a 1 L flask equipped with a magnetic stirring bar and placed in a water bath of 50°C. Heating and stirring was maintained for 2 h and then left with stirring overnight at ambient temperature. Then, after cooling of the solution in an ice bath, a volume of 130.5 mL of 6.16 M sodium hydroxide was added with stirring.

Methanol was evaporated from the mixture using a rotary evaporator at a temperature below 40°C and under vacuum pressure of 30 T. The semi solid residue was diluted with 180 mL of toluene and filtered. The precipitate was washed two more times with 180 mL portions of toluene and the filtrates were transferred into a 1 L separatory funnel. The upper layer was collected and dried with sodium sulphate, concentrated and vacuum distilled. A mass

of 34.6 g of 2,3-dimethoxyaniline (94.0% yield) was collected at 105-107°C at 8 T in form of colorless, crystallizing oil.

TLC, SiO_2, c-Hex:Tetrahydrofuran (abbreviated as THF) (6:1); R_f=0.35 detection UV, 5% $KMnO_4$ heat/ brown-green.

FT-IR film (cm^{-1}): 3463, 3368, 2939, 1609, 1497, 1475, 1319, 1262, 1226, 1129, 1085, 1050, 999, 773, 729, 694.

^1H NMR, (400MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 3.75 br s, 2H; 3.83 s, 3H; 3.84 s 3H; 6.34 d, J=8.1 Hz, 1H; 6.38 d, J=8.1Hz, 1H; 6.84 t, J=8.1Hz, 1H.

Synthesis of ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indolone-3-carboxylate from 2,3-dimethoxyaniline and diethylketomalonate. A solution of 69.33 g (398.1mM) of diethylketomalonate in 250 mL of toluene is placed in a 1 L round bottomed flask equipped in a dropping funnel with air equilibration and a magnetic stirring rod placed in an ice-water bath. A solution of 56.769 g (370.6 mM) of 2,3-dimethoxyaniline in 200 mL of toluene is charged into the dropping funnel. The stirring is started and 2,3-dimethoxyaniline solution is slowly added into the flask, with continuous cooling and magnetic stirring of the reaction mixture. The addition was completed in 4 hrs time and the mixture was allowed to warm up to room temperature and left with stirring overnight for a total of 22 h. Then, the mixture was heated to 80°C for 2 hrs and followed by an increase of the temperature of the mixture to 100°C. A volume of 25 mL of the distillate was collected. A volume of 25 mL of the distillate was collected, including 4 mL of water and 21 mL of toluene. A TLC SiO_2 (PhMe:THF/6:1, UV, hot $KMnO_4$ indicated the presence of: diethylketomalonate R_f 0.86; 2,3-dimethoxyanilide of monoethylketomalonate R_f 0.66; 2,3-dimethoxyaniline R_f 0.43; diethylketomalonate monohydrate R_f 0.30 and the desired product, ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indolone-3-carboxylate R_f 0.20. Heating to 100°C was continued for 24 hrs after which a white precipitate was formed in the flask. The content of the flask was then stirred and heated at 80-90°C for the next 48 h. After this time it was cooled to room temperature and the precipitate was filtered off and washed with 50 mL of toluene. After drying, 16.1 g of ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indolone-3-carboxylate (24.0% yield) were obtained. The filtrate was concentrated in a rotary evaporator and subjected to LC on SiO_2 using c-Hex:THF mixture with THF content from 7.5 to 20%. Additional 12.2 g (18.2% yields) of fairly pure product were collected.

Mp 150-151°C.

TLC, SiO_2, Toluene (abbreviated as PhMe):THF (6:1), R_f=0.12 detection UV, 5% $KMnO_4$ heat/ canary-yellow.

FT-IR film (cm^{-1}): 3293, 2937, 1728, 1726, 1636, 1505, 1466, 1336, 1236, 1234, 1164, 1084, 1016, 1192, 729.

^1H NMR, (400 MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 1.191 t, J=7.2Hz, 3H; 3.892 s, 3H; 3.898 s, 3H; 4.152-4.319 m, 16 lines, dqx2, all J=7.2 Hz with the quartets centers at: 4.179, 4.205, 4.265, 4.292, 2H; 4.346 br s, 1H; 6.575 d, J=8.4 Hz, 1H, 6.961 dd, J=8.4&0.4 Hz, 1H; 7.744 br s, 1H.

Synthesis of 6,7-dimethoxyisatine from ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indolone-3-carboxylate. A solution of 10.67 g (40.2 mM) of ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indolone-3-carboxylate in 100 mL of ethanol was stirred in water bath of ambient temperature. Into this mixture a solution of 4.828 g (120.7 mM) of sodium hydroxide in 25 mL of water was added drop by drop. A stream of air, free of CO_2, was passed by the reaction mixture which was vigorously stirred. Air passing and stirring of the mixture at ambient temperature was maintained overnight. The recovered mixture was intense red-brown. The solution was neutralized by the addition of 5 mL of concentrated hydrochloric acid. The white precipitate of inorganic salts that formed was filtered off and the filtrate was concentrated in a rotary evaporator to 20 mL volume and left for crystallization in refrigerator. The orange-yellow crystals were collected and air dried. An amount of 2.24 g (26.9% yield) of pure 6,7-dimethoxyisatine was obtained. An additional 0.54 g (6.5% yield) of the product was separated from the filtrate by liquid chromatography using SiO_2 and PhMe:THF (4:1) mixture.

Mp 209-210°C.

TLC, SiO_2, PhMe:THF (6:1), R_f=0.18 yellow spot, detection UV, 5% $KMnO_4$ heat/ canary-yellow.

FT-IR film (cm^{-1}): 3218, 1747, 1707, 1623, 1507, 1452, 1442, 1337, 1286, 1240, 1184, 1082, 1041, 973, 949, 794, 685, 702, 662.

^1H NMR, (400 MHz), $CDCl_3$, δ(ppm): 3.91 s 3H; 3.98 s 3H; 6.60 d, J=8.4 Hz, 1H; 7.42 d, J=8.4Hz, 1H; 7.74 br s, 1H.

Synthesis of 6,7-dimethoxy-1-methylisatine from 6,7-dimethoxyisatine. A solution of 2.255 g (20.1 mM) of potassium tert-butanolate in 20 mL of anhydrous THF was added from a syringe by rubber septum, with magnetic stirring and cooling in an ice- water bath, into a 50 mL round bottom flask containing a solution of 2.78 g (13.4 mM) of 6,7-dimethoxyisatine in 15 mL of anhydrous THF. Into this mixture 3.8 mL (8.65 g, 60 mM) of methyl iodide were added by means of a syringe and the mixture with heavy precipitate that formed immediately was stirred overnight at 35°C. TLC (SiO_2, PhMe:THF (6:1)) confirmed full conversion of the substrate (6,7-dimethoxyisatine) R_f= 0.18 into the 6,7-dimethoxy-1-methylisatine R_f = 0.34. The precipitate was filtered off and washed with three 20 mL portions of anhydrous THF. The combined filtrates were evaporated to dryness and the product was collected as a bright red colored fraction from flash chromatography. SiO_2 and a mixture of PhMe:THF (9:1) was used. After evaporation to dryness of the red colored eluent, 2.517 g (84.8% yield) of bright yellow crystals were collected.

Mp 190-191°C.

TLC, SiO_2, PhMe:THF (6:1), R_f = 0.34 orange-red spot, detection UV, 5% $KMnO_4$ heat/ canary-yellow.

FT-IR film (cm^{-1}): 2955, 1724, 1614, 1497, 1450, 1373, 1264, 1205, 1168, 1131, 1086, 1044, 1028, 979, 975, 828, 800, 775, 654.

^1H NMR, (400 MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 3.490 s, 3H; 3.877 s, 3H; 3.982 s, 3H; 6.575 d, J=8.4 Hz, 1H; 7.416 d, J=8.4Hz, 1H.

Synthesis of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine. An amount of 2.517 g (11.38 mM) of 6,7-dimethoxy-1-methylisatine and 1.823 g (13.65 mM) of N-chlorosuccinimide and 30 mL of DMF were placed in a 100 mL round bottom flask equipped with a magnetic stirring bar and a 10 mL dropping funnel with air equilibration and placed in an ice-water bath. A 10 mL solution of 1.125 mL (13.6 mM) of concentrated hydrochloric acid in DMF was charged into the dropping funnel and added drop by drop into a stirred and cooled reaction mixture. After addition was completed, the solution was mixed at ambient temperature for additional 2 h. Then the solvents were rotary evaporated under 8 T vacuum and at 50°C and the residue was subjected to flash chromatography on SiO_2 using PhMe:THF (19:1) mixture. An eluent containing a brick-

red band of the product was collected and rotary evaporated to dryness yielding 1.83 g (62.9% yield) of brick-red crystals of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine.

Mp 140-142°C.

TLC, SiO_2, PhMe:THF (6:1), R_f = 0.51 red spot, detection UV, 5% $KMnO_4$ heat/ canary-yellow.

UV/VIS (nm) c.-0.143 mg/mL in Ethanol: 318, e 2.75, 433, e 0.70.

FT-IR film (cm^{-1}): 2951, 1726, 1602, 1457, 1442, 1423, 1404, 1359, 1292, 1263, 1232, 1093, 1046, 1005, 979, 941, 897, 881, 797, 766, 668.

^1H NMR, (400 MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 3.475 s, 3H; 3.935 s, 3H; 4.027 s, 3H; 7434 s, 1H.

The molecular structure of sporidesmin and the of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template can be found in Figure 12. The synthetic pathway is summarized in Figure 13.

Example 14

Sporidesmin MIP and NIP synthesis (with methacrylic acid)

A solution of 1.8 g (7.04 mM) of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine, 1.194 mL (1.212 g, 14.08 mM) of methacrylic acid, 3.415 mL (3.664 g, 28.16 mM) of 2-hydroxyethylmethacrylate, 39.83 mL (41.86 g, 211.2 mM) of ethylene glycol dimethacrylate and 1.0 g (6.09 mM) of AIBN in 100 mL of toluene is placed in a 500 mL, four neck round bottom flask equipped with a 120 mL dropping funnel with gas equilibration, a mechanical stirrer, a reflux condenser with bubble-meter and a thermometer. A volume of 120 mL of toluene is placed in the dropping funnel, the stirrer is started and nitrogen is passed through the toluene (in the dropping funnel) and over the surface of the mixture in the flask and released outside through the bubble-meter. After 30 min of stirring and blowing nitrogen, the rate of gas flow is limited to single bubbles and the temperature in the flask is increased to 65°C by immersing the flask in a water bath of 70°C. Within 15 min polymerization starts and the solution becomes more and more viscous. When it is difficult to maintain a vigorous agitation, the toluene from the dropping funnel is added as fast as possible, to dilute the mixture. Vigorous agitation and heating is maintained for 4 h. During this time small spheres of the MIP are formed. The mixture is left without stirring or heating overnight. In the morning MIP spheres

are filtered off and washed 13 times with 150 mL of ethanol each. The orange red colored filtrates are collected, rotary concentrated. The 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine (sporidesmin template) is recovered by flash chromatography using PhMe:THF (98:2) and collecting brick-red band of the template. Rotary evaporation yielded 1.572 g (87.3% recovery) of very pure, crystalline 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine. The spheres of MIP are air dried overnight at ambient temperature and one additional hour at 80°C in a laboratory oven.

A quantity of 45.362 g of sporidesmin MIP (methacrylic acid) were obtained in form of small egg-shell white spheres and identified as MIP #519-98.

Sporidesmin NIP (methacrylic acid) 45.883 g in form of snow-white spheres, was obtained by following the same procedure however no sporidesmin template have been added to the reaction mixture and only three ethanol washes (150 mL each) were performed. The polymer was identified as MIP #555-99.

Both MIP and NIP were easy to filter and wash on sintered glass filter.

Example 15

Sporidesmin MIP and NIP synthesis (with 2-vinylpyridine)

A solution of 1.5 g (5.86 mM) of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine, 1.260 mL (1.232 g, 11.72 mM) of 2-vinylpyridine, 2.845 mL (3.053 g, 23.46 mM) of 2-hydroxyethyl-methacrylate, 33.191 mL (34.833 g, 176 mM) of ethylene glycol dimethacrylate and 0.833 g (5.07 mM) of AIBN in 80 mL of toluene is placed in a 500 mL, four neck round bottom flask equipped with a 100 mL dropping funnel with gas equilibration, a mechanical stirrer, a reflux condenser with bubble-meter and a thermometer. A volume of 120 mL of toluene is placed in the dropping funnel, the stirrer is started and nitrogen is passed through the toluene (in the dropping funnel) and over the surface of the mixture in the flask and released outside through the bubble-meter. After 30 min of stirring and blowing nitrogen the rate of gas flow is limited to single bubbles and the temperature in the flask is increased to 65°C by immersing the flask in a water bath of 70°C. Within 15 min polymerization starts and the solution becomes more and more viscous. When it is difficult to maintain a vigorous agitation, the toluene from the dropping funnel is added as fast as possible, to dilute the mixture. Vigorous agitation and heating is maintained for 4 h. During this time small spheres of the MIP are formed. The mixture is left without stirring or heating overnight. Then, MIP spheres are filtered off and

washed 13 times with 150 mL of ethanol each. All filtrates from washing MIP's are collected and rotary evaporated to dryness. The red colored residue is dissolved in 20 mL of toluene and applied to the top of a liquid chromatography column (24 mm x 50 cm) filled with 200 mL SiO_2 in toluene. The red band is washed with PhMe:THF (5:1). Rotary evaporation yielded 1.489 g (99.2% recovery) of crystalline 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine. The spheres of MIP are air dried overnight at ambient temperature and for two more hours at 80°C in a laboratory oven. An amount of 37.936 g of sporidesmin MIP (2-vinylpyridine) were obtained in form of small egg-shell white spheres and identified as MIP #519-101.

Sporidesmin NIP (2-vinylpyridine). An amount of 39.2 g in form of snow-white spheres, was obtained following the same procedure, however no sporidesmin template have been added to the reaction mixture and only three ethanol washes (150 mL each) were performed. The polymer was identified as MIP #555-102.

Example 16

UV initiated, low temperature polymerization/synthesis of sporidesmin MIP's.

Photochemical reaction set. Quartz, photochemical UV immersion well (Ace Glass, Catalogue # 7856-10) equipped in 450 Watt UV Lamp (ACE Glass, Catalogue# 7825-34) and 450 Watt Cased Power Supply (ACE Glass, Catalogue#7830-58) is attached to a circulation chiller WKL 230 LAUDA (supplied by Brinkmann Instuments, Inc.), and cooling water of 4oC is run through the well mantle at the time when the UV lamp is on.

Polymerization process. A mixture of monomers: methacrylic acid 1.2g (13.95 mM) and ethylene glycol monomethacrylate 3.631 g (13.95 mM), sporidesmin template 1.783 g (6.97 mM), initiator (IABN) 0.991 g (6.03 mM) and a crosslinker, ethylene glycol dimethacrylate 41.444 g (209.1 mM) are placed in a translucent, polyethylene bottle (Nalgene®style 2105) and a stream of Argon is passed through the mixture for 15 min to remove all of the oxygen, which is known to inhibit free radical polymerization. The bottle is then closed and attached to the immersion well, at the level of the UV lamp center, and immersed, together with the photochemical reaction set, into an ice-water bath. Cooling water is run through the lamp mantle, when the light is turned on, and the reaction mixture irradiation is maintained for three and half hours (UV safety glasses are required at the time when the UV lamp is on). Additional ice is supplied to, and excess of water is drained from the bath during

the course of the UV polymerization, to maintain cooling bath temperature at 4°C. After completing polymerization the bottle is open, the polymer is crushed and grinded into small pieces which are washed: three times with ethanol, two times with 1:1 water-ethanol mixture, six times with 3:1 water-ethanol mixture and one more time with ethanol, to remove the template from the polymer and secure maximum activity of MIP which is finally dried in a laboratory oven, to remove ethanol residues yielding 41.1 g (89% yield) of the product.

Example 17

MIPs' sequestration capabilities toward mycotoxins – applied to sporidesmin analogs

MIP and NIP polymers produced by heat initiated precipitation polymerization either using methacrylic acid or 2-vynilpyridine monomers in toluene (See e.g., Example 14 and Example 15) were tested toward 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template (See e.g., Example 13) and gliotoxin, an analog to the sporidesmin molecule containing the similar disulphide-bridged piperazinedione ring system (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for the removal of the template and gliotoxin mycotoxins from liquid or semi-liquid media via chemical interactions. The MIPs and NIPs produced were used herein to depict the differences in affinity of sequestration. A sequestration experiment was conducted by weighing 400 mg of MIP/NIP material into amber Schott bottles and addition of 100 mL of a working solution of the analyte investigated to obtain a inclusion rate of 0.4 g/L of the sequestrants in the medium. The preparation was made together with a blank sample containing no MIP material and a positive control containing either the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template or gliotoxin. The sequestration test was performed in citrate buffer 50 mM adjusted to pH 4.0. All samples were incubated during 90 min on an orbital rotary shaker (Brunswick, Champaign, IL, USA) at 150 rpm maintained at a temperature of 37°C. Five final concentrations of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template or gliotoxin were tested with the system - 500; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500 parts per billion (ppb) or 1,000; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000. After incubation the preparations were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected into amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the mycotoxin or template with the vial, and calculated from HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to photo diode–array detector signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered) according to standard methods. The HPLC analysis for gliotoxin was performed

using a mixture of acetonitrile/acetic acid/trifluoroacetic acid (34.9:65:0.1, v/v) as mobile phase. The HPLC method for the detection of the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template was selected according to the standard elution parameters for sporidesmin analysis consisting of a mixture of acetonitrile/water/methanol (45:45:10, v/v). Detection was performed on the U.V. photodiode array with full wavelength scanning (268.1 nm gave the optimal signal for gliotoxin; 258.8 nm gave the optimal signal for the template).

Results showed that MIP #519-98 and #519-101 and NIP #519-99 and #519-10X were able to interact with more than 90.8% of the gliotoxin tested between 500 to 2,500 ppb for a 0.4% level of inclusion of the adsorbents at pH 4.0 (See Table 8). The adsorption of the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template was also investigated given an affinity of more than 94.9% for MIP #519-98 and #519-101 and NIP #519-99 and #519-10X for template concentrations between 1,000 to 5,000 ppb of the template molecule present in the medium at pH 4.0 for a 0.4% level of inclusion of the adsorbents (Table 8). Thus, in some embodiments, the present invention provides that the synthesized MIPs in toluene were both favorable to the adsorption of sporidesmin analogs (e.g., gliotoxin and 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template) with a slight advantage for the MIP #519-101 synthesized using monomers of 2-vynilpyridine when added at an inclusion rate of 4 g/L under pH 4.0 with affinities for sequestration up to 97.82 ± 4.25% of affinity rate and 95.85 ± 1.25% respectively for gliotoxin and 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template. Difference between the MIP and the NIP was minimal for any of the formulation prepared.

Table 8. Mean adsorption affinity expressed in percent for 2 MIPs and 2NIPs toward 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template and gliotoxin evaluated at pH 4.0 and 0.4% level of inclusion of the adsorbent.

Sample I.D.	Mean adsorption	
	Gliotoxin (%)	Template (%)
MIP 519-98	90.84 ± 1.47	94.94 ± 2.21
NIP 555-99	91.04 ± 1.51	95.35 ± 0.72
MIP 519-101	97.82 ± 4.25	95.85 ± 1.25
NIP 519-10X	97.14 ± 4.02	95.86 ± 1.02

Example 18

Titration of the amount of MIP for the sequestration of analogs of sporidesmin

A titration experiment was conducted to investigate inclusion rates of MIP, from 0.1 g/L to 1.00 g/L (or 0.01 to 0.1% of inclusion rate). The preparation was made together with a blank sample containing no MIP material and a positive control containing only the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template or gliotoxin to be tested. The sequestration test was performed in citrate buffer 50 mM adjusted to pH 4.0. All samples were incubated during 90 min on an orbital rotary shaker (Brunswick, Champaign, IL, USA) at 150 rpm maintained at a temperature of 37°C. Five final concentrations of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template or gliotoxin were tested with the system, 1,000; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000 ppb in a final volume of 100 mL. After incubation the microcentrifuge tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected into amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the analyte with the vial, and calculated from HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to diode–array detectors signal according to standard methods (See e.g., Example 17).

Table 9. Mean adsorption affinity expressed in percent for 2 MIPs and 3NIPs toward 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template evaluated at pH 4.0 and 4 levels of inclusion of the adsorbent.

Sample I.D.	% inclusion	Adsorption (%)					
		Template concentration (ppb)					
		1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	Mean
MIP 519-98	0.010	48.90	57.93	48.17	37.86	38.63	46.30
	0.025	61.50	69.25	61.98	65.94	50.74	61.88
	0.050	80.37	87.95	73.97	76.41	69.28	77.59
	0.100	94.10	91.35	89.72	86.74	84.73	89.33
NIP 519-99	0.010	59.83	53.83	41.80	42.17	38.40	47.21
	0.025	76.70	67.50	61.71	58.60	57.51	64.40
	0.050	89.63	83.18	73.08	75.46	77.25	79.72
	0.100	91.50	90.97	87.99	88.86	87.23	89.31
MIP 519-101	0.010	48.60	37.95	39.12	38.29	34.72	39.74
	0.025	72.73	62.12	60.53	51.69	54.58	60.33
	0.050	76.93	73.40	73.94	70.98	70.17	73.09
	0.100	90.83	87.50	87.66	89.16	84.41	87.91
NIP 519-10X	0.010	41.33	42.88	36.18	25.54	26.58	34.70
	0.025	58.67	57.45	53.56	47.35	46.85	52.77
	0.050	75.20	68.38	68.26	65.43	63.66	68.19
	0.100	83.57	84.02	82.04	78.64	75.09	80.67
NIP 519-47X	0.010	16.57	7.48	10.59	17.05	10.39	12.42
	0.025	13.20	10.25	7.61	13.26	18.61	12.59
	0.050	4.17	12.40	11.92	12.12	13.76	10.87
	0.100	10.13	10.52	11.59	17.88	24.72	14.97

As shown in Figure 14, Table 9 and Table 10, , in some embodiments, e.g., at 0.05 g/L of inclusion level of the adsorbent, the present invention showed an optimum efficacy above 70% of sequestration value and reached almost 90% of sequestration at 0.10 g/L. Thus, in some embodiments, the present invention provides that MIPs/NIP synthesized with methacrylic acid are more favorable over the MIP/NIP synthesized using 2-vinylpyridine for the adsorption of a sporidesmin analog (e.g., gliotoxin and 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template(e.g., when added at an inclusion rate between 0.01 and 0.1 g/L under pH 4.0)). Differences between the MIP and the NIP were however minimal for any of the formulation prepared except for the NIP synthesized at low temperature and UV initiated polymerization with adsorption values increasing with the inclusion level of the adsorbent from 10 to 15%.

Table 10. In vitro isothermal adsorption characteristics of NIP and MIP at four different inclusion rates to Sporidesmin template in citrate buffer media of pH4.

Inclusion (%)	NIP #519-99	MIP #519-98	NIP #519-10X	MIP #519-101	NIP #519-47X
0.010	47.207 ± 9.159	46.302 ± 8.297	34.703 ± 7.837	39.737 ± 5.229	12.416 ± 4.197
0.025	64.404 ± 7.894	61.882 ± 6.983	52.774 ± 5.517	60.331 ± 8.136	12.585 ± 4.101
0.050	79.720 ± 6.683	77.594 ± 7.047	68.186 ± 4.396	73.087 ± 2.671	10.873 ± 3.817
0.100	89.309 ± 1.858	89.329 ± 3.702	80.671 ± 3.767	87.912 ± 2.375	14.967 ± 6.288

Example 19

Affinity of different MIP and NIP and specificity characterization toward sporidesmin analogs

Experiments were performed during development of embodiments of the invention in order to evaluate the affinity of different NIPs/MIPs synthesized in toluene as solvent used for heat initiated precipitation polymerization. The MIP produced were used herein to depict the differences in affinity of sequestration of the sporidesmin analogs (e.g., gliotoxin and 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template) and to evaluate the specificity of the material. An amount of 30 mg of MIP was placed into a SEP-PAK column fitted with silanized polyethylene solid phase extraction frits. Silanized glass vials were utilized to ensure the stability of the analyte in aqueous solvents and to prevent any aspecific interaction between the analyte and the glass vials. The method of silanization was applied to nylon and PTFE/PE filters and tubes based on methods generally used in the art. The preparation was made together with a blank sample containing no MIP material and a positive control containing either the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template or gliotoxin. Solid Phase Extraction-like (SPE-like) filtering devices were generated for an equivalent of 0.1 g/L of inclusion of the MIP by filtering through 30 mg of material 1 mL of a solution of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template or gliotoxin. The vials and filters were prepared by filling them or immersing them with silanizing reagent (SURFASIL, See e.g., Example 9). The SPE-like filtering devices were loaded with a 1 mL solution of either 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template or gliotoxin used at a single concentration of 2,000 ppb. Along with the samples, a control working solution was maintained. Samples and controls were both incubated at 37°C for 2 min with intermittent shaking. After the incubation period, the samples were pushed through the syringe and were collected in 15 mL centrifuged tubes and centrifugation at 10,0000 *g* during 10 min.

The supernatant were collected into amber and silanized HPLC vials and analyzed. To evaluate the specificity of the desorption for the targeted molecule, six washing steps were performed on the material containing the MIP polymers. Each of the washes were collected in 15 mL centrifuge tubes and centrifugation at 10,0000 *g* during 10 min before analysis via HPLC. Six washes were performed with increasing concentration of organic solvent, which included a first wash with 50 mM citrate buffer wash and five consecutive washes with 20, 40, 60, 80, 100% methanol in water (v/v), respectively. The experiment used the previously heat initiated precipitated polymerized MIP #519-98 and #519-101 and NIP #519-99 and #519-10X (powder forms) together with crystalline forms of MIP and NIP identified as #519-47 and #519-47X that were generated under low temperature and UV polymerization (See e.g., Example 5). The supernatant was collected into amber and silanized HPLC vials, preventing any interaction of the mycotoxin or template with the vial, and calculated from HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to photo diode–array detector signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered) according to standard methods. The HPLC analysis for gliotoxin was performed using a mixture of acetonitrile/acetic acid/trifluoroacetic acid (34.9:65:0.1, v/v) as mobile phase. The HPLC method for the detection of the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template was selected according to the standard elution parameters for sporidesmin analysis consisting of a mixture of acetonitrile/water/methanol (45:45:10, v/v). Detection was performed on the U.V. photodiode array with full wavelength scanning (268.1 nm gave the optimal signal for gliotoxin; 258.8 nm gave the optimal signal for the template).

Results indicated (See Figure 15 and Table 11) that MIPs #519-101 and #519-98 had lower desorption values when washed with 40% of methanol compared to their respective NIP #519-10X and #519-99 for the adsorption of gliotoxin. Washes containing more than 60% of methanol were however able to remove almost the entire amount of gliotoxin sequestered. In some embodiment, the MIP #519-101 synthesized using monomers of 2-vynilpyridine had higher specificity than the corresponding NIP #519-10X and the NIP #519-99, MIP #519-98, NIP #519-47X and MIP 519-47 when a wash using 20% of methanol was applied to the system. The polymers 519-47X and 519-47 were not able to adsorb more than 25% of the gliotoxin. The application of a buffer wash was able to remove any adsorbed gliotoxin.

Results indicated (See Figure 16 and Table 11) that MIPs #519-101 had lower desorption values when washed with 20 and 40% of methanol compared to its respective NIP #519-10X.

The specificity of MIP #519-98 and NIP #519-99 were however comparable with no difference in specificity for the adsorption of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template. Washes containing more than 60% of methanol were however able to remove almost the entire amount of 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template sequestered. In some embodiment and as found with gliotoxin, the MIP #519-101 synthesized using monomers of 2-vynilpyridine had higher specificity than the corresponding NIP #519-10X and the NIP #519-99, MIP #519-98, NIP #519-47X and MIP 519-47 when a wash using 20 and 40% of methanol was applied to the system. The polymers 519-47X and 519-47 exhibited difference in the specificity of sequestration in favor of the MIP compound. However, despite the adsorption of the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template being inferior to 50 %, it presented a better affinity than that found with gliotoxin showing a better specificity of the MIP for the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template.

Table 11. Adsorption properties of 3 MIPs, 3NIPs, toward the 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template and gliotoxin at pH 4.0 in a SPE configuration at 0.1% level of inclusion of the adsorbent and survival to titrated methanol washes with a mixture of citrate buffer (solution A) and methanol (solution B).

Adsorbent	Mean percent adsorption						
Conditions	Initial	A: 100% B: 0%	A: 80% B: 20%	A: 60% B: 40%	A: 40% B: 60%	A: 20% B: 80%	A: 0% B: 100%
	Gliotoxin (% adsorption)						
NIP 519-10X	99.3 ± 0.6	99.3 ± 0.0	67.7 ±1.9	47.7 ± 1.4	-0.3 ± 2.0	0.8 ± 1.6	-0.8 ± 1.2
MIP 519-101	99.9 ± 0.3	99.9 ± 0.0	99.9 ± 0.0	55.5 ± 0.1	8.3 ± 2.0	-4.6 ± 3.1	-5.1 ± 8.7
NIP 519-99	99.0 ± 0.4	98.2 ± 0.4	80.5 ± 1.0	50.7 ± 2.8	4.0 ± 2.5	-8.4 ± 6.1	-7.6 ± 9.6
MIP 519-98	99.1 ± 0.4	99.0 ± 0.3	78.5 ± 0.4	44.9 ± 2.2	15.4 ± 1.2	-9.6 ± 14.8	-6.1 ± 7.7
NIP 555-47X	22.7 ± 1.2	-1.7 ± 1.5	-10.6 ± 0.4	-13.6 ± 6.5	-28.4 ± 2.7	-24.1 ± 11.4	-33.4 ± 5.7
MIP 519-47	25.1 ± 2.6	-2.4 ± 10.5	-18.5 ± 13.2	-20.7 ± 3.05	-28.2 ± 2.4	-28.2 ± 11.1	-36.5 ± 8.2
	5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine template (% adsorption)						
NIP 519-10X	98.5 ± 0.8	98.0 ± 1.0	86.5 ± 0.2	59.5 ± 1.1	-1.8 ± 1.0	-39.4 ± 0.7	-19.5 ± 1.8
MIP 519-101	99.9 ± 0.1	99.4 ± 0.6	94.8 ± 0.1	72.4 ± 0.1	-0.2 ± 1.3	-2.2 ± 1.5	-15.3 ± 1.5
NIP 555-99	99.0 ± 0.6	97.5 ± 0.1	90.5 ± 0.2	65.2 ± 0.8	13.1 ± 1.4	-1.85 ± 1.0	-9.8 ± 1.4
MIP 519-98	98.8 ± 0.2	97.2 ± 0.3	89.2 ± 0.7	55.1 ± 0.6	9.35 ± 1.3	-7.9 ± 0.4	-8.0 ± 3.3
NIP 555-47X	44.8 ± 5.6	33.0 ± 0.8	9.7 ± 3.9	6.2 ± 0.9	-29.7 ± 0.1	-17.5 ± 1.4	-19.3 ± 3.2
MIP 519-47	48.7 ± 7.0	44.7 ± 0.6	28.2 ± 0.6	-17.1 ± 0.8	-20.1 ± 2.1	-21.3 ± 13.6	-24.1 ± 3.4

Example 20

MIPs' sequestration capabilities toward mycotoxins – applied to sporidesmin

MIP polymer produced using 2-vynilpyridine monomers in toluene (See e.g., Example 15) was tested toward sporidesmin (AgResearch Limited, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand) for the removal of the sporidesmin (A 93%; B, D, E 2 to 17%) mycotoxins from liquid or semi-liquid media via chemical interactions. The MIP produced was used to characterize the affinity of sequestration and to evaluate the specificity of the material. A sequestration experiment was conducted by weighing 50 and 400 mg of MIP material into Schott bottles and addition of 100 mL of a working solution of sporidesmin mixture given 0.5 and 4.0 g/L of inclusion rate of the adsorbent in the medium. The preparation was made together with a blank sample containing no MIP material and a positive control containing the sporidesmins only. The sequestration test was performed in succinate buffer 50 mM adjusted to pH 6.0 to meet the physiological conditions of the rumen gastric compartment. All samples were incubated during 90 min on an orbital rotary shaker at 150 rpm maintained at a temperature of 37°C. Three final concentrations of sporidesmins were tested with the system, 500; 1,000; 2,000 ppb. After incubation the preparations were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected into HPLC vials, and calculated from HPLC coupled to UV detector signal (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin sequestered) according to standard methods. The HPLC method for the detection of sporidesmins used a mixture of acetonitrile/water/methanol (45:45:10, v/v) to perform the elution of the analytes and a C18 column (4.6 mm × 25 cm). Detection was performed on the U.V. detector (280 nm gave the optimal signal for sporidesmins).

The MIP #519-98 product adsorbed 80.5 to 85.7% for an inclusion rate of 0.5 g/L and more than 98.5% when used at an inclusion rate of 4 g/L of sporidesmin present at 500; 1,000 and 2,000 ppb (See e.g., Table 12). Variation between repetitions accounted for less than 1% of the adsorption. A slight saturation effect could be observed at 0.5 g/L of inclusion rate with a decrease of the adsorption value obtained throughout the sporidesmin range investigated.

Table 12. MIP #519-98 adsorption efficacy at 0.5 and 4.0 g/L of inclusion rate toward 3 concentrations of sporidesmin.

Inclusion rate (%)	Mean Percent of Adsorption (%) for sporidesmin concentrations of:		
	500 ppb	1,000 ppb	2,000 ppb
0.05	85.65 ± 0.87	84.03 ± 0.70	80.51 ± 1.37
0.40	99.13 ± 0.00	98.85 ± 0.00	98.54 ± 0.09

All publications and patents mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described compositions and methods of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention that are obvious to those skilled in the relevant fields are intended to be within the scope of the present invention.

CLAIMS

What Is Claimed Is:

1. A composition comprising a molecularly imprinted polymer synthesized using a mycotoxin template.

2. The composition of claim 1, wherein said mycotoxin template is an ochratoxin template.

3. The composition of claim 2, wherein the ochratoxin template is N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine.

4. The composition of claim 1, wherein the mycotoxin template is a sporidesmin template.

5. The composition of claim 4, wherein the sporidesmin template is 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine.

6. The composition of claim 4, wherein the sporidesmin template is selected from the group consisting of ethyl 3-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-indolone-3-carboxylate, 6,7-dimethoxyisatine, and 6,7-dimethoxy-1-methylisatine.

7. A method of making a molecularly imprinted polymer comprising:

a) providing:

i. a mycotoxin template; and

ii. one or more monomers and one or more crosslinkers; and

b) contacting said mycotoxin template with said one or more monomers and said one or more crosslinkers under conditions that permit polymerization of said one or more monomers and said one or more crosslinkers in the presence of said mycotoxin template.

8. The method of claim 7, wherein said mycotoxin template is N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine.

9. The method of claim 7, wherein said mycotoxin template is 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine.

10. The method of claim 7, wherein said one or more monomers are selected from the group consisting of 2-vinylpyridine, 2-hydroxyethylmethacrylate and methacrylic acid.

11. The method of claim 7, wherein said one or more crosslinkers comprise ethylene glycol dimethacrylate.

12. The method of claim 7, wherein said polymerization is initiated by forming free radicals in an organic solvent at a temperature between 55 and 110 degrees Celsius.

13. The method of claim 12, wherein said free radicals are formed by thermally initiated decomposition of azoisobutyronitrile (AIBN).

14. The method of claim 12, wherein said organic solvent is selected from the group consisting of toluene, cyclohexane, acetonitrile, a polyvinyl alcohol (PVA)/ water solution, and a mixture of two or more of toluene, cyclohexane, acetonitrile, and a PVA/ water solution.

15. The method of claim 12, wherein said temperature is between 55 and 75 degrees Celsius.

16. The method of claim 7 wherein said mycotoxin template is removed from said molecularly imprinted polymer after polymerization of said one or more monomers and said one or more crosslinkers.

17. The method of claim 16, wherein one or more washes with a solution selected from the group consisting of an organic solvent, a buffer, water and a combination thereof is utilized to remove said mycotoxin template from said molecularly imprinted polymer.

18. The method of claim 17, wherein said organic solvent is selected from the group consisting of ethyl alcohol, methyl alcohol, acetonitrile, toluene, and a mixture thereof.

19. The method of claim 17 wherein said buffer is a buffer prepared by reacting sodium hydroxide, citric acid, succinic acid and acetic acid.

20. The method of claim 17, wherein said water is deionized water.

21. The method of claim 17, wherein said molecularly imprinted polymer is dried after said one or more washes.

22. The method of claim 21 wherein exposure of said molecularly imprinted polymer to a temperature between 20 and 90 degrees Celsius is utilized to dry said molecularly imprinted polymer.

23. The method of claim 22, wherein said temperature is between 60 and 80 degrees Celsius.

24. The method of claim 23, wherein said temperature is between 75 and 80 degrees Celsius.

25. A method of sequestering a mycotoxin from a material, comprising:

a) providing:

i) a material comprising mycotoxins; and

ii) a molecularly imprinted polymer generated via polymerization of one or more monomers and one or more crosslinkers in the presence of a mycotoxin template; and

b) contacting said molecularly imprinted polymer with said material comprising mycotoxins under conditions that permit said molecularly imprinted polymer to bind said myotoxin.

26. The method of claim 25, wherein said method sequesters ochratoxin A from said material.

27. The method of claim 25, wherein said method sequesters sporidesmin from said material.

28. The method of claim 25, wherein said material comprising mycotoxins is selected from the group consisting of a beverage, a foodstuff, an animal feed, a pharmaceutical composition, a nutraceutical composition, a cosmetic composition, and a substance necessary to sustain life.

29. The method of claim 28, wherein said substance necessary to sustain life is selected from the group consisting of a medium for use in aquaculture and a gaseous sample comprising oxygen.

30. The method of claim 25, wherein a molecularly imprinted polymer bound to a mycotoxin is not separated from said material comprising mycotoxins.

31. The method of claim 25, further comprising c) separating molecularly imprinted polymers bound to mycotoxin from said material comprising mycotoxins.

32. The method of claim 31, wherein said separating comprises extracting, concentrating and isolating said molecularly imprinted polymers bound to mycotoxin from said material comprising mycotoxins.

33. The method of claim 32, wherein said separating occurs in a chromatographic or separative column or cartridge.

34. The method of claim 32, wherein after separating, mycotoxin bound to said molecularly imprinted polymers are removed from said molecularly imprinted polymers by washing.

35. The method of claim 34, wherein the mycotoxins are qualitatively and quantitatively analyzed after removal from said molecularly imprinted polymers.

36. The method of claim 35, wherein the quantitative and qualitative analysis is utilized for traceability.

37. The method of claim 34, wherein said molecularly imprinted polymer from which mycotoxins has been removed is reused to sequester a mycotoxin from a material comprising mycotoxins.

38. The method of claim 25, wherein said molecularly imprinted polymer adsorbs 1 to 10 times more water than its weight.

39. The method of claim 38, wherein said molecularly imprinted polymer adsorbs 1 to 5 times more water than its weight.

40. The method of claim 38, wherein said molecularly imprinted polymer adsorbs 1 to 2 times more water than its weight.

41. The method of claim 25, wherein two or more different molecularly imprinted polymers are contacted with said material comprising mycotoxins in order to sequester two or more specific mycotoxins from said material.

42. A method for synthesizing N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine, comprising:

a) converting 3-5 dichlorosalicylic acid into 2-acetoxyacetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid;

b) converting 2-acetoxyacetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid into 2-acetoxyacetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid chloride;

c) reacting 2-acetoxyacetoxy-3,5-dichlorobenzoic acid chloride with L-phenylalanine ethyl ester to form N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine; and

d) converting N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine into N-(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine.

43. The method of claim 42,wherein said converting comprises hydrolyzing of ester functions in N-(2-acetoxy-3,5-dichlorobenzoyl)-L-phenylalanine.

44. A method for synthesizing 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine, comprising:

a) converting 2,3-dimethoxybenzoic acid into 2,3-dimethoxy-N-tertbutoxycarbonylaniline;

b) converting 2,3-dimethoxy-N-tertbutoxycarbonylaniline into 2,3-dimethoxyaniline;

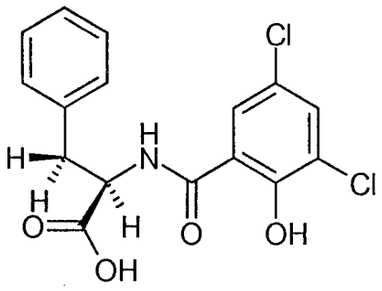
c) reacting 2,3-dimethoxyaniline with diethylketomalonate to form ethyl 6,7-dimethoxy-3-hydroxy-3-(2-indolone)-carboxylate;

d) converting ethyl 6,7-dimethoxy-3-hydroxy-3-(2-indolone)-carboxylate into 6,7-dimethoxyisatine;

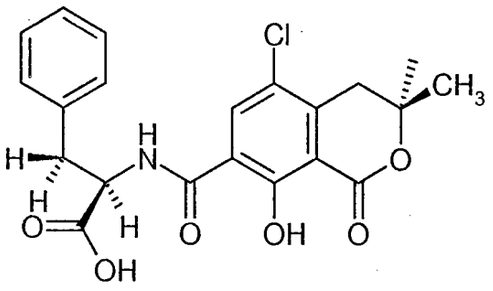
e) converting 6,7-dimethoxyisatine into 6,7-dimethoxy-1-methylisatine; and

f) converting 6,7-dimethoxy-1-methylisatine into 5-chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine.

Figure 1

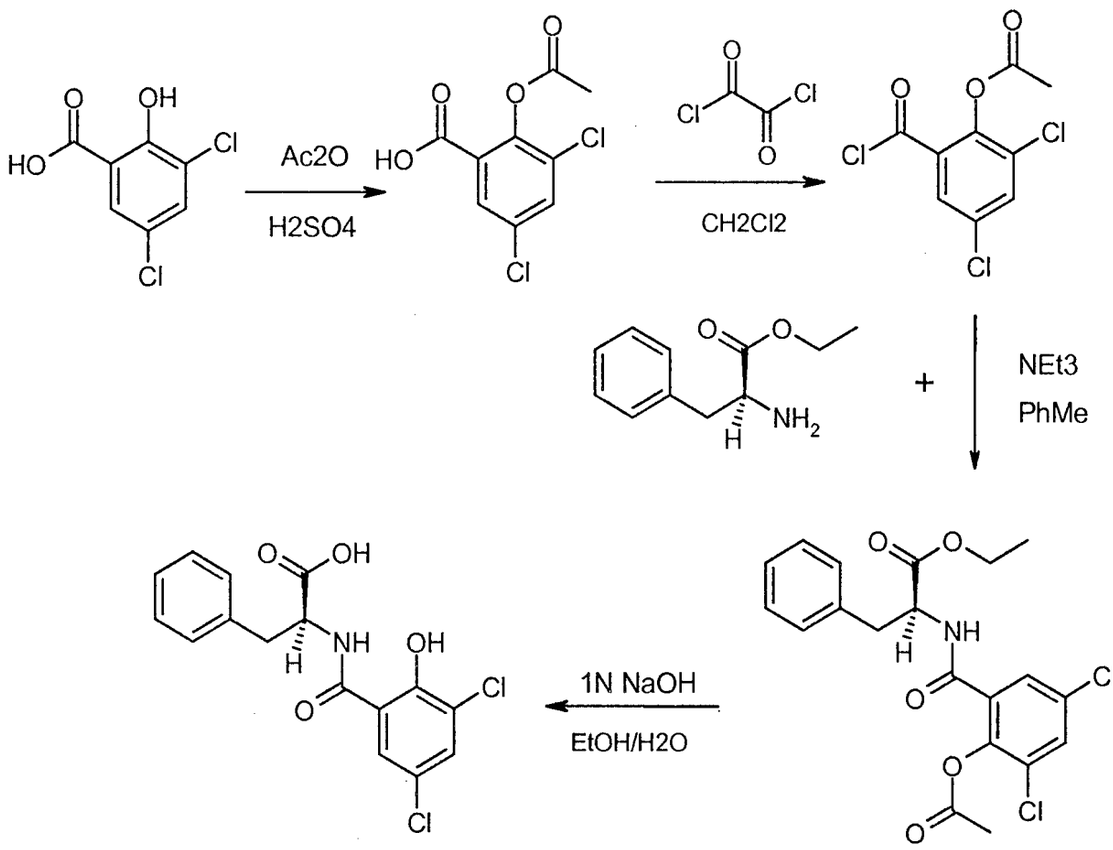


Template



Ochratoxin A

Figure 2



Ochratoxin A Template (I)

Phenylalanine benzamide diester (II)

Figure 3

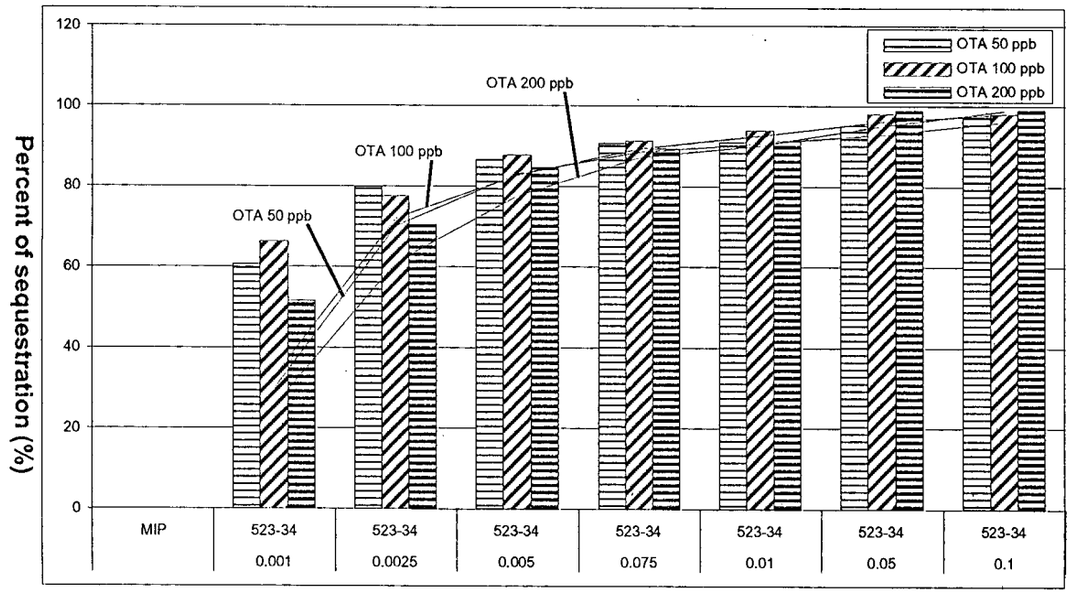

120
100
80
60
40
20
0
Percent of sequestration (%)
OTA 50 ppb
OTA 100 ppb
OTA 200 ppb
OTA 50 ppb
OTA 100 ppb
OTA 200 ppb
MIP
523-34 0.001
523-34 0.0025
523-34 0.005
523-34 0.075
523-34 0.01
523-34 0.05
523-34 0.1

Figure 4

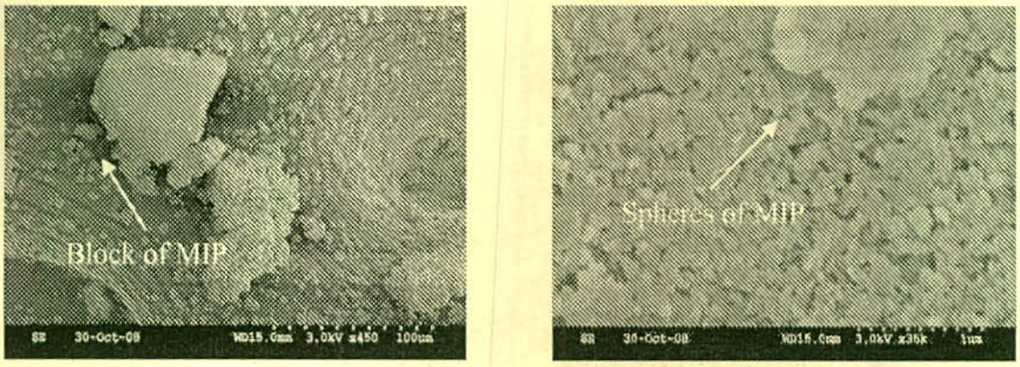

Block of MIP
SE 30-Oct-08 WD15.0mm 3.0kV x450 100um
Spheres of MIP
SE 30-Oct-08 WD15.0mm 3.0kV x35k 1um

Figure 5

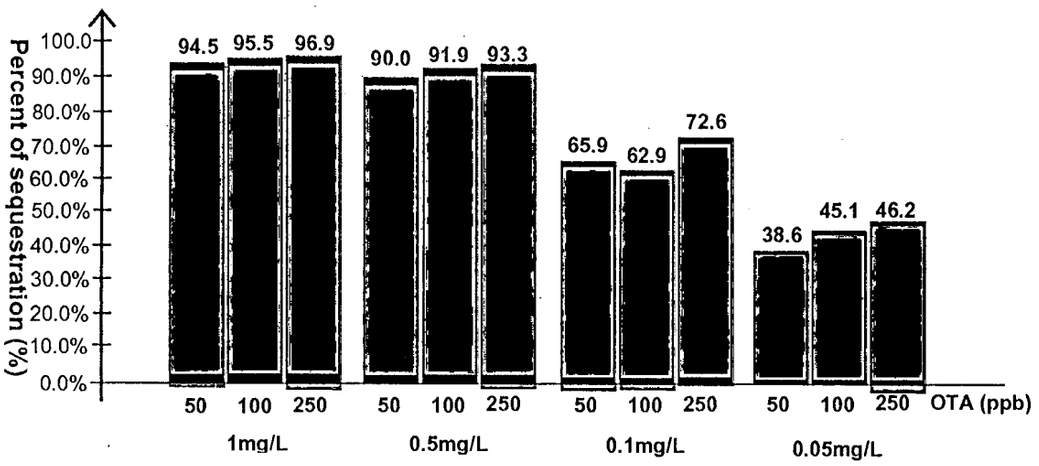

Percent of sequestration (%)
100.0
90.0%
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
94.5
95.5
96.9
90.0
91.9
93.3
65.9
62.9
72.6
38.6
45.1
46.2
50
100
250
OTA (ppb)
1mg/L
0.5mg/L
0.1mg/L
0.05mg/L

Figure 6

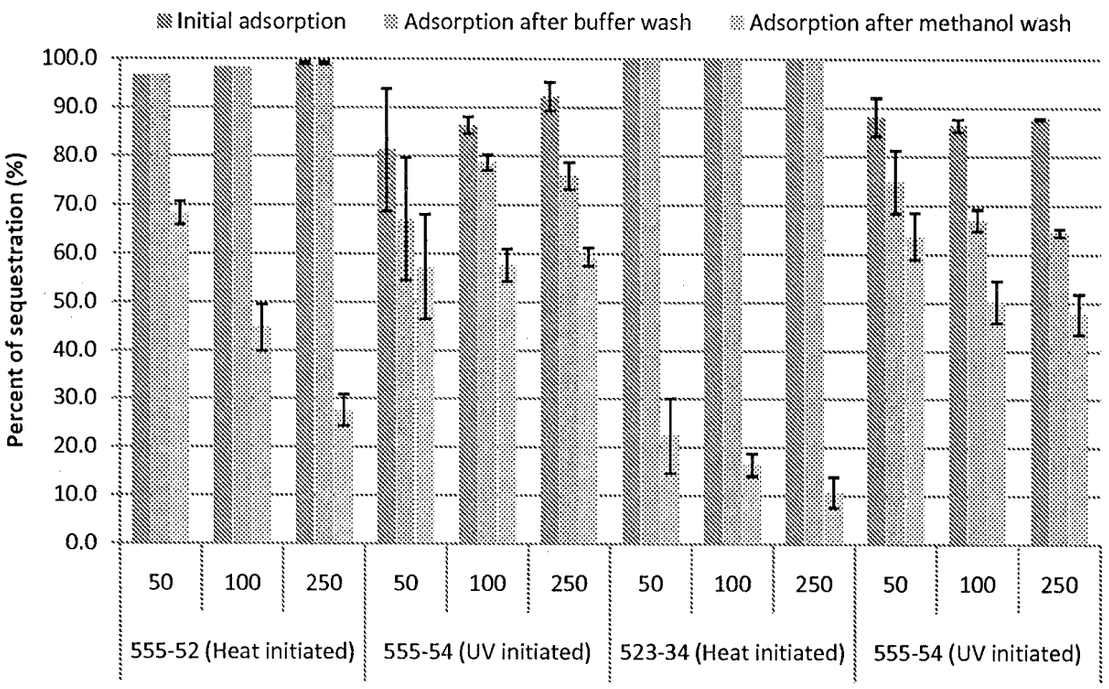

Initial adsorption
Adsorption after buffer wash
Adsorption after methanol wash
Percent of sequestration (%)
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
50
100
250
555-52 (Heat initiated)
555-54 (UV initiated)
523-34 (Heat initiated)
555-54 (UV initiated)

Figure 7

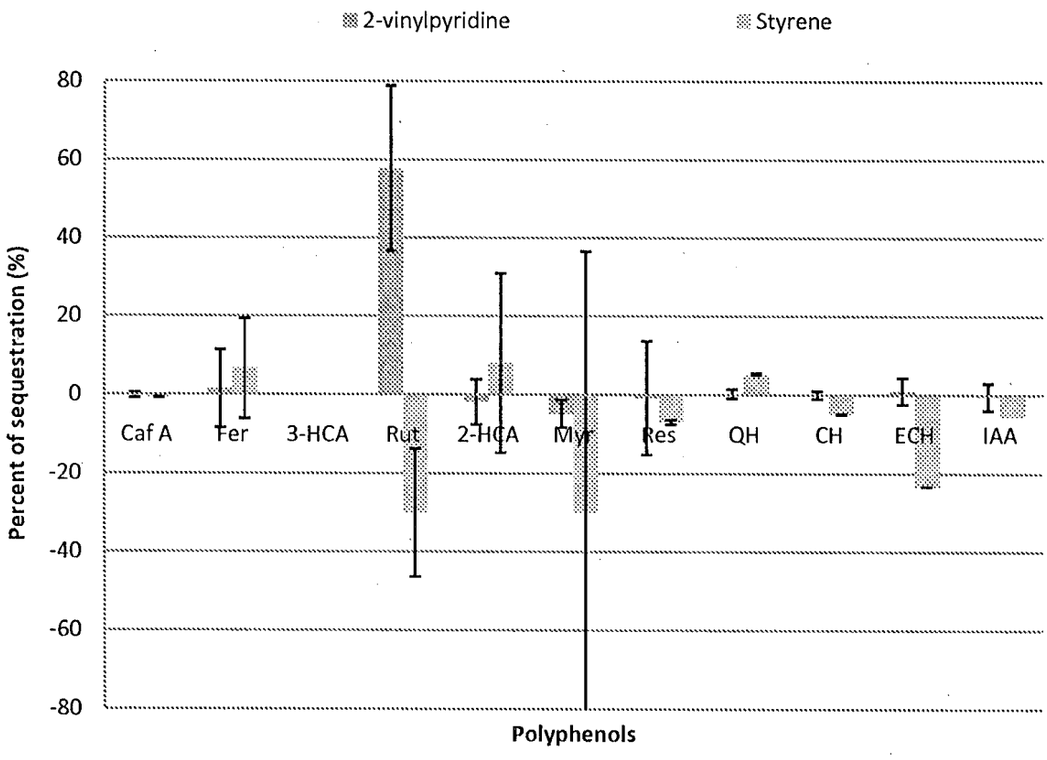

2-vinylpyridine
Styrene
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
Percent of sequestration (%)
Caf A
Fer
3-HCA
Rut
2-HCA
Myr
Res
QH
CH
ECH
IAA
Polyphenols

Figure 8

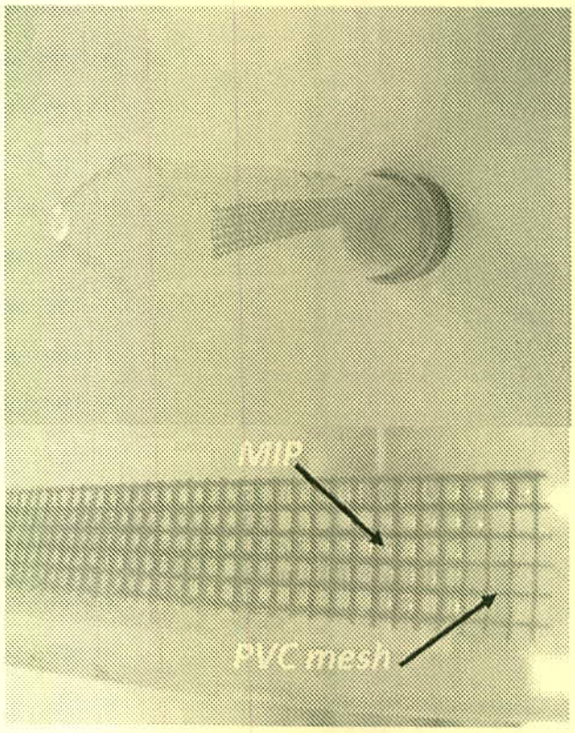


Figure 9

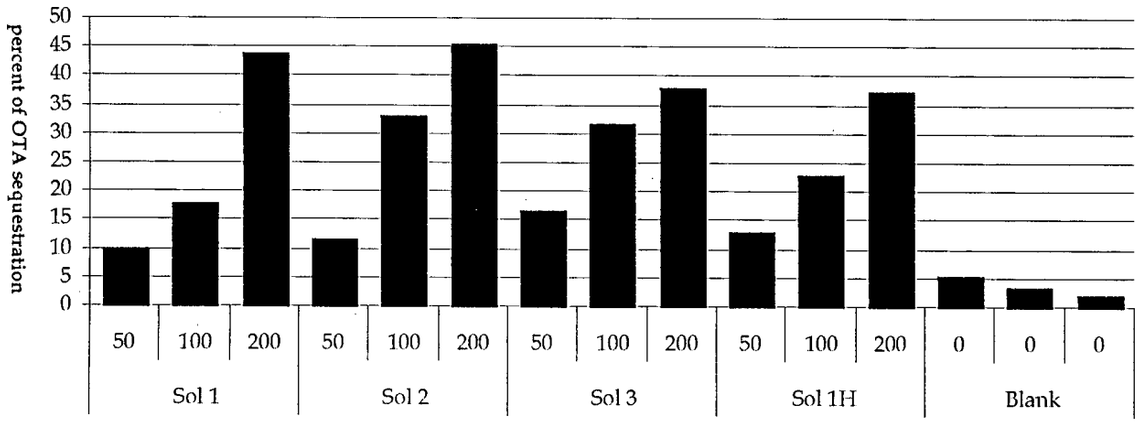

percent of OTA sequestration
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
50
100
200
50
100
200
50
100
200
50
100
200
0
0
0
Sol 1
Sol 2
Sol 3
Sol 1H
Blank

Figure 10

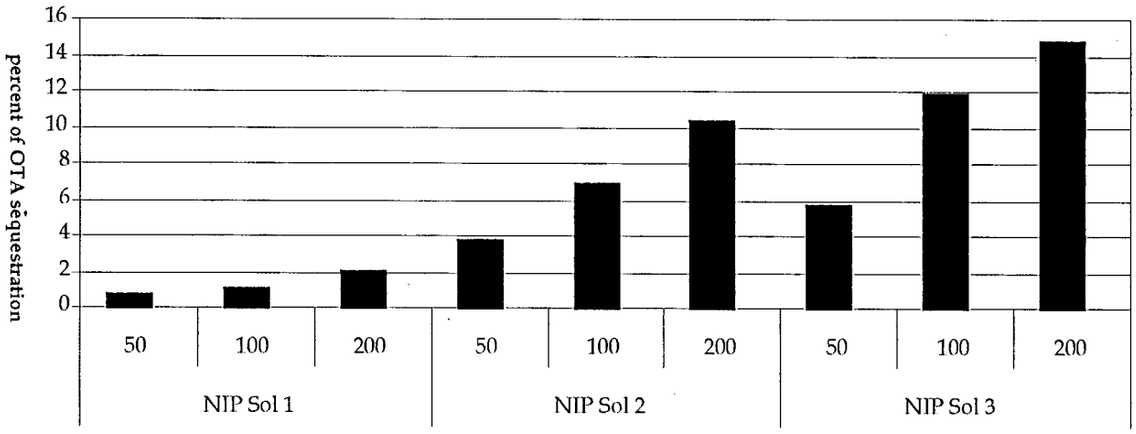
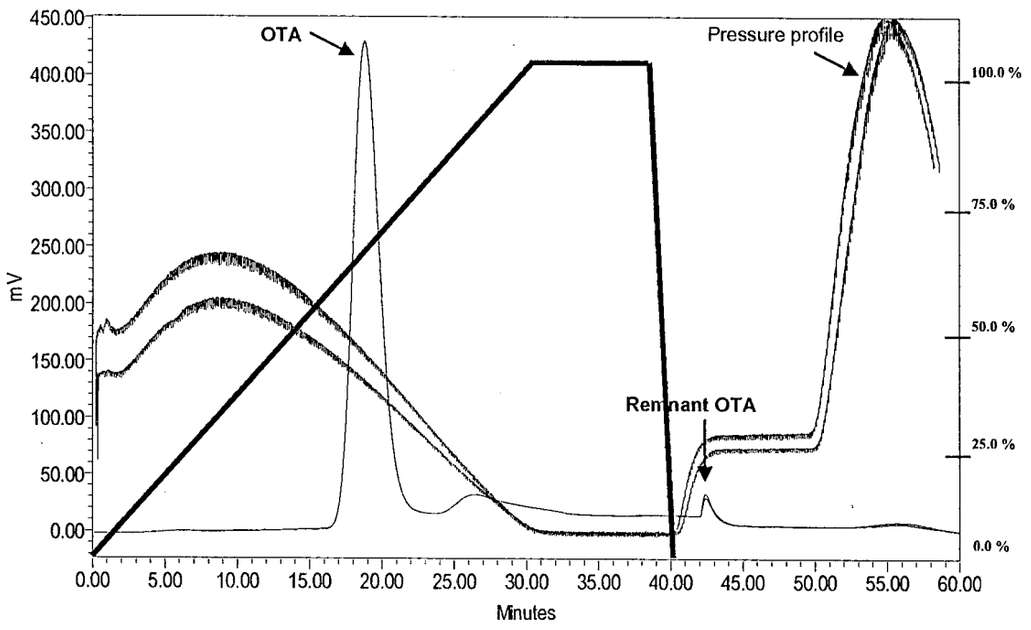
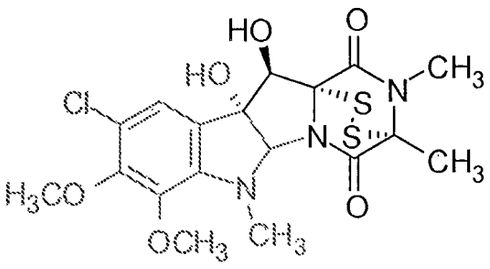

percent of OTA sequestration
16
14
12
10
8
6
4
2
0
50
100
200
50
100
200
50
100
200
NIP Sol 1
NIP Sol 2
NIP Sol 3

Figure 11

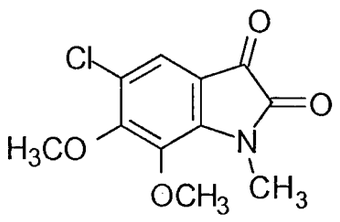


	Time	Flow	% 1% Tetraethylammonium in methanol	% Acetonitrile	% H2O
1	0.01	1.00	0.0	0.0	100.0
2	30.00	1.00	0.0	100.0	0.0
3	40.00	1.00	0.0	100.0	0.0
4	41.00	1.00	100.0	0.0	0.0
5	50.00	1.00	100.0	0.0	0.0
6	60.00	1.00	0.0	0.0	100.0
7	61.00	1.00	0.0	0.0	100.0
8	62.00	0.10	0.0	0.0	100.0

Figure 12



Mycotoxin - Spirodesmin A



5-Chloro-6,7-dimethoxy-1-methylisatine
Spirodesmin A template

Figure 13

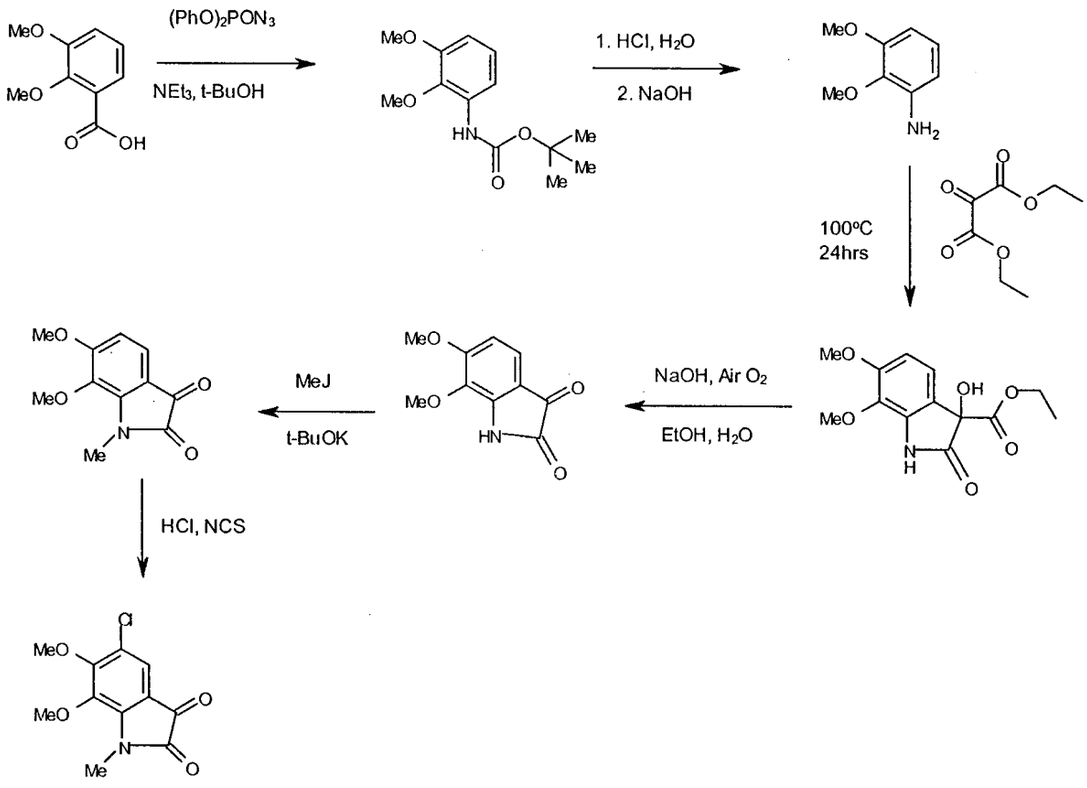

MeO
MeO
OH
O
(PhO)2PON3
NEt3, t-BuOH
HN
O
Me
Me
Me
1. HCl, H2O
2. NaOH
NH2
100°C
24hrs
OH
NaOH, Air O2
EtOH, H2O
MeJ
t-BuOK
N
Me
HCl, NCS
Cl

Figure 14

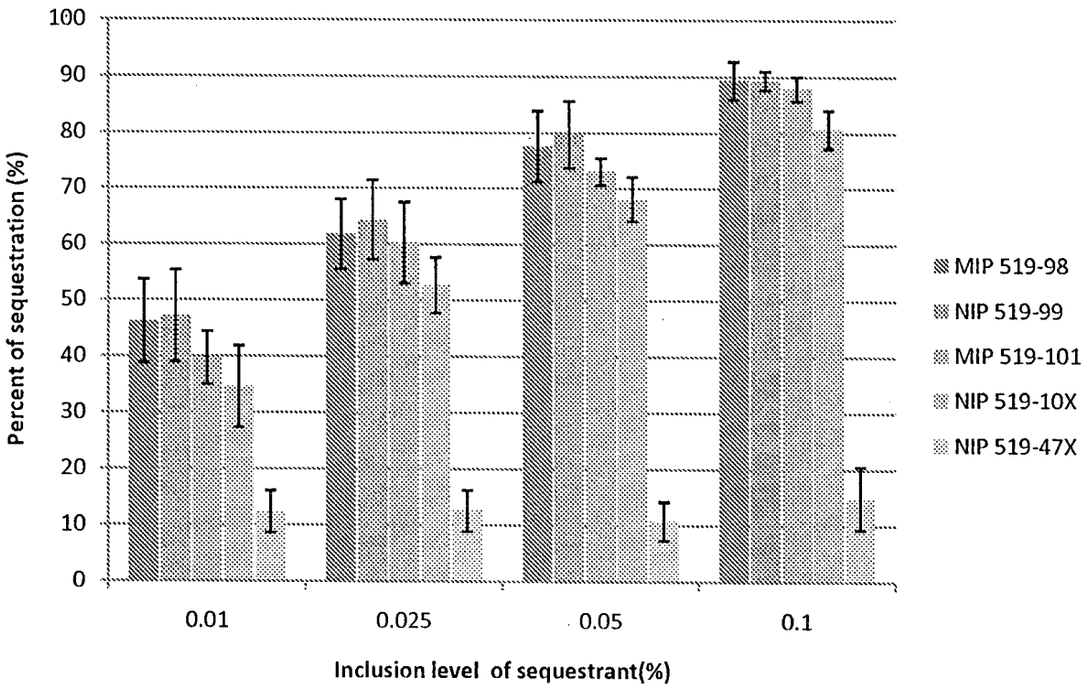

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Percent of sequestration (%)
0.01
0.025
0.05
0.1
Inclusion level of sequestrant(%)
MIP 519-98
NIP 519-99
MIP 519-101
NIP 519-10X
NIP 519-47X

Figure 15

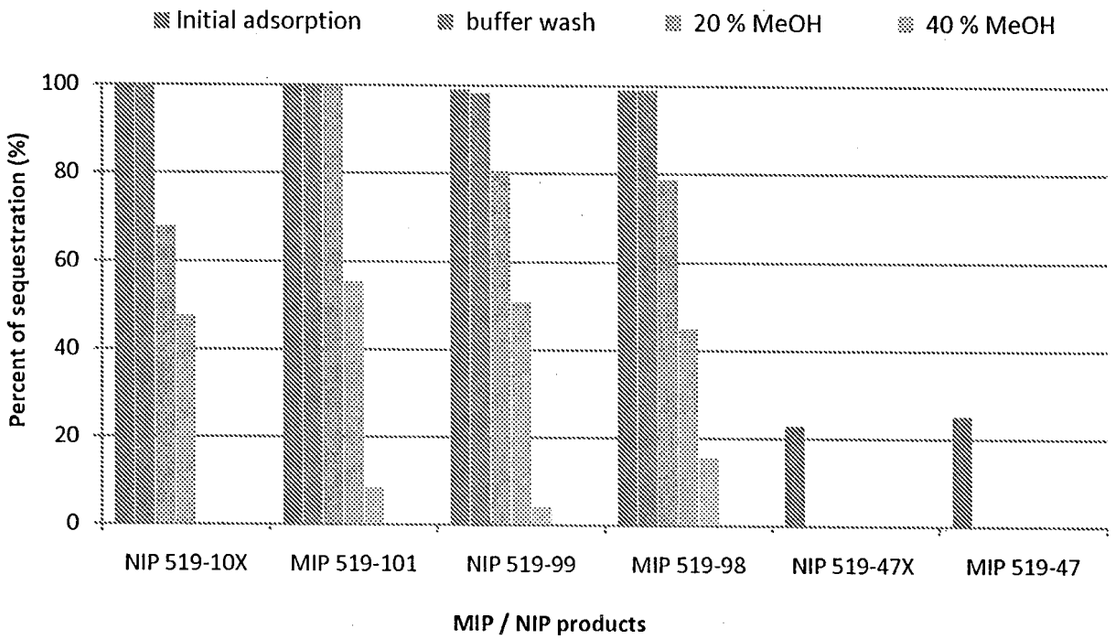
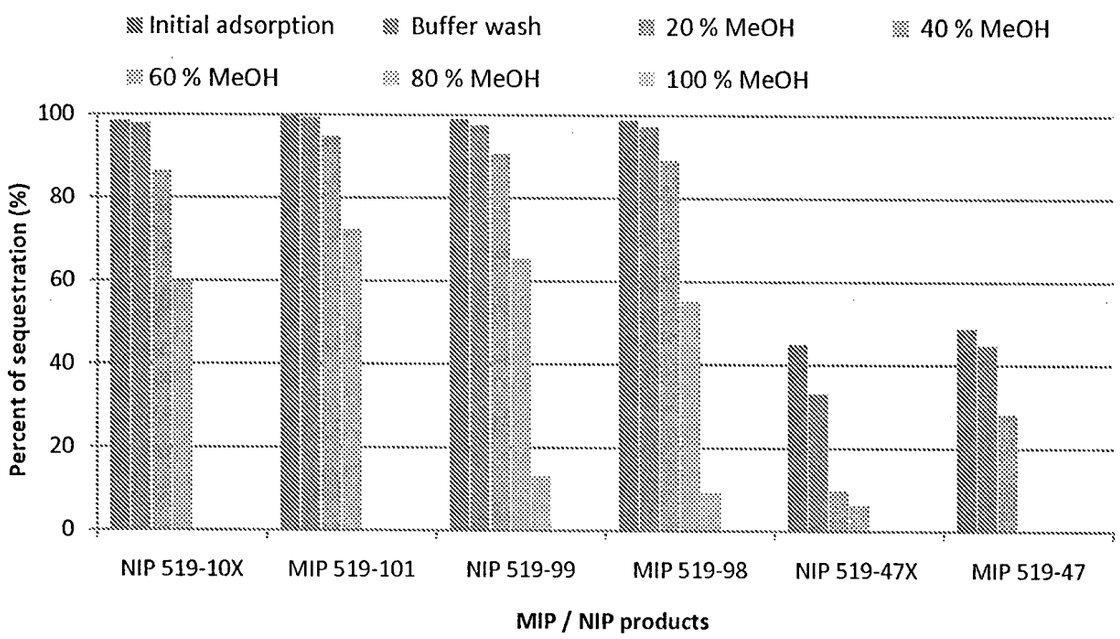

Initial adsorption
buffer wash
20 % MeOH
40 % MeOH
Percent of sequestration (%)
100
80
60
40
20
0
NIP 519-10X
MIP 519-101
NIP 519-99
MIP 519-98
NIP 519-47X
MIP 519-47
MIP / NIP products

Figure 16


Initial adsorption
Buffer wash
20 % MeOH
40 % MeOH
60 % MeOH
80 % MeOH
100 % MeOH
Percent of sequestration (%)
100
80
60
40
20
0
NIP 519-10X
MIP 519-101
NIP 519-99
MIP 519-98
NIP 519-47X
MIP 519-47
MIP / NIP products

TRADUCCION
SOLICITUD
INTERNACIONAL

ADSORBENTES SINTÉTICOS DE MICOTOXINA Y MÉTODOS PARA ELABORARLOS Y UTILIZARLOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente Solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense Número de Serie 61/237,549 presentada en Agosto 27, 2009, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona de manera general con los polímeros de impresión molecular (MIP). En particular, la presente invención se relaciona con MIP ecológicamente amigables, reutilizables, métodos para producirlos, y métodos para utilizarlos (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber objetivos (por ejemplo, micotoxinas)). Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones que incluyen aplicaciones dietarias, terapéuticas, profilácticas, procesamiento y fabricación de alimentos y bebidas, así como también aplicaciones en investigación y control de calidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios secretados por una variedad de hongos, producidos frecuentemente en granos de cereales así como también forrajes antes, durante y después de cosechas. Los forrajes y cereales entran en forma natural en contacto con esporas fúngicas. La contaminación fúngica de las plantas y la biosíntesis de las toxinas

depende del estado de salud de la planta antes de cosecha, condiciones metereológicas, técnicas de cosecha, retrasos y condiciones hidrotérmicas antes de estabilización para conservación y procesamiento de alimentos. Dependiendo del hongo, se controla el crecimiento fúngico por un número de parámetros físico-químicos que incluyen la cantidad de agua libre (a_w), temperatura, presencia de oxígeno, naturaleza del sustrato, y condiciones de pH. Las micotoxinas proliferan en pre-cosecha así como también en post-cosecha en almacenamiento.

Algunos hongos solo producen toxinas en niveles específicos de humedad, temperatura u oxígeno. Los efectos de micotoxinas varían en gran medida en su severidad. Algunas micotoxinas son letales, algunas provocan enfermedades identificables o problemas de salud, algunas debilitan el sistema inmune sin producir síntomas específicos para aquella micotoxina, algunas actúan como alérgenos o irritantes, y algunas no han tenido efecto conocido en los animales o humanos. Durante la II Guerra Mundial los soldados Rusos sufrieron necrosis dérmica severa, hemorragia y destrucción de la médula ósea después de comer granos con moho que se contaminaron con *Fusarium*. Sin embargo, no fue sino hasta 1960, cuando más de 100,000 pavos de Gran Bretaña fueron diezmados por una fatal enfermedad del hígado (Enfermedad de Turkey X) que la comunidad científica reconoció los efectos negativos asociados con las micotoxinas (Ver, por ejemplo, Trenholm H.L., Charmley L.L., and Prelusky D.B., 1996. *Micotoxina binding agents: An update on what we know*. In:

Biotechnology in the Feed Industry (Lyons T. P y Jacques K.A eds.) Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK, pp. 327-349.). De acuerdo con los reportes recientes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), aproximadamente 25 % del suministro de grano mundial se contamina con micotoxinas. La contaminación por micotoxina tiene un impacto económico negativo en los productores de alimentos y comidas, particularmente productos de grano y aves de corral.

Las micotoxinas pueden aparecer en la cadena alimenticia como resultado de la infección fúngica de los productos vegetales (por ejemplo, forraje, grano, proteína de planta, subproductos de grano procesados, productos de molasas y forraje duro), y se pueden comer directamente por los humanos, o introducir mediante granos contaminados, alimentos para ganado u otros animales. Las micotoxinas resisten en gran medida la descomposición durante digestión ya que permanecen en la cadena alimenticia de los productos comestibles (por ejemplo, carne, pescado, huevos y productos lácteos) o bajo la forma de metabolitos de la toxina progenitora ingerida. Los tratamientos de temperatura tales como cocción y congelamiento no son métodos adecuados para reducir la prevalencia de las micotoxinas. Así, subsiste la necesidad de composiciones y/o métodos para reducir los efectos perjudiciales y/o eliminar la aparición de micotoxina en los alimentos y/o las cadenas alimenticias.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con los polímeros de impresión molecular (MIP). En particular, la presente invención se relaciona con MIP ecológicamente amigables, reutilizables, métodos para producirlos, y métodos para utilizarlos (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber objetivos (por ejemplo, micotoxinas). Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones que incluyen aplicaciones dietarias, terapéuticas, profilácticas, procesamiento y fabricación de alimentos y bebidas, así como también aplicaciones en investigación y control de calidad.

De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende un polímero de impresión molecular sintetizado utilizando una plantilla de micotoxina. La presente invención no se limita a la plantilla de micotoxina utilizada para generar un polímero de impresión molecular. De hecho, se puede utilizar una variedad de plantillas de micotoxina que incluyen, pero no se limitan a, acetoxiscirpenediol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina acetil T-2, aflatoxina, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, *ácido* altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceína +1, beauvericina +2, bentenolida, brevianamida, butenolida, calonectrina, chaetoglobosina, chaetocina, chaetomina, citrinina, citreoviridina, cocliodinol, citochalasinas, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desactilneosolaniol, desoxinivalenol diacetato, *monoacetato*

desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, destruxina B, emestrina, enniatinas, toxinas alcaloides del cornezuelo y endofitos tales como ergina, ergocornina, ergocristina, ergocriptina, ergometrina, ergonina, ergosina, ergotamina, ergovalina, lisergol, ácido lisérgico, y epímeros relacionados, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisinas A1, A2, B1 y B2 y B3, fusarenón-X, fusarocromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, hialodendrina, ipomeanina, islanditoxina, isofumigaclavinas A y B, lateritina +1, leptosina, licomarasmina +1, malformina, maltorizina, moniliformina, monoacetoxiscirpenol, ácido micofenólico, neosolaniol, nivalenol, toxina NT-1, toxina NT-2, ocratoxina, oosporeina, ácido oxálico, paspalitrem A y B, patulina, ácido penicílico, penitrem, fomopsinas, toxina PR, roridina E, roquefortina A y B, rubratoxina, rubrosquirina, rubrosulfina, rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, escirpentriol, sirodesmina, eslaframina, esporidesmina, esterigmatocistina, swainsonina, toxina T-1, toxina T-2, ácido tenuazoico, triacetoxiscirpendiol, tricotecenos, tricodermina, tricotecina, tricoverrinas, tricoverroles, triptoquivaleno, verrucarina, verruculogeno, verticilinas, viopurpurina, viomeleina, viriditoxina, wortmannina, xantocilina, yavanicin+1, zearalenoles, zearalanonas, zearalenona, α, β, zearalanona, α, β, zeranol y subfamilias y/o derivados de los mismos, y/o conjugados. En algunas realizaciones preferidas, la plantilla de micotoxina es OTA. En otras realizaciones preferidas, la plantilla de micotoxina es esporidesmina o un alcaloide cornezuelo. En algunas realizaciones, la plantilla de ocratoxina es N-(2-hidroxi-

3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina. En algunas realizaciones, la plantilla de esporidesmina es 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina. Sin embargo, la presente invención no se limita a estas ocratoxinas o plantillas de esporidesmina. De hecho, se puede utilizar una variedad de diferentes plantillas que incluyen N-terc-butoxicarbonil-2,3-dimetoxianilina, 2,3-dimetoxianilina, etil 3-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-indolona-3-carboxilato, 6,7-dimetoxiisatina, o 6,7-dimetoxi-1-metilisatina.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para elaborar un polímero de impresión molecular que comprende: proporcionar: una plantilla de micotoxina; y uno o más monómeros y uno o más reticuladores; y poner en contacto la plantilla de micotoxina con uno o más monómeros y uno o más reticuladores bajo condiciones que permiten la polimerización de uno o más monómeros y uno o más reticuladores en la presencia de la plantilla de micotoxina. En algunas realizaciones, la plantilla de micotoxina es N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina. En algunas realizaciones, la plantilla de micotoxina es 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina. La presente invención no se limita a la plantilla de micotoxina utilizada. De hecho, se puede utilizar una variedad de moléculas sintéticas como plantillas de micotoxina en donde las moléculas sintéticas imitan una o más de las estructuras, formas y/o otras características químicas de micotoxinas naturales. De la misma manera la presente invención no se limita por los tipos de monómeros utilizados. Por ejemplo, se conoce una variedad de monómeros

conocidos por aquellas personas mediadamente versadas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, 2-vinilpiridina, 2-hidroxietilmetacrilato y ácido metacrílico. De la misma manera la presente invención no se limita al tipo de reticulador utilizado. Por ejemplo, se conoce una variedad de reticuladores por aquellas personas medianamente versadas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, dimetacrilato de etilenglicol. En algunas realizaciones, la polimerización se inicia al formar radicales libres en un disolvente orgánico a una temperatura entre 55 y 110 grados Celsius, aunque se pueden utilizar menores (por ejemplo, 50, 45, 40, 35, 30 grados Celsius o menos) y mayores (por ejemplo, 115, 120, 125, 130 grados Celsius o más). En algunas realizaciones, los radicales libres se forman mediante la descomposición iniciada térmicamente de azoisobutironitrilo (AIBN). La presente invención no está limitada por el tipo de disolvente orgánico utilizado. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es tolueno, ciclohexano, acetonitrilo, una solución de alcohol polivinílico (PVA)/agua, y una mezcla de dos o más de tolueno, ciclohexano, acetonitrilo, y una solución de PVA/agua. En algunas realizaciones, la temperatura está entre 55 y 75 grados Celsius. En algunas realizaciones, la plantilla de micotoxina se retira del polímero de impresión molecular después de la polimerización de uno o más monómeros y uno o más reticuladores. En algunas realizaciones, se utilizan uno o más lavados con una solución para retirar la plantilla de micotoxina del polímero de impresión molecular. La presente invención no está limitada por el tipo de solución utilizada para lavado. En algunas realizaciones, la

solución es un disolvente orgánico, un regulador, agua o una combinación de los mismos. La presente invención no está limitada por el tipo de disolvente orgánico utilizado. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es alcohol etílico, alcohol metílico, acetonitrilo, tolueno, y/o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, el regulador es un regulador preparado al hacer reaccionar hidróxido de sodio, ácido cítrico, ácido succínico y ácido acético. En algunas realizaciones, el agua es agua desionizada. En algunas realizaciones, el polímero de impresión molecular se seca después de uno o más lavados. En algunas realizaciones, la exposición del polímero de impresión molecular a una temperatura entre 20 y 90 grados Celsius (por ejemplo, entre 60 y 80 grados Celsius; entre 75 y 80 grados Celsius) se utiliza para secar el polímero de impresión molecular, aunque se pueden utilizar temperaturas menores o mayores.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para secuestrar una micotoxina de un material, que comprende: proporcionar un material que comprende micotoxinas; y un polímero de impresión molecular generado por medio de la polimerización de uno o más monómeros y uno o más reticuladores en la presencia de una plantilla de micotoxina; y poner en contacto el polímero de impresión molecular con el material que comprende micotoxinas bajo condiciones que permiten al polímero de impresión molecular unirse a la miotoxina. La presente invención no está limitada por el tipo de micotoxinas secuestradas (por ejemplo, dirigido para secuestro) del material. De hecho, se puede

secuestrar una variedad de micotoxinas que incluyen, pero no se limitan a, acetoxiscirpenediol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina acetil T-2, aflatoxina, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, *ácido* altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceina +1, beauvericina +2, bentenolida, brevianamida, butenolida, calonectrina, chaetoglobosina, chaetocina, chaetomina, citrinina, citreoviridina, cochliodinol, citochalasinas, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desactilneosolaniol, diacetato de desoxinivalenol, *monoacetato de* desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, destruxina B, emestrina, enniatinas, toxinas alcalinas de cornezuelo y endofitos tales como ergina, ergocornina, ergocristina, ergocriptina, ergometrina, ergonina, ergosina, ergotamina, ergovalina, lisergol, ácido lisérgico, y epímeros relacionados, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisinas A1, A2, B1 y B2 y B3, fusarenón-X, fusarocromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, hialodendrina, ipomeanina, islanditoxina, isofumigaclavinas A y B, lateritina +1, leptosina, licomarasmina +1, malformina, maltorizina, moniliformina, monoacetoxiscirpenol, ácido microfenólico, neosolaniol, nivalenol, toxina NT-1, toxina NT-2, ocratoxina, oosporeina, ácido oxálico, paspalitrem A y B, patulina, ácido penicílico, penitrem, fomopsinas, toxina PR, roridina E, roquefortina A y B, rubratoxina, rubrosquirina, rubrosulfina, rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, escirpentriol, sirodesmina, eslaframina, esporidesmina, esterigmatocistina, swainsonina, toxina T-1, toxina T-2, ácido tenuazoico,

triacetoxiscirpendiol, tricotecenos, tricodermina, tricotecina, tricoverrinas, tricoverroles, triptoquivaleno, verrucarina, verruculogeno, verticilinas, viopurpurina, viomeleina, viriditoxina, wortmannina, xantocilina, yavanicin+1, zearalenoles, zearalanonas, zearalenona, α, β, zearalanona, α, β, zeranol y subfamilias y/o derivados de los mismos. En algunas realizaciones preferidas, la micotoxina secuestrada que forma el material es ocratoxina A. En algunas realizaciones preferidas, la micotoxina es esporidesmina. En algunas realizaciones, el material que comprende micotoxinas es una bebida, un alimento, un alimento para animales, una composición farmacéutica, una composición nutracéutica, una composición cosmética, una sustancia necesaria para mantener la vida, u otro material. En algunas realizaciones, la sustancia necesaria para mantener la vida es un medio para uso en acuacultura y una muestra gaseosa que comprende oxígeno. En algunas realizaciones, un polímero de impresión molecular unido a una micotoxina no se separa del material que comprende micotoxinas. En algunas realizaciones, el método para secuestrar una micotoxina de un material, comprende adicionalmente separar los polímeros de impresión molecular unidos a micotoxina del material que comprende micotoxinas. En algunas realizaciones, separar comprende extraer, concentrar y aislar los polímeros de impresión molecular unidos a la micotoxina del material que comprende micotoxinas. En algunas realizaciones, la separación ocurre en un cartucho o columna cromatográfica o de separación. En algunas realizaciones, después de separar, la micotoxina unida a los polímeros de impresión molecular se retira de los

polímeros de impresión molecular mediante lavado. En algunas realizaciones, las micotoxinas se analizan cuantitativamente y cualitativamente después de la remoción de los polímeros de impresión molecular. En algunas realizaciones, el análisis cuantitativo y cualitativo se utiliza para trazabilidad (por ejemplo, para identificar y/o interrelacionar la cronología, ubicación, y/o aplicación de un ítem (por ejemplo, la ubicación, tipo y cantidad de micotoxinas encontradas) por medio de la identificación documentada registrada). En algunas realizaciones, el polímero de impresión molecular del que se han retirado las micotoxinas se vuelve a utilizar para secuestrar una micotoxina de un material que comprende micotoxinas. En algunas realizaciones, el polímero de impresión molecular adsorbe 1 a 10 veces más (por ejemplo, 1 a 5 veces más, 1 a 2 veces más) agua que su peso. En algunas realizaciones, dos o más polímeros de impresión molecular diferentes se ponen en contacto con el material que comprende micotoxinas con el fin de secuestrar dos o más micotoxinas específicas del material.

La invención también proporciona un método para sintetizar N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina, que comprende: convertir ácido 3-5 diclorosalicílico en ácido 2-acetoxiacetoxi-3,5-diclorobenzoico; convertir ácido 2-acetoxiacetoxi-3,5-diclorobenzoico en cloruro de ácido 2-acetoxiacetoxi-3,5-diclorobenzoico; hacer reaccionar cloruro de ácido 2-acetoxiacetoxi-3,5-diclorobenzoico con etil éster de L-fenilalanina para formar N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina; y convertir N-(2-acetoxi-3,5-

diclorobenzoil)-L-fenilalanina en N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina. En algunas realizaciones, la conversión comprende la hidrolización de las funciones de éster de N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina.

La invención también proporciona un método para sintetizar 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina, que comprende: convertir ácido 2,3-dimetoxibenzoico en 2,3-dimetoxi-N-tercbutoxicarbonilanilina; convertir 2,3-dimetoxi-N-tercbutoxicarbonilanilina en 2,3-dimetoxianilina; hacer reaccionar 2,3-dimetoxianilina con dietilcetomalonato para formar etil 6,7-dimetoxi-3-hidroxi-3-(2-indolona)-carboxilato; convertir etil 6,7-dimetoxi-3-hidroxi-3-(2-indolona)-carboxilato en 6,7-dimetoxiisatina; convertir 6,7-dimetoxiisatina en 6,7-dimetoxi-1-metilisatina; y convertir 6,7-dimetoxi-1-metilisatina en 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina.

La invención también proporciona un método para sintetizar un polímero de impresión molecular específico para micotoxina, que comprende: generar un compuesto de plantilla capaz de facilitar la unión de MIP a la micotoxina; combinar el compuesto de plantilla en una reacción que comprende un monómero MIP y un reactivo de reticulación en un sistema de disolvente que comprende un disolvente no prótico, apolar; y promover la polimerización mediante una acción seleccionada del grupo que consiste de exponer el recipiente de reacción a una temperatura elevada o exponer el recipiente de reacción a irradiación UV. En algunas realizaciones, la micotoxina

comprende ocratoxina A, sin embargo, la invención no se limita así. De hecho, se puede sintetizar una variedad de polímeros de impresión molecular específicos para una micotoxina como se describe aquí que incluyen, pero no se limitan a, los MIP específicos para acetoxiscirpenediol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina acetil T-2, aflatoxina, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, *ácido* altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceina +1, beauvericina +2, bentenolida, brevianamida, butenolida, calonectrina, chaetoglobosina, chaetocina, chaetomina, citrinina, citreoviridina, cocliodinol, citochalasinas, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desactilneosolaniol, diacetato de desoxinivalenol, *monoacetato de* desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, destruxina B, emestrina, enniatinas, toxinas alcaloides de cornezuelo y endofitos tales como ergina, ergocornina, ergocristina, ergocriptina, ergometrina, ergonina, ergosina, ergotamina, ergovalina, lisergol, ácido lisérgico, y epímeros relacionados, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisinas A1, A2, B1 y B2 y B3, fusarenón-X, fusarocromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, hialodendrina, ipomeanina, islanditoxina, isofumigaclavinas A y B, lateritina +1, leptosina, licomarasmina +1, malformina, maltorizina, moniliformina, monoacetoxiscirpenol, ácido micofenólico, neosolaniol, nivalenol, toxina NT-1, toxina NT-2, ocratoxina, oosporeina, ácido oxálico, paspalitrem A y B, patulina, ácido penicílico, penitrem, fomopsinas, toxina PR, roridina E, roquefortina A y B, rubratoxina, rubrosquirina, rubrosulfina,

rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, escirpentriol, sirodesmina, eslaframina, esporidesmina, esterigmatocistina, swainsonina, toxina T-1, toxina T-2, ácido tenuazoico, triacetoxiscirpendiol, tricotecenos, tricodermina, tricotecina, tricoverrinas, tricoverroles, triptoquivaleno, verrucarina, verruculogeno, verticilinas, viopurpurina, viomeleína, viriditoxina, wortmannina, xanthocilina, yavanicin+1, zearalenoles, zearalanonas, zearalenona, α, β, zearalanona, α, β, zeranol y subfamilias y/o derivados de los mismos. En algunas realizaciones, la plantilla comprende N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina. En algunas realizaciones, la plantilla comprende 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina. La presente invención no se limita a cualquier monómero o reticulador particular. De hecho, se puede utilizar una variedad de monómeros y reticuladores que incluyen aquellos descritos aquí. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente lavar el polímero de impresión molecular para retirar la plantilla. En algunas realizaciones, el lavado comprende 1, 2, 3, 4 o más lavados con una solución (por ejemplo, una solución alcalina diluida, una solución de ácido diluida, o agua) para retirar la plantilla.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra ocratoxina A y N-(3,5-dicloro-2-hidroxibenzoil)-L-fenilalanina (Plantilla OTA).

La Figura 2 muestra la ruta sintética N-(3,5-dicloro-2-hidroxibenzoil)-L-fenilalanina (Plantilla OTA).

La Figura 3 muestra la eficacia de secuestro MIP-OTA para OTA en varios índices de inclusión.

La Figura 4 muestra el MIP-OTA observado en un microscopio de electrón de barrido Hitachi S-4300 a ×15,000 de magnificación y a 3.0keV.

La Figura 5 muestra la afinidad de secuestro de los MIP (sintetizados en mezcla de tolueno-ciclohexano) para 5 niveles diferentes de inclusión hacia 3 concentraciones diferentes de OTA.

La Figura 6 muestra la actividad de secuestro para OTA mediante los MIP hechos de estireno y 2-vinilpiridina como monómeros funcionales y polimerizados con iniciación con calor o baja temperatura e iniciación de UV. Los valores de la adsorción inicial y el remanente de adsorción después de lavado con regulador de citrato (pH 4.0) y después que se reportan 100% de lavado con metanol.

La Figura 7 muestra la actividad de secuestro para polifenoles y ácido acético 3-indol por los MIP hechos de estireno y 2-vinilpiridina como monómeros funcionales y polimerizados con baja temperatura e iniciación de UV. Se reportan los valores de adsorción inicial.

La Figura 8 muestra fotos de malla de fibra de vidrio recubierta con MIP-OTA y utilizada en un tubo falcon de 50 mL

para secuestro de OTA en vino.

La Figura 9 muestra los resultados de las pruebas de secuestro de tres niveles de MIP-OTA cubiertos en malla de fibra de vidrio utilizando cuatro condiciones diferentes de polimerización y se prueba con vino blanco que comprende concentraciones añadidas de 50, 100, 200 ppb de OTA.

La Figura 10 muestra los resultados de la prueba de secuestro de tres niveles de NIP cubiertos en malla de fibra de vidrio utilizando 3 tres condiciones de polimerización y se prueba en vino blanco para concentraciones añadidas de 50, 100, 200 ppb de OTA.

La Figura 11 muestra un perfil cromatográfico de soluciones estándar de OTA registradas con un detector fluorescente y selección de gradiente utilizado para optimizar el tiempo de retención de la micotoxina.

La Figura 12 muestra la esporidesmina y la estructura molecular de la plantilla de esporidesmina (5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina).

La Figura 13 muestra la síntesis de la ruta de la plantilla de esporidesmina.

La Figura 14 muestra la eficacia de secuestro para la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina mediante MIP-esporidesmina y NIP en varios índices de inclusión.

hoja en blanco

La Figura 15 muestra la actividad de secuestro para gliotoxina de los MIP y NIP sintetizados con calor iniciado o baja temperatura/polimerización iniciada por UV y estabilidad/especificidad de la interacción después de seis lavados sucesivos realizados con el nivel aumentado de metanol.

La Figura 16 muestra la actividad de secuestro para la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina de los MIP y NIP sintetizados con calor iniciado o baja temperatura/ polimerización iniciada por UV y estabilidad/especificidad de la interacción después de seis lavados sucesivos realizados con el nivel aumentado de metanol.

DEFINICIONES

Como se utiliza aquí, el término "polímero de impresión molecular" o "MIP" se refiere a polímeros sintéticos que unen selectivamente un compuesto particular. En realizaciones preferidas, los polímeros de impresión molecular se sintetiza en la presencia de los compuestos objetivos, también denominados como compuestos de plantilla, creando un MIP con un alto grado de afinidad para el compuesto objetivo específico (por ejemplo, micotoxinas). En general, los polímeros se construyen con plantillas (por ejemplo, molécula /ligando/plantilla sintéticamente construida (por ejemplo, plantilla de micotoxinas sintéticas) que imitan la estructura, forma y/o otras características químicas de un objetivo natural (por ejemplo, micotoxinas naturales) y otros

componentes tales como monómeros y/o reactivos reticuladores. Por ejemplo, los compuestos de plantilla se incorporan en una mezcla pre-polimérica y permite formar asociados con los monómeros. La mezcla luego se polimeriza con los compuestos de plantilla en su lugar. Una vez se ha formado el polímero, los compuestos de plantilla se retiran, dejando atrás cavidades complementarias con afinidad para la plantilla (u otras composiciones semejan la plantilla (por ejemplo, micotoxinas que ocurren en forma natural). Tales regiones (por ejemplo, cavidades u otras regiones) se diseñan para los compuestos objetivos de unión futura que surgen para alta afinidad para tales compuestos.

Vale la pena tener en cuenta, que mientras se utilizan compuestos objetivo específicos para formar los polímeros de impresión molecular, los polímeros pueden tener una alta afinidad para una clase de compuestos que es distinta pero similar al compuesto objetivo. Por ejemplo, un polímero de impresión molecular puede unir un número de compuestos que son similares en forma, densidad de carga, geometría u otras propiedades físicas o químicas para el compuesto de plantilla (por ejemplo, plantilla de micotoxina sintética).

Como se utiliza aquí, el término "polímero", se refiere a una molécula (macromolécula) compuesta de unidades estructurales repetidas conectadas típicamente mediante enlaces químicos covalente que forman una red.

Como se utiliza aquí, el término "compuesto de

plantilla" o "compuesto objetivo" se refiere a un compuesto que se compleja mediante ligandos (por ejemplo, monómeros) que se polimerizan posteriormente, formando un polímero de impresión molecular. Los compuestos de plantilla incluyen compuestos orgánicos (por ejemplo, micotoxinas, péptidos, y proteínas) así como también compuestos inorgánicos (por ejemplo, minerales, y metales pesados). Como se utiliza aquí, el término "plantilla de micotoxina" se refiere a una molécula construida sintéticamente que imita la estructura, forma y/o otra característica química de un micotoxina natural (por ejemplo, ocrotoxina, esporidesmina, etc.). La presente invención no está limitada por el tipo de plantilla de micotoxina utilizada. De hecho se puede utilizar una variedad de micotoxinas que incluyen, pero no se limitan a, Aflatoxinas: aflatoxina B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, esterigmatocistina y subfamilias, aflatoxicol; Tricotecenos: desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, monoacetoxiscirpenol, escirpenetriol, toxina T-2, toxinas HT-2, tetraol T-2, fusarenón X, fusarina C, ácido fusárico, fusarocromanona, aurofusarina, fusaproliferina, neosolaniol, nivalenol junto con metabolitos y sub-familias; Fumonisinas: fumonisina A1, A2, B1, B2, B3 y subfamilias; Ocratoxinas: ocratoxina A, B, α, β y metabolitos; Zearalenona, zearalenol α, β, zearalanona, zearalanol α, β, zeranol y metabolitos; Patulina, gliotoxina, ácido micofenólico, ácido moniliformina ciclopiazónico, citrinina, beauvericina, citreoviridina, citochalasina H; ácido penicílico, toxina PR, roquefortina A, B, rubratoxina y subfamilias; alcaloides de cornezuelo: ergotamina, alcaloides clavina; Isofumigaclavinas A, B;

paspalitrem A, B, aflatrem, penitrems y subfamilias; Fomopsinas: Fomopsina A y subfamilias; Verrucarina A, verruculogeno y subfamilias; esporidesmina y subfamilias; eslaframina, swainsonina, ácido tenuazoico, alternariol, wortmannina, y otras micotoxinas descritas aquí.

Como se utiliza aquí, el término "monómero", se refiere a una molécula que se llega a unir químicamente a otros monómeros para formar un polímero.

Como se utiliza aquí, los términos "reticulado" y "reticulador", se refieren a moléculas que contienen dos, tres o cuatro enlaces dobles que son capaces de unir dos o más monómeros para formar una red polimérica.

Como se utiliza aquí, el término "unidad estructural", se refiere a un bloque de construcción de una cadena polimérica, y se relaciona con la unidad de repetición.

Como se utiliza aquí, el término "aniónico" o "anión" se refiere a un ión que tiene una carga negativa.

Como se utiliza aquí, el término "catiónico" o "catión" se refiere a un ión que tiene una carga positiva. Este término se puede referir a compuestos poliméricos, tales como los polímeros de impresión molecular, que contienen una carga positiva.

Como se utiliza aquí, el término "ácido" como se utiliza

aquí se refiere a cualquier compuesto químico que puede denotar protones y/o aceptar electrones. Como se utiliza aquí, el término "base" se refiere a cualquier compuesto químico que puede aceptar protones y/o donar electrones o iones de hidróxido. Como se utiliza aquí, el término "sal" se refiere a compuestos que se pueden derivar de ácidos o bases orgánicas o inorgánicas.

Como se utiliza aquí, el término "exudación", se refiere a una fracción restante de la plantilla hasta asociación con el MIP después de diversas etapas de lavado del MIP, y que continúa la disociación de MIP e interfieren con su actividad de absorción.

Como se utiliza aquí, el término "porogénico/porógeno", se refiere a una sustancia, molécula, regulador, disolvente, (por ejemplo, tolueno, xileno, etilbenceno) utilizado para cambiar el tamaño de las cavidades en un polímero (por ejemplo, cavidades de un MIP), mientras que la relación de porógeno se correlaciona directamente con la cantidad de porosidad de la estructura final.

Como se utiliza aquí, el término "porosidad", se refiere a una medición de los espacios vacíos en un material (por ejemplo, una cavidad MIP) que puede mantener un gas o líquido o permite el paso a través de este.

Como se utiliza aquí, el término "polimerización", se refiere a un proceso de hacer reaccionar las moléculas de

monómero en una reacción química para formar redes tridimensionales o cadenas poliméricas.

Como se utiliza aquí, el término "precipitación", se refiere a la formación de un sólido en una solución durante una reacción química. Cuando ocurre la reacción, el sólido formado se llama el precipitado, y el líquido restante por encima del sólido se llama sobrenadante.

Como se utiliza aquí, el término "centrifugación" se refiere al proceso de separar las moléculas por tamaño o densidad utilizando fuerzas centrífugas generadas por un rotor de giro que pone un objeto en rotación alrededor de un eje fijo, aplicando una fuerza perpendicular al eje. La centrifuga trabaja utilizando el principio de sedimentación, cuando se utiliza la aceleración centrípeta para distribuir uniformemente las sustancias de mayor o menor densidad en diferentes capas de densidad.

Como se utiliza aquí, el término "concentración" se refiere a la cantidad de una sustancia por espacio definido. La concentración se expresa usualmente en términos de masa por unidad de volumen. Para diluir una solución, uno puede agregar más disolvente, o reducir la cantidad de soluto (por ejemplo, mediante separación selectiva, evaporación, secado pro rociado, secado por congelamiento). Por contraste, concentrar una solución, uno puede reducir la cantidad de disolvente.

Como se utiliza aquí, el término "capa" se refiere a un depósito usualmente horizontal organizado en estrato de un material que forma una parte sobrepuesta o segmento obtenido después de la separación mediante centrifugación o sedimentación en relación con las propiedades de densidad del material.

Como se utiliza aquí, el término "purificado" o "para purificar" se refiere a la remoción de los componentes externos de una muestra. Cuando se utiliza en un contexto químico "purificado" o "para purificar" se refiere a la separación física de una sustancia química de interés de sustancias contaminantes, indeseadas o externas. Los métodos comúnmente utilizados para la purificación de moléculas orgánicas, incluyen, pero no se limitan a los siguientes: purificación de afinidad, filtración mecánica, centrifugación, evaporación, extracción de impurezas, disolución en un disolvente en el que otros componentes son insolubles, cristalización, adsorción, destilación, fraccionamiento, sublimación, fusión, refinación, electrólisis y diálisis.

Como se utiliza aquí, el término "secado" se refiere a cualquier tipo de proceso que reduce o elimina el líquido en una sustancia.

Como se utiliza aquí, el término "secado por rociado" se refiere a un método para secar una sustancia que contiene líquido utilizando gas caliente para evaporar el líquido para

hoja en blanco

reducir o eliminar el líquido en la sustancia. En otras palabras el material se seca por medio de rociado o atomización en una corriente de aire seco caliente.

Como se utiliza aquí, el término "polvo seco que fluye libremente" se refiere a un polvo seco que fluye libremente.

Como se utiliza aquí, el término "molido" se refiere una partícula de tamaño reducido por impacto, corte, o desgaste.

Como se utiliza aquí, el término "lavado" se refiere a la remoción o limpieza (por ejemplo, utilizando cualquier tipo de soluto (por ejemplo, agua destilada, regulador, o disolvente, o mezcla) de impurezas o componente inesperado soluble de una precipitación (por ejemplo, se puede lavar un MIP para retirar los componentes de plantilla de la muestra)

Como se utiliza aquí, el término "analito" se refiere a un átomo, una molécula, una sustancia, o un constituyente químico. En general, un analito, en y por sí mismo no se mide, a diferencia de, aspectos o propiedades (físicas, químicas, biológicas, etc.) del analito que se determinan utilizando un procedimiento analítico, tal como Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (abreviado como HPLC). Por ejemplo, en general no se mide una "silla" (componente de analito) en y de sí misma, sino, que se miden la altura, ancho, etc. de una silla. De forma similar, en general uno no mide una micotoxina a diferencia mide una o más propiedades de la micotoxina (por ejemplo, micotoxinas fluorescentes,

relacionadas por ejemplo, con su estabilidad, concentración, o actividad biológica).

Como se utiliza aquí, el término "muestra" se utiliza en un sentido más amplio que incluye un espécimen de cualquier fuente (por ejemplo, muestras sintéticas, biológicas y ambientales). Las muestras sintéticas incluyen cualquier material que se produce artificialmente (por ejemplo, MIP). Se pueden obtener muestras biológicas de animales (que incluyen humanos) y abarca fluidos, sólidos, tejidos, y gases. Las muestras biológicas incluyen productos de sangre, tal como plasma, suero y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia de superficie, muestras de suelo, agua, cristales e industriales.

Como se utiliza aquí, el término "cromatografía líquida de alto desempeño" y el término "HPLC" se refiere a una forma de cromatografía líquida para separar los compuestos. Los compuestos se disuelven en una solución. Los compuestos se separan al inyectar la mezcla de la muestra en una columna, a través de lo cual un disolvente o mezcla de disolvente ha fluido, para eluir los componentes de la mezcla, de la columna. Los instrumentos HPLC comprenden un reservorio de fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación, y un detector. La presencia de los analitos en la columna efluente se registra al detectar cuantitativamente un cambio en el índice refractivo, absorción UV-VIS a una longitud de onda establecida, fluorescencia después de excitación con una longitud de onda adecuada, o respuesta

electroquímica.

Como se utiliza aquí, el término "señal" se utiliza de manera general en referencia a cualquier proceso detectable que indica que ha ocurrido una reacción (por ejemplo, la unión del anticuerpo al antígeno). Se pueden evaluar las señales cualitativamente así como también cuantitativamente. Ejemplos de tipos de "señales" incluyen, pero no se limitan a, señales radioactivas, señales fluorométricas o señales de producto calorimétrico/reactivo.

Como se utiliza aquí, el término "microscopía electrónica de barrido" y el término "SEM" se refieren a un tipo de microscopio de electrón que forma imágenes de la superficie de la muestra mediante barrido con un rayo de energía alto de electrones en un patrón de barrido. Los electrones interactúan con los átomos que hacen la muestra, las señales de producción que contienen información acerca de la topografía de la superficie de la muestra, la composición y otras propiedades tales como conductividad eléctrica.

Como se utiliza aquí, el término "agente de fijación" se refiere a un químico que es capaz de fijar una sustancia a otra con el fin de "fijar", estabilizar, o de otra forma conservar la sustancia en su forma corriente para evitar que la sustancia se degrade o de otra forma cambie. Frecuentemente, se utilizan agentes de fijación en microscopia de electrón de barrido (SEM) para preparar la muestra.

Como se utiliza aquí, el término "*in vivo*" se refiere a estudios y/o experimentos se conducen dentro de un organismo vivo, que ocurre dentro de un organismo biológico.

Como se utiliza aquí, el término "*in vitro*" se refiere a un ambiente artificial por fuera del organismo vivo y a procesos biológicos o reacciones que ocurrirían normalmente dentro de un organismo pero se hace que ocurran en un ambiente artificial. Ejemplos de ambientes in vitro incluyen tubos de prueba y cultivo celular.

Como se utiliza aquí, el término "*in situ*" significa en la condición de la mezcla de reacción.

Como se utiliza aquí, el término "*ex vivo*" se refiere a estudios y/o experimentos y/o aplicación hecha en o en tejido vivo en un ambiente artificial por fuera del organismo con la alteración mínima de las condiciones naturales.

Como se utiliza aquí, el término "absorber" se refiere a los procesos por los que un material "toma" o "succiona" otra sustancia. Por ejemplo, "absorción" se puede referir al proceso de absorber o asimilar las sustancias en células o a través de los tejidos y órganos a través de difusión u osmosis (por ejemplo, absorción de nutrientes por el sistema digestivo o absorción de fármacos en el torrente sanguíneo).

Como se utiliza aquí, los términos "adsorber" y

"adsorción" se refiere a un proceso que ocurre cuando un material se secuestra por, y/o se acumula por (por ejemplo, sobre la superficie de) una composición (secuestrante y/o adsorbente), o a un proceso en el que una composición (por ejemplo, MIP) se une a una molécula objetivo (por ejemplo, micotoxinas) en una muestra (por ejemplo, para retirar la molécula objetivo de una muestra).

Como se utiliza aquí, el término "sorción" se refiere a la adsorción y absorción.

Como se utiliza aquí, el término "secuestrador" y/o el término "secuestro" se refiere una asociación física (por ejemplo, mediante unión (por ejemplo, unión de hidrógeno, unión iónica, unión covalente u otro tipo de unión) de dos o más entidades que entran en contacto con otro (por ejemplo, formar un complejo). Las formas de ejemplo de las asociaciones incluyen, pero no se limitan a, unión de hidrógeno, coordinación, y formación del par de iones. Las interacciones de secuestro pueden involucrar un número variable de interacciones químicas (por ejemplo, enlaces químicos) dependiendo de la estereoquímica y geometría de cada entidad (por ejemplo, definir adicionalmente la especificidad de la secuestro). Cuando se secuestran dos o más entidades estas se pueden secuestrar por medio de enlaces químicos, pero también se pueden asociar por medio de carga, dipolo-dipolo u otro tipo de interacciones.

Como se utiliza aquí, los términos "agente de secuestro"

y/o "agente secuestrante", se refiere a una entidad que es capaz de formar un complejo con una segunda entidad.

Como se utiliza aquí, el término "complejo" se refiere a una entidad formada mediante la asociación entre dos o más entidades separadas (por ejemplo, asociación entre dos o más entidades en donde las entidades son iguales o diferentes (por ejemplo, las mismas o diferentes especies químicas). La asociación puede ser mediante un enlace covalente o un enlace no covalente (por ejemplo, por medio de interacción van der Waals, electrostática, interacción de carga, interacción hidrófoba, interacción dipolo, y/o fuerzas de unión a hidrógeno (por ejemplo, enlaces de uretano, enlaces de amida, enlaces de éster, y combinación de los mismos)).

Como se utiliza aquí, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una composición (por ejemplo, MIP) suficiente para llevar a cabo resultados benéficos o deseados. Se puede administrar una cantidad efectiva y/o combinar con otro material en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no está destinado a limitar una formulación o ruta de administración particular.

Como se utiliza aquí, el término "animal" se refiere a aquel tipo de animal. Esto incluye, pero no se limita a animales de granja, ganado, animales domésticos, mascotas, animales marinos y de agua dulce, y animales silvestres.

Como se utiliza aquí, el término "alimentos" se refiere

a materiales que se consumen por un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano y/o animal (por ejemplo, que contribuye a la energía y/o nutrientes en la dieta del sujeto). Ejemplos de alimentos incluyen, pero no se limitan a, lácteos, jugo, granos, frutos, vegetales, carne, Ración Mezclada Total (TMR), forraje, glóbulos, concentrados, premezclas, coproductos, granos, granos destilados, molasas, fibras, pienso, pastos, heno, hojuelas, hojas, comida, solubles, y complementos.

Como se utiliza aquí, "sistema digestivo" se refiere a un sistema (que incluye el sistema gastrointestinal) puede o no ocurrir la digestión.

Como se utiliza aquí, el término "digerir" o "digestión" se refiere a la conversión del alimento, productos alimenticios, u otros compuestos orgánicos en forma absorbible; para suavizar, descomponer, o romper por calor y humedad o acción química.

Como se utiliza aquí, el término "biodisponibilidad" se refiere a la fracción de una molécula o componente que está disponible en un organismo o alcanza la circulación sistémica. Cuando se administra una molécula o componente intravenosamente, su biodisponibilidad es 100 %. Sin embargo, cuando se administra una molécula o componente por medio de otras rutas (tal como oralmente), su biodisponibilidad se reduce (debido a la absorción incompleta y metabolismo de primer paso).

Como se utiliza aquí, los términos "administración" y el término "administrar" se refieren a la acción de una sustancia dada, que incluye un fármaco, profármaco, u otro agente, o tratamiento terapéutico a un sujeto (por ejemplo, un sujeto o células in vivo, in vitro, o ex vivo, tejidos, y órganos). Las rutas de administración de ejemplo pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (tópica o transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalante), mucosa oral (bucal), oído, rectal, vaginal, mediante inyección (por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente, intratumoralmente, intraperitonealmente, etc.) y similares.

Como se utiliza aquí, el término "co-administración" y el término "co-administrar" se refiere a la administración de por lo menos dos agentes o terapias para un sujeto y/o material (por ejemplo, alimento). La co-administración de dos o más agentes o terapias pueden ser concurrentes, o se puede administrar un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia.

Como se utiliza aquí, el término "tratamiento" se refiere a la mejora y/o reversión de un signo o síntoma de enfermedad (por ejemplo, micotoxicosis). El término "tratamiento" se refiere a tratamientos terapéuticos y profilácticos o medidas preventivas. Por ejemplo, los sujetos que se pueden beneficiar del tratamiento con composiciones y métodos de la invención incluyen aquellos ya con una enfermedad y/o trastorno (por ejemplo, micotoxicosis) así

como también aquellos en los que una enfermedad y/o trastorno se evita (por ejemplo, utilizando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

Como se utiliza aquí, el término "micotoxina" se refiere a compuestos tóxicos y/o carcinogénicos producidos por diversas especies fúngicas.

Como se utiliza aquí, el término "micotoxicosis" se refiere a una afección en la que las micotoxinas pasan las barreras de resistencia del cuerpo de un humano o animal. La micotoxicosis se puede considerar una infección o una enfermedad y puede tener un efecto perjudicial en aquellos que la padecen.

Como se utiliza aquí, los términos "enfermedad", "infección" y "afección o respuesta patológica" se refiere a un estado, signos, y/o síntomas que se asocian con un deterior del estado normal de un sujeto vivo (por ejemplo, humano y/o animal) o de cualquiera de sus órganos o tejidos que se interrumpen o modifican el desempeño de las funciones normales, y pueden ser una respuesta a los factores ambientales (tales como malnutrición, riesgos industriales, o clima, que incluyen micotoxicosis), agentes infectivos específicos (tales como gusanos, amebas, bacterias, virus, priones, etc.), para el defecto inherente del organismo (tal como diversas anomalías genéticas), o combinaciones de estos y otros factores.

Como se utiliza aquí, el término "en riesgo de enfermedad" se refiere a un sujeto que está predispuesto a experimentar una enfermedad particular. Esta predisposición puede ser genética (por ejemplo, una tendencia genética particular para experimentar la enfermedad, tal como trastornos hereditarios), o debido a otros factores (por ejemplo, edad, peso, condiciones ambientales, exposiciones a compuestos perjudiciales (por ejemplo, presentes en el ambiente, etc.)).

Como se utiliza aquí, el término "que sufre de enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un sujeto animal o humano) que experimenta una enfermedad particular y no está limitado a signos o síntomas particulares, o enfermedad.

Como se utiliza aquí, el término "tóxico" se refiere a cualesquier efectos negativos, perjudiciales, dañinos, o de otra forma nociva en un sujeto, una célula, o un tejido cuando se compara como la misma célula o tejido antes del contacto o la administración de la toxina/ toxicante.

Como se utiliza aquí, el término "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo (por ejemplo, una composición que comprende un MIP) con un portador, inerte o activo, que elabora la composición especialmente adecuada para uso terapéutico o diagnóstico in vitro, in vivo o ex vivo.

Como se utiliza aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" y el término "farmacológicamente aceptable" se refiere a composiciones que no producen sustancialmente más reacciones adversas conocidas que reacciones benéficas conocidas.

Como se utiliza aquí, el término "trazabilidad" se refiere a la propiedad del resultado de una medición o el valor de un estándar por lo que se puede relacionar con las referencias indicadas, usualmente estándares nacionales o internacionales, aunque una cadena ininterrumpida de comparaciones, todas tienen dudas establecidas. Es la aplicación práctica de los conceptos de metrología general para mediciones químicas y proporciona la terminología, conceptos y estrategia para asegurar también que son comparables las mediciones químicas analíticas. Esto mide las entidades únicamente identificables en una forma que es verificable. Las mediciones de trazabilidad se utilizan, entre otras cosas, para interrelacionar la cronología, ubicación, y/o aplicación de un ítem por medio de la identificación registrada documentada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Diversos grupos fúngicos producen micotoxinas que tienen efectos perjudiciales en la salud del animal. Estas toxinas se producen principalmente por el género fúngico de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* cuando prevalecen condiciones favorables para su formación. Ninguna región del mundo escapa de las micotoxinas y su impacto negativo en la

hoja en blanco

salud del animal y el humano. El efecto negativo de la contaminación por micotoxina luego de suministros de grano y la productividad del animal son enormes y el riesgo para la salud humana está aún presente. Los climas calientes tienden a sucumbir a aflatoxinas y fumonisinas mientras que en las áreas más frías con mayor humedad son sujeto de ocratoxina, esporidesmina, zearalenona, desoxinivalenol, toxina T-2, y diacetoxiscirpenol.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por mohos y hongos que contaminan los granos de cereal así como también forrajes, frutos, productos alimenticios y alimentos así como también el ambiente (por ejemplo, suelo, agua y aire a través de micotoxicosis adquirida por aerosol, etc.). Las micotoxinas tienen efectos peligrosos en la salud humana y animal. Debido a que las micotoxinas están presentes a lo largo de la cadena alimenticia, las micotoxinas se someten a regulación que limita la contaminación excesiva del material de alimento/comida y al ambiente con base en propiedades toxicológicas de los diferentes grupos de toxinas (Ver por ejemplo, Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union (2006/576/EC)). A este respecto, diferentes agencias de seguridad alrededor del globo han establecido valores límite y procedimientos de control para probar el nivel de la contaminación. Estas regulaciones todavía no se armonizan entre los países y/o continentes y también son propensas al

estado político y económico del área geográfica que se considera. Las regulaciones, cuando están disponibles, se encuentran en un número no exhaustivo de reportes relacionados con casos de intoxicación aguda producidos con formas cristalinas de micotoxinas en situaciones de modelo. Como una comprensión de las micotoxinas, el impacto del nivel de exposición crónica, la duración de la exposición y la co-ocurrencia de diferentes micotoxinas que contaminan de forma natural los materiales de alimento/comida y el ambiente que puede ejercer efectos tóxicos sinérgicos, pueden cumplir una función importante en el estado de salud de los animales y humanos y su susceptibilidad a diversas otras infecciones y así estados inmunes. En esta perspectiva, las soluciones se han considerado para manipular los niveles no regulados de compuestos tóxicos que ingresan a la cadena alimenticia y están presentes en el ambiente. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones de la invención, un método a gran escala, económico para la preparación del adsorbente sintético, de alfa afinidad para la remoción de micotoxinas (por ejemplo, que incluyen, pero no se limitan a, la familia completa de clases menores o mayores de moléculas de micotoxina que incluyen: Aflatoxinas: aflatoxina B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, esterigmatocistina y subfamilias, aflatoxicol; Tricotecenos: desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, monoacetoxiscirpenol, escirpenetriol, toxina T-2, toxinas HT-2, tetraol T-2, fusarenona X, fusarina C, ácido fusárico, fusarocromanona, aurofusarina, fusaproliferina, neosolaniol, nivalenol junto con metabolitos y sub-familias; Fumonisinas: fumonisina A1, A2, B1, B2, B3 y

subfamilias; Ocratoxinas: ocratoxina A, B, α, β y metabolitos; Zearalenona, zearalenol α, β, zearalanona, zearalanol α, β, zeranol y metabolitos; Patulina, gliotoxina, ácido micofenólico, ácido moniliformin ciclopiazónico, citrinina, beauvericina, citreoviridina, citochalasina H; ácido penicilínico, toxina PR, roquefortina A, B, rubratoxina y subfamilias; alcaloides de cornezuelo: ergotamina, alcaloides clavina; Isofumigaclavinas A, B; paspalitrem A, B, aflatrem, penitrems y subfamilias; Fomopsinas: Fomopsina A y subfamilias; Verrucarina A, verruculogeno y subfamilias; esporidesmina y subfamilias; eslaframina, swainsonina, ácido tenuazoico, alternariol, y wortmannina).

La ocratoxina A (abreviada como OTA) es el metabolito micotoxina producido principalmente por *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum* entre otras especies de moho que pueden crecer en productos alimenticios inapropiadamente almacenados (Ver por ejemplo, Pfohl-Leszkowicz A., y Manderville R.A., 2007. Molecular Nutrition and Food Research, **51**: 61-99), granos contaminados, granos de café (Ver por ejemplo, O'Brien E., y Dietrich D.R. 2005. Critical Reviews in Toxicology, **35**: 33-60), uvas para vino (Ver por ejemplo, Blesa J., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J., 2006. Critical Review in Food Science and Nutrition, **46**: 473-478), y se pueden transferir y contaminar los líquidos y sólidos consumidos por los humanos (por ejemplo, jugo de uvas, vino, cerveza, café, extractas de cacao, así como también alimentos y comidas que utilizan granos y comida contaminada y otros subproductos de animales (por ejemplo, leche, huevos, etc.)

que consumen granos contaminados o se exponen de otra forma a las micotoxinas) que pueden ser perjudiciales para el OTA de humanos es un carcinógeno (Grupo 2B; Ver por ejemplo, Clark H.A., y Snedeker S.M, 2006. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews, **9**: 265-96), compuesto nefrotóxico y pueden provocar inmunosupresión (Ver por ejemplo, Al-Anati L., y Petzinger E., 2006. Journal of Veterinary Pharmocology and Therapeutics, **29**: 79-90; Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007 como se mencionó previamente; O'Brien y Dietrich, 2005 como se mencionó previamente). EL OTA puede inducir cambios en la función renal de los cerdos que incluyen alteración de la excreción de orina, y aumentos de la excreción de glucosa en orina, que se ha caracterizado como la nefropatía porcina. Los alimentos para pollos, pavos y patos con granos que contienen OTA tienen pobre conversión del alimento y producción reducida d huevos. En los humanos, la patología de OTA se ha descrito clínicamente como la nefropatía endémica Balkan (Ver por ejemplo, Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Grosso F., Nikolov I., Chernozemsky I.N., Castegnaro M., y Dragacci S., 2004. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **52**:2404-2410). Los estudios en animales indican que debido a su similitud a fenilalanina, después de su absorción en el nivel del tracto gastrointestinal, OTA puede entrar en la circulación enterohepática y se une a la fracción de albúmina en la sangre y que persiste así en tejidos de animal durante un periodo extendido (Ver por ejemplo, Creppy E.E., kane A., Dirheimer G., Lafarge-Frayssinet C., Mousset S., y Frayssinet C., 1985. Toxicology Letters, **28**: 29-35.).

Otra clase de toxinas fúngicas, las epipolitiodioxopiperazinas que incluyen gliotoxina, hialodendrina, sirodesmina, chaetomina, chaetocina, verticilinas, leptosina, emestrina, y esporidesmina es de interés particular. El último, de manera general de alto impacto económico en la producción de animales, se encuentra en áreas específicas del mundo, principalmente es agricultura principal de New Zelanda (Ver por ejemplo, Hohenboken W.D., Morris C.A., Munday R., De Nicolo G., Amyes N.C., Towers N.R. y Phua S.H., 2004. New Zealand journal of Agricultural Investigación, **47**: 119-127) pero también se ha reportado en las Islas Azores de Portugal. La esporidesmina es una molécula hidrófoba sintetizada por *Pithomyces chartarum* que infesta ciertos pastos. La toxicidad se induce por la presencia de un puente de disulfuro, que puede inactivar las proteínas por medio de la reacción con los grupos tiol y la generación de especies de oxígeno reactivo (radical de superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo). Esta patología se conoce mejor como eczema facial, una fotosensibilización hepatógena que resulta de la destrucción de las células epiteliales del ducto biliar que provoca filoeritina (un metabolito de clorófilo) para acumularse en la sangre circulante y la energía absorbida de la luz solar, y particularmente que afecta ovejas, cabras, caballos, y venados. Los signos clínicos incluyen reducciones en la producción de leche, pérdida de peso, fotosensibilización, y muerte (Ver por ejemplo, Munday R., 1982. Chemico-Biological Interactions, **41**: 361-374). Además de la exposición de las

micotoxinas en alimentos, comidas, pastizales y líquidos, los animales y humanos entran en contacto con, y llegan a afectarse por las micotoxinas en otras formas. Por ejemplo, los animales pueden entrar en contacto con las micotoxinas en su lecho, el pescado puede entrar en contacto con las micotoxinas en su ambiente acuoso, y otros materiales orgánicos se pueden afectar por micotoxinas.

La contaminación por micotoxina es inevitable, y con el fin de reducir los efectos negativos de las micotoxinas, los materiales inorgánicos tales como arcillas, bentonitas y aluminosilicatos, o carbón activado, conocidos por sus propiedades de adsorción, se utilizan históricamente en la agricultura (por ejemplo, mezcla con alimento para animal y/o ingredientes, formas encapsuladas o como dispositivos de filtro). Las arcillas utilizadas en grandes cantidades secuestran algunas micotoxinas en los fluidos (por ejemplo, n el tracto gastrointestinal del animal y/o los humanos) y minimizan sus efectos tóxicos (Ver por ejemplo, Ramos A.J., y Hernandez E., 1997. Animal Feed Science and Technology, **65**: 197-206; Grant P.G., y Phillips T.D., 1998. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **46**: 599-605). Sin embargo, las arcillas impiden la absorción de muchos nutrientes benéficos que son importantes para los animales y humanos tales como vitaminas, minerales y aminoácido reduciendo por lo tanto la densidad del nutriente de la diete. Más aún, las arcillas con un material inerte que se puede utilizar (por ejemplo, alimento para animales) en grandes cantidades que tiene un efecto benéfico (por ejemplo, reducción de la

contaminación por micotoxina). Sin embargo, las arcillas de alimento para animales en grandes cantidades pueden tener un efecto negativo en el ambiente cuando las arcillas se excretan del animal. También se han utilizado otros adsorbentes de micotoxina de amplio espectro, que carecen de especificidad para las micotoxinas específicas, que incluyen la invención descrita en el número de patente Estadounidense 6,045,834.

En general, los polímeros de impresión molecular (abreviados como MIP), son polímeros que se forman en la presencia de una molécula, la plantilla, que se extrae después de esto, conduciendo así a cavidades complementarias detrás. Estos polímeros muestran una cierta afinidad química para la molécula original y se pueden utilizar para fabricar sensores, catálisis o para métodos de separación. El primer material impreso es basado en silicato de sodio. El primer uso experimental de estos materiales es para la separación de los tintes en 1949 (Ver por ejemplo, Andersson H.S., and Nicholls I.A., 2001. In: molecularly imprinted polymers: Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry, (Sellergen B., ed.), Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 23 Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 1-19).

La presente invención se relaciona de manera general con los polímeros de impresión molecular (MIPs). En particular, la presente invención se relaciona con MIP ecológicamente amigables, reutilizables, métodos para producirlas, métodos

para utilizarlas (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber los compuestos objetivos (por ejemplo, micotoxinas)), y métodos para aplicar el uso en diferentes formas (por ejemplo, para detectar la presencia de micotoxinas para propósitos de trazabilidad y para retirar las micotoxinas de una fuente contaminada). Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones que incluyen aplicaciones dietarias, terapéuticas, profilácticas, procesamiento y fabricación de alimentos y bebidas, filtrado líquido así como también investigación y control de calidad.

De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos de plantilla (por ejemplo, luego de los que se sintetizan el MIP) que impactan la alta capacidad de absorción y la selectividad de los MIP para los compuestos objetivo (por ejemplo, micotoxinas). Los compuestos de plantilla se pueden retirar de la síntesis MIP post MIP (por ejemplo, por lo que "activar" el MIP y permitirle unirse a y adsorber los compuestos objetivos (por ejemplo, micotoxinas)). Así, la presente invención proporciona procesos (por ejemplo, un proceso sintético) y materiales que permite producción a gran escala de la plantilla y MIP, que no es solo económico (por ejemplo, que permite producción a gran escala, realizable en una forma económicamente disponible), pero que también utiliza reactivos que están más fácilmente disponibles que las plantillas de MIP históricamente utilizadas. La presente invención también proporciona, en algunas realizaciones, composiciones (por ejemplo, compuestos de plantilla,

monómeros, reticuladores así como también MIP) que son bio-neutros (por ejemplo, no son ambientalmente perjudiciales). Por ejemplo, en algunas realizaciones, los monómeros y reticuladores de la invención son capaces de formar complejos reversibles, de alta afinidad con plantilla (por ejemplo, con grupos funcionales de la plantilla), produciendo por lo tanto los MIP con alta afinidad para los compuestos objetivos (por ejemplo, micotoxinas) y que proporcionan efectos positivos en el ambiente (por ejemplo, propiedades de absorción altas en agua o las que el absorbente de MIP hasta 10 veces más agua que su peso beneficiando por lo tanto la hidratación del suelo al retener agua). De forma similar, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona los MIP con alta afinidad hacia los compuestos objetivos (por ejemplo, micotoxinas) que son reutilizables (por ejemplo, que se pueden separar de los compuestos objetivos y reutilizar).

I. Plantillas utilizadas para la síntesis de los polímeros de impresión molecular (MIP)

Los esquemas generales para la síntesis de MIP incluyen las etapas para polimerización y reticulación de los monómeros en la presencia de las moléculas de plantilla que dirigen la formación de los sitios de unión dentro de la red MIP. Se imparte especificidad geométrica a los sitios de unión MIP en las etapas análogas al uso de copias de esculturas de cera para la preparación de moldes durante la técnica artística de moldeo a la cera perdida. Después que se forma la red de MIP, la plantilla se retira de tal manera que el MIP libre de plantilla está disponible para la secuestro

del compuesto objetivo. En algunas realizaciones, el retiro de la plantilla se logra a través de una serie de etapas de lavado (por ejemplo, utilizando aquellas descritas en la Sección IV adelante).

En algunas realizaciones, se utiliza un compuesto objetivo como una plantilla. Sin embargo, esto eleva el problema potencial de exudación de plantilla, o una lixiviación gradual de la plantilla residual en una muestra. En aplicaciones analíticas, la exudación de plantilla provoca erróneamente alto fondo, mientras que en aplicaciones no analíticas (por ejemplo, secuestro), la exudación de plantilla puede confundir esfuerzos de secuestro al introducir realmente moléculas objetivo en la muestra. Adicionalmente, por ejemplo cuando se sintetizan los MIP que están dirigidos hacia los objetivos con propiedades tóxicas y/o carcinogénicas (por ejemplo, micotoxinas), utilizando menos moléculas de plantilla perjudiciales durante el proceso de síntesis de MIP se puede desear desde el punto de vista de la seguridad personal así como también para minimizar el desperdicio perjudicial. En realizaciones preferidas, la molécula de plantilla no es perjudicial y/o se degrada fácilmente, y por lo tanto no representa un riesgo ambiental o de salud. En realizaciones preferidas, la plantilla es reutilizable luego de la liberación del MIP. En realizaciones preferidas, la plantilla se puede producir en grandes cantidades y en una forma segura en la que se pueden producir las micotoxinas.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, una plantilla utilizada para la síntesis de MIP puede ser el mismo compuesto como el compuesto objetivo deseado. En algunas realizaciones, una plantilla utilizada para la síntesis de MIP puede ser diferente del compuesto objetivo deseado. En realizaciones preferidas de la presente invención, el compuesto objetivo deseado es una micotoxina. Ejemplos de micotoxinas incluyen pero no se limitan a Aflatoxinas: aflatoxina B1, B2, G1, G2, M1, P1, Q1, esterigmatocistina y subfamilias, aflatoxicol; Tricotecenos: desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, monoacetoxiscirpenol, escirpenetriol, toxina T-2, toxinas HT-2, tetraol T-2, fusarenona X, fusarina C, ácido fusárico, fusarocromanona, aurofusarina, fusaproliferina, neosoloniol, nivalenol y metabolitos y subfamilias así como también conjugados; Fumonisinas: fumonisina A1, A2, B1, B2, B3 y subfamilias así como también conjugados; Ocratoxinas: ocratoxina A, B, α, β y metabolitos; Zearalenona, zearalenol, α- y β-zearalanona, zearalanol, α- y β-zeranol y metabolitos así como también conjugados; Patulina, ácido micofenólico, moniliformina, ácido ciclopiazónico, citrinina, beauvericina, citreoviridina, citochalasina H; gliotoxina, esporidesmina, hialodendrina, sirodesmina, chaetomina, chaetocina, verticilinas, leptosina, emestrina, y subfamilias; ácido penicílico, toxina PR, roquefortina A, B, rubratoxina y subfamilias; alcaloides de cornezuelo: ergotamina, ergocriptina, ergovalina, ergocristina, ergometrina, ergosina, ergonina, ergocornina, ergina, lisergol, ácido lisérgico, y alcaloides de epímeros clavina; Isofumigaclavinas A, B; paspalitrem A, B, aflatrem,

penitrem y subfamilias; Fomopsinas: Fomopsina A y subfamilias; Verrucarina A, verruculogeno y subfamilias; eslaframina, swainsonina, ácido tenuazoico, alternariol, y wortmannina. En ciertas realizaciones, el compuesto objetivo es OTA, esporidesmina, alcaloides de cornezuelo.

En algunas realizaciones, el diseño y/o determinación de un compuesto de plantilla no objetivo se realiza mediante análisis estructural cuidadoso de la molécula objetivo, minimización estructural, y determinación de las características estructurales y grupos funcionales críticos para la formación del sitio de unión MIP efectivo. Se conocen en la técnica métodos para la minimización estructural (Ver por ejemplo, Baggiani C., Giraudi G., and Vanni A., 2002. Bioconjugation, **10**: 389-394; incorporado aquí como referencia en su totalidad). Aunque la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo particular, y una comprensión del mecanismo no es necesaria para practicar la presente invención, las consideraciones estructurales que se toman en cuenta durante el diseño de la plantilla incluyen pero no se limitan a quiralidad, planaridad, la eliminación de las estructuras responsables de las propiedades indeseadas de la molécula (por ejemplo, eliminación de los determinantes moleculares de toxicidad), y/o la existencia de una superficie accesible al disolvente apropiada, superficie potencial electrostática, y/o superficie lipófila-hidrófila de la molécula de plantilla y sus interacciones potenciales con monómeros y reticulador así como también simplicidad de la síntesis de plantilla. En algunas realizaciones, se

aplican técnicas de reconocimiento de forma ultrarrápida para permitir la detección de rutina para los compuestos que pueden semejar más cercanamente una molécula de acuerdo no solo con un reconocimiento de estructura bidimensional superada sino preferiblemente uno de los patrones de más discriminación, es decir, la forma molecular tri-dimensional (Ver, por ejemplo, Balletser P., y Richards W.G., 2007. Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, **463**: 1307-1321.

En un ejemplo no limitante, una plantilla para Ocratoxina A es N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina, como se muestra en La Figura **1**.

En un ejemplo no limitante de un método de síntesis para N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina, la síntesis empieza con la reacción de ácido 3,5-diclorosalicílico con anhídrido acético para obtener ácido 2-acetoxi-3,5-diclorobenzoico que a su vez se convierte en al cloruro ácido mediante la acción de cloruro de oxalilo. El ácido 2-acetoxi-3,5-diclorobenzoico luego se hace reaccionar in situ con clorhidrato de etil éster fenilalanina, en la presencia de trietilamina, para producir etil éster de N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina. La última etapa del método de síntesis introduce hidrólisis altamente específica y novedosa de las ambas funciones de etil éster N-(2-acetoxi-3,5-dicloro benzoil)-L-fenilalanina para obtener la plantilla OTA, N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina (I) con 98% de rendimiento. Esta reacción de síntesis se resume en La Figura

2.

Así, la presente invención proporciona procesos y materiales para la síntesis de plantillas (por ejemplo, Plantillas OTA) que son escalables en grandes cantidades en una forma económicamente lograble.

II. Monómeros y agentes de reticulación utilizados para la polimerización de los MIP

La selección de monómeros utilizados en la síntesis de los MIP toma en cuenta características estructurales de la molécula de plantilla con el fin de evaluar qué monómero o combinación de monómeros es más probable que forme interacciones (por ejemplo, enlaces covalentes, no covalentes, iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, interacciones Van der Waals) con la plantilla. En un ejemplo no limitante, las características estructurales clave de la Plantilla OTA (I) descritas aquí (por ejemplo, N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina) incluyen (i) los dos grupos funcionales ácidos (-OH y $-CO_2H$); (ii) un grupo de péptido fuertemente polar (-NHCO-); (iii) y diversos fragmentos de hidrocarburo de baja polaridad de la estructura de plantilla (por ejemplo, cada uno de los cuales tiene el potencial para formar complejos con los monómeros y las moléculas de reticulador). La Solicitud de Patente Estadounidense No. 10/181435, incorporada aquí como referencia en su totalidad, describe monómeros funcionales MIP y métodos de la selección computacional de monómero (Ver, por ejemplo, Baggiani et al., 2002. Como se mencionó

previamente).

Las clases de monómeros y monómeros específicos (por ejemplo, utilizados en métodos de síntesis MIP de la invención) incluyen, pero no se limitan a, las siguientes clases y derivados de los mismos: ácido acrílico y derivados (por ejemplo, ácido 2-bromoacrílico, cloruro acriloilo, tirosina N-acriloilo, pirrolidona N-acriloilo, ácido trans-2-(3-piridil)-acrílico), acrilatos (por ejemplo, alquil acrilatos, alil acrilatos, hidroxipropil acrilato), ácido metacrílico y derivados (por ejemplo, ácido itacónico, ácido 2-(trifluorometil) propenoico), metacrilatos (por ejemplo, metil metacrilato, hidroxietil metacrilato, 2-hidroxietil metacrilato, sal de sodio de 3-sulfopropil metacrilato, etilenglicol monometacrilato), estirenos (por ejemplo, (2, 3 y 4)-aminoestireno, ácido estireno-4-sulfónico, 3-nitroestireno, 4-etiestireno), vinilos (por ejemplo, vinil cloroformato, ácido 4-vinilbenzoico, 4-vinilbenzaldehído, vinil imidazol, 4-vinilfenol, 4-vinilamina, acroleína), vinilpiridinas (por ejemplo, (2, 3, y/o 4)-vinilpiridina, 3-butene 1,2-diol), ácidos borónicos (por ejemplo, ácido 4-vinilborónico), ácidos sulfónicos (por ejemplo, ácidos 4-vinilsulfónico, ácido acrilamido-2-metil-1-propano-sulfónico), queladores de metal (por ejemplo, ácido de estireno iminodi acético), acrilamidas y derivados (por ejemplo, N-metil acrilamida), metacrilamidas y derivados (por ejemplo, N,N-dimetil acrilamida, N-(3-aminopropil) metacrilamida), alquenos (por ejemplo, ácido 4-pentenoico, 3-cloro-1-fenil-1-propeno), anhídrido de ácido (met)acrílico y

derivados (por ejemplo, anhídrido metacrílico), monómeros que contienen sílice (por ejemplo, (3-metacriloxipropil) trimetoxi silano, tetrametildisiloxano), polienos (por ejemplo, isopreno, 3-hidroxi-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrieno), azidas (por ejemplo, ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico), tioles (por ejemplo, alil mercaptano). El acrilato terminado o uretanos insaturados de otra forma, carbonatos y epóxidos también se pueden utilizar en las realizaciones de la presente invención, cuando pueden ser monómeros con base en sílice.

En realizaciones preferidas, los monómeros y el reticulador utilizados para la síntesis de los MIP dirigidos hacia una plantilla para OTA (es decir, N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina) comprenden 2-vinilpiridina, 2-hidroxietil metacrilato y/o dimetacrilato de etilenglicol. Aunque la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo particular, y no es necesaria una compresión del mecanismo para practicar la presente invención, 2-vinilpiridina forma enlaces iónicos con los grupos ácidos de la plantilla, y contiene el enlace vinilo en proximidad cercana al átomo de nitrógeno básico del anillo piridina. Esta interacción entre la plantilla y la 2-vinilpiridina promueve la formación del polímero en la vecindad más cercana de la plantilla molécula y permite un enlace estrecho entre el MIP y OTA en el MIP (por ejemplo, después que se retira el compuesto de plantilla y el MIP se deja interactuar las moléculas OTA objetivo). Aunque la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo particular, y no es necesaria

una comprensión del mecanismo para practicar la presente invención, el grupo hidroxilo del monómero 2-hidroxietil-metacrilato forma enlaces de hidrógeno adicionales con uniones de péptido altamente polares de la plantilla. Un reactivo adicional es dimetacrilato de etilenglicol. Aunque la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo particular, y no es necesario una comprensión del mecanismo para practicar la presente invención, dimetacrilato de etilenglicol encuentra uso en algunas realizaciones como un agente reticulador (ver adelante), como un diéster insaturado que interactúa con grupos de baja polaridad que están presentes en la molécula de la plantilla OTA. En algunas realizaciones, se utilizan tipos individuales de monómeros individualmente o en combinación con otros tipos de monómeros.

Si se utiliza, el agente o agentes de reticulación serán preferiblemente uno o diversos compuestos poliméricos u oligoméricos, o un compuesto que se proporciona para división bajo condiciones específicas. Los agentes de reticulación que conducen a la rigidez para los compuestos poliméricos objeto se conocen por aquellos expertos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, acrilatos di-, tri-, tetra- y penta-funcionales, metacrilatos, acrilamidas, vinilos, alilos, y estirenos. Ejemplos específicos de agentes de reticulación incluyen pero no se limitan a p-divinilbenceno, dimetacrilato de etilenglicol (abreviado como EGDMA), tetrametileno dimetacrilato (abreviado como TDMA), N,N'-metileno bisacrilamida (abreviado como MDAA), N,N'-1,3-fenilenobis(2-

metil-2-propenamida) (PDBMP), 2,6-bisacriloilamidopiridina, 1,4-diacriloil piperazina (abreviado como DAP), 1,4-fenileno diacrilamida, y N,O-bisacriloil-L-fenilalaninol. Ejemplos de reticuladores divisibles, reversibles incluyen, pero no se limitan a, N,N'-bis-(acriloil) cistamina, N,N-dialiltartardiamida, N,N-(1,2-dihidroxietileno) bisacrilamida, N1-((E)-1-(4-vinilfenil) metilideno)-4-vinilanilene, alil disulfuro, y bis(2-metacriloiloxietil))disulfuro. En realizaciones preferidas, se utiliza dimetacrilato de etilenglicol como un agente de reticulación. Aunque el monómero de reticulación preferido es dimetacrilato de etilenglicol, las realizaciones de la presente invención no están limitadas a este agente, y se pueden utilizar otros monómeros reticulados, tales como, divinilbenceno y trimetilolpropano trimetacrilato (abreviado como TRIM).

Se puede utilizar cualquier relación de monómeros simples que proporciona una estructura MIP de integridad apropiada, por ejemplo, que se puede utilizar en el contexto de la aplicación final (por ejemplo, en productos alimenticios o comida, en agua destinada para uso en acuacultura, in vivo, etc.). Aquellos expertos en la técnica pueden seleccionar las relaciones adecuadas de monómeros para proporcionar la integridad estructural deseada, que se relaciona íntimamente con la naturaleza y estructura de la molécula objetivo y con la naturaleza y la estructura de la plantilla utilizada.

En el caso de los compuestos poliméricos y oligoméricos que se utilizan in vivo (por ejemplo, como terapéuticos o diagnósticos, o como componentes de secuestro consumibles de alimento para animal o alimentos para humanos), es importante seleccionar los monómeros que no son tóxicos y que exhiben estabilidad y solubilidad in vivo adecuada. Ejemplos preferidos incluyen, pero no se limitan a, acrilamidas y metacrilatos. Alternativamente, el polímero se puede tratar post-polimerización para mejorar la solubilidad de la plantilla, por ejemplo, mediante reacción con reactivos orgánicos o inorgánicos adecuados.

Se pueden utilizar diferentes métodos de polimerización que incluyen polimerización de radical libre, catiónica, y aniónica. Las condiciones de polimerización se seleccionan y se proporcionadas aquí que no afectan adversamente la conformación activa del compuesto para el que se produce un compuesto polimérico complementario. En realizaciones particularmente preferidas, se utilizan métodos de polimerización de precipitación de radical libre (ver Sección III adelante).

Adicionalmente, la polimerización de los MIP se empieza típicamente mediante la adición de un agente de iniciación. Los agentes de iniciación incluyen pero no se limitan a azo-bisisobutironitrilo (abreviado como AIBN), azo-bisdimetilvaleronitrilo (abreviado como ABDV), dimetilacetal de bencilo, benzoilperóxido (abreviado como BPO), y 4,4'-azo(ácido 4-cianovalérico). En realizaciones preferidas, el

agente de iniciación es azo-bisisobutironitrilo.

En realizaciones preferidas, los monómeros, reticuladores, y/o los MIP tienen propiedades de seguridad y/o ambientales favorables tales como retención y alta absorción de agua, y toxicidad reducida o no toxicidad. En realizaciones preferidas, los MIP pueden ser reutilizables y económicamente realizables/producibles.

III. Disolventes utilizados para la síntesis de los MIP

La selección del disolvente/ mezcla de disolvente en la que se lleva a cabo la reacción de polimerización tiene un impacto profundo en el alcance, selectividad y especificidad de la afinidad de unión de un MIP a su compuesto objetivo. Aunque la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo particular, y no es necesaria una comprensión del mecanismo para practicar la presente invención, se facilita la porosidad o se proporciona mediante disolvente porogénico o mezcla de disolvente que exhibe las siguientes propiedades: este se disuelve en la mezcla de monómero, es inactivo a la reacción de polimerización y no disuelve el polímero producido (MIP). Los disolventes porogénicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidrocarburos aromáticos, tales como tolueno, xileno, etilbenceno y dietilbenceno; disolventes no polares, tales como ciclohexano; hidrocarburos saturados, tales como hexano, heptano, octano y decano; alcoholes, tales como alcohol isopropílico y isoamilo; hidrocarburos halogenados alifáticos, tales como diclorometano, dicloroetano y tricloroetano; ésteres

aromáticos o alifáticos, tales como acetato de etilo, acetato de butilo, dimetilftalato. En realizaciones preferidas, se utilizan disolventes de hidrocarburos aromáticos. En realizaciones particularmente preferidas, solo se utiliza tolueno. En algunas realizaciones, se utiliza una mezcla de tolueno con otro disolvente. En algunas realizaciones, se utiliza tolueno en combinación con ciclohexano. Se pueden utilizar disolvente porogénicos individualmente o en combinaciones de dos o más. La cantidad del disolvente porogénico agregado se puede variar de aproximadamente 10% a 500% por masa con base en la cantidad total de los monómeros. Aunque la presente invención no se limita a cualquier mecanismo particular, y no es necesaria una comprensión del mecanismo para practicar la presente invención, disolventes polares (por ejemplo, agua, acetonitrilo) deshacen los complejos estrechos entre los monómeros y la plantilla, por lo que el MIP disminuye la especificidad de la unión de la molécula objetivo (por ejemplo, como en tolueno, etc.).

El disolvente o la mezcla de disolvente utilizada como un medio para la síntesis de MIP también tienen un impacto en las propiedades de hinchamiento de MIP y en el tamaño de los poros dentro de la red tri-dimensional MIP. En ciertas realizaciones, se utilizan disolventes polares tales como acetonitrilo como un disolvente o co-disolvente para la polimerización MIP cuando se desea un aumento en el hinchamiento del MIP y aumento del tamaño de poro MIP; alternativamente, tales disolventes se evitan cuando un aumento en el hinchamiento del MIP y el tamaño de poro MIP no

se desea (por ejemplo, cuando el MIP está destinado para uso como una columna cromatográfica donde el hinchamiento puede impedir el índice de flujo e interrumpir la elución de los analitos y la capacidad de realizar el instrumento HPLC).

La elección acertada del sistema de disolvente puede afectar directamente el tamaño de poro MIP. En ejemplos no limitantes, durante la síntesis de un MIP dirigido a una plantilla de OTA, se forman partículas más pequeñas (1-20 µm) en disolventes de baja polaridad como ciclohexano y/o tolueno, mientras que se forman partículas mucho mayores y de tamaño menos homogéneo (10-170 µm) en disolventes polares como acetonitrilo o agua. Adicionalmente, en altas concentraciones de monómeros, los rendimientos de la reacción de polimerización produce grandes grupos de MIP que son fácilmente de dispersar mediante molido, sin la producción de partículas muy finas como ocurre durante el molido de los monolitos MIP (ver discusión detallada en la Sección IV adelante). Pueden ser indeseables partículas muy finas en aplicaciones donde, por ejemplo, un MIP está destinado para uso como una resina de columna (en donde las partículas finas pueden impedir el índice de flujo) o cuando la presencia de las partículas finas impide o complica la recolección de los MIP durante centrifugación o filtración o interrumpe el confinamiento apropiado del MIP en el caso de filtración, que está actualmente regido por el tamaño de poro del filtro de malla específico que incorpora el MIP, si el filtro debe conservar la cantidad de MIP incluida. Los grupos MIP dispersos se pueden tamizar para proporcionar los productos

de tamaño homogéneo, definido. Por lo tanto, la elección del disolvente de polimerización, la concentración de monómero, y los métodos de manipulación física se puede seleccionar para resultar en una producción óptima de los MIP con tamaño de poro deseado y tamaño de partícula, mientras se evita la formación de las partículas finas.

La elección del sistema de disolvente dicta la forma física del MIP que se forma durante los procesos de polimerización. Por ejemplo, algunos sistemas de disolvente (que incluyen pero no se limitan a la producción de disolventes de baja polaridad tales como ciclohexano y/o tolueno), como se describió anteriormente, los grupos MIP sólidos durante un proceso denominado como polimerización de precipitación. Otros sistemas de disolvente (que incluyen pero no se limitan a disolventes polares tales como alcohol polivinílico en agua) promueven un proceso cinéticamente distinto denominado como polimerización de emulsión (Vivaldo-Lima E., Wood P.E., Hamielec A.E., 1997. Industrial and Engineering Chemistry Research, **36**: 939-965). En general, la naturaleza de la polimerización afecta la forma física de la red MIP y la facilidad con la cual se puede procesar adicionalmente (por ejemplo, la necesidad de molido; uniformidad del tamaño de partícula; producción; facilidad de intercambio de regulador o disolvente). Los procesos de polimerización se revisan en Yan H., y Ho Row K., 2006. International Journal of Molecular Science, **7**: 155-178; incorporado aquí como referencia en su totalidad. En realizaciones preferidas, se utiliza la polimerización de

hoja en blanco

precipitación. En ciertas realizaciones, la polimerización de precipitación resulta en un producto MIP que se forma como un polvo de tamaño de partícula uniforme y fácilmente manejable. En comparación, otros métodos de polimerización que incluyen pero no se limitan a polimerización en masa pueden producir un gran monolito de MIP que se puede triturar antes de procesamiento adicional o usar, y que resulta en tamaños de partícula irregulares y posteriormente bajo desempeño.

IV. Métodos para retirar la plantilla de MIP luego de la síntesis de MIP y el procesamiento físico de los MIP

Las técnicas utilizadas para la disociación de la plantilla del MIP nuevamente sintetizado se determinan de manera general por la naturaleza del MIP de plantilla. Por ejemplo, cuando se han formado enlaces covalentes entre la plantilla y la red MIP, se requiere división química de la plantilla de MIP. En contraste, cuando la interacción entre la plantilla y la red MIP no es covalente, puede ser suficiente la extracción del disolvente para retirar la plantilla (Ver, por ejemplo, Yan H., y Ho Row K., 2006 como se mencionó previamente y se incorpora aquí como referencia en su totalidad; Sellergren B., 2001. *The non-covalent approach to molecular imprinting*. In: molecularly imprinted polymers: Man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry, (Sellergen B., ed.), Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 23 Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 113-184). El procesamiento post-síntesis de los MIP también se denomina como la activación de MIP. En realizaciones preferidas, una primera

etapa de activación MIP implica la decantación y luego evaporación (reciclaje) del disolvente del material MIP, bajo presión ligeramente reducida (por ejemplo, utilizando un sistema de evaporador rotario). Una segunda etapa implica el molido de las partículas MIP para producir un tamaño de partícula más pequeño (por ejemplo, utilizando un mortero y pestillo o equipo de molido). Una tercera etapa implica múltiples lavados de las partículas MIP, por ejemplo, con 0.2 o/v% de hidróxido de sodio. En realizaciones en las que se sintetiza un MIP OTA, la vigorosidad del lavado se puede seguir hasta que se obtiene una prueba negativa con solución $FeCl_3$ para la detección de la plantilla (ver Ejemplo 2 a Ejemplo 4). En algunas realizaciones, un lavado único con 1% de ácido acético y el lavado único con agua se sigue mediante secado del producto final MIP (por ejemplo, a 80° C en un horno de secado durante 6-8 h) hasta que se retiran todas las trazas de disolvente. Finalmente, las partículas de MIP se pueden tamizar para proporcionar el producto de tamaño de partícula definido. En realizaciones preferidas, la forma física del MIP no requiere molido extensivo antes de uso, por ejemplo, el MIP no forma bloques monolíticos que requieren triturado o molido para dispersión. En realizaciones preferidas, la mayor parte del MIP forma esferas que forman un polvo luego de secado.

En realizaciones preferidas, las etapas de lavado son suficientes para retirar por lo menos 95% de la molécula de plantilla de la red MIP. En realizaciones particularmente preferidas, son suficientes etapas de lavado para retirar por

lo menos 99% de la molécula de plantilla de la red MIP. En realizaciones más preferidas, son suficientes las etapas de lavado para retirar por lo menos 99.9% de la molécula de plantilla de la red MIP.

V. Aplicación de las composiciones MIP

Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones que incluyen aplicaciones dietarias, terapéuticas, profilácticas, procesamiento y fabricación de alimentos y bebidas, así como también aplicaciones en investigación y control de calidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las plantillas sintéticas (por ejemplo, generadas utilizando los métodos descritos aquí) se utilizan para la síntesis de MIP. La presente invención no está limitada a cualquier plantilla sintética particular y/o MIP sintetizado. De hecho, se puede generar una variedad de plantillas sintéticas y se utilizan que incluyen, pero no se limitan a, una plantilla OTA (por ejemplo, N-(3,5-dicloro-2-hidroxibenzoil)-L-fenilalanina , Ver Ejemplo 1), plantillas para aflatoxina, una plantilla tricoteceno (por ejemplo, plantilla de alcohol sesquiterpeno (por ejemplo, plantilla desoxinivalenol (DON))), una plantilla zearalenona, una plantilla de esporidesmina, una plantilla esterigmatocistina, una plantilla fumonisina, una plantilla patulina, una plantilla citrinina, y/o plantilla de cornezuelo relacionada con endofito. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y métodos para producir una plantilla sintética (por ejemplo, para uso en la síntesis de MIP OTA) que

comprende grupos funcionales exteriores que ensamblan una micotoxina (por ejemplo, en donde la plantilla se utiliza para generar un MIP en un proceso de la invención y posteriormente se retira de este, el MIP exhibe alta afinidad para la micotoxina ensamblada para los grupos funcionales exteriores), en donde la micotoxina se selecciona del grupo que comprende acetoxiscirpenediol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina acetil T-2, extendido a todas las aflatoxinas, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, *ácido* altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceina +1, beauvericina +2, bentenolida, brevianamida, butenolida, calonectrina, chaetoglobosina, chaetocina, chaetomina, citrinina, citreoviridina, cochliodinol, citochalasinas, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desactilneosolaniol, desoxinivalenol diacetato, desoxinivalenol monoacetato, diacetoxiscirpenol, destruxina B, emestrina, enniatinas, extendido a todas las toxinas alcaloides del cornezuelo y endofitos tales como ergina, ergocornina, ergocristina, ergocriptina, ergometrina, ergonina, ergosina, ergotamina, ergovalina, lisergol, ácido lisérgico, y epímeros relacionados, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisinas A1, A2, B1 y B2 y B3, fusarenona-X, fusarocromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, hialodendrina, ipomeanina, islanditoxina, isofumigaclavinas A y B, lateritina +1, leptosina, licomarasmina +1, malformina, maltorizina, moniliformina, monoacetoxiscirpenol, ácido microfenólico, neosolaniol, nivalenol, toxina NT-1, toxina NT-2, extendido a todas las

ocratoxinas, oosporeina, ácido oxálico, paspalitrem A y B, patulina, ácido penicílico, penitrem, fomopsinas, toxina PR-, roridina E, roquefortina A y B, rubratoxina, rubrosquirina, rubrosulfina, rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, escirpentriol, sirodesmina, eslaframina, esporidesmina, esterigmatocistina, swainsonina, toxina T-1, toxina T-2, ácido tenuazoico, triacetoxiscirpendiol extendido a todos los tricotecenos, tricodermina, tricotecina, tricoverrinas, tricoverroles, triptoquivaleno, verrucarina, verruculogeno, verticillinas, viopurpurina, viomeleina, viriditoxina, wortmannina, xantocilina, yavanicin+1, zearalenoles, zearalanonas, zearalenona, α, β, zearalanona, α, β, zeranol y subfamilias y/o derivados de los mismos, y/o conjugados. En ciertas realizaciones, el compuesto objetivo es OTA, esporidesmina, o alcaloides de cornezuelo.

De forma similar, se puede generar una variedad de MIP y utilizar que incluyen, pero no se limitan a, un MIP generado que utiliza una cualquiera de las plantillas sintéticas mencionadas anteriormente o cualquier otra molécula orgánica como una plantilla (por ejemplo, nutrientes tales como vitaminas, fármacos, antibióticos, contaminantes, hormonas, enzimas, proteínas, etc.).

Los MIP descritos aquí encuentran uso en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utilizan los MIP para la purificación de los líquidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los MIP se utilizan para retirar selectivamente los compuestos objetivos (por ejemplo,

una o más micotoxinas) de un líquido. La presente invención no está limitada por los compuestos objetivos (por ejemplo, uno o más micotoxinas) retirados del líquido. De hecho, se puede retirar una variedad de los compuestos objetivo que incluyen, peo no se limitan a, las micotoxinas descritas aquí. De forma similar, la presente invención no está limitada por el tipo de líquido del que se retira un compuesto objetivo. De hecho, una variedad de soluciones líquidas diferentes puede tener uno o más de los compuestos objetivo (por ejemplo, micotoxinas) retiradas (por ejemplo, al administrar uno o más tipos diferentes de MIP a la solución) que incluyen, pero no se limitan a, bebidas (por ejemplo, consumidas por los humanos (por ejemplo, jugo, vino (por ejemplo, vino blanco, vino rojo, etc.), agua, cerveza, té, café, etc.)), agua (por ejemplo, utilizad en acuacultura, agua potable, etc.), líquidos utilizados en la producción de alimentos (por ejemplo, alimentos para humanos, alimentos para animales), fluidos biológicos (por ejemplo, sangre, fluido ruminal, fluido estomacal, etc.), etc.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos aquí proporcionan los MIP que retiran selectivamente los compuestos objetivo (por ejemplo, micotoxinas) de un líquido. El líquido puede ser una bebida, agua, muestra biológica, suministro de agua potable, sangre, fluido ruminal, u otro tipo de líquido que contiene los compuestos objetivo. Adicionalmente, los compuestos objetivo se pueden retirar de otros tipos de fluidos. En algunas realizaciones, los MIP descritos aquí se ponen en contacto

con (por ejemplo, mezclado con) un líquido para una cantidad suficiente de tiempo que permite al MIP interactuar con y unirse a un compuesto objetivo (por ejemplo, micotoxina). Aunque no es necesaria una comprensión del mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo particular, en algunas realizaciones, después que al líquido se le permite interactuar con el MIP, las cavidades de complejo/unión contenidas en el MIP (por ejemplo, cavidades que permanecen después que la molécula de plantilla se retira del MIP) se une al compuesto objetivo luego de contacto, retirando efectivamente el compuesto objetivo del líquido. El líquido luego se puede procesar adicionalmente, empacar, o hacer para consumo (por ejemplo, para el consumo humano, para el consumo animal, o para hábitats de animal). En algunas realizaciones, los MIP generados y/o proporcionados aquí poseen una estructura rígida que soporta fuerzas químicas o físicas asociadas con el proceso de remoción/secuestro. Por ejemplo, en una realización preferida, un MIP proporcionado aquí se une selectivamente a un compuesto objetivo, por lo que retirar el compuesto objetivo de una sustancia (por ejemplo, líquido, superficie sólida, fluido biológico (por ejemplo, sangre, fluido ruminal, etc.), necesario para sostener la vida (por ejemplo, aire o medio de acuacultura), etc.), y mantiene asociación con el compuesto objetivo cuando se recolecta el complejo MIP-compuesto objetivo y/o se retira de la sustancia (por ejemplo, bombear líquido a través del filtro, verter líquido a través del filtro, sumergir el filtro en un líquido, recubrir el MIP sobre la superficie de

un contenedor, centrifugaciones, recubrir el MIP sobre la superficie de un filtro, excreción de heces de animal, etc.).

En una realización, un método para retirar los compuestos objetivo de un líquido es altamente selectivo. Por ejemplo, un líquido puede contener una multitud de compuestos objetivo en donde el MIP retira selectivamente solo uno de los compuestos objetivo específicos (por ejemplo, micotoxina), en donde "uno" se refiere al tipo de compuesto objetivo y no al número de los compuestos objetivo retirados. En algunas realizaciones, una pluralidad de MIP (por ejemplo, una pluralidad de diferentes poblaciones de MIP (por ejemplo, en donde una población de los MIP es específica para un tipo de micotoxina (por ejemplo, ocratoxina) y una segunda población de los MIP es específica para un segundo tipo de micotoxina (por ejemplo, aflatoxina) se administran a un líquido y se dejan interactuar durante una cantidad suficiente de tiempo para retirar selectivamente una pluralidad de diferentes tipos de compuestos objetivo (por ejemplo, micotoxinas) del líquido. La presente invención no está limitada por el número de diferentes tipos de MIP que se administran a un líquido que comprende una pluralidad de diferentes tipos de compuestos objetivos (por ejemplo, micotoxinas). En algunas realizaciones, un líquido comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más tipos diferentes de compuestos objetivo (por ejemplo, micotoxinas), a los que una composición que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más tipos diferentes de MIP con especificidad para uno de la pluralidad de los compuestos objetivos se administran al

líquido bajo condiciones de tal manera que los MIP interactúan con y secuestran los compuestos objetivo. En algunas realizaciones, un MIP exhibe afinidad específica para una única molécula/compuesto objetivo. En algunas realizaciones, un MIP exhibe afinidad específica para un grupo de moléculas que tienen una propiedad física o química común. En algunas realizaciones, un MIP posee una pluralidad de diferentes cavidades de complejo/unión para diferentes compuestos objetivo de tal manera que el MIP es capaz de unir selectivamente múltiples compuestos objetivo, luego del uso de una pluralidad de moléculas/compuestos objetivo cuando se procesa el MIP.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para retirar los compuestos objetivo de un líquido que comprende una pluralidad de diferentes tipos de compuestos objetivo (por ejemplo, micotoxinas u otra molécula orgánica de la molécula/compuesto objetivo (por ejemplo, nutrientes tales como vitaminas, fármacos, antibióticos, contaminantes, hormonas, enzimas, proteínas, etc.)). En algunas realizaciones, el método incluye un grupo de diferentes tipos de MIP designados para unir diferentes compuestos objetivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona una muestra de un líquido en donde se realiza un ensayo para identificar la presencia de uno o más los compuestos objetivos en la muestra líquida. La presencia de las micotoxinas específicas se puede detectar con el fin de determinar que micotoxinas están presentes. Luego de la identificación de uno o más tipos de compuestos objetivo

presentes en la muestra líquida (por ejemplo, cuando la muestra líquida es representativa de las características del líquido del que se toma la muestra), uno o más MIP se generan (por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos aquí) y/o combinados, y luego uno o más MIP se administran a la solución líquida para retirar los compuestos objetivo. En algunas realizaciones, la identificación de uno o más tipos de los compuestos objetivo comprende el uso de columnas y/o filtros que comprende uno o más MIP específicos para los compuestos objetivo. En algunas realizaciones, una vez se utiliza el MIP para la remoción del compuesto objetivo de una muestra (por ejemplo, una muestra líquida), el compuesto objetivo se retira del MIP y el MIP se vuelve a utilizar. En algunas realizaciones, el MIP se desecha en una forma apropiada. Por ejemplo, los compuestos objetivo se pueden retirar de un MIP (por ejemplo, con el fin de hacer el MIP reutilizable) por medio de lavado con un disolvente y/o solución, que se puede seleccionar de los disolventes utilizados los métodos para disociar los MIP de la plantilla luego de las reacciones de síntesis, y el procesamiento físico de los MIP (por ejemplo, que incluyen pero no se limitan a, acetonitrilo, tolueno, metanol, hidróxido de sodio, ácido acético, etc.), o similares. Los MIP reciclados luego se regresan para uso.

Los métodos para retirar los compuestos objetivo de un líquido pueden producir altos rendimientos de recuperación debido a la naturaleza selectiva de los MIP. En algunas realizaciones, un método de remoción recupera de

aproximadamente 25% a aproximadamente 99% del compuesto objetivo presente en un líquido. En algunas realizaciones, un método de remoción recupera de aproximadamente 35% a aproximadamente 99% del compuesto objetivo presente en un líquido. En algunas realizaciones, un método de remoción recupera de aproximadamente 50% a aproximadamente 99% del compuesto objetivo presente en un líquido. En algunas realizaciones, un método de remoción recupera de aproximadamente 75% a aproximadamente 99% del compuesto objetivo presente en un líquido. En otras realizaciones, un método de remoción disminuye la concentración resultante del compuesto objetivo del líquido en un nivel de las partes por billón (ppb) (por ejemplo, en una concentración que es apropiada para el consumo humano y/o animal). Los métodos para la remoción se pueden diseñar para proporcionar niveles de concentración específicos como se encuentra en los esquemas reguladores propuestos y actuales conocidos por aquellos expertos en la técnica. En alguna realización, se utilizan métodos para remoción en líquidos con niveles de pH específicos. Por ejemplo, se pueden utilizar las composiciones y métodos de la invención con líquidos que tienen un pH entre aproximadamente 1 y 13.

En algunas realizaciones, se utilizan los MIP para retirar los compuestos objetivos de una superficie. Por ejemplo, ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para reducir la presencia de los compuestos objetivo (por ejemplo, micotoxinas) sobre una superficie que comprende poner en contacto la superficie con

una composición que comprende un MIP. En realizaciones específicas, poner en contacto se realiza durante un periodo suficiente para el MIP para unir tao y/o secuestrar los compuestos objetivo. En otras realizaciones, la presente invención proporciona un método para descontaminar una superficie ambiental que alberga los compuestos objetivo. En tal una realización, el compuesto objetivo se asocia con una superficie ambiental y el método comprende poner en contacto la superficie ambiental con una cantidad de una composición (por ejemplo, que comprende un MIP) suficiente para descontaminar la superficie. Aunque puede ser deseable, la descontaminación no necesita resultar en eliminación total del compuesto objetivo. En algunas realizaciones, las composiciones (por ejemplo, que comprenden un MIP) y los métodos comprenden adicionalmente tintes, pinturas, y otros compuestos de identificación y elaboración con el fin de asegurar que una superficie tratada se ha tratado suficientemente con una composición de la presente invención.

En algunas realizaciones, se utilizan los MIP para evitar que un compuesto objetivo entre en contacto con una superficie u otro compuesto (por ejemplo, suelo). Por ejemplo, ciertas realizaciones la presente invención contemplan los métodos para elaborar las composiciones por las que se combinan los MIP con otros materiales (por ejemplo, plástico o producto tipo almidón) y aplicadas a la vegetación (por ejemplo, vegetación agrícola de cultivo) para proteger la vegetación de los compuestos de superficie (por ejemplo, micotoxina) durante el crecimiento y prevención

adicional de los compuestos de la contaminación de otros compuestos (por ejemplo, suelo).

En ciertas realizaciones, se trata una superficie (por ejemplo, superficie externa o interna) de un sujeto (por ejemplo, humano o animal) (por ejemplo, externamente o internamente) con una composición de la presente invención. En otras realizaciones, poner en contacto es mediante administración oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Cuando se administran las actuales composiciones como farmacéuticos, se contempla que las composiciones comprenden adicionalmente adyuvantes farmacéuticamente aceptables, excipientes, estabilizantes, diluyentes, y similares. En aún realizaciones adicionales, la presente invención proporciona composiciones que comprenden adicionalmente moléculas bioactivas farmacéuticamente aceptables adicionales (*por ejemplo*, anticuerpos, antibióticos, medios para la transfección de ácido nucleico, vitaminas, minerales, co-factores, factores capaces de unión a y/o secuestrar micotoxinas (por ejemplo, extractos de pared celular de levadura (por ejemplo, extractos de pared celular de levadura combinados con un material de arcilla, y/o extracto de pared celular de levadura que contiene arcilla y/o partículas de arcilla integradas y/o entrelazadas en la pared celular de levadura), etc.). En algunas realizaciones, un sujeto se le administra una composición de la invención (por ejemplo, que comprende MIP) con el fin de tratar terapéuticamente una enfermedad o afección (por ejemplo, pie de atleta). En otras realizaciones, a un sujeto se administra una composición de

la invención (por ejemplo, que comprende MIP) con el fin de tratar profilácticamente (por ejemplo, evitar el inicio de los signos o síntomas de) una enfermedad o afección (por ejemplo, pie de atleta). En algunas realizaciones, las composiciones (por ejemplo, que comprenden MIP) y los métodos se aplican a cualquier tipo de área o superficie. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el área comprende una superficie sólida (por ejemplo, un dispositivo médico), una solución, la superficie de un organismo (por ejemplo, una porción interna o externa de un humano), o un producto alimenticio.

La presente invención no está limitada por la cantidad de uno o más MIP administrados a (por ejemplo, mezclados con) un líquido o sólido (por ejemplo, para la remoción de los compuestos objetivos). En algunas realizaciones, aproximadamente 0.10 mg, 0.50 mg, 1.0 mg, 2.0 mg, 5.0 mg, 10.0 mg. 20.0 mg, 50.0 mg, 100.0 mg, 500.0 mg o más de un MIP se administra por litro de líquido o sólido.

En algunas realizaciones, un MIP de la presente invención se utiliza para un método de eliminación de toxina tal como hemoperfusión. La hemoperfusión es una técnica de tratamiento en la que se pasan grandes volúmenes de sangre de un sujeto sobre una sustancia adsorbente (por ejemplo, MIP) con el fin de retirar las sustancias tóxicas de la sangre.

Normalmente, los adsorbentes más comúnmente utilizados en hemoperfusión son resinas y diversas formas de carbón

activado o carbono. Sin embargo, la especificidad de unión de estos materiales es relativamente pobre y frecuentemente estos adsorben factores sanguíneos importantes así como también moléculas objetivo. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso de un MIP de la invención como adsorbentes más específicos y de alta afinidad para las moléculas objetivo.

La hemoperfusión trabaja para bombear la sangre que corre a través del catéter arterial en una columna o cartucho que contiene el material adsorbente (por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona que el material adsorbente utilizado es un MIP descrito aquí). Cuando la sangre pasa sobre las partículas de carbono o resina en la columna, las moléculas o partículas tóxicas se drenan a las superficies de las partículas adsorbentes y se atrapan dentro de la columna. La sangre fluye al otro extremo de la columna y se regresa al sujeto a través del tubo unido al catéter venoso. La hemoperfusión es capaz de limpiar las toxinas de un gran volumen de sangre que la hemodiálisis u otros métodos de filtración; por ejemplo, puede procesar cerca de 300 mL de sangre por minuto.

Un MIP de la presente invención se puede utilizar para hemoperfusión. En algunas realizaciones, los MIP de la invención se utilizan para retirar una o más micotoxinas de la sangre de un sujeto utilizando hemoperfusión.

Se pueden ajustar los regímenes de dosificación para

proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, un MIP que contiene un único bolo se puede administrar a un animal, se pueden administrar diversas dosis divididas durante el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Las dosificaciones de los MIP de la presente invención son dependientes de manera general de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto profiláctico o terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos tales como el compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad a las micotoxinas en los individuos. La dosificación administrada, por supuesto, variará dependiendo de los factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y ruta de administración; edad, salud, peso del receptor; naturaleza y grado de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento, y el efecto deseado.

Los MIP de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender MIP y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos,

agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de portador farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina regulada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como mannitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de emulsificación o humectantes, conservantes o reguladores, que mejoran la vida útil o efectividad de los MIP.

En ciertas realizaciones, los MIP de la invención se pueden administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se pueden encerrar en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimir en comprimidos, o incorporar directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y utilizar en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, gránulos, y similares. Para administrar un compuesto de la invención por otro diferente para administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones. En ciertas realizaciones, los MIP de la invención se co-formulan con y/o se co-administran con uno o más agentes terapéuticos adicionales

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de los MIP de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con factores tales como estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la nanopartícula impresa para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la que cualesquier efectos perjudiciales o tóxicos de la nanopartícula impresa se contrarrestan por los efectos terapéuticamente benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr los resultados profilácticos deseados. Típicamente, debido a que se utiliza la dosis profiláctica en los sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

En algunas realizaciones, cuando se mezcla con la materia orgánica (por ejemplo, alimentos), y/o líquido (por ejemplo, agua, vino o otras bebidas) y/o se carga directamente al sujeto, las composiciones de la presente invención reducen la absorción o retoma de las micotoxinas por el sujeto (por ejemplo, aliviando por lo tanto el desempeño reducido, aumentando la salud y/o reduciendo la incidencia de enfermedades asociadas con micotoxina o las respuestas patológicas en el sujeto) y reduciendo y/o previniendo del depósito de micotoxinas o sus metabolitos en carne, pescado, huevos, leche y otros productos destinados a ingresar a la cadena alimenticia humana.

En algunas realizaciones, la presente invención se utiliza para generar dispositivos de separación (por ejemplo, extracción de fase sólida (abreviado como SPE)) que se utilizan para retirar los compuestos sólidos o semisólidos de una mezcla de impurezas con base en sus propiedades físicas y químicas que es diferente de los dispositivos de separación convencionales (por ejemplo, fase normal, fase inversa, o extracción de fase sólida de intercambio de iones). En algunas realizaciones, se pueden incorporar dispositivos de separación en un cartucho que sirve para extraer y posteriormente purificar la plantilla correspondiente específica y los análogos de plantilla del MIP producido.

En algunas realizaciones, la presente invención puede servir para el empaque de la columna cromatográfica utilizada con cromatografía líquida y permitir la elución específica de

la plantilla correspondiente y los análogos de plantilla del MIP utilizado. Las columnas MIP producidas permiten una interacción más específica que las otras técnicas y materiales disponibles conocidos en la técnica (por ejemplo, fase normal, intercambio de iones, columnas de sílice de fase inversa que comprende el tamaño de diversas cadenas alquilo hidrófobas $(-(CH_2)_n-CH_3$ con *n* igual a 4, 8, 18, pero no limitado a) que interactúa con los péptidos y moléculas pequeñas) pero más específicamente dirigido a la plantilla correspondiente y los análogos de plantilla del MIP producido. En alguna realización, se puede utilizar una pluralidad de diferentes tipos de MIP cada uno dedicado a una micotoxina específica o grupo de micotoxinas para el empaque de la columna.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona materiales para separar, y cuantificar micotoxinas. La presente invención luego se puede utilizar para medición de trazabilidad del material de alimento/comida, o la fuente de líquido para el propósito de medir las micotoxinas presentes en la muestra y su comparación a un compuesto de referencia comúnmente aceptado (por ejemplo, material estándar de micotoxina eluido utilizando HPLC unido al UV, detector fluorescente o detectores de espectrometría de masa, etc.)

En algunas realizaciones, la trazabilidad del nivel de micotoxina se puede llevar a cabo utilizando un único tipo de MIP o una pluralidad de diferentes tipos de MIP, cada uno

adaptado a la micotoxina o grupo de micotoxinas, y aplicado a la detección de los materiales de muestra que comprende una muestra de alimento o comida (por ejemplo, muestras de granas (por ejemplo, maíz, trigo, etc.), frutos (por ejemplo, manzana, peras, uvas, etc.), café, té, cacao etc.).

En algunas realizaciones, la trazabilidad del nivel de micotoxina utilizando MIP único o una pluralidad de diferentes tipos de MIP cada uno adaptado para dirigir la micotoxina específica o grupo de micotoxinas, se aplica a la investigación analítica (por ejemplo, HPLC) para determinar si están presentes las micotoxinas en la muestra y si es así, qué micotoxinas están presentes y en qué niveles. En algunas realizaciones las herramientas analíticas utilizadas para detectar las micotoxinas (por ejemplo, HPLC) se pueden utilizar para predecir el daño por contaminación con micotoxina en el alimento. En otras realizaciones se pueden utilizar herramientas analíticas utilizadas para detectar las micotoxinas para determinar qué MIP o combinación de MIP se necesitan para aplicación al material del que se toma una muestra con el fin de reducir o eliminar las micotoxinas presentes.

En algunas realizaciones, la trazabilidad del nivel de micotoxina utilizando MIP único o una pluralidad de diferentes tipos de MIP cada uno dedicado a una micotoxina específica o grupo de micotoxinas, se aplica a la detección del contenido de micotoxina de los líquidos utilizados en sistemas de producción del animal o utilizados como bebidas

para el consumo animal y humano (por ejemplo, agua, leche, jugos, vino, cerveza, etc.).

En algunas realizaciones, se puede aplicar trazabilidad en términos de contenido de micotoxina al procesamiento de alimento/comida (procesamiento de carne, procesamiento para producir productos frescos) para probar la presencia de las micotoxinas durante el flujo de producción completo para determinar cuando surge un hecho de contaminación, y se requiere retiro del mercado. Los códigos de barra y otros medios de seguimiento, todo el movimiento del producto y las etapas dentro del proceso de producción se deben referenciar de acuerdo con lo anterior para permitir la trazabilidad de la muestra analizada.

En algunas realizaciones, la trazabilidad del nivel de micotoxina utilizando MIP único o una pluralidad de diferentes tipos de MIP cada uno dedicado a una micotoxina específica o grupo de micotoxinas, se aplica a la detección del contenido de micotoxina en sangre. Por ejemplo, la presente invención se puede utilizar en la práctica de transfusión, para facilitar el ensayo de auditoría continúa que representa la localización de un producto con sangre y su estado actual en términos de procesamiento, prueba, almacenamiento, etc. en todos los puntos de recolección inicial del derecho de un donante a través de la transfusión a un receptor o desecho a través de la trazabilidad del nivel de micotoxina.

En algunas realizaciones, la presente invención utiliza los MIP descritos aquí en combinación con uno o más métodos y/o materiales descritos aquí para uso en composiciones y/o métodos para la reducción, remoción y/o eliminación de las micotoxinas (por ejemplo, métodos físicos, de mezcla, químicos, microbiológicos descritos aquí (por ejemplo, para adsorber y/o secuestrar las toxinas)). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un MIP descrito aquí se utiliza con uno o más métodos físicos, de mezcla, químicos, o microbiológicos para secuestrar las micotoxinas. Se puede utilizar una variedad de medios para reducir la presencia de micotoxinas tales como separación mecánica (Ver, por ejemplo, Dickens J.W., y Whitaker T.B., 1975. Peanut Science, **2**: 45-50), segregación de densidad (Ver, por ejemplo, Huff W.E., and Hagler W.M., 1982. Cereal Chemistry, **59**: 152-153), limpieza de grano mediante lavado con agua o carbonato de sodio para reducir la contaminación del maíz (por ejemplo, con toxinas Fusarium), clasificar los granos contaminados (por ejemplo, por medio de separación física o fluorescencia para detectar la presencia de micotoxinas), inactivación térmica (Ver, por ejemplo, Lee L.S., 1989. Journal of American Oil Chemistry Society, **66**: 1398-1413), irradiación por UV, irradiación por microondas o por rayos X (Ver, por ejemplo, CAST, 2003. *Mycotoxins: Risk inplant, animal, and human systems*. In: Task Force Report 139 (Niyo K. ed.), Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA: pp. 1-199), y extracción de disolvente de las toxinas (Ver, por ejemplo, Scott P.M., 1998. Review of Veterinary Medicina, **149**: 543-548). Se ha utilizado una variedad de

agentes químicos tales como ácidos, bases (por ejemplo, amoniaco, soda cáustica), oxidantes (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, ozono), agentes de reducción (por ejemplo, bisulfitos), agentes de cloración y formaldehído, para degradar las micotoxinas en alimentos contaminados, particularmente aflatoxinas (Ver, por ejemplo, Hagler W.M, Jr., 1991. In Micotoxinas, Cancer and Health. (Bray G. and Ryan D. eds.) Lousiana State University Press, Baton Rouge, LN, USA; Phillips T.D., Clement B.A., y Park D.L., 1994. *Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds*. In: The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary agriculture significance (Eaton L.D. y Groopman J.D. eds.), Academic Press, New York, NY, USA: pp. 383-406;). Se pueden utilizar de manera similar filtros (por ejemplo, columnas de filtración) y dispositivos similares utilizados para retirar las micotoxinas.

La invención también proporciona sistemas y métodos para proporcionar diversos aspectos de un producto (por ejemplo, productos y /o componentes de los mismos de la invención y/o el servicio que utiliza la invención). La invención también proporciona sistemas y métodos para proporcionar productos de la compañía a una parte fuera de la compañía, por ejemplo, un sistema y método para proporcionar a un cliente o un distribuidor de producto un producto de la compañía tal como uno o más MIP (por ejemplo, MIP dirigidos a micotoxina específicos). Por ejemplo, en algunas realizaciones la presente invención proporciona un sistema para la manipulación del producto que se puede separar de o combinar

con un sistema de trazabilidad. Por ejemplo, las muestras de los materiales se pueden analizar para determinar si las micotoxinas están presentes o ausentes en el material; si están presentes las micotoxinas, se pueden identificar las micotoxinas específicas. Esta información se puede utilizar para trazabilidad (por ejemplo, para demostrar la ausencia de todas o ciertas micotoxinas). Esta información también se puede utilizar para proporcionar un sistema para el manejo del producto MIP por el que se puede crear una combinación específica del MIP y combinar para dirigir específicamente las micotoxinas presentes en el material de muestra.

En algunas realizaciones, la compañía recibe entrada (por ejemplo, en la forma de una orden, información, o materiales (por ejemplo, muestra biológica (por ejemplo, muestra líquida que se sospecha comprende los compuestos objetivos)) de una parte fuera de la compañía (por ejemplo, un distribuidor y/o cliente) a un departamento de orden; y proporciona salida (por ejemplo, en la forma de un producto suministrado en el departamento de envíos (por ejemplo, a un distribuidor y/o cliente) o en la forma de reporte de datos (por ejemplo, trazabilidad como servicio de análisis de laboratorio)). En algunas realizaciones, el sistema de manejo de producto se organiza para optimizar la recepción de órdenes y suministro (por ejemplo, en una forma eficiente en costos) de productos (por ejemplo, composiciones que comprenden uno o más MIP (por ejemplo, MIP específicos de micotoxinas)) a una parte fuera de la compañía; y para obtener el pago para tal producto de la parte. En algunas

realizaciones, el sistema de manejo de producto organiza en código de barras las muestras o materiales presentados para análisis y suministro (por ejemplo, en una forma eficiente de costo) de reportes de envíos (por ejemplo, niveles de varias micotoxinas que se analizan a través del uso de MIP-SPE o columnas HPLC hechas de MIP (por ejemplo, MIP específicos de micotoxinas)) a una parte fuera de la compañía; y para obtener el pago de tal servicio proveniente de la parte.

En algunas realizaciones, la compañía comprende la fabricación y administración. Las composiciones de la presente invención se puede producir en la fabricación y/o mediante una tercera parte, y se pueden almacenar separadamente allí tal como almacenamiento de materiales y/o otro almacenamiento de componente (por ejemplo, almacenamiento de producto) y/o se pueden ensamblar adicionalmente (por ejemplo, combinar (por ejemplo, uno o más MIP se pueden combinar con uno o más otros tipos de MIP y /o con otros componentes (por ejemplo, portadores y/o otros componentes bioactivos descritos allí))) y almacenar (por ejemplo, en almacenamiento de dispositivo y/o producto). En algunas realizaciones, la administración incluye el departamento de órdenes (por ejemplo, que recibe entrada en la forma de una orden para un producto del cliente y/o distribuidor). El departamento de órdenes luego puede proporcionar salida en la forma de instrucciones al departamento de envíos para cumplir con la orden (es decir, para reenviar productos cuando lo requiere el cliente o distribuidor). En algunas realizaciones, el departamento de

envíos, además de llenar una orden para el producto o para el servicio, también puede proporcionar información/datos al departamento de facturación. En algunas realizaciones, otro componente de la compañía puede incluir el departamento de servicio al cliente (por ejemplo, que puede recibir la entrada del cliente y/o proporcionar salida en la forma de retroalimentación o información al cliente y/o puede recibir entrada o proporcionar salida a cualquier otro componente de la compañía). Por ejemplo el departamento de servicio al cliente también puede recibir entrada del cliente en la forma de información técnica solicitada, por ejemplo, para confirmar que los productos y métodos de la invención se pueden aplicar a la necesidad particular del cliente, y pueden proporcionar salida al cliente en la forma de una respuesta a la información técnica solicitada.

Así, en algunas realizaciones, los componentes de la compañía se configuran en forma adecuada para comunicarse entre sí para facilitar la transferencia de los materiales y partes, dispositivos, otros componentes, productos, hojas de datos e información dentro y fuera de la compañía. Por ejemplo, se puede utilizar una ruta física para transferir productos desde el almacenamiento de producto al departamento de envío luego de recibir entrada adecuada del departamento de órdenes o del almacenamiento de la muestra al departamento analítico luego de la recepción de la solicitud de análisis. El departamento de órdenes, en comparación, se puede enlazar electrónicamente con otros componentes dentro de la compañía, por ejemplo, mediante una red de comunicaciones (por ejemplo,

una red (por ejemplo, internet y/o intranet)), y se puede configurar adicionalmente para recibir entrada, por ejemplo, del cliente mediante una red telefónica, por mail u otro servicio portador, o mediante internet.

En algunas realizaciones, un sistema de manejo de producto comprende adicionalmente uno o más sistemas de recolección de datos.

En algunas realizaciones, la compañía puede utilizar un número de aplicaciones de software para proporcionar componentes de la compañía con información y/o proporcionar que una parte fuera de la compañía acceda a uno o más componentes de la compañía (por ejemplo, acceda al departamento de órdenes y/o el departamento de servicio al cliente y/o recolección/almacenamiento de datos). Tales aplicaciones de software pueden comprender una red de comunicaciones tal como Internet, una red de área local, o intranet. Por ejemplo, en una aplicación basada en internet, el cliente puede acceder a un sitio web adecuado y/o un servidor web que coopere con el departamento de órdenes de tal manera que el cliente puede suministrar entrada en la forma de una orden al departamento de órdenes. En respuesta, el departamento de órdenes puede comunicarse con el cliente para confirmar que la orden haya sido recibida, y puede comunicarse adicionalmente con el departamento de envíos, que proporciona entrada de los productos de la invención (por ejemplo, las composiciones que comprenden uno o más diferentes tipos de MIP (por ejemplo, MIP específicos de

micotoxinas)) se deben enviar al cliente o al departamento de análisis, que proporciona la entrada de los análisis utilizando los productos de la invención (por ejemplo, composiciones que comprenden uno o más diferentes tipos de MIP (por ejemplo, MIP específicos de micotoxinas) empacados como dispositivos separados). Así, de esta forma, el negocio de la compañía puede proceder en una forma efectiva.

Así, en algunas realizaciones, en una disposición de trabajo en red, diversos subcomponentes de una compañía (por ejemplo, el departamento de almacenamiento, de análisis, el departamento de facturación y el departamento de envío) se pueden comunicar entre sí por medio de los sistemas de computador respectivos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para proporcionar diversos aspectos de un producto (por ejemplo, productos y/o componentes del mismo de la invención), así como también información con respecto a diversos aspectos de un producto de la presente invención (por ejemplo, datos de desempeño, estadísticas de uso, etc.), a las partes (por ejemplo, clientes/usuarios, distribuidores, terceras partes (por ejemplo, agencias gubernamentales (por ejemplo, Institutos Nacionales de la Salud y/o Centros para el Control de Enfermedades), etc.). En algunas realizaciones, se retira un producto del almacenamiento del producto, por ejemplo, por el departamento de envío, y se envía a una parte solicitada tal como el cliente o distribuidor. Típicamente, tal envío ocurre en respuesta a la parte que pone una orden, que luego se procesa (por ejemplo, remitido a la parte apropiada) dentro

de la organización y resulta en el producto ordenado que se envía a la parte o el servicio que se va a proporcionar a la parte. Los datos que se relaciona con el envío del producto o las hojas de datos de servicio analítico a la parte se puede transmitir adicionalmente dentro de la organización, por ejemplo, desde el departamento de envío o de análisis al departamento de facturación, que, a su vez, puede transmitir una factura a la parte, con el producto o la ficha técnica, o en un periodo después que se ha enviado el producto o la ficha técnica. La presente invención también proporciona métodos para proporcionar servicio técnico a las partes utilizando un producto y/o componentes del mismo de la invención. Aunque se puede realizar tal función por los individuos implicados en la investigación y desarrollo del producto, las consultas relacionadas con el servicio técnico se pueden manipular de manera general, enrutar, y/o dirigir por un departamento administrativo de la organización (por ejemplo, departamento de servicio al cliente). Las comunicaciones del servicio técnico (por ejemplo, resuelven problemas relacionados con el uso del producto o componentes individuales del producto) pueden requerir intercambio de información entre un usuario (por ejemplo, cliente) y el departamento de servicio al cliente.

Como se mencionó anteriormente, son posibles cualquier número de variaciones de un proceso para proporcionar productos (por ejemplo, productos y/o componentes de los mismos descritos aquí) y/o el servicio a un usuario y están dentro del alcance de la invención. De acuerdo con lo

anterior, la invención incluye métodos (por ejemplo, métodos de negocios) que involucran (1) la producción de productos (por ejemplo, un producto y/o componentes del mismo descritos aquí); (2) recibir órdenes para estos productos; (3) enviar los productos a las partes que ponen tales órdenes; (4) enviar facturas a las partes obligadas a pagar los productos enviados como tal; y/o (5) recibir el pago de los productos para los productos enviados a las partes. Por ejemplo, se proporcionan métodos que comprenden dos o más de las siguientes etapas: (a) obtener partes, materiales, y/o componentes de un proveedor; (b) preparar uno o más primeros productos (por ejemplo, uno o más componentes descritos aquí (por ejemplo, una plantilla MIP descrita aquí, y/o uno o más diferentes tipos de MIP generados utilizando la plantilla MIP)); (c) almacenar uno o más primeros productos de la etapa (b); (d) combinar uno o más primeros productos de la etapa (b) con uno o más otros componentes para formar uno o más segundos productos (por ejemplo, una composición que comprende dos o más tipos diferentes de MIP); (e) almacenar uno o más primeros productos de la etapa (b) o uno o más segundos productos de la etapa (d); (f) obtener una orden para el primer producto de la etapa (b) o un segundo producto de la etapa (d); (g) enviar el primer producto de la etapa (b) o el segundo producto de la etapa (d) a la parte que pone la orden de la etapa (f); (h) Seguir los datos con respecto a la cantidad de dinero que incumbe a la parte a la que se le envió el producto en la etapa (g); (i) enviar una factura a la parte a la que se envío el producto en la etapa (g); (j) obtener un pago para el producto enviado en la etapa (g) (de

manera general, pero no necesariamente, el pago se hace a la parte a la que el producto se envía en la etapa (g)); y (k) intercambiar la información técnica entre la organización y una parte en posesión de un producto enviado en la etapa (d) (típicamente, la parte a la que el producto se envía en la etapa (g)).

Un consumidor puede desear consumir una o una pluralidad de diferentes tipos de MIP. En algunas realizaciones, una composición que comprende una pluralidad de diferentes tipos de MIP se personalice por el comprador (por ejemplo, con base en la información con respecto a la presencia de uno o más tipos de los compuestos objetivos para ser eliminados/secuestrados). Una ventaja de esto es que un consumidor puede ser capaz de personalizar un producto particular a sus necesidades (por ejemplo, comprar una composición que comprende una pluralidad de diferentes tipos de MIP específicos para cada compuesto objetivo, a diferencia de comprar en forma separada composiciones que comprenden solo un único MIP, y luego utilizar cada composición en combinación con otras).

La invención proporciona adicionalmente métodos asociados con el diseño de los productos personalizados. Estos métodos incluyen, por ejemplo, (1) tomar una orden de un cliente para el producto con subcomponentes específicos y/o metodología para operar los mismos, (2) preparación del producto con subcomponentes específicos y/o metodología para operarlos, (3) y proporcionar (por ejemplo, envío) el

producto de (b) al consumidor.

EXPERIMENTAL

Se proporcionan los siguientes ejemplos con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no se constituyen como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Síntesis de la plantilla ocratoxina A

Preparación de ácido 2-acetoxi-3,5-diclorobenzoico. Un matraz de tres cuellos, de fondo redondo de 1 L equipado con: un agitador mecánico, un termómetro y un embudo de goteo de 125 mL con equilibrio de presión se pone en un baño de agua mantenido a 65° C. Los siguientes reactivos se cargan posteriormente al matraz con una agitación eficiente: 250 mL de tolueno seco, 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 207 g de molido de pozo, ácido 3,5-diclorosalicílico sólido, que forma una suspensión móvil. Cuando la temperatura de esta mezcla constantemente agitada alcanza 60° C (con la temperatura del baño de agua mantenida a 65° C) una adición en forma de gotas de 108 g (100 mL) de anhídrido acético se inicia y se completa dentro de 30 min. Durante la adición de anhídrido acético la temperatura de la mezcla de reacción no se le permite acceder 75° C. Después de completar la adición, la mezcla se agita y se calienta a 70° C durante otras 4 h. Después de este tiempo, la agitación se detiene y la mezcla se enfría durante la noche a temperatura ambiente. Los cristales blancos que se separan de la mezcla se filtran, se

lavan con 2 × 10 mL de tolueno enfriado en hielo y vacío se seca a 50° C para producir 206 g (82.7% de rendimiento) de ácido 2-acetoxi-3,5-diclorobenzoico. Un adicional de 30.6 g (12.3% de rendimiento) del producto se recupera por: concentrar el filtrado a ½ del volumen original, enfriar la solución en un baño de agua helada, filtrar el producto cristalino y secarlo por vacío a 50° C.

La preparación In situ de cloruro de ácido 2-acetoxi-3,5-diclorobenzoico y su uso en la preparación de etil éster N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina (Debido a que se lleva a cabo el proceso de seguridad principal bajo una campana extractora).

El sistema de producción se hace de un reactor de 3L equipado con un agitador mecánico eficiente (Ace Glass Inc, Louisville, KY, cat#13650-12/23) un embudo de goteo de 250 mL, un condensador de reflujo con tubo de secado de $CaCl_2$ con la saluda unida al absorbente de los vapores ácidos, una entrada de gas de nitrógeno y un termómetro puesto en un baño de agua de 22° C. Un litro de tolueno seco, 5 mL de dimetilformamida y 103 g de ácido 2-acetoxi-3,5-diclorobenzoico se cargan en el reactor bajo agitación. Una gota mediante la adición en gotas en la mezcla de reacción de 217 mL (1.05 equiv.) de 2 M solución de cloruro de oxalilo en dicloruro de metileno se hace bajo agitación durante 2.5 h. Una corriente de una mezcla de gases tóxicos: HCl, CO y CO_2, que se produce en la reacción se absorbe en 1 L de 10% de solución de hidróxido de sodio puesta en una trampa enfriada

con agua de grifo. Después de completar la adición de cloruro de oxalilo acompañada por la disolución completa de los sólidos, una corriente fuerte de nitrógeno seco se pasa a través de la solución durante 1 h para retirar la mayor parte de gases ácidos (HCl, CO_2) que permanecen disueltos en la mezcla de reacción. Después de este tiempo el contenido del matraz se enfría por debajo de 15° C en un baño de agua helada, y 95 g (1.0 equiv.) del clorhidrato de etil éster de L-fenilalanina sólido se agrega en la mezcla. Se instala un nuevo embudo de goteo de 500 mL en lugar del embudo de 250 mL y se llena con una solución de 145 mL de trietilamina (2.55 equiv.) en 350 mL de tolueno. La solución de trietilamina luego se agrega durante un periodo de tiempo de 2 hr en el baño de agua helada y la mezcla de reacción agitada. Durante el tiempo de adición, la temperatura de la mezcla se mantiene por debajo de 25° C. Esta temperatura se mantiene durante 4 h después de la terminación de la adición de trietilamina y luego el clorhidrato de trietilamina se filtra y la torta blanca se lava con dos porciones de 100 mL de tolueno. El filtrado luego se transfiere en un embudo de separación de 3 L y se lavan con dos porciones de 500 mL de agua y una porción de 500 mL de solución salina. La capa de tolueno luego se concentra a un volumen de 500 mL y se deja durante la noche en un refrigerador para cristalización. Los cristales blancos se recolectan en el filtro y se lavan con 100 mL de tolueno enfriado en hielo, produciendo 108.7 g (62% de rendimiento) del etil éster de N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina.

^{1}H RMN (cloroformo deuterado (abreviado como $CDCl_3$), ppm): 7.78 δ, J 2.8, 1H; 7.55 δ, J 2.4, 1H; 7.30-7.27 m, 3H; 7.11 broad δ, J 8.0, 1H; 7.08 δq, J 8.0 y 1.6, 1H; 4.99 q, J 6.0, 1H; 4.24 q, J 7.0, 2H; 3.29 dd, J 5.6 y 14.4, 1H; 3.21 dd, J 9.2 y 14.0, 1H; 2.11 s, 3H; 1.31 t, J 7.2, 3H.

Preparación de N-(3,5-dicloro-2-hidroxibenzoil)-L-fenilalanina (Plantilla OTA). Ciento ocho gramos de etil éster de N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina se disuelven en 1 L de alcohol etílico anhidro y se ponen en un matraz de fondo redondo de 2 L equipado con una barra de agitación magnética y se ponen en un baño de agua a temperatura ambiente. En esta mezcla una solución de 33.33 g de hidróxido de sodio en 37.2 mL de agua se agrega en una porción única y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 17 h (durante la noche). Un volumen de 68.6 mL de ácido clorhídrico concentrado se agrega bajo agitación, que se mantiene durante 2 h adicionales. El cloruro de sodio precipitado se filtra y el filtrado se evapora hasta secado a 60° C bajo 30 T de presión. El residuo de 88.9 g (98% de rendimiento) solidificado después de enfriar en forma de un producto vítreo incoloro, que es muy soluble en tolueno o acetonitrilo, produciendo por lo tanto una Plantilla OTA (por ejemplo, para uso en la producción de MIP-OTA). MS: M^+ 354 y 356 ^{1}H RMN ($CDCl_3$, ppm): 12.2 muy amplio s, 1H; 7.49 d, J 2.4, 1H; 7.35-7.28 m, 3H; 7.20 d, J 2.0, 1H; 7.18-7.16 m, 2H; 6.80 br d, J 6.4, 1H; 6.4 muy amplio s, 1H; 5.07 dd, 5.2 y 5.2, 1H; 3.34 dd, J 14.0 y 5.2, 1H; 3.27 dd, J 13.6 y 5.2, 1H.

Ejemplo 2

Síntesis MIP-OTA en mezcla de tolueno-ciclohexano

Se ponen quinientos mililitros de tolueno, 35.42 g (0.1M) de Plantilla OTA, 16.18 mL (0.15 M) de 2-vinilpiridina, 12.13 mL (0.1 M) de 2-hidroxietilmetacrilato, 235.75 mL (1.25 M) de dimetacrilato de etilenglicol y 2.46 g (15 mM) de AIBN en un matraz de cuatro cuellos de 3 L equipado con un: agitador mecánico, condensador de reflujo, termómetro y entrada/salida de nitrógeno. La solución clara resultante se agita durante 1 h a temperatura ambiente y una corriente constante de nitrógeno que pasa a través del recipiente (por ejemplo, para retirar oxígeno que puede inhibir la polimerización). El matraz luego se calienta a 60° C y la mezcla se agita vigorosamente. La polimerización ocurre mientras que la temperatura de la solución aumenta a ~55° C (por ejemplo, observado por un aumento en la viscosidad de la solución). Se agrega quince minutos después que empieza la polimerización, 600 mL de (1:1) mezcla de ciclohexano/tolueno se agrega en una porción única para promover la separación de la esfera polimérica de la solución. La agitación vigorosa de la mezcla se mantiene y un adicional de 500 mL de tolueno agregado 30 min después de mejorar la mezcla general del volumen de crecimiento de la suspensión sólida MIP en un volumen relativamente bajo de disolvente. Una temperatura de 60° C y la agitación se mantiene durante 5 h adicionales después de lo cual la agitación se apaga para dejar que se sedimenten las esferas MIP. El sobrenadante se decanta y el glóbulo se transfiere en un matraz evaporador rotatorio de 2 L para retirar los

disolventes restantes de las esferas MIP, a 40° C y bajo una presión reducida de 30 T. Las esferas secas se muelen a aproximadamente malla 140 y se lavan 5 veces, mediante agitación con 1.5 L de 0.2 p/v% de solución de hidróxido de sodio durante 30 min y decantación. La porción final de las esferas MIP-OTA se mezcla con 1.5 L de 0.5 v/v% de ácido acético, que también se decanta y 1.5 L de agua DI. Las esferas MIP-OTA húmedas libres de plantilla resultantes (~1.0 L de volumen) se secan en un horno de laboratorio a 80° C durante 4 h, utilizando cuatro bandejas de vidrio. El MIP-OTA similar a polvo blanco pesa 248 g (93% de rendimiento). Se sintetizan diversas muestras identificadas en la Tabla 1 adelante utilizando este método.

Para estos procedimientos y procedimientos de síntesis posterior, se retiran los inhibidores de polimerización de los monómeros y el reticulador mediante destilación por vacío, antes de ser utilizado en la polimerización, y los disolventes utilizados en la polimerización son de pureza ACS. La concentración de la plantilla en lavados posteriores se obtiene al comparar la intensidad del color rojo-naranja del complejo Fe^{3+} de la plantilla a λ_{max} 385 nm con la curva de calibración construida para concentraciones de plantilla entre 10 µg/mL y 1 mg/mL.

Tabla 1. Identificación de las muestras sintetizadas en la mezcla de tolueno-ciclohexano

Muestra ID	Tolueno-ciclohexano	Lavado final	Morfología

	(mL)		
523-29/30	45/15	Etanol	Esferas , polvo blanco
523-31	65/15	Etanol	Esferas , polvo blanco
523-34	65/35	Etanol/NaOH	Esferas, polvo blanco
523-35	55/22	Etanol/NEt_3/H_2O	Polvo blanco, grupos
523-36	90/30	NaOH/H_2O	Grupos blancos

Ejemplo 3

Síntesis de OTA MIP en acetonitrilo

Se ponen quinientos mililitros de acetonitrilo, 17.71 g (50 mM) de Plantilla OTA, 8.1 mL (75 mM) de 2-vinilpiridina, 6.1 mL (50 mM) de 2-hidroxietilmetacrilato, 117.9 mL (625 mM) de dimetacrilato de etilenglicol y 1.23 g (15 mM) de AIBN en un matraz de cuatro cuellos de 3 L equipado con un: agitador mecánico, un embudo de goteo de 500 mL con equilibrio de presión, un termómetro y entrada/salida de nitrógeno y se calienta con una manta de calentamiento eléctrica. La solución clara resultante se agita durante 1 h a temperatura ambiente y una corriente constante de nitrógeno pasa a través del recipiente (por ejemplo, para retirar oxígeno que puede inhibir la polimerización). Después de esto, el matraz se calienta a 60°C y la mezcla se agita vigorosamente. La polimerización se produce mientras que la temperatura de la solución aumenta a ~55° C (por ejemplo, observado por la viscosidad aumentada de la solución). Treinta minutos después que inicia la polimerización (por ejemplo, cuando es observable la formación de gel), 1.5 L de acetonitrilo (se precalienta a 55° C y se lava con nitrógeno para retirar el oxígeno) se agrega rápidamente, en tres porciones de un

embudo de goteo de 500 mL para evitar la formación del polímero de bloque y para promover la separación de las esferas de polímero de la solución. La agitación vigorosa y el calentamiento de la mezcla se mantienen durante las siguientes 17 h (durante la noche). Después de esto, el calentamiento y la agitación se apaga y las esferas MIP se dejan sedimentar. El sobrenadante se decanta y el glóbulo se transfiere en un matraz evaporador rotatorio de 2 L y el resto del disolvente retirado de las esferas MIP a 40° C y bajo presión reducida de 30 T. Las esferas secas se muelen a aproximadamente malla 140 y se lavan 5 veces, mediante agitación con 1.5 L de 0.2 p/v% de solución de hidróxido de sodio durante 30 min y decantación. La porción final de las esferas de MIP-OTA se mezcla con 1.5 L de 0.5 v/v% de ácido acético, que también se decanta y 1.5 L de agua DI. Las esferas MIP-PTA húmedas libres de plantilla resultantes (~1.2 L de volumen) se secan en un horno de laboratorio a 80° C durante 6 h, utilizando 4 bandejas de vidrio. El MIP-TRa similar a polvo blanco pesa 115 g (86.2% de rendimiento). Diversas muestras identificadas en la Tabla 2 adelante se sintetizan utilizando este método.

Tabla 2. Identificación de las muestras sintetizadas en acetonitrilo

Muestra ID	**Acetonitrilo (mL)**	**Lavado final***	**Morfología**
523-48	100 (+ tolueno 50 mL)	NaOH	Esferas/grupos, amarillo
523-49	50 (+ agua 150 mL)	NaOH	Esferas, amarillo/naranja

523-59	225 mL	NaOH	Esferas, blanca
523-60	190 mL	NaOH	Esferas, blanca

* después de lavado 4x 0.2% de NaOH, lavado 1x 1% de AcOH seguido con lavado de 1x H_2O.

Ejemplo 4

Preparación de MIP-OTA a gran escala en tolueno

La preparación se lleva a cabo en un reactor de 3 L con una tapa de cuatro cuellos, equipado con un agitador mecánico con dos propulsores instalados en el fondo y en la mitad, un mantel de calentamiento eléctrico, un termómetro, un embudo de goteo de 1.5 L con equilibrio de aire y entrada de gas de nitrógeno, y un condensador de reflujo equipado con un medidor de burbuja para controlar el flujo de nitrógeno. Los siguientes reactivos se cargan en el reactor: 54.54 g (154 mM) de N-(3,5-dicloro-2-hidroxibenzoil)-L-fenilalanina (Plantilla OTA), 25 mL (231 mM) de 2-vinilpiridina, 18.7 mL (154.0 mM) de etilenglicol monometacrilato, 363 g (1.925 M) de dimetacrilato de etilenglicol, 770 mL de tolueno y 5.0 g (30.8 mM) de AIBN. Un adicional de 1.5 L de tolueno se pone en un embudo de goteo. La mezcla de reacción se agita vigorosamente y el gas disuelto se retira al pasar una corriente fuerte de nitrógeno a temperatura ambiente durante 45 min y primero a través de tolueno que se ha puesto en el embudo de goteo, y luego a través del volumen de vacío del reactor. Se inicia un flujo de nitrógeno débil que se mantiene durante el tiempo de polimerización. La polimerización se inicia al calentar la mezcla de reacción hasta 55° C. Después de 15 min, la viscosidad de la mezcla

aumenta y la agitación llega a ser menos eficiente. En este punto, se agrega un volumen adicional de tolueno (de temperatura ambiente) del embudo de goteo. La adición se fija para correr lo suficientemente rápido para evitar el sobrecalentamiento de la mezcla debido a las propiedades exotérmicas de la reacción y para mantener la viscosidad de la mezcla de reacción lo suficientemente baja para permitir la agitación eficiente durante el tiempo de formación y separación de las esferas poliméricas. La temperatura de 60-70° C y la agitación se mantienen durante las siguientes 5 h y luego la mezcla se deja sin agitación a temperatura ambiente hasta el siguiente día. Luego, se decanta 1.75 L de la capa de tolueno de las partículas MIP y las partículas de MIP húmedas de tolueno se muelen y se transfieren a un matraz evaporador rotatorio de 2.0 L. La mayor parte del tolueno (~0.45 L) que se atrapa dentro de las partículas de MIP se destila de las esferas MIP bajo presión ligeramente reducida y a una temperatura por debajo de 70° C. Al final de la remoción del tolueno el producto similar a polvo de aquel formado exhibe una tendencia para producir el polvo. En este punto, la evaporación se detiene y las partículas MIP se lavan con 2 porciones de etanol de 500 mL cada una. Luego se decanta alrededor de 0.75 L de etanol de los sólidos y se evapora para producir 30 g (55%) de la Plantilla OTA regenerada y 700 mL de etanol regenerado. Los sólidos finos blancos luego se lavan con 4 veces con porciones de 0.5 L de 0.2 p/v% de NaOH seguido por un lavado único con 500 mL de 1 v/v% de ácido acético y una única porción de 500 mL de agua DI. El OTA-MIP resultante 'húmedo' luego se seca durante 24 h

en un horno de laboratorio a 80 C. Se obtiene una masa de 411.4 g (96.6% de rendimiento) del producto similar a polvo blanco y se fracciona utilizando tamices estándar. Esta metodología se utiliza para sintetizar las diversas muestras identificadas en la Tabla 3. Los detalles de la repartición de tamaño se proporcionan en la Tabla 4.

Tabla 3. Identificación de las muestras sintetizadas en tolueno o alcohol polivinílico (abreviado como PVA)

Muestra ID	**Tolueno o PVA(mL)**	**Lavado final**	**Morfología**
514-37/39	150 mL de Tolueno	NaOH*	Esferas/grupos, blanca
523-40	5 mL de PVA +100 mL de agua	NaOH*	Esferas/grupos, blanca
514-41	5 mL PVA+ 50 mL de agua	NaOH*	Esferas/grupos, verde
514-42/44	388+776 mL de tolueno	NaOH*	Esferas/grupos, blanca

*lavado 4x con 0.2% de NaOH se sigue con lavado 1x con 1% de AcOH y agua 1x.

Tabla 4. Repartición de tamaño del MIP-OTA producido.

Tamaño de la fracción	**Peso de la fracción (g)**	**p% de MIP-OTA**
>106 µm	212.81	51.8
45 µm -106 µm	127.72	31.1
20 µm-45 µm	56.97	13.9
<20 µm	13.28	3.2

Ejemplo 5

Baja temperatura y MIP-PTA iniciado con UV y

polimerización/síntesis de NIP.

Se establece la reacción fotoquímica. El pozo de inmersión de UV fotoquímico Quartz (vidrio ACE, Catálogo # 7856-10) equipado en una Lámpara de UV de 450 Vatios (vidrio ACE, Catálogo #7825-34) y Suministro de Energía de 450 Vatios en Estuche (vidrio ACE, Catálogo #7830-58) se une a un refrigerador de circulación WKL 230 LAUDA (suministrado por Brinkmann Instuments, Inc.), y refrigerador de agua de 4° C se corre a través de la manta de pozo al momento en que se enciente la lámpara UV.

Los monómeros de polimerización (Tabla 5), plantilla, iniciador (IABN) y un reticulador se ponen en una botella translúcida de polietileno (Nalgene®style 2105) y se pasa una corriente de Argón a través de la mezcla durante 15 min para retirar todo el oxígeno, que se sabe que inhibe la polimerización del radical libre. La botella se cierra y se une al pozo de inmersión, en el nivel del centro de la lámpara de UV, y se sumerge, junto con el conjunto de reacción fotoquímico, en un baño de agua helada. El agua fría se hace correr a través del manto de la lámpara, cuando la luz se enciende, y la irradiación de mezcla de reacción se mantiene durante cuatro horas (se requieren vidrios de seguridad de UV al momento cuando se enciende la lámpara UV). Se suministra hielo adicional, y se drena el exceso de agua del baño durante el curso de la polimerización UV, para mantener la temperatura del baño frío a 4° C. Después de completar la polimerización la botella se abre, el polímero se tritura y se muele en piezas pequeñas que se lavan: una

vez con etanol, diez veces con 0.2% de hidróxido de sodio, una vez con 1% de ácido acético y tres veces con etanol, para retirar la plantilla del polímero y la actividad máxima segura del MIP que finalmente se seca en un horno de laboratorio para retirar los residuos de etanol. Los rendimientos de MIP-OTA son de 56.7% y 49% respectivamente para #555-54A y 555-54B.

Tabla 5. Identificación de las muestras MIP-OTA sintetizadas utilizando baja temperatura e iniciación de UV

MIP-OTA	Estireno (mM)	2-Vinil-Piridina (mM)	Etileneglicol Monometacrilato (mM)	Etilenegli col Dimetacrilato (mM)	IABN (mM)	Plantilla OTA (mM)
555-54[a]	10.73	-	7.16	89.5	1.07	7.16
555-54B	-	10.73	7.16	89.5	1.07	7.16

Ejemplo 6

Capacidades de secuestro de MIP hacia micotoxinas - aplicadas a OTA

Los polímeros MIP producidos en tolueno-ciclohexano, acetonitrilo o tolueno se prueban hacia micotoxina OTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para la remoción de micotoxina OTA del medio líquido o semilíquido por medio de interacciones químicas. El MIP producido se utiliza aquí para describir las diferencias en la afinidad de la secuestro de la micotoxina OTA y para evaluar la especificidad del material. Se pone una cantidad de 12.5 mg de MIP en un

dispositivo de filtro de ultracentrífuga Amicon (5,000 Da). La preparación se hace junto con una muestra blanco que no contiene material MIP y un control positivo que solo contiene la toxina OTA que se va a probar. La prueba de secuestro se realiza en regulador de citrato 50 mM ajustado a pH 4.0. Todas las muestras se incuban durante 90 min en un agitador rotatorio orbital (Brunswick, Champaign, IL, USA) a 150 rpm mantenido a una temperatura de 37° C. Se prueba tres concentraciones finales de OTA con el sistema, 50, 100, 250 partes por billón (ppb) en un volumen final de 12.5 mL. Después de la incubación de microcentrifuga los tubos se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenandante se recolecta en frascos HPLC silanizados y ámbar, evitando cualquier interacción de la micotoxina con el frasco, y se calcula a partir de HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado con la señal de detectores de disposición de diodo y fluorométricos (por ejemplo, para detectar las cantidades de micotoxina y la micotoxina secuestrada) de acuerdo con los métodos estándar (Ver, por ejemplo, Entwisle A.C., Williams A.C., Mann P.J., Slack P.T., Gilbert J., 1995. *Liquid chromatography method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: Collaborative study*. Journal of AOAC, **83**: 1377-1383).

Los resultados (ver Tabla 5) indican que ambos MIP preparados con la plantilla OTA y sin la plantilla (NIP) en una concentración de 1.00 g/L tienen muy alta afinidad para la molécula de micotoxina OTA a pH 4.0. De acuerdo con el método de preparación, el MIP generado después de la

polimerización de precipitación (identificado como # 523-31 sintetizado en tolueno; # 523-34, -35, -36 sintetizado en mezcla de tolueno-ciclohexano; y # 523-48 sintetizado en mezcla de tolueno-acetonitrilo) tiene una eficacia de secuestro por encima de 98.8% mientras que el MIP generado después de la polimerización de emulsión (identificado como # 523-40 y -41 sintetizado en agua y alcohol polivinílico; y 49 sintetizado en acetonitrilo) tiene una afinidad menor por debajo de 63%. La molécula NIP también es capaz de interactuar con 98.8% de eficacia de secuestro. En esta etapa, el grupo de polimerización de precipitación no exhibe diferencias estadísticas entre los NIP y los MIP mientras que el grupo de polimerización de emulsión exhibe diferencias significativas entre MIP y NIP y también entre los MIP.

Se utilizan dos etapas de lavado sucesivas bajo 15% de etanol/hidróxido de sodio, solución de ácido acético al 1% para evaluar la capacidad de los dos grupos MIP para conservar la interacción y producir la resistencia del secuestro (Ver Tabla 6). El grupo de polimerización de emulsión muestra una liberación robusta del OTA desde el MIP así como también una liberación de la plantilla restante coeluyendo con la micotoxina OTA que produce el porcentaje negativo adsorbido. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona que la metodología de la polimerización de emulsión no es adecuada en la creación de un adsorbente eficiente para las moléculas OTA. La presente invención también proporciona que el grupo de polimerización de precipitación tiene una afinidad significativamente alta

hacia OTA que permite una desorción máxima de solo 26.3% de la molécula OTA para el MIP sintetizado en una mezcla de tolueno-acetonitrilo sin ninguna interferencia con cualquier plantilla restante.

Tabla 6. Actividad de secuestro de los MIP y NIP sintetizados en tolueno, acetonitrilo y mezcla de tolueno-ciclohexano para ocratoxina A y estabilidad de la interacción después de dos lavados sucesivos con 15% de etanol/hidróxido de sodio.

	Promedio aún adsorbido (%)			Promedio de desorción (%)		
Muestra ID	Inicial	1er lavado	2do lavado	Inicial	1er lavado	2do lavado
NIP 523-31#	98.84	92.52	86.66	1.162	7.478	13.342
MIP 523-34#	98.95	93.05	89.50	1.048	6.955	10.500
MIP 523-35#	99.04	90.60	86.09	0.963	9.397	13.915
MIP 523-36#	99.00	86.76	82.83	1.000	13.238	17.175
MIP 523-48#	99.73	85.76	73.71	0.273	14.242	26.293

polimerización de precipitación

Ejemplo 7

Titulación de la cantidad de MIP para la secuestro de ocratoxina A

Se conduce un experimento de titulación para investigar los índices de inclusión de MIP, de 0.01 g/L a 1.00 g/L (o 0.001 a 0.1% del índice de inclusión). La preparación se hace junto con una muestra blanco que no contiene material MIP y un control positivo que solo contiene la toxina OTA que se va aprobar. La prueba de secuestro se realiza en regulador de citrato 50 mM ajustado a pH 4.0. Todas las muestras se incuban durante 90 min en un agitador rotatorio orbital (Brunswick, Champaign, IL, USA) a 150 rpm mantenido a una

temperatura de 37° C. Se prueban tres concentraciones finales de OTA con el sistema, 50, 100, 250 ppb en un volumen final de 12.5 mL. Después de la incubación los tubos de microcentrifuga se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recolecta en frascos HPLC silanizados y ámbar, previniendo cualquier interacción de la micotoxina con el frasco, y se calcula a partir de HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado con la señal de los detectores de disposición de diodo y fluorométricos (por ejemplo, para detectar las cantidades de micotoxina y micotoxina secuestrada) de acuerdo con métodos estándar (Ver, por ejemplo, Entwisle et al., 2000 como se mencionó previamente).

Como se muestra en la Figura 3, a 0.05 g/L la eficacia óptima está por encima de 80% del valor de secuestro y alcanza un promedio de 86.4 ± 1.5% de secuestro. La incidencia del nivel de inclusión de los compuestos MIP se evalúa al examinar la actividad de secuestro de 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.50, y 1.00 g/L del MIP #523-34 (sintetizado en mezcla de tolueno-ciclohexano) y #523-60 (sintetizado en acetonitrilo) en 50, 100, 200 ppb de OTA en condición de regulador ácido (pH 4.0). El tamaño de MIP se fija entre 45 y 106 µm de diámetro de partículas debido a que esta fracción da el mejor resultado de secuestro y representa la proporción mayor del tamaño de las partículas en el producto total MIP sintetizado.

Cada MIP, #523-34 y #523-60, es capaz de adsorber 91.53

± 10.86 y 81.75 ± 23.67% de OTA, respectivamente como un promedio de la secuestro total independientemente del nivel de inclusión. Se encuentra un punto de deflexión en la curva de secuestro para los niveles de inclusión de MIP de 0.05 y 0.10 g/L respectivamente para las muestras #523-34 y #523-60. Los promedios de afinidad de secuestro para la inclusión de 0.05 a 1.00 y 0.10 a 1.00 g/L para #523-34 son 96.31 ± 2.23 y 97.39 ± 0.70%, respectivamente. Los promedios de afinidad de secuestro para los niveles de inclusión entre 0.05 y 1.00 g/L y entre 0.10 y 1.00 g/L para #523-60 son 94.51 ± 6.54 y 97.76 ± 0.91%, respectivamente. La presente invención así proporciona que el MIP sintetizado en una mezcla de tolueno-ciclohexano es favorable en un índice de afinidad mayor para la secuestro OTA a 0.01 g/L de inclusión con 72.42 ± 2.58% del índice de afinidad mientras que la muestra producida con acetonitrilo es menos efectiva con un índice de afinidad de 47.40 ± 6.08 y 84.77 ± 1.96 respectivamente a 0.01 y 0.05 g/L de inclusión del producto.

Ejemplo 8

Afinidad de diferentes MIP y NIP y caracterización de especificidad hacia ocratoxina A

Se realizan experimentos durante el desarrollo de las realizaciones de la invención con el fin de evaluar la afinidad de diferentes NIP/MIP sintetizados en acetonitrilo o tolueno como el disolvente utilizado para la polimerización. Las muestras #523-31 (tolueno) y #523-59 (acetonitrilo) se sintetizan sin ninguna plantilla de OTA (definido como un Polímero No Impreso); las muestras #523-34 (mezcla de

tolueno-ciclohexano) y #523-60 (acetonitrilo) se polimerizan alrededor de la plantilla análoga OTA. Las muestras luego se someten a tamizado utilizando diferentes tamices de tamaño de corte. Los tamaños del rango de partícula probados se describen en el Ejemplo 4. La producción de MIP produce partículas de tamaño entre aproximadamente 45 y 106 µm de diámetro (como se muestra en la Figura 4). La preparación se hace junto con una muestra blanco que no contiene material MIP y un control positivo que solo contiene la toxina OTA que se va a probar. La prueba de secuestro se realiza en regulador de citrato 50 mM ajustado a pH 4.0. Todas las muestras se incuban durante 90 min en un agitador rotatorio orbital (Brunswick, Champaign, IL, USA) a 150 rpm mantenido a una temperatura de 37°C. Se prueban tres concentraciones finales de OTA con el sistema, 50, 100, 250 ppb en un volumen final de 12.5 mL. Después de la incubación de la microcentrifuga los tubos se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recolecta en frascos HPLC silanizados y ámbar, previniendo cualquier interacción de la micotoxina con el frasco, y se calcula a partir de HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado con la señal de los detectores de disposición de diodo y fluorométricos (por ejemplo, para detectar las cantidades de micotoxina y micotoxina secuestrada).

La comparación de la afinidad OTA solo muestra diferencia limitada evaluada en una única serie de secuestro sin etapas de lavado sucesivas en 3 concentraciones diferentes de toxina (50, 100, 250 ppb). Solo la muestra

#523-59 hecha de NIP sin tamiz exhibe bajas capacidades de secuestro en cada concentración de pH de OTA. Los valores de secuestro inferiores también se encuentran para la muestra MIP #523-34 para valores de concentración 50 ppb de OTA especialmente para tamaños entre 20 y 45 y en un grado menor de 45 a 106 µm de diámetro. Así, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona que el tamaño de las partículas MIP producidas de acuerdo con los métodos de la presente invención tienen poco impacto en la afinidad del adsorbente total para OTA, con una afinidad que fluctúa en los casos peores entre 78 a 99% de los índices de secuestro. Los NIP son menos efectivos en sus propiedades de secuestro que los MIP que producen la especificidad de los MIP para interactuar con la micotoxina OTA.

Ejemplo 9

Atrapamiento de OTA añadido en vino utilizando MIP y filtración directa de ocratoxina A añadida en vino utilizando el dispositivo de filtración similar a la Extracción de Fase Sólida MIP (SPE)

Se prueba un procedimiento de extracción estándar en una muestra de vino blanco (Chardonnay 2005 - California) utilizando una columna de inmunoafinidad. La extracción se hace en una muestra pura de vino así como también en muestras añadidas de vino con 5, 10, 20 ppb de OTA cristalino puro. El promedio de la concentración original del vino es 1.676 ± 0.269 ppb de OTA (por ejemplo, cuando se determina siguiendo un procedimiento de extracción estándar). La recuperación de la muestra añadida 5 ppb es 100% y alrededor de 77.7% para 10

ppb.

La preparación se hace junto con una muestra blanco que no contiene material MIP y un control positivo que solo contiene la toxina OTA que se va a probar. La prueba de secuestro se realiza en regulador de citrato 50 mM ajustado a pH 4.0. Todas las muestras se incuban durante 90 min en un agitador rotatorio orbital (Brunswick, Champaign, IL, USA) a 150 rpm mantenido a una temperatura de 37°C. Se prueba tres concentraciones finales de OTA con el sistema, 50, 100, 250 ppb en un volumen final de 12.5 mL. Después de incubación se centrifugan los tubos de microcentrífuga a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recolecta en frascos HPLC silanizados y ámbar, previniendo cualquier interacción de la micotoxina con el frasco, y se calcula a partir de HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado con la señal de detectores de disposición de diodo y fluorométricos (por ejemplo, para detectar las cantidades de micotoxina y micotoxina secuestrada).

La secuestro de OTA del vino se evalúa utilizando un procedimiento estándar para la secuestro de micotoxina en el MIP #523-34 de mejor desempeño original (mezcla de fenol-ciclohexano. La secuestro varía en un promedio de 43.29 ± 4.08 a 67.15 ± 4.94 a 91.75 ± 1.59 tao 95.612 ± 1.201% para un nivel de inclusión de 0.05, 0.10, 0.50, y 1.00 g/L, respectivamente. La titulación del MIP determina una afinidad óptima cuando se utiliza en un nivel de inclusión de 0.5 y 1.0 mg/mL (Ver Figura 5).

Así, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y métodos para utilizarlos para atrapar/adsorber micotoxinas (por ejemplo, OTA) de vino (por ejemplo, partículas MIP que se utilizan (por ejemplo, bajo condiciones de agitación) para unir efectivamente y adsorber las micotoxinas del vino).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona MIP (por ejemplo, generados de acuerdo con un método descrito aquí) para atrapar y/o adsorber las micotoxinas (por ejemplo, uno o una pluralidad de diferentes tipos de micotoxinas (por ejemplo, presentes en medio líquido o solución de extracción de la matriz de complejo (por ejemplo, alimento, comida, vegetal, animal, etc.)).

Se generan dispositivos de filtración similares a Extracción de Fase Sólida (como SPE) para un equivalente de 0.1 g/L de inclusión del MIP. Se necesitan frascos de vidrio silanizados para asegurar la estabilidad de OTA en disolventes acuosos y para evitar cualquier interacción específica entre OTA y los frascos de vidrio. El método se silanización se aplica a filtros de nylon y PTFE/PE y tubos con base en métodos utilizados de manera general en la técnica (Ver, por ejemplo, Entwisle et al., 2000 como se mencionó previamente). Los frascos y filtros se preparan al llenarlos y sumergirlos con el reactivo silanizante (SURFASIL). Después de 1 minuto, estos se enjuagan una vez con tolueno luego dos veces con metanol seguido por tres

veces con agua y se secan. La silanización se realiza y genera una reducción dramática de la interacción del material con la molécula OTA como se realiza en el campo. Por ejemplo, se observa menos de 5% de interferencia (por ejemplo, en contraste a aproximadamente 16 a 26% de interferencia sin la silanización anterior de los materiales cuando se utilizan filtros PE/PTFE). El Nylon no es adecuado para silinización. Todos los tubos de polipropileno se reemplazan con tubos de vidrio silanizados.

Se generan dispositivos de filtro como SPE para atrapar OTA del vino después de una filtración directa de la muestra a través de la columna. Se prueba la eficacia del MIP para depuración OTA del vino (Chardonnay 2005 - California) añadido con 5 y 10 ppb de OTA. Los resultados demostrados para 5 y 10 ppb de OTA añadido, una reducción instantánea 55.41 ± 5.542 y 56.937 ± 5.739% del contenido de OTA del vino, respectivamente. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona los MIP específicos de micotoxina (por ejemplo, generados de acuerdo con los métodos descritos aquí) que se utilizan con un SPE o dispositivo de filtro similar a SPE para retirar las micotoxinas del líquido (por ejemplo, vino) que comprende micotoxinas.

Ejemplo 10

Atrapamiento de ocratoxina A utilizando el dispositivo de Fase Sólida MIP iniciada con UV a temperatura baja y calor iniciado (SPE) y evaluación de selectividad hacia los

constituyentes claves del vino.

Se generan dispositivos de filtro como Extracción de Fase Sólida (similar a SPE) para un equivalente de 0.1 g/L de inclusión del MIP. Se necesitan frascos de vidrio silanizados para asegurar la estabilidad de OTA en disolventes acuosos y para evitar cualquier interacción específica entre OTA y los frascos de vidrio. El método se silanización se aplica a filtros de nylon y PTFE/PE y tubos con base en métodos utilizados de manera general en la técnica (Ver, por ejemplo, Entwisle et al., 2000 como se mencionó previamente). Los frascos y filtros se preparan al llenarlos o sumergirlos con el reactivo de silanización (SURFASIL). Después de 1 minuto, estos se enjuagan una vez con tolueno luego dos veces con metanol seguido por tres veces con agua y se secan. Se realiza silanización y se genera una reducción dramática de la interacción del material con la molécula OTA cuando se realiza en el campo. Por ejemplo, se observa menos de 5% de interferencia (por ejemplo, en contraste a aproximadamente 16 tao 26% de interferencia sin silanización anterior de los materiales cuando se utilizan filtros PE/PTFE. El nylon no es adecuado para silanización. Todos los tubos de polipropileno se reemplazan con tubos de vidrio silanizados.

Las soluciones madre de veinte compuestos incluyen polifenoles: ácido cafeico (Caf A), hidrato de catecina (CH), epicatecina (ECH), ácido ferúlico (Fer), ácido trans-3-hidroxicinnámico (3-HCA), ácido 2-hidroxicinnámico (2-HCA), cloruro malvidin-3-galactosida (Mal), miricetina (Myr),

deshidrato de quercetina (QH), trans-resveratrol (Res), trihidrato de rutina (Rut) y ácido indol-3- acético (IAA) (Sigma, St Louis, MO, USA) se preparan al disolver en metanol (grado HPLC) y agregar agua y 85% de ácido o-fosfórico a pH inferior a aproximadamente 3.0. El sobrenandante se recolecta en frascos HPLC silanizados y ámbar, evitando cualquier interacción del analito con el frasco, y se calcula a partir de HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado con la señal de detectores de disposición de diodo y fluorométricas (por ejemplo, para detectar cantidades de micotoxina y micotoxina secuestrada). Se utiliza una columna Spherisorb ODS HPLC de fase inversa C18 de 5 µm, 4.6 µm x 250 mM (Waters Corp., Milford, MA, USA) termofijada a 30° C. Las longitudes de onda de emisión y de excitación se fijan a 225 nm y 365 nm, respectivamente. El detector de disposición de iodo foto UV se fija a modo de barrido completo de 210 a 799 nm longitudes de onda. La fase móvil consiste de agua/ácido fosfórico (99.5%:0.5%; v/v) y (B) acetonitrilo (grado HPLC) /agua/ácido fosfórico (50%/49.5%/0.5%; v/v/v).

Todos los MIP muestran buena adsorción de OTA en solución reguladora, todos sobre 80% de adsorción. El MIP 555-52 muestra la mejor absorción, casi 100 %. De forma similar, el OTA permanece adsorbido durante el lavado de regulador de todos los MIP, pero se desorben durante el lavado de metanol específicamente del MIP #555-52 y #523-34 iniciado por calor y significativamente en la concentración OTA mayor. El OTA permanece adsorbido a la baja temperatura y MIP #555-54A y #555-54B iniciado por UV en el lavado de

metanol mejor que los MIP iniciados por calor, con 50% de adsorción en promedio a los MIP iniciados por UV mantenidos a través del lavado de metanol (Ver Figura 6).

Están bien documentados los beneficios de salud de los compuestos de poligenol del antioxidante. En la estrategia de filtrar la micotoxina en líquido (por ejemplo, vino) tal como OTA, también es primordial evaluar el impacto del material secuestrante en algunos compuestos benéficos tales como polifenoles. En algunas realizaciones y como se documenta aquí (ver por ejemplo, Ejemplo 6 a Ejemplo 9) la polimerización iniciada con calor que produce MIP #555-52 y #523-34 son capaces de interactuar efectivamente con la micotoxina OTA presente en un medio líquido, con niveles de adsorción por encima de 95% mientras que la baja temperatura y la polimerización iniciada por UV que produce MIP #555-54 y #555-54X da rango de eficacia de adsorción entre 80 y 92% de eficacia de secuestro (Figura 6).

En algunas realizaciones, la baja temperatura y las composiciones de la invención MIP iniciadas con UV exhiben especificidad para el OTA cuando se evalúa con una mezcla de diferentes polifenoles, una antocianina, y ácido indol-3-acético. En este caso, el MIP #555-54A y #555-54B exhibe alta adsorción de OTA (por encima de 80%) y evita al mismo tiempo de los polifenoles o ácido indol-3- acético (por ejemplo, que proporciona características organolépticas y anti-oxidantes (por ejemplo, de vino)). En el estudio de los MIP iniciados por UV, el tiempo de incubación se elimina y las muestras de

vino y los lavados se empujan a través del MIP o el filtro inmediatamente. Se observa muy poca adsorción (Figura 7). Así, en algunas realizaciones, la invención proporciona un MIP que exhibe especificidad para una micotoxina (por ejemplo, OTA) mientras que exhibe concurrentemente poca a ninguna unión a (por ejemplo, adsorción de) compuestos benéficos (por ejemplo, polifenoles y/o ácido indol-3-acético). La cuantificación de la miricetina, resveratrol y rutina es propensa a incertidumbre debido a su presencia a concentración muy baja cerca al límite de detección y el límite de cuantificación del instrumento analítico HPLC que da como consecuencia desviaciones estándar largas y valores negativos. En la realización actual, los MIP iniciados por UV así son eficientes en el atrapamiento de OTA y no se deterioran por el contenido de polifenol de un medio líquido de vino que demuestra que se genera la especificidad del material MIP.

Ejemplo 11

Recubrimiento de MIP en malla de fibra de vidrio para la aplicación como un dispositivo de filtración

Se conducen experimentos durante el desarrollo de las realizaciones de la invención para probar el recubrimiento de la malla de fibra de vidrio con MIP-OTA (Ver Figura 8). Se utilizan múltiples concentraciones de OTA para determinar la afinidad de cada preparación. Los diferentes MIP generados se resumen en la Tabla 7 adelante. Se recubren tres detecciones de malla con los MIP con varias concentraciones del reactivo

de reticulación, que afecta la fragilidad. (Soluciones de monómero 1, 2, 3 y 1H). La malla que se prepara a partir de los MIP recubiertos se corta con base en el peso antes y después del recubrimiento MIP para dar 50, 100 y 200 mg del MIP evaluado por el peso diferencial. Se conducen ensayos de secuestro con malla recubierta con MIP sumergida en un tubo falcon de 20 mL, con determinación de las características de secuestro a OTA en medio de vino después de 90 min de incubación utilizando un agitador rotatorio. Un mL de los tubos que contienen la solución de vino añadido con tres concentraciones diferentes de OTA se mide antes y después de incubación con los filtros de malla MIP-OTA. La muestra se recolecta en frascos HPLC silanizados y ámbar, que previene cualquier interacción de la micotoxina con el frasco, y se calcula con HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado con la señal de detectores de disposición de diodo y fluorométricas (por ejemplo, para detectar cantidades de micotoxina y micotoxina secuestrada).

Tabla 7. Descripción de las condiciones de polimerización para el recubrimiento de MIP en malla de fibra de vidrio.

Parámetros	**Función**	**Solución de Monómero**			
		1	**2**	**3**	**1H**
Análogo ocratoxina A (mg)	Plantilla	1000	500	250	1000
2-Vinil piridina (µl)	Base para formar sal con OTA	1000	500	250	1000
Dimetacrilato de etilenglicol (mL)	Reticulador	5	5	5	5
2-Hidroxi etil	Molécula de	800	400	200	800

metacrilato (µl)	unión				
Azobisisobutiro-nitrilo (mg)	Iniciador de polimerización	66	55	50	66
Curado (horno)	Para el secado de malla	65 °C	65 °C	65 °C	80-90 °C
Disolvente	Sólidos disueltos	Ninguno	Ninguno	Ninguno	500 µl de tolueno

Los resultados indican que la secuestro máxima contra el OTA es dependiente del nivel de inclusión del MIP. La secuestro máxima se obtiene con 500 mg de la plantilla, 250 mg de vinil-piridina y 200 mg de hidroxil etil metacrilato que produce un MIP que adsorbe hasta 46.5% de OTA de la concentración 100 ppb en vino (Ver Figura 9). Por el contrario, el mismo experimento se lleva a cabo con el polímero NIP idénticamente procesado recubierto en fibra de vidrio que muestra menos de 15% (baja hasta el 1%) de eficacia de secuestro dependiendo al procedimiento de preparación (Ver Figura 10) ejemplificando por lo tanto la especificidad del material MIP-OTA para OTA.

Ejemplo 12

Capacidad de retención cromatográfica de MIP

Se utiliza MIP #523-34 (sintetizado con mezcla de tolueno-ciclohexano) como fase estática de una columna HPLC de 4.6 × 150 mM después de empacar el material utilizando sonicación en un baño de agua y luego aplicar índice de flujo continúo durante la noche de 5.0 mL/min de serie de acetonitrilo a través de la columna (MIP utilizando una bomba binaria de HPLC Waters Alliance (Waters Corp, Milford, MA,

USA)). Se determina que la presión de la columna es aproximadamente 400 psi y es comparable con otras condiciones HPLC descritas en otra parte (Ver, por ejemplo, Baggiani et al., 2002 como se mencionó previamente; Jodlbauer J., Maier N.M., y Lindner W. Journal of Chromatography A, **945**: 45-63; Maier N.M., Buttinger g., Welhartizki S., gavioli E., Lindner W., 2004. Journal of Chromatography B, **804**: 103-11). La columna se estabiliza bajo el índice de flujo de acetonitrilo a 1.0 mL/min sobre 48 h y se lavan extensamente con metanol 99% y tetraetilamina 1% para retirar el resto de la plantilla OTA de la columna. Se realiza la caracterización del análisis frontal HPLC-PDA-FID de OTA utilizando la columna MIP.

Se evalúa la supervivencia de la columna bajo diferentes condiciones de fase móvil y bajo diferentes configuraciones de gradiente a través de la columna mantenida a una temperatura constante de 30° C. Se prueba diversos gradientes que incluyen 100% de agua y transición a 100% de acetonitrilo o 100% de metanol y vice versa; y también utilizando tetraetilamina 1% en metanol a metanol 100% durante 60 min. La columna sobrevive sin ninguna modificación en la fase estática después de un aumento de la presión hasta 1600 psi que produce la supervivencia de la columna a altas presiones. La inyección de la acetona se utiliza para evaluar el volumen vacío de la columna con una elución del analito sobre un periodo de 2 min. Se evalúa la elución de OTA utilizando las mismas condiciones utilizadas para un perfil de elución regular ODS C18 (85% de acetonitrilo). La retención del OTA se evalúa a 5 min con la columna MIP bajo el gradiente

isocrático. Para aumentar el tiempo de retención de OTA, se implementa un gradiente que permite la retención de OTA para aumentar a 19.5 min.

Las condiciones finales seleccionadas se presentan en la Figura 11 y la condición de gradiente se detalla en la tabla asociada. Se observan dos picos, el pico principal de OTA se eluye entre 17 y 22 min (a 63% de acetonitrilo) y un segundo pico asociado con una fracción OTA altamente vinculada remanente liberada mediante la adición de tetraetilamina 1% a la columna.

Ejemplo 13

Síntesis de la plantilla de esporidesmina

La preparación de N-terc-butoxicarbonil-2,3-dimetoxianilina de ácido 2,3-dimetoxibenzoico. Se cargan trescientos milímetros de alcohol terc-butilo anhidro, 50.0 g (274 mM) de ácido 2,3-dimetoxibenzoico y 28.33 g (280 mM, 39 mL) de trietiletilamina anhidra se cargan en un matraz de dos cuellos, de fondo redondo de 1 L, equipado con un embudo de goteo de 120 mL con equilibrio de presión y medidor de burbuja de gas, barra de agitación magnética pesada y un termómetro. El contenido del matraz se agita magnéticamente y se calienta a 80° C en un baño de aceite. Se agrega una cantidad de 77.04 g (280 mM, 60.5 mL) de difenil fosforazidato gota a gota en la mezcla con un índice suficientemente lento para controlar la evolución de la producción de gases. Se mantiene el calentamiento a 80°C y agitación magnética durante la noche. Los componentes

volátiles de la mezcla luego se evaporan rotatorio bajo vacío 30 T y a una temperatura por debajo 55° C. El producto aceitoso se transfiere a un embudo de separación de 1 L y se disuelve en una mezcla de 500 mL de ciclohexano y 200 mL de acetato de etilo. La solución se lava tres veces con 200 mL de agua DI y una vez con 200 mL de cloruro de sodio acuoso saturado y se seca sobre sulfato de sodio anhidro durante 15 min, se filtra y se concentra en evaporador rotatorio bajo vacío 30 T a 80° C. Se obtienen N-terc-butoxicarbonil-2,3-dimetoxianilina 67.88 g (98% de rendimiento) como aceite incoloro.

TLC, SiO_2, CH_2Cl_2 : ciclohexano (abreviado como c-Hex) (1:2); R_f =0.66 detección UV, 5% de $KMnO_4$ caliente de amarillo brillante.

Película FT-IR (cm^{-1}): 3319, 2941, 1669, 1601, 1529, 1477, 1459, 1416, 1369 1296, 1258, 1090, 998, 978, 780, 737.

^1H RMN, (400MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 1.53 s, 9H; 3.86 s, 3H; 3.862 s, 3H; 6,593 dd, J=8.4&1.6 Hz, 1H; 7.004 t, J=8.4&8.0, 1H; 7.135 br s, 1H; 7.725 d, J=8.0 Hz.

Preparación de 2,3-dimetoxianilina a partir de N-terc-butoxicarbonil-2,3-dimetoxianilina. Se carga un volumen de 580 mL de metanol, 67.88 g (268 mM) de N-terc-butoxicarbonil-2,3-dimetoxianilina y 66.45 mL de 12.1 M HCl a un matraz de 1 L equipado con una barra de agitación magnética y se pone en un baño de agua de 50° C. Se mantiene calentamiento y agitación durante 2 h y luego se deja con agitación durante la noche a temperatura ambiente. Luego, después de enfriar la solución en un baño de hielo, un volumen de 130.5 mL de 6.16

M hidróxido de sodio se agrega con agitación.

Se evapora el metanol de la mezcla utilizando un evaporador rotatorio a una temperatura por debajo de 40° C y bajo presión de vacío de 30 T. El residuo semisólido se diluye con 180 mL de tolueno y se filtra. El precipitado se lava dos más veces con porciones de 180 mL de tolueno y los filtrados se transfieren en un embudo de separación 1 L. La capa superior se recolecta y se seca con sulfato de sodio, se concentra y se destila por vacío. Se recolecta una masa de 34.6 g de 2,3-dimetoxianilina (94.0% de rendimiento) a 105-107° C a 8 T en forma de aceite cristalizante, incoloro.

TLC, SiO_2, c-Hex:Tetrahidrofurano (abreviado como THF) (6:1); R_f =0.35 detección UV, 5% de $KMnO_4$ calor/ café-verde.

Película FT-IR (cm^{-1}): 3463, 3368, 2939, 1609, 1497, 1475, 1319, 1262, 1226, 1129, 1085, 1050, 999, 773, 729, 694.

^1H RMN, (400MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 3.75 br s, 2H; 3.83 s, 3H; 3.84 s 3H; 6.34 d, J=8.1 Hz, 1H; 6.38 d, J=8.1Hz, 1H; 6.84 t, J=8.1Hz, 1H.

Síntesis de etil 3-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-indolona-3-carboxilato de 2,3-dimetoxianilina y dietilcetomalonato. Una solución de 69.33 g (398.1mM) de dietilcetomalonato en 250 mL de tolueno se pone en un matraz de fondo redondo de 1 L equipado con un embudo de goteo con equilibrio de aire y una barra de agitación magnética puesta en un baño de agua helada. Una solución de 56.769 g (370.6 mM) de 2,3-dimetoxianilina en 200 mL de tolueno se carga en el embudo de goteo. La agitación se inicia y solución de 2,3-

dimetoxianilina se agrega lentamente en el matraz, con enfriado continúo y agitación magnética de la mezcla de reacción. La adición se completa en un tiempo de 4 hrs y la mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y se deja con agitación durante la noche para un total de 22 h. Luego, la mezcla se calienta a 80° C durante 2 hrs y seguido por un aumento de la temperatura de la mezcla a 100° C. Se recolecta un volumen de 25 mL del destilado. Se recolecta un volumen de 25 mL del destilado, que incluye 4 mL de agua y 21 mL de tolueno. Un TLC de SiO_2 (PhMe:THF/6:1, UV, $KMnO_4$ caliente que indica la presencia de: dietilcetomalonato R_f 0.86; 2,3-dimetoxianilida de monoetilcetomalonato R_f 0.66; 2,3-dimetoxianilina R_f 0.43; monohidrato de dietilcetomalonato R_f 0.30 y el producto deseado, etil 3-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-indolona-3-carboxilato R_f 0.20. Se continúa calentamiento a 100 °C durante 24 hrs después de lo cual se forma un precipitado blanco en el matraz. El contenido del matraz luego se agita y se calienta a 80-90° C para las siguientes 48 h. Después de este tiempo se enfría a temperatura ambiente y el precipitado se filtra y se lava con 50 mL de tolueno. Después de secado, se obtienen 16.1 g de etil 3-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-indolona-3-carboxilato (24.0% de rendimiento). El filtrado se concentra en un evaporador rotatorio y se somete a LC en SiO_2 utilizando mezcla de c-Hex:THF con el contenido de THF de 7.5 a 20%. Se recolectan 12.2 g adicionales (18.2% de rendimientos) del producto bastante puro.

Pf 150-151°C.

TLC, SiO_2, Tolueno (abreviado como PhMe): THF (6:1), R_f =0.12 detección UV, 5% $KMnO_4$ calor/ amarillo canario.

Película FT-IR (cm^{-1}): 3293, 2937, 1728, 1726, 1636, 1505, 1466, 1336, 1236, 1234, 1164, 1084, 1016, 1192, 729.

^1H RMN, (400 MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 1.191 t, J=7.2Hz, 3H; 3.892 s, 3H; 3.898 s, 3H; 4.152-4.319 m, 16 líneas, dqx2, todos J=7.2 Hz con los centros cuartetes a: 4.179, 4.205, 4.265, 4.292, 2H; 4.346 br s, 1H; 6.575 d, J=8.4 Hz, 1H, 6.961 dd, J=8.4&0.4 Hz, 1H; 7.744 br s, 1H.

La síntesis de 6,7-dimetoxiisatina de etil 3-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-indolona-3-carboxilato. Se agita una solución de 10.67 g (40.2 mM) de etil 3-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-indolona-3-carboxilato en 100 mL de etanol se agita en baño de agua de temperatura ambiente. En esta mezcla una solución de 4.828 g (120.7 mM) de hidróxido de sodio en 25 mL de agua se agrega gota a gota. Se pasa una corriente de aire, libre de CO_2, por la mezcla de reacción que se agita vigorosamente. El paso de aire y la agitación de la mezcla a temperatura ambiente se mantienen durante la noche. La mezcla recuperad es rojo-café intenso. La solución se neutraliza por la adición de 5 mL de ácido clorhídrico concentrado. El precipitado blanco de las sales inorgánicas que se forman se filtran y el filtrado se concentra en un evaporador rotatorio al volumen de 20 mL y se deja para cristalización en el refrigerador. Se recolectan cristales naranja-amarillos y se secan al aire. Se obtiene una cantidad de 2.24 g (26.9% de rendimiento) de 6,7-dimetoxiisatina puro. Se separa 0.54 g adicionales (6.5% de rendimiento) del producto del filtrado mediante cromatografía líquida utilizando SiO_2 y mezcla PhMe:THF (4:1).

Pf 209-210°C.

TLC, SiO_2, PhMe:THF (6:1), R_f =0.18 mancha amarilla, detección UV, 5% $KMnO_4$ calor/ amarillo canario.

Película FT-IR (cm^{-1}): 3218, 1747, 1707, 1623, 1507, 1452, 1442, 1337, 1286, 1240, 1184, 1082, 1041, 973, 949, 794, 685, 702, 662.

^1H RMN, (400 MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 3.91 s 3H; 3.98 s 3H; 6.60 d, J=8.4 Hz, 1H; 7.42 d, J=8.4Hz, 1H; 7.74 br s, 1H.

La síntesis de 6,7-dimetoxi-1-metilisatina de 6,7-dimetoxiisatina. Una solución de 2.255 g (20.1 mM) de terc-butanolato de potasio en 20 mL de THF anhidro se agrega desde una jeringa mediante el septo de caucho, con agitación magnética y enfriamiento en un baño de agua helada, en un matraz de fondo redondo de 50 mL que contiene una solución de 2.78 g (13.4 mM) de 6,7-dimetoxiisatina en 15 mL de THF anhidro. En esta mezcla se agregan 3.8 mL (8.65 g, 60 mM) de yoduro de metilo por medio de una jeringa y la mezcla con precipitado pesado que se forma inmediatamente se agita durante la noche a 35° C. El TLC (SiO_2, PhMe:THF (6:1)) confirma la conversión completa del sustrato (6,7-dimetoxiisatina) R_f = 0.18 en la 6,7-dimetoxi-1-metilisatina R_f = 0.34. El precipitado se filtra y se lava con tres porciones de 20 mL de THF anhidro. Los filtrados combinados se evaporan hasta secado y el producto se recolecta como una fracción color rojo brillante de cromatografía flash. Se utiliza SiO_2 y una mezcla de PhMe:THF (9:1). Después de evaporación hasta secado del eluyente color rojo, se recolectan 2.517 g (84.8% de rendimiento) de cristales

amarillos brillantes.

Pf 190-191°C.

TLC, SiO_2, PhMe:THF (6:1), R_f = 0.34 mancha naranja-roja, detección UV, 5% $KMnO_4$ calor/ amarillo canario.

Película FT-IR (cm^{-1}): 2955, 1724, 1614, 1497, 1450, 1373, 1264, 1205, 1168, 1131, 1086, 1044, 1028, 979, 975, 828, 800, 775, 654.

^1H RMN, (400 MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 3.490 s, 3H; 3.877 s, 3H; 3.982 s, 3H; 6.575 d, J=8.4 Hz, 1H; 7.416 d, J=8.4Hz, 1H.

Síntesis de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina. Se pone una cantidad de 2.517 g (11.38 mM) de 6,7-dimetoxi-1-metilisatina y 1.823 g (13.65 mM) de N-clorosuccinimida y 30 mL de DMF en un matraz de fondo redondo de 100 mL equipado con una barra de agitación magnética y un embudo de goteo de 10 mL con equilibrio de aire y se pone en un baño de agua helada. Una solución de 10 mL 1.125 mL (13.6 mM) de ácido clorhídrico concentrado en DMF se carga en el embudo de goteo y se agrega gota a gota en una mezcla de reacción agitada y enfriada. Después que se completa la adición, la solución se mezcla a temperatura adicional durante 2 h adicionales. Luego los disolventes se evaporan rotatorios bajo vacío 8 T y a 50° C y el residuo se somete a cromatografía flash en SiO_2 utilizando mezcla PhMe:THF (19:1). Se recolecta un eluyente que contiene una banda de color rojo ladrillo del producto y se evapora en horno rotario hasta secado que produce 1.83 g (62.9% de rendimiento) de cristales de color rojo ladrillo de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina.

Pf 140-142°C.

TLC, SiO_2, PhMe:THF (6:1), R_f = 0.51 mancha roja, detección UV, 5% $KMnO_4$ calor/ amarillo canario.

UV/VIS (nm) c.-0.143 mg/mL en Etanol: 318, e 2.75, 433, e 0.70.

Película FT-IR (cm^{-1}): 2951, 1726, 1602, 1457, 1442, 1423, 1404, 1359, 1292, 1263, 1232, 1093, 1046, 1005, 979, 941, 897, 881, 797, 766, 668.

^1H RMN, (400 MHz), $CDCl_3$, δ (ppm): 3.475 s, 3H; 3.935 s, 3H; 4.027 s, 3H; 7434 s, 1H.

La estructura molecular de esporidesmina y la plantilla de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina se puede encontrar en la Figura 12. La ruta sintética se resume en la Figura 13.

Ejemplo 14

Síntesis de esporidesmina MIP y NIP (con ácido metacrílico)

Una solución de 1.8 g (7.04 mM) de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina, 1.194 mL (1.212 g, 14.08 mM) de ácido metacrílico, 3.415 mL (3.664 g, 28.16 mM) de 2-hidroxietilmetacrilato, 39.83 mL (41.86 g, 211.2 mM) de dimetacrilato de etilenglicol y 1.0 g (6.09 mM) de AIBN en 100 mL de tolueno se pone en un matraz de fondo redondo de cuatro cuellos de 500 mL, equipado con un embudo de goteo de 120 mL con equilibrio de gas, un agitador mecánico, un condensador de reflujo con medidor de burbuja y un termómetro. Se pone un volumen de 120 mL de tolueno en el embudo de goteo, el agitador se inicia y el nitrógeno se pasa a través de tolueno (en el embudo de goteo) y sobre la superficie de la mezcla en el matraz y se libera a través del

medidor de burbuja. Después de 30 min de agitación y soplado de nitrógeno, el índice de flujo de gas se limita a burbujas únicas y la temperatura en el matraz se aumenta a 65° C al sumergir el matraz en un baño de agua de 70° C. Dentro de 15 min inicia la polimerización y la solución llega a ser más y más viscosa. Cuando es difícil de mantener una agitación vigorosa, el tolueno del embudo de goteo se agrega tan rápido como sea posible, para diluir la mezcla. Se mantiene agitación vigorosa y calentamiento durante 4 h. Durante este tiempo se forman esferas pequeñas del MIP. La mezcla se deja sin agitación o calentamiento durante la noche. En la mañana las esferas de MIP se filtran y se lavan 13 veces con 150 mL de etanol cada una. Los filtrados de color rojo naranja se recolectan, se concentran rotatorio. La 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina (plantilla de esporidesmina) se recupera de cromatografía flash utilizando PhMe:THF (98:2) y se recolecta la banda de color rojo ladrillo de la plantilla. La evaporación rotatoria produce 1.572 g (87.3% de recuperación) de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina cristalina, muy puro. Las esferas de MIP se secan al aire durante la noche a temperatura ambiente y una hora adicional a 80° C en un horno de laboratorio.

Se obtiene una cantidad de 45.362 g de esporidesmina MIP (ácido metacrílico) en forma de esferas blancas de cápsulas en forma de huevo pequeñas y se identifican como MIP #519-98.

La esporidesmina NIP (ácido metacrílico) 45.883 g en la forma de esferas blancas nieve, se obtienen mediante el mismo

procedimiento sin embargo no se ha agregado plantilla de esporidesmina a la mezcla de reacción y solo se realizan tres lavados de etanol (150 mL cada uno). El polímero se identifica como MIP #555-99.

El MIP y el NIP son fáciles de filtrar y se lavan en un filtro de vidrio sinterizado.

Ejemplo 15

Síntesis de esporidesmina MIP y NIP (con 2-vinilpiridina)

Una solución de 1.5 g (5.86 mM) de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina, 1.260 mL (1.232 g, 11.72 mM) de 2-vinilpiridina, 2.845 mL (3.053 g, 23.46 mM) de 2-hidroxietil-metacrilato, 33.191 mL (34.833 g, 176 mM) de dimetacrilato de etilenglicol y 0.833 g (5.07 mM) de AIBN en 80 mL de tolueno se pone en un matraz de fondo redondo de cuatro cuellos de 500 mL, equipado con un embudo de goteo 100 mL con equilibrio de gas, un agitador mecánico, un condensador de reflujo con medidor de burbujas y un termómetro. Se pone un volumen de 120 mL de tolueno en el embudo de goteo, el agitador se inicia y el nitrógeno se pasa a través del tolueno (en el embudo de goteo) y sobre la superficie de la mezcla en el matraz y se libera a través del medidor de burbuja. Después de 30 min de agitación y soplado de nitrógeno el índice del flujo de gas se limita a burbujas únicas y la temperatura en el matraz se aumenta a 65° C al sumergir el matraz en un baño de agua de 70° C. Dentro de 15 min inicia la polimerización y la solución llega a ser más y más viscosa. Cuando es difícil mantener una agitación vigorosa, el tolueno del embudo de

goteo se agrega tan rápido como sea posible, para diluir la mezcla. Se mantienen agitación vigorosa y calentamiento durante 4 h. Durante este tiempo se forman esferas pequeñas del MIP. La mezcla se deja sin agitación o calentamiento durante la noche. Luego, se filtran esferas MIP y se lavan 13 veces con 150 mL de etanol cada una. Todos los filtrados de los MIP lavados se recolectan y se evaporan rotatorios hasta secado. El residuo color rojo se disuelve en 20 mL de tolueno y se aplica a la parte superior de una columna de cromatografía líquida (24 mM x 50 cm) llena con 200 mL de SiO_2 en tolueno. La banda roja se lava con PhMe:THF (5:1). La evaporación rotatoria produce 1.489 g (99.2% de recuperación) de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina cristalino. Las esferas del MIP se secan al aire durante la noche a temperatura ambiente y durante más de dos horas a 80° C en un horno de laboratorio. Se obtiene una cantidad de 37.936 g de esporidesmina MIP (2-vinilpiridina) en forma de esferas blancas de cubierta similar a huevo pequeña y se identifica como MIP #519-101.

Esporidesmina NIP (2-vinilpiridina). Se obtiene una cantidad de 39.2 g en forma de esferas blancas nieve, siguiendo el mismo procedimiento, sin embargo no se ha agregado plantilla de esporidesmina a la mezcla de reacción y solo se realizan tres lavados de etanol (150 mL cada uno). El polímero se identifica como MIP #555-102.

Ejemplo 16

Polimerización/síntesis a temperatura baja, iniciada por UV

de esporidesmina MIP.

La reacción fotoquímica de pozo de inmersión UV fotoquímica set. Quartz (vidrio ACE, Catálogo # 7856-10) equipado en una Lámpara UV de 450 Vatios (vidrio ACE, Catálogo# 7825-34) y Suministro de Energía de 450 Vatios en Estuche (vidrio ACE, Catálogo #7830-58) se une a un congelador de circulación WKL 230 LAUDA (suministrado por Brinkmann Instruments, Inc.), y agua fría de 4° C se hace correr a través de la manta de pozo al momento cuando se enciende la lámpara UV.

Proceso de polimerización. Una mezcla de monómeros: ácido metacrílico 1.2g (13.95 mM) y monometacrilato etilenglicol 3.631 g (13.95 mM), plantilla de esporidesmina 1.783 g (6.97 mM), iniciador (IABN) 0.991 g (6.03 mM) y un reticulador, se ponen dimetacrilato de etilenglicol 41.444 g (209.1 mM) en una botella de polietileno, translúcida (Nalgene®style 2105) y se pasa una corriente de Argón a través de la mezcla durante 15 min para retirar todo el oxígeno, que se sabe inhibe la polimerización del radical libre. La botella luego se cierra y se une al pozo de inmersión, al nivel del centro de lámpara UV, y se sumerge, junto con el conjunto de reacción fotoquímica, en un baño de agua helada. El agua fría se hace correr a través del manto de la lámpara, cuando la luz se enciende, y la irradiación de mezcla de la reacción se mantiene durante tres horas y media (se requieren vidrios de seguridad de UV al momento cuando se enciende la lámpara UV). Se suministra hielo adicional a, y se drena el exceso de agua del baño durante el curso de la

polimerización UV, para mantener la temperatura del baño frío a 4°C. Después de completar la polimerización la botella se abre, el polímero se tritura y se muele en piezas pequeñas que se lavan: tres veces con etanol, dos veces con 1:1 mezcla de agua-etanol, seis veces con 3:1 mezcla de agua-etanol y una vez más con etanol, para retirar la plantilla del polímero y asegurar la actividad máxima de MIP que se seca finalmente en un horno de laboratorio, para retirar los residuos de etanol que producen 41.1 g (89% de rendimiento) del producto.

Ejemplo 17

Capacidades de secuestro de MIPs hacia las micotoxinas - aplicadas a los análogos de esporidesmina

Los polímeros MIP y NIP producidos por polimerización de precipitación iniciada utilizando ácido metacrílico o monómeros 2-vinilpiridina en tolueno (Ver por ejemplo, Ejemplo 14 y Ejemplo 15) se prueban hacia la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina (Ver por ejemplo, Ejemplo 13) y gliotoxina, un análogo para la molécula de que contiene el sistema de anillo de piperazinediona puenteada con disulfuro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para la remoción de la plantilla y las micotoxinas de gliotoxina del medio líquido o semi-líquido por medio de interacciones químicas. Los MIP y NIP producidos se utilizan aquí para describir las diferencias en la afinidad de secuestro. Se conduce un experimento de secuestro al pesar 400 mg del material MIP/NIP en botellas ámbar Schott y la adición de 100 mL de una solución de trabajo del analito investigado para

obtener un índice de inclusión de 0.4 g/L de los secuestrantes en el medio. La preparación se hace junto con una muestra blanco que no contiene material MIP y un control positivo que contiene la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina o gliotoxia. Se realiza la prueba de secuestro en regulador de citrato 50 mM ajustado a pH 4.0. Todas las muestras se incuban durante 90 min en un agitador rotatorio orbital (Brunswick, Champaign, IL, USA) a 150 rpm mantenido a una temperatura de 37° C. Se prueba cinco concentraciones finales de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina o gliotoxina con el sistema - 500; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500 partes por billón (ppb) o 1,000; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000. Después de la incubación las preparaciones se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recolecta en frascos HPLC silanizados y ámbar, evitando cualquier interacción de la micotoxina o la plantilla con el frasco, y se calcula desde HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado a la señal de detector de disposición de foto diodo (por ejemplo, para detectar las cantidades de micotoxina y micotoxina secuestrada) de acuerdo con métodos estándar. Se realiza análisis HPLC para gliotoxina utilizando una mezcla de acetonitrilo/ácido acético/ácido trifluoro acético (34.9:65:0.1, v/v) como fase móvil. El método HPLC para la detección de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina se selecciona de acuerdo con los parámetros de elución estándar para análisis de esporidesmina que consiste de una mezcla de acetonitrilo/agua/metanol (45:45:10, v/v). La detección se realiza en disposición de fotodiodo de U.V. con barrido de longitud de onda completo (268.1 nm da la

señal óptima para gliotoxina; 258.8 nm da la señal óptima de la plantilla).

Los resultados muestran que el MIP #519-98 y #519-101 y NIP #519-99 y #519-10X son capaces de interactuar con más de 90.8% de la gliotoxina probada entre 500 a 2,500 ppb para un nivel de 0.4% de inclusión de los adsorbentes a pH 4.0 (Ver Tabla 8). La adsorción de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina también se investiga que da una afinidad de más de 94.9% para MIP #519-98 y #519-101 y NIP #519-99 y #519-10X para las concentraciones de plantilla entre 1,000 a 5,000 ppb de la molécula de plantilla presente en el medio a pH 4.0 para un nivel 0.4% de inclusión de los adsorbentes (Tabla 8). Así, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona que los MIP sintetizados en tolueno son favorables para la adsorción de los análogos esporidesmina (por ejemplo, gliotoxina y la plantilla de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina) con una ligera ventaja para el MIP #519-101 sintetizado utilizando los monómeros de 2-vynilpiridina cuando se agrega a un índice de inclusión de 4 g/L bajo pH 4.0 con afinidades para secuestro hasta 97.82 ± 4.25% del índice de afinidad y 95.85 ± 1.25% respectivamente para gliotoxina y la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina. La diferencia entre el MIP y el NIP es mínimo para cualquier formulación preparada.

Tabla 8. Afinidad de adsorción media expresada en porcentaje para 2 MIP y 2NIP hacia la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina y gliotoxina evaluado a pH 4.0 y 0.4% de nivel

de inclusión del adsorbente.

Muestra I.D.	**Adsorción media**	
	Gliotoxina (%)	**Plantilla (%)**
MIP 519-98	90.84 ± 1.47	94.94 ± 2.21
NIP 555-99	91.04 ± 1.51	95.35 ± 0.72
MIP 519-101	97.82 ± 4.25	95.85 ± 1.25
NIP 519-10X	97.14 ± 4:02	95.86 ± 1.02

Ejemplo 18

Titulación de la cantidad de MIP para la secuestro de los análogos de esporidesmina

Se conduce un experimento de titulación para investigar los índices de inclusión de MIP, de 0.1 g/L a 1.00 g/L (o 0.01 a 0.1% del índice de inclusión). La preparación se hace junto con una muestra blanco que no contiene material MIP y un control positivo que solo contiene la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina o la gliotoxina que se va a probar. La prueba de secuestro se realiza en regulador de citrato d50 mM ajustado a pH 4.0. Todas las muestras se incuban durante 90 min en un agitador rotatorio orbital (Brunswick, Champaign, IL, USA) a 150 rpm mantenido a una temperatura de 37° C. Se prueban cinco concentraciones finales de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina o gliotoxina con el sistema, 1,000; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000 ppb en un volumen final de 100 mL. Después de incubación los tubos de microcentrifuga se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recolecta en frascos HPLC silanizados y ámbar, previniendo cualquier interacción del analito con el frasco, y calculado de HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado a detectores de la señal de

disposición diodo de acuerdo con métodos estándar (Ver por ejemplo, Ejemplo 17).

Tabla 9. Afinidad de adsorción media expresada en porcentaje para 2 MIP y 3NIP hacia la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina evaluado a pH 4.0 y 4 niveles de inclusión del adsorbente.

Muestra I.D.	**% de inclusión**	**Adsorción (%)**					
		Concentración de plantilla (ppb)					
		1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	Media
MIP 519-98	0.010	48.90	57.93	48.17	37.86	38.63	46.30
	0.025	61.50	69.25	61.98	65.94	50.74	61.88
	0.050	80.37	87.95	73.97	76.41	69.28	77.59
	0.100	94.10	91.35	89.72	86.74	84.73	89.33
NIP 519-99	0.010	59.83	53.83	41.80	42.17	38.40	47.21
	0.025	76.70	67.50	61.71	58.60	57.51	64.40
	0.050	89.63	83.18	73.08	75.46	77.25	79.72
	0.100	91.50	90.97	87.99	88.86	87.23	89.31
MIP 519-101	0.010	48.60	37.95	39.12	38.29	34.72	39.74
	0.025	72.73	62.12	60.53	51.69	54.58	60.33
	0.050	76.93	73.40	73.94	70.98	70.17	73.09
	0.100	90.83	87.50	87.66	89.16	84.41	87.91
NIP 519-10X	0.010	41.33	42.88	36.18	25.54	26.58	34.70
	0.025	58.67	57.45	53.56	47.35	46.85	52.77
	0.050	75.20	68.38	68.26	65.43	63.66	68.19
	0.100	83.57	84.02	82.04	78.64	75.09	80.67
NIP 519-47X	0.010	16.57	7.48	10.59	17.05	10.39	12.42
	0.025	13.20	10.25	7.61	13.26	18.61	12.59
	0.050	4.17	12.40	11.92	12.12	13.76	10.87
	0.100	10.13	10.52	11.59	17.88	24.72	14.97

Como se muestra en la Figura 14, Tabla 9 y Tabla 10, en algunas realizaciones, por ejemplo, a 0.05 g/L del nivel de inclusión del adsorbente, la presente invención muestra una eficacia óptima por encima de 70% del valor de secuestro y alcanza casi 90% de secuestro a 0.10 g/L. Así, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona que son más favorables los MIP/NIP sintetizados con ácido metacrílico sobre el MIP/NIP sintetizado utilizando 2-vinilpiridina para la adsorción de un análogo esporidesmina (por ejemplo, gliotoxina y plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina (por ejemplo, cuando se agrega a un índice de inclusión entre 0.01 y 0.1 g/L bajo pH 4.0)). Las diferencias entre el MIP y el NIP son sin embargo mínimas para cualquier formulación preparada excepto para el NIP sintetizado a baja temperatura y polimerización iniciada por UV con valores de adsorción que aumentan con el nivel de inclusión del adsorbente de 10 a 15%.

Tabla 10. Características de adsorción isotérmica in vitro de NIP y MIP en cuatro índices de inclusión diferentes para la Plantilla de esporidesmina en medio de regulador de citrato de pH4.

Inclusión (%)	**NIP #519-99**	**MIP #519-98**	**NIP #519-10X**	**MIP #519-101**	**NIP #519-47X**
0.010	47.207 ± 9.159	46.302 ± 8.297	34.703 ± 7.837	39.737 ± 5.229	12.416 ± 4.197
0.025	64.404 ± 7.894	61.882 ± 6.983	52.774 ± 5.517	60.331 ± 8.136	12.585 ± 4.101
0.050	79.720 ±	77.594 ±	68.186 ±	73.087 ±	10.873 ±

	6.683	7.047	4.396	2.671	3.817
0.100	89.309 ± 1.858	89.329 ± 3.702	80.671 ± 3.767	87.912 ± 2.375	14.967 ± 6.288

Ejemplo 19

Afinidad de diferentes MIP y NIP y caracterización de especificidad hacia análogos esporidesmina

Se realizan experimentos durante el desarrollo de las realizaciones de la invención con el fin de evaluar la afinidad de diferentes NIP/MIP sintetizado en tolueno como disolvente utilizado para polimerización de precipitación iniciada por calor. Los MIP producidos se utilizan aquí para describir las diferencias en la afinidad de la secuestro de los análogos esporidesmina (por ejemplo, gliotoxina y plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina) y evaluar la especificidad del material. Se pone una cantidad de 30 mg de MIP en una columna SEP-PAK fijada con fritas de extracción de fase sólida de polietileno silanizado. Se utilizan frascos de vidrio silanizados para asegurar la estabilidad del analito en disolventes acuosos y para evitar a cualquier interacción específica entre el analito y los frascos de vidrio. El método de silanización se aplica a filtros de nylon y PTFE/PE y tubos con base en métodos utilizados de manera general en la técnica. La preparación se hace junto con una muestra blanco que no contiene material MIP y un control positivo que contiene la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina o gliotoxina. Se generan dispositivos de filtración como Extracción de Fase Sólida (como SPE) para un equivalente de 0.1 g/L de inclusión del MIP al filtrar a través de 30 mg de

material 1 mL de una solución de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina o gliotoxina. Se preparan frascos y filtros al llenarlos o sumergirlos con el reactivo silanizante (SURFASIL, Ver por ejemplo, Ejemplo 9). Se cargan dispositivos de filtro similares a SPE con 1 mL de solución de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina o gliotoxina utilizada en una única concentración de 2,000 ppb. Junto con las muestras, se mantiene una solución de trabajo de control. Las muestras y los controles se incuban a 37° C durante 2 min con agitación intermitente. Después del periodo de incubación, las muestras se empujan a través de la jeringa y se recolectan en tubos de centrífuga de 15 mL y centrifugación a 10,0000 g durante 10 min. Se recolectan sobrenadantes en frascos de HPLC silanizados y ámbar y se analizan. Para evaluar la especificidad de la desorción para la molécula objetivo, se realizan seis etapas de lavado en el material que contiene los polímeros MIP. Se recolectan cada uno de los lavados en tubos de centrífuga de 15 mL y centrifugación a 10,0000 g durante 10 min antes de análisis por medio de HPLC. Se realizan seis lavados con concentración aumentada del disolvente orgánico, que incluyen un primer lavado con lavado de regulador de citrato 50 mM y cinco lavados consecutivos con 20, 40, 60, 80, 100% de metanol en agua (v/v), respectivamente. El experimento utiliza MIP #519-98 y #519-101 y NIP #519-99 y #519-10X polimerizado precipitado previamente iniciado por calor (formas de polvo) junto con formas cristalinas de MIP y NIP identificado como #519-47 y #519-47X que se generan bajo temperatura baja y polimerización de UV (Ver por ejemplo, Ejemplo 5). Se

recolecta el sobrenadante en frascos HPLC silanizados y ámbar, que evitan cualquier interacción de la micotoxina o plantilla con el frasco, y calculado desde HPLC (Alliance, Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado con la señal de detector de disposición de foto diodo (por ejemplo, para detectar cantidades de micotoxina y micotoxina secuestrada) de acuerdo con métodos estándar. El análisis HPLC para gliotoxina se realiza utilizando una mezcla de acetonitrilo/ácido acético/ácido trifluoroacético (34.9:65:0.1, v/v) como fase móvil. El método HPLC para la detección de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina se selecciona de acuerdo con los parámetros de elución estándar para análisis de esporidesmina que consiste de una mezcla de acetonitrilo/agua/metanol (45:45:10, v/v). se realiza detección en la disposición de fotodiodo U.V. con barrido de longitud de onda completo (268.1 nm da la señal óptima para gliotoxina; 258.8 nm da la señal óptima para la plantilla).

Los resultados indicados (ver Figura 15 y Tabla 11) que los MIP #519-101 y #519-98 tienen menores valores de desorción cuando se lavan con 40% de metanol comparado con su NIP #519-10X y #519-99 respectivo para la adsorción de gliotoxina. Los lavados que contienen más de 60% de metanol sin embargo son capaces de retirar casi la cantidad completa de la gliotoxina secuestrada. En alguna realización, el MIP #519-101 sintetizado utilizando monómeros de 2-vinilpiridina tienen mayor especificidad que el NIP #519-10X y el NIP #519-99, MIP #519-98, NIP #519-47X y MIP 519-47 correspondientes

cuando se aplica un lavado utilizando 20% de metanol al sistema. Los polímeros 519-47X y 519-47 no son capaces de adsorber más de 25% de la gliotoxina. La aplicación de un lavado regulador es capaz de retirar cualquier gliotoxina adsorbida.

Los resultados indican (Ver Figura 16 y Tabla 11) que los MIP #519-101 tienen valores desorción menores cuando se lavan con 20 y 40% de metanol comparado con su NIP #519-10X respectivo. La especificidad de MIP #519-98 y NIP #519-99 sin embargo son comparables sin diferencia en la especificidad para la adsorción de plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina. Los lavados que contienen más de 60% de metanol sin embargo son capaces de retirar casi la cantidad completa de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina secuestrada. En alguna realización y como se encuentra con gliotoxina, el MIP #519-101 sintetizado utilizando monómeros de 2-vinilpiridina tienen especificidad mayor que el NIP #519-10X y el NIP #519-99, MIP #519-98, NIP #519-47X y MIP 519-47 correspondiente cuando se aplica un lavado utilizando 20 y 40% de metanol al sistema. Los polímeros 519-47X y 519-47 exhiben diferencia en la especificidad de secuestro en favor del compuesto MIP. Sin embargo, a pesar de la adsorción de la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina es inferior a 50 %, se presenta una afinidad mejor que aquella encontrada con la gliotoxina que muestra una mejor especificidad del MIP para la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina.

Tabla 11. Propiedades de adsorción de 3 MIP, 3NIP, hacia la plantilla 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina y gliotoxina a pH 4.0 en una configuración SPE al nivel 0.1% de inclusión del adsorbente y la supervivencia de los lavados de metanol titulados con una mezcla de regulador de citrato (solución A) y metanol (solución B).

Adsorbente	Porcentaje medio de adsorción						
Condiciones	Inicial	A: 100% B: 0%	A: 80% B: 20%	A: 60% B: 40%	A: 40% B: 60%	A: 20% B: 80%	A:
	Gliotoxina (% de adsorción)						
NIP 519-10X	99.3 ± 0.6	99.3 ± 0.0	67.7 ±1.9	47.7 ± 1.4	-0.3 ± 2.0	0.8 ± 1.6	-0. 1.2
MIP 519-101	99.9 ± 0.3	99.9 ± 0.0	99.9 ± 0.0	55.5 ± 0.1	8.3 ± 2.0	-4.6 ± 3.1	-5. 8.7
NIP 519-99	99.0 ± 0.4	98.2 ± 0.4	80.5 ± 1.0	50.7 ± 2.8	4.0 ± 2.5	-8.4 ± 6.1	-7. 9.6
MIP 519-98	99.1 ± 0.4	99.0 ± 0.3	78.5 ± 0.4	44.9 ± 2.2	15.4 ± 1.2	-9.6 ± 14.8	-6. 7.7
NIP 555-47X	22.7 ± 1.2	-1.7 ± 1.5	-10.6 ± 0.4	-13.6 ± 6.5	-28.4 ± 2.7	-24.1 ± 11.4	-33 5.7
MIP 519-47	25.1 ± 2.6	-2.4 ± 10.5	-18.5 ± 13.2	-20.7 ± 3.05	-28.2 ± 2.4	-28.2 ± 11.1	-36 8.2
	Plantilla de 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina (% de adso						
NIP 519-10X	98.5 ± 0.8	98.0 ± 1.0	86.5 ± 0.2	59.5 ± 1.1	-1.8 ± 1.0	-39.4 ± 0.7	-19 1.8
MIP 519-101	99.9 ± 0.1	99.4 ± 0.6	94.8 ± 0.1	72.4 ± 0.1	-0.2 ± 1.3	-2.2 ± 1.5	-15 1.5
NIP 555-99	99.0 ± 0.6	97.5 ± 0.1	90.5 ± 0.2	65.2 ± 0.8	13.1 ± 1.4	-1.85 ± 1.0	-9. 1.4
MIP 519-98	98.8 ± 0.2	97.2 ± 0.3	89.2 ± 0.7	55.1 ± 0.6	9.35 ± 1.3	-7.9 ± 0.4	-8. 3.3
NIP 555-47X	44.8 ± 5.6	33.0 ± 0.8	9.7 ± 3.9	6.2 ± 0.9	-29.7 ± 0.1	-17.5 ± 1.4	-19 3.2

MIP 519-47	48.7 ± 7.0	44.7	± 0.6	28.2	± 0.6	-17.1	± 0.8	-20.1	± 2.1	-21.3	± 13.6	-24 ± 3.4

Ejemplo 20

Capacidad de secuestro MIP hacia las micotoxinas - aplicadas a esporidesmina

El polímero MIP producido utilizando monómeros 2-vinilpiridina en tolueno (Ver por ejemplo, Ejemplo 15) se prueba hacia esporidesmina (AgInvestigación Limited, Ruakura Investigación Centre, Hamilton, Nueva Zelanda) para la remoción de la esporidesmina (A 93%; B, D, E 2 a 17%) las micotoxinas del medio líquido o semilíquido por medio de interacción químicas. El MIP producido se utiliza para caracterizar la afinidad de secuestro y para evaluar la especificidad del material. Se conduce un experimento de secuestro al pesar 50 y 400 mg del material MIP en botellas Schott y la adición de 100 mL de una solución de trabajo de mezcla de esporidesmina que da 0.5 y 4.0 g/L del índice de inclusión del adsorbente en el medio. La preparación se hace junto con una muestra blanco que no contiene material MIP y un control positivo que contiene solo esporidesminas. La prueba de secuestro se realiza en regulador de succinato 50 mM ajustado a pH 6.0 para cumplir las condiciones fisiológicas del compartimiento gástrico ruminal. Todas las muestras se incuban durante 90 min en un agitador rotatorio orbital a 150 rpm mantenido a una temperatura de 37° C. Se prueba tres concentraciones finales de esporidesminas con el sistema, 500; 1,000; 2,000 ppb. Después de incubación las preparaciones se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 min. El

sobrenadante se recolecta en frascos HPLC, y se calcula desde HPLC acoplado con la señal de detector UV (por ejemplo, para detectar las cantidades de micotoxina y micotoxina secuestrada) de acuerdo con métodos estándar. El método HPLC para la detección de las esporidesminas se utiliza como una mezcla de acetonitrilo/agua/metanol (45:45:10, v/v) para realizar la elución de los analitos y una columna C18 (4.6 mM × 25 cm). Se realiza detección en el detector UV (280 nm da la señal óptima para las esporidesminas).

El producto MIP #519-98 adsorbido 80.5 a 85.7% para un índice de inclusión de 0.5 g/L y más de 98.5% cuando se utiliza a un índice de inclusión de 4 g/L de esporidesmina presente a 500; 1,000 y 2,000 ppb (Ver por ejemplo, Tabla 12). La variación entre las repeticiones produce menos de 1% de la adsorción. Se puede observar un efecto de saturación ligero a 0.5 g/L del índice de inclusión con una reducción del valor de adsorción obtenido a través del rango de esporidesmina investigado.

Tabla 12. Eficacia de adsorción MIP #519-98 a 0.5 y 4.0 g/L del índice de inclusión hacia 3 concentraciones de esporidesmina.

Índice de inclusión (%)	**Porcentaje Medio de Adsorción (%) para concentraciones de esporidesmina de:**		
	500 ppb	1,000 ppb	2,000 ppb
0.05	85.65 ± 0.87	84.03 ± 0.70	80.51 ± 1.37
0.40	99.13 ± 0.00	98.85 ± 0.00	98.54 ± 0.09

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la

especificación anterior se incorporan aquí como referencia. Serán evidentes diversas modificaciones y variaciones de las composiciones y métodos descritos de la invención por aquellos expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en conexión con las realizaciones preferidas específicas, cabe entender que la invención cuando se reivindica no se debe limitar excesivamente a tales realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios por aquellos expertos en los campos relevantes están destinados a estar dentro del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

Lo Que Se Reivindica Es:

1. Una composición que comprende un polímero de impresión molecular sintetizado utilizando una plantilla de micotoxina.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha plantilla de micotoxina es una plantilla de ocratoxina.

3. La composición de la reivindicación 2, en donde la plantilla de ocratoxina es N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina.

4. La composición de la reivindicación 1, en donde la plantilla de micotoxina es una plantilla de esporidesmina.

5. La composición de la reivindicación 4, en donde la plantilla de esporidesmina es 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina.

6. La composición de la reivindicación 4, en donde la plantilla de esporidesmina se selecciona del grupo que consiste de etil 3-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-indolona-3-carboxilato, 6,7-dimetoxiisatina, y 6,7-dimetoxi-1-metilisatina.

7. Un método para elaborar un polímero de impresión

molecular que comprende:

a) proporcionar:

i. una plantilla de micotoxina; y

ii. uno o más monómeros y uno o más reticuladores; y

b) poner en contacto dicha plantilla de micotoxina con dicho uno o más monómeros y dicho uno o más reticuladores bajo condiciones que permiten la polimerización de dicho uno o más monómeros y dicho uno o más reticuladores en la presencia de dicha plantilla de micotoxina.

8. El método de la reivindicación 7, en donde dicha plantilla de micotoxina es N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina.

9. El método de la reivindicación 7, en donde dicha plantilla de micotoxina es 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina.

10. El método de la reivindicación 7, en donde dicho uno o más monómeros se seleccionan del grupo que consiste de 2-vinilpiridina, 2-hidroxietilmetacrilato y ácido metacrílico.

11. El método de la reivindicación 7, en donde dicho uno o más reticuladores comprenden dimetacrilato de etilenglicol.

12. El método de la reivindicación 7, en donde dicha polimerización se inicia al formar radicales libres en un disolvente orgánico a una temperatura entre 55 y 110 grados Celsius.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dichos radicales libres se forman mediante la descomposición iniciada térmicamente de azoisobutironitrilo (AIBN).

14. El método de la reivindicación 12, en donde dicho disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste de tolueno, ciclohexano, acetonitrilo, una solución de alcohol polivinílico (PVA)/agua, y una mezcla de dos o más de tolueno, ciclohexano, acetonitrilo, y una solución de PVA/agua.

15. El método de la reivindicación 12, en donde dicha temperatura está entre 55 y 75 grados Celsius.

16. El método de la reivindicación 7 en donde dicha plantilla de micotoxina se retira de dicho polímero de impresión molecular después de la polimerización de dicho uno o más monómeros y dicho uno o más reticuladores.

17. El método de la reivindicación 16, en donde uno o más lavados con una solución seleccionada del grupo que consiste de un disolvente orgánico, un regulador, agua y una combinación de los mismos se utiliza para retirar

dicha plantilla de micotoxina de dicho polímero de impresión molecular.

18. El método de la reivindicación 17, en donde dicho disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste de alcohol etílico, alcohol metílico, acetonitrilo, tolueno, y una mezcla de los mismos.

19. El método de la reivindicación 17 en donde dicho regulador es un regulador preparado al hacer reaccionar hidróxido de sodio, ácido cítrico, ácido succínico y ácido acético.

20. El método de la reivindicación 17, en donde dicha agua es agua desionizada.

21. El método de la reivindicación 17, en donde dicho polímero de impresión molecular se seca después de dicho uno o más lavados.

22. El método de la reivindicación 21 en donde la exposición de dicho polímero de impresión molecular a una temperatura entre 20 y 90 grados Celsius se utiliza para secar dicho polímero de impresión molecular.

23. El método de la reivindicación 22, en donde dicha temperatura está entre 60 y 80 grados Celsius.

24. El método de la reivindicación 23, en donde dicha

temperatura está entre 75 y 80 grados Celsius.

25. Un método para secuestrar una micotoxina de un material, que comprende:

a) proporcionar:

i) un material que comprende micotoxinas; y

ii) un polímero de impresión molecular generado por medio de la polimerización de uno o más monómeros y uno o más reticuladores en la presencia de una plantilla de micotoxina; y

b) poner en contacto dicho polímero de impresión molecular con dicho material que comprende micotoxinas bajo condiciones que permiten dicho polímero de impresión molecular unirse a dicha micotoxina.

26. El método de la reivindicación 25, en donde dichos secuestrantes del método ocratoxina A provienen de dicho material.

27. El método de la reivindicación 25, en donde dichos secuestrantes del método esporidesmina provienen de dicho material.

28. El método de la reivindicación 25, en donde dicho material que comprende micotoxinas se selecciona del grupo que consiste de una bebida, un alimento, un alimento para animales, una composición farmacéutica, una composición nutracéutica, una composición cosmética,

y una sustancia necesaria para mantener la vida.

29. El método de la reivindicación 28, en donde dicha sustancia necesaria para mantener la vida se selecciona del grupo que consiste de un medio para uso en acuacultura y una muestra gaseosa que comprende oxígeno.

30. El método de la reivindicación 25, en donde un polímero de impresión molecular unido a una micotoxina no se separa de dicho material que comprende micotoxinas.

31. El método de la reivindicación 25, que comprende adicionalmente c) separar los polímeros de impresión molecular unidos a la micotoxina de dicho material que comprende micotoxinas.

32. El método de la reivindicación 31, en donde dicha separación comprende extraer, concentrar y aislar dicho polímero de impresión molecular unido a micotoxina de dicho material que comprende micotoxinas.

33. El método de la reivindicación 32, en donde dicha separación ocurre en una columna o cartucho cromatográfica o separativa.

34. El método de la reivindicación 32, en donde después de separar, la micotoxina unida a dichos polímeros de impresión molecular se retiran de dicho polímeros de impresión molecular mediante lavado.

35. El método de la reivindicación 34, en donde las micotoxinas se analizan cuantitativamente y cualitativamente después de la remoción de dichos polímeros de impresión molecular.

36. El método de la reivindicación 35, en donde el análisis cuantitativo y cualitativo se utiliza para trazabilidad.

37. El método de la reivindicación 34, en donde dicho polímero de impresión molecular del que se han retirado las micotoxinas se vuelve a utilizar para secuestrar una micotoxina de un material que comprende micotoxinas.

38. El método de la reivindicación 25, en donde dicho polímero de impresión molecular adsorbe 1 a 10 veces más agua que su peso.

39. El método de la reivindicación 38, en donde dicho polímero de impresión molecular adsorbe 1 a 5 veces más agua que su peso.

40. El método de la reivindicación 38, en donde dicho polímero de impresión molecular adsorbe 1 a 2 veces más agua que su peso.

41. El método de la reivindicación 25, en donde dos o más polímeros de impresión molecular diferentes se ponen en contacto con dicho material que comprende micotoxinas

con el fin de secuestrar dos o más micotoxinas específicas de dicho material.

42. Un método para sintetizar N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina, que comprende:

a) convertir ácido 3-5 diclorosalicílico en ácido 2-acetoxiacetoxi-3,5-diclorobenzoico;

b) convertir ácido 2-acetoxiacetoxi-3,5-diclorobenzoico en cloruro de ácido 2-acetoxiacetoxi-3,5-diclorobenzoico;

c) hacer reaccionar cloruro de ácido 2-acetoxiacetoxi-3,5-diclorobenzoico con etil éster de L-fenilalanina para formar N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina; y

d) convertir N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina en N-(2-hidroxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina.

43. El método de la reivindicación 42, en donde dicha conversión comprende la hidrolización de las funciones de éster de N-(2-acetoxi-3,5-diclorobenzoil)-L-fenilalanina.

44. Un método para sintetizar 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina, que comprende:

a) convertir ácido 2,3-dimetoxibenzoico en 2,3-dimetoxi-N-tercbutoxicarbonilanilina;

b) convertir 2,3-dimetoxi-N-tercbutoxicarbonilanilina en 2,3-dimetoxianilina;

c) hacer reaccionar 2,3-dimetoxianilina con dietilcetomalonato para formar etil 6,7-dimetoxi-3-hidroxi-3-(2-indolona)-carboxilato;

d) convertir etil 6,7-dimetoxi-3-hidroxi-3-(2-indolona)-carboxilato en 6,7-dimetoxiisatina;

e) convertir 6,7-dimetoxiisatina en 6,7-dimetoxi-1-metilisatina; y

f) convertir 6,7-dimetoxi-1-metilisatina en 5-cloro-6,7-dimetoxi-1-metilisatina.

RESUMEN

La presente invención se relaciona de manera general con los polímeros de impresión molecular (MIP). En particular, la presente invención se relaciona con MIP ecológicamente amigables, reutilizables que se pueden producir en cantidades relativamente grandes, métodos para producirlos, y métodos para utilizarlos (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber los compuestos objetivos (por ejemplo, micotoxinas). Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones que incluyen aplicaciones terapéuticas dietarias, profilácticas, procesamiento y fabricación de alimentos y bebidas, así como también investigación, control de calidad y trazabilidad.

PODERES

The State of Wisconsin

Office of the
Secretary of State

CERTIFIED

272

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

5. at Madison, Wisconsin
6. August 15, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210603
9. Seal/stamp:

10. Signature

Douglas La Follette

DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are correct, or that the Secretary of State approves of the contents.

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO(38)(E) CERTIFICA
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
(38)
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.

NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)

STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Power of Attorney from ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA. Executed by Nathan Hunter Hohman, appointing Baker & McKenzie as agent, dated July 20, 2011, the original of which I have examined.

Dated at Madison, Wisconsin, this 11th day of August 2011.

Vickie Hoeft

Notary Public State of Wisconsin
My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)

VICKIE HOEFT NOTARY PUBLIC STATE OF WISCONSIN

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO (38)(E) CERTIFICA
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

BAKER & McKENZIE

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 900.034.906-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakermckenzie.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

ALLTECH, INC.

located at

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, United States of America

declares that it hereby grants to

ÁLVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or RICARDO METKE MENDEZ and/or JUAN PABLO CONCHA-DELGADO and/or OLGA GEORGETTE OTERO

of the firm Baker & McKenzie Colombia S.A members of Baker & McKenzie, domiciled at Av. 82 No. 10-62, 6th floor, of Bogotá D.C., Colombia, full and sufficient power of attorney to pursue before the competent authorities the following matters:

Trademark registrations and renewals; deposit and registration of commercial names and commercial ensigns; registration and renewal of domain names; Prosecution and obtainment of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits layout-designs and vegetal varieties; recordals of mergers, changes of name, assignments, changes of domicile and address; security interests; liens and other acts that affect or limit the mentioned industrial property rights; filing and prosecution of oppositions; recordal of license of use agreements; filing and prosecution of cancellation actions, annulment actions, annulment and reinstatement of right action, and all judicial actions available for the prosecution of proceedings related to intellectual property matters, unfair competition, and protection of consumers.

to which end it empowers them to file requests, petitions and lawsuits, appeals and objections, pay taxes, receive, including faculties to enter into settlement agreements, conciliations and transactions, abandon applications and renounce rights and, in general, to take all the actions before the competent authorities in order to duly protect our intellectual property. To the said mandatories sufficient power is granted hereby to receive notifications for and on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the Company judicially and extrajudicially to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the marks and other intellectual property rights, and to do everything that may be required before administrative or judicial officers of any class to comply this power giving them likewise faculty to substitute these presente and revoke such substitutions if necessary.

1 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.

Done and subscribed in Nicholasville, Kentucky USA

On the 20 day of July of 2011

Nathan Hunter Hohman
Secretary and Treasurer, Alltech, Inc.
Signature of the person Issuing the Power

PODER

La abajo firmada,

ALLTECH, INC.

domiciliada en

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

ÁLVARO CORREA-ORDÓÑEZ y/o RICARDO METKE MÉNDEZ y/o JUAN PABLO CONCHA-DELGADO y/o OLGA GEORGETTE OTERO

de la firma Baker & McKenzie Colombia S.A., miembros de Baker & McKenzie, domiciliada en la Av. 82 No. 10-62 Piso 6 en Bogotá D.C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para adelantar ante las autoridades competentes los siguientes asuntos:

Registro y renovación de marcas; depósito y registro de nombres comerciales y enseñas comerciales; registro y renovación de nombres de dominio; trámite y obtención de solicitudes de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; inscripción de fusiones, cambios de nombre, traspasos, cambios de domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda, embargos y otros actos que afecten o limiten los mencionados derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de oposiciones; inscripción de licencias de uso; presentación y tramitación de acciones de cancelación; acciones de nulidad, acciones de nulidad y restablecimiento del derecho y demás acciones judiciales, relacionadas con procesos de propiedad industrial, competencia desleal y protección al consumidor.

a cuyo efecto los faculta para presentar solicitudes, peticiones y demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas, recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, abandonar solicitudes y renunciar a derechos, y en general, a dar ante las autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida protección de nuestra propiedad industrial. Asimismo se concede a los expresados mandatarios poder suficiente para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de marcas y otros derechos de propiedad industrial se presentaren y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden para el cumplimiento de este mandato, dándoles igualmente facultad para sustituir el presente poder y en caso necesario, revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado en

A los días del mes de de 20

Firma de la persona que firma el Poder

CERTIFIED

The State of Wisconsin

Office of the Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

5. at Madison, Wisconsin
6. August 22, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210863
9. Seal/stamp:

10. Signature

Doug La Follette

DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are correct, or that the Secretary of State approves of the contents.

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO(38)(E) CERTIFICA
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

SEAL OF THE STATE OF WISCONSIN

NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)

STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Certificate of Existence for ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA, the original of which I have examined.

Dated at Madison, Wisconsin, this 18th day of August 2011.

Vickie Hoeft

Notary Public State of Wisconsin
My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)

VICKIE HOEFT
NOTARY
PUBLIC
STATE OF WISCONSIN

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO(38)(E) CERTIFICA
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

Commonwealth of Kentucky
Elaine N. Walker, Secretary of State

8/4/2011

Division of Corporations
Business Filings
P. O. Box 718
Frankfort, KY 40602
(502) 564-3490
http://www.sos.ky.gov

Certificate of Existence

Authentication Number: 116510
Visit https://app.sos.ky.gov/ftshow/certvalidate.aspx to authenticate this certificate.

I, Elaine N. Walker, Secretary of State of the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that according to the records in the Office of the Secretary of State,

ALLTECH, INC.

is a corporation duly incorporated and existing under KRS Chapter 271B, whose date of incorporation is August 7, 1980 and whose period of duration is perpetual.

I further certify that all fees and penalties owed to the Secretary of State have been paid; that articles of dissolution have not been filed; and that the most recent annual report required by KRS 271B.16-220 has been delivered to the Secretary of State.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my Official Seal at Frankfort, Kentucky, this 4th day of August, 2011.

COMMONWEALTH OF KENTUCKY
OFFICE OF SECRETARY OF STATE

Elaine N. Walker

Elaine N. Walker
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky
116510/0148768

AUTENTICACIÓN DE COPIA
ESCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO(38)(E) CERTIFICA
LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.

6

CERTIFIED

The State of Wisconsin

Office of the
Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

5. at Madison, Wisconsin
6. August 22, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210864
9. Seal/stamp:

10. Signature

Douglas La Follette

DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are correct, or that the Secretary of State approves of the contents.

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO(38)(E) CERTIFICA
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)

STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Certificate of Incorporation and Annual Report from ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA, the originals of which I have examined.

Dated at Madison, Wisconsin, this 18th day of August 2011.

Vickie Hoeft

Notary Public State of Wisconsin
My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)

VICKIE HOEFT NOTARY PUBLIC STATE OF WISCONSIN

...ACION DE COPIA DE ORIGINAL
...TERIOR TREINTA Y OCHO(38)[E] CERTIFICA
...COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
...ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
(38)
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

8

COMMONWEALTH OF KENTUCKY

Elaine N. Walker
Secretary of State

Certificate

I, Elaine N. Walker, Secretary of State for the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that the foregoing writing has been carefully compared by me with the original thereof, now in my official custody as Secretary of State and remaining on file in my office, and found to be a true and correct copy of

CERTIFICATE OF INCORPORATION OF

ALLTECH, INC. FILED AUGUST 7, 1980;

2011 ANNUAL REPORT FILED MARCH 1, 2011.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my Official Seal at Frankfort, Kentucky, this 4th day of August, 2011.

COMMONWEALTH OF KENTUCKY
OFFICE OF SECRETARY OF STATE

Elaine N. Walker

Elaine N. Walker
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky
dwilliams/0148768 - Certificate ID: 116511

COPIA DE ORIGINAL
21 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notaría 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

148768

281

Commonwealth of Kentucky

OFFICE OF
SECRETARY OF STATE

FRANCES JONES MILLS
Secretary

FRANKFORT,
KENTUCKY

CERTIFICATE OF INCORPORATION

I, FRANCES JONES MILLS, Secretary of State of the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that Articles of Incorporation of

ALLTECH, INC.

whose initial agent for process is THOMAS PEARSE LYONS

LANE ALLEN PLAZA, 845 LANE ALLEN ROAD

and whose address is LEXINGTON, KENTUCKY

duly signed according to law, have been filed in my office. I further certify that all taxes, fees and charges payable upon the filing of said Articles of Incorporation have been paid.

COMMONWEALTH OF KENTUCKY
DEPARTMENT OF CORPORATIONS

Given under my hand and seal of Office as Secretary of State, at Frankfort, Kentucky, this 7TH *day of* AUGUST, 1980.

Frances Jones Mills
SECRETARY OF STATE

SECRETARY OF STATE

ASSISTANT SECRETARY OF STATE

CERTIFICACION DE COPIA DE ORIGINAL
EL NOTARIO FRENTE FOLIO 38(E) CERTIFICA
LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
21 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notaria 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

ORIGINAL COPY FILED
SECRETARY OF STATE OF KENTUCKY
FRANKFORT, KENTUCKY

AUG 07 1980

SECRETARY OF STATE

SECRETARY OF STATE

SECRETARY OF STATE
RECEIVED
AUG 7 1980
COMMONWEALTH OF KENTUCKY

ARTICLES OF INCORPORATION
OF
ALLTECH, INC.

The undersigned, Thomas Pearse Lyons, of Lexington, Kentucky, hereby forms a corporation under the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE I.

The name of the corporation shall be Alltech, Inc. 179945

ARTICLE II.

The corporation shall continue perpetually, unless sooner dissolved according to the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE III.

The purpose of the corporation is to produce biochemicals for the food industry and to act as consultants therewith. In addition to the foregoing, the purposes of the corporation shall include the transaction of any and all lawful business for which corporations may be incorporated under the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE IV.

The total authorized number of shares of stock of this corporation is two thousand (2,000), the shares to be without par value, and the holder of each share of stock shall be entitled to one (1) vote for each share held.

ARTICLE V.

The initial registered office of the corporation is: Lane Allen Plaza, 845 Lane Allen Road, Lexington, Kentucky 40504. The initial registered agent of the corporation at the above address is: Thomas Pearse Lyons.

ARTICLE VI.

The initial Board of Directors shall consist of one (1) person who shall be: Thomas Pearse Lyons, 3529 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40502. The director shall continue to serve until his successor has been elected and qualified. The subsequent organization of the Board of Directors, including the number of directors, shall be governed by the

21 MAR 2012
(38)
BOLFERY BERMUDEZ
Notaria 38 del Circulo de Bogota D.C.

ARTICLE VII.

The incorporator of this corporation is: Thomas Pearse Lyons, 3529 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503.

ARTICLE VIII.

This corporation shall have all of the powers granted to corporations under the laws of the Commonwealth of Kentucky.

IN WITNESS WHEREOF, witness the hand of the incorporator hereof, this, the 6th day of August, 1980.

THOMAS PEARSE LYONS

STATE OF KENTUCKY)
) Sct.
COUNTY OF FAYETTE)

Subscribed and sworn to before me by Thomas Pearse Lyons this 6th day of August, 1980.

My Commission expires: 8/22/83

NOTARY PUBLIC, STATE AT LARGE
KENTUCKY

PREPARED BY:

GERALDS, CASSIDY & MOLONEY
605 Court Square Building
Lexington, KY 40507

By
OSCAR H. GERALDS, JR.

REPRODUCCION DE COPIA DE ORIGINAL
DE SECRETO NOTARIAL FIRMA Y SCRIBIR, CERTIFICA
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
38
REGOLEGREY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

PARP
0148768
Elaine N. Walker
Secretary of State
Received and Filed
3/1/2011 4:08:15 PM
Fee receipt: $15.00

Commonwealth of Kentucky
Elaine N. Walker, Secretary of State

Elaine N. Walker
Secretary of State
P. O. Box 1150
Frankfort, KY 40602-1150
(502) 564-3490
http://www.sos.ky.gov

Annual Report
Online Filing

ARP

Company: ALLTECH, INC.
Company ID: 0148768
State of origin: Kentucky
Formation date: 8/7/1980 12:00:00 AM
Date filed: 3/1/2011 4:08:15 PM
Fee: $15.00

Principal Office

3031 CATNIP HILL
NICHOLASVILLE, KY 40356

Registered Agent Name/Address

NATIONAL REGISTERED AGENTS, INC
400 WEST MARKET STREET SUITE 1800
LOUISVILLE, KY 40202

Current Officers

President	Thomas Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Secretary	Nathan H Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Treasurer	Nathan H Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Vice President	Mark Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356

Directors

Director	Thomas Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Director	Nathan H Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356

Signatures

Signature Nathan Hohman
Title Secretary/Treasurer

COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO 38(E) CERTIFICA QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

Traducción oficial del inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

Estado de Wisconsin

Oficina del Secretario de estado

Sello redondo. certificado

APOSTILLA

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft
3. Quien ejerce funciones de notario público estado de Wisconsin
4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin

CERTIFICADO

5. En Madison , Wisconsin 6. El 15 de agosto de 2011.
7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin
8 No. 210603 9. Sello del estado de Wisconsin
10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. –

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

Estado de Wisconsin
Condado de Dane) ss

Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Poder de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike NicholaSville KY 40356, Estados Unidos, suscrito por Nathan Hunter Hohman, nombrando a Baker & McKenzie como agente, fechado el 20 de julio de 2011, cuyo original examiné

Fechado en Madison, Wisconsin, el 11 de agosto de 2011.

Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.

Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03 - 2011- .

PODER

En inglés y español de ALLTECH, INC, firmado en Nicholasville, Kentucky Estados Unidos, el 20 julio de 2011. firmado por Nathan Hunter Hohman secretario y tesorero

De Alltech, Inc. : Estado de Wisconsin.

Oficina del Secretario de estado

Sello redondo. certificado

APOSTILLA

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft
3. Quien ejerce funciones de notario estado de Wisconsin
4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin

CERTIFICADO

5. En Madison , Wisconsin 6. El 22 de agosto de 2011.
7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin
8 No. 210603 9. Sello del estado de Wisconsin
10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. – 2 15

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

Estado de Wisconsin

Condado de Dane) ss

Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Certificado de Existencia de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike NicholaSville KY 40356, Estados Unidos, cuyo original examiné

Fechado en Madison, Wisconsin, el 18 de agosto de 2011.

Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.

Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03 - 2011- 8- 4- 2011 .

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

División de sociedades anónimas Presentación de negocios Apartado 718 Frankfort KY 40602 (502) 564 23490 http://www.sos.ky.gov	Certificado de Existencia
No. De autenticación 11650 Visite https// app.sos.ky.gov/ftshow/certvalidate.aspx para autenticar este certificado	

Yo Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que conforme a los registros en la oficina del secretario de estado

ALLTECH, INC es una sociedad anónima debidamente constituida y con existencia bao el capítulo KRS 271B, cuya fecha de constitución es 7 de agosto de 1980, y con un período de duración a perpetuidad.

Certifico además que ha pagado todos los derechos y sanciones debidos al Secretario de estado , que la sociedad no ha presentado artículos de disolución, y que entregó al secretario de estado el informe anual más reciente requerido por KRS 271 B 16- 220.

Firma de Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky.

Sello redondo del secretario de estado de Kentucky

Estado de Wisconsin. Oficina del Secretario de estado

Sello redondo: certificado

21 MAR 2012 APOSTILLA

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft
3. Quien ejerce funciones de notario público estado de Wisconsin
4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin

CERTIFICADO

5. En Madison , Wisconsin 6. El 22 de agosto de 2011.
7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin
8 No. 210604 9. Sello del estado de Wisconsin
10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. –

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

15

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

Estado de Wisconsin
Condado de Dane) ss

Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Certificado de Constitución de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville KY 40356, Estados Unidos, cuyo original examiné

Fechado en Madison, Wisconsin, el 18 de agosto de 2011.

Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.

Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03 - 2011-

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

CERTIFICADO

Yo Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que he comparado cuidadosamente el escrito anterior con el original del mismo, ahora bajo mi custodia oficial como secretario de estado y que permanece en archivo en mi oficina, y encuentro que es una copia verdadera y correcta del CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN DE

ALLTECH, INC presentado el 7 de agosto de 1980,

INFORME ANUAL DE 2001 Presentado el 1 marzo de 2011.

En testimonio de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial en Frankfort, Kentucky el 4 de agosto de 2011.

Firma de Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky.

Sello redondo del secretario Estado De Kentucky-

---- : 148768

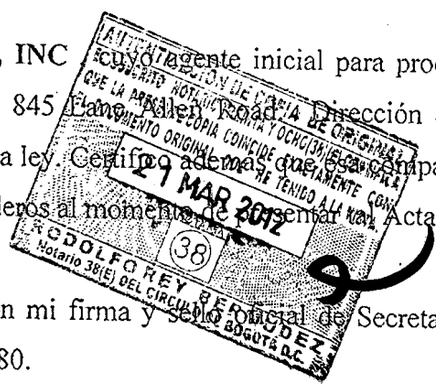
ESTADO DE WISCONSIN. - Oficina del Secretario de estado

Frances Jones Mills – secretaria Sello redondo. Frankfort Kentuchy

CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN

Yo Frances Jones Mills. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que he se ha presentado en esta oficina el Certificado De Constitución De

ALLTECH, INC cuyo agente inicial para proceso es Thomas Pearse Lyons, dirección Lane Allen Plaza, 845 Lane Allen Road 14 Dirección en Lexington Kentucky, debidamente firmado conforme a la ley. Certifico además que esa compañía ha pagado todos los impuestos, derechos, y cargos pagaderos al momento de presentar tal Acta Constitutiva.



Expedido con mi firma y sello oficial de Secretario de Estado en Frankfort, Kentucky el 7 de agosto de 1980.

Firma de Frances Jones Mills.. Secretario de estado de Kentucky.

Sello redondo del secretario Estado De Kentucky-

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

16

4/5

288

CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN DE ALLTECH, INC.

El suscrito Thomas Pearse Lyons, de Lexington Kentucky, por el presente constituye una sociedad anónima conforme a las leyes del estado de Kentucky

Articulo 1.

La razón social de la sociedad es Alltech, Inc.

Articulo II.

La sociedad tiene una duración a perpetuidad, a menos de que se disuelva antes conforme a las leyes del estado de Kentucky,

Articulo III

- El objeto social de la sociedad es producir bioquímicos para la industria alimentaria y actuar como consultores de la misma. Además de lo anterior, el objeto de la sociedad incluye hacer la transacción de todo negocio legal para los que se constituyan sociedades conforme a las leyes del estado de Kentucky.

Articulo IV.

El número total de acciones autorizadas de la sociedad es dos mil (2.000), acciones con valor nominal y el tenedor de cada acción de capital tendrá derecho a un voto por acción.

Articulo V. La oficina registrada inicial de la sociedad es: Lane Allen Plaza 845 Lane Allen Road, Lexington, Kentucky 40504. El agente inicial registrado de la sociedad anterior es: Thomas Pearse Lyons.

Articulo VI.

La junta directiva inicial consiste en una (1) persona que será Thomas Pearse Lyons, 35 29 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503. El director continuará sirviendo hasta que se elija y califique su sucesor. La organización subsiguiente de la Junta Directiva incluyendo el número de directores, se regirá por las leyes (N.-T.: texto cortado)

Articulo VII. El fundador de la sociedad es Thomas Pearse Lyons, 3529 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503.

Articulo VIII-

Esta sociedad tendrá todos los poderes otorgados a la sociedad conforme a las leyes del estado de Kentucky.

En testimonio de lo anterior, firma el fundador el 6 de agosto 1980.

Firma Thomas Pearse Lyons.

Estado de Kentucky)

Condado Fayette

Suscrito y legalizado ante mi por Thomas Pearse Lyons el 6 de agosto de 1980.

Su comisión vence el 8-27-83

Firma ilegible del Notario publico para todo el estado de Kentucky.

Preparado por Gerald Cassidy & Mooney

605 Court Square Building. Lexington KY 40507

Por Oscar H. Geralds, JR.

AUTENTICACIÓN DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
27 MAR 2012
38
NOTARIO DEL CIRCULO
BERMUDEZ

Marlen Neira C

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

5/5
289

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

01480148768
Elaine N. Walker Secretario de estado- Recibido y archivado
3/1/2011 4:08:15 **PM** pago de derechos: $15.00

Apartado 1150 Frankfort KY 40602 (502) 564 23490 http://www.sos.ky.gov	INFORME ANUAL PRESENTACION EN LINEA - ARP

Compañía ALLTECH, INC.
Identificación de compañía 0148768
Estado de Origen Kentucky
Fecha de constitución 817/1980 hora 12:00:00 AM
Fecha de presentación 3/11201 hora 14:08:15 PM
Derechos pagados $15.06

Oficina Principal
3031 CATNIP HILL NICHOLASVILLE, KY 40356

Nombre de agente Registrado/dirección
National Registered Agents, Inc
400 West Market Street Suite 1800 Louisville, Ky 40202 .

Funcionarios actuales

Presidente	Thomas Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356
Secretario	Nathan H Hohman .	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356
Tesorero	Nathan Hohman 3031	Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356
Vice Presidente	Mark Pearse. Lyons	Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356

Directores

Director	Thomas Pearse Lyons	Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356
Director	Nathan H Hohman	Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356

Firmas
Firma Nathan Hohman
Cargo SecretarioTesorero

Es traducción conforme con copia para confrontar. Bogota. Sept 6- 2011.

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO(38)(E) CERTIFICA QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
21 MAR 2012
(38)
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

18

CESIÓN DEL INVENTOR
AL SOLICITANTE

ACH1
290

COMMONWEALTH OF KENTUCKY

Alison Lundergan Grimes
SECRETARY OF STATE

For use in: Colombia

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

   This public document

2. has been signed by Cindy Ridener

3. acting in the capacity of Deputy County Clerk
   Fayette County
   Commonwealth of Kentucky

4. bears the seal/stamp of Cindy Ridener
   Deputy County Clerk
   Commonwealth of Kentucky

CERTIFIED

5. at Frankfort, Kentucky 6. the 2nd day of March, 2012

7. by Secretary of State, Commonwealth of Kentucky

8. No. 63366.104750.36004.96575

9. Se

10. Signature:

Alison Lundergan Grimes

Alison Lundergan Grimes
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky

STATE OF KENTUCKY

COUNTY OF FAYETTE

Pursuant to KRS 423.020, I DONALD W. BLEVINS JR, Clerk of the County of Fayette for the state of Kentucky, the same being a Court of Record, DO HEREBY CERTIFY THAT:

THE NOTARY COMMISSION OF ABIGAIL S TAYLOR, RECORDED IN NOTARY BOOK 0124, PAGE 0082 WILL EXPIRE ON 03/02/2015

Whose name is subscribed to the certificate of the proof or acknowledgement of the annexed instrument and thereon written was, at the time of taking such proof or acknowledgement, a Notary Public in and for said County of Fayette, dwelling in the City of Lexington, commissioned, sworn, and duly authorized to take same. And, further, that I am well acquainted with the handwriting of such Notary and verily believe that the signature to said certificate or proof or acknowledgement is genuine.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the said Court and County, this 02 day of March, 2012.

Clerk, Fayette County Court

BY HIS LAWFUL DEPUTY PURSUANT TO KRS 61.035

BAKER & McKENZIE

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 900.034.906-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakermckenzie.com

ASSIGNMENT

**YIANNIKOURIS, Alexandros;
KWIATKOWSKI, Stefan;
KUDUPOJE, Manoj, Bojappa;
MATNEY, Clayton;**

by means of this document assign(s) to

ALLTECH, INC

A company organized under the laws of

United States of America

Domiciled in

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356 (US),

all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention entitled and as fully set forth and described in:

SYNTHETIC MYCOTOXIN ADSORBENTS AND METHODS OF MAKING AND UTILIZING THE SAME

So far as the Republic of Colombia is concerned and any other country in which the application is filed.

Done and subscribed in

On the 22nd day of Feb of 20 12

YIANNIKOURIS, Alexandros

Signature of the inventors

CESION

**YIANNIKOURIS, Alexandros;
KWIATKOWSKI, Stefan;
KUDUPOJE, Manoj, Bojappa;
MATNEY, Clayton;**

por medio de la presente cedo (cedemos) a

ALLTECH, INC

Una compañía organizada bajo las leyes de

Estados Unidos de América

domiciliada en

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, Estados Unidos de América

todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención titulada y tal como describe en:

en lo que concierne a la República de Colombia y cualquier otro país del mundo en donde se presente la solicitud.

Dado y firmado en

A los 22 días del mes de Feb de 20 12

YIANNIKOURIS, Alexandros

Firma de los inventores

BAKER & McKENZIE

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 900.034.906-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakermckenzie.com

ASSIGNMENT

**YIANNIKOURIS, Alexandros;
KWIATKOWSKI, Stefan;
KUDUPOJE, Manoj, Bojappa;
MATNEY, Clayton;**

by means of this document assign(s) to

ALLTECH, INC

A company organized under the laws of

United States of America

Domiciled in

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356 (US),

all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention entitled and as fully set forth and described in:

SYNTHETIC MYCOTOXIN ADSORBENTS AND METHODS OF MAKING AND UTILIZING THE SAME

So far as the Republic of Colombia is concerned and any other country in which the application is filed.

Done and subscribed in

On the 22nd day of Feb of 2012

KWIATKOWSKI, Stefan

Kwiatkowski Stefan

Signature of the inventors

CESION

**YIANNIKOURIS, Alexandros;
KWIATKOWSKI, Stefan;
KUDUPOJE, Manoj, Bojappa;
MATNEY, Clayton;**

por medio de la presente cedo (cedemos) a

ALLTECH, INC

Una compañía organizada bajo las leyes de

Estados Unidos de América

domiciliada en

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, Estados Unidos de América

todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención titulada y tal como describe en:

en lo que concierne a la República de Colombia y cualquier otro país del mundo en donde se presente la solicitud.

Dado y firmado en

A los 22 días del mes de Feb de 2012

KWIATKOWSKI, Stefan

Kwiatkowski Stefan

Firma de los inventores

BAKER & McKENZIE

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 900.034.906-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakermckenzie.com

ASSIGNMENT

**YIANNIKOURIS, Alexandros;
KWIATKOWSKI, Stefan;
KUDUPOJE, Manoj, Bojappa;
MATNEY, Clayton;**

by means of this document assign(s) to

ALLTECH, INC

A company organized under the laws of

United States of America

Domiciled in

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356 (US),

all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention entitled and as fully set forth and described in:

SYNTHETIC MYCOTOXIN ADSORBENTS AND METHODS OF MAKING AND UTILIZING THE SAME

So far as the Republic of Colombia is concerned and any other country in which the application is filed.

Done and subscribed in

On the 22nd day of Feb of 2012

KUDUPOJE, Manoj, Bojappa

K. B. Manoj

Signature of the inventors

CESION

**YIANNIKOURIS, Alexandros;
KWIATKOWSKI, Stefan;
KUDUPOJE, Manoj, Bojappa;
MATNEY, Clayton;**

por medio de la presente cedo (cedemos) a

ALLTECH, INC

Una compañía organizada bajo las leyes de

Estados Unidos de América

domiciliada en

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, Estados Unidos de América

todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención titulada y tal como describe en:

en lo que concierne a la República de Colombia y cualquier otro país del mundo en donde se presente la solicitud.

Dado y firmado en

A los 22 días del mes de Feb de 2012

KUDUPOJE, Manoj, Bojappa

K. B. Manoj

Firma de los inventores

BAKER & McKENZIE

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 900.034.906-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakermckenzie.com

ASSIGNMENT

**YIANNIKOURIS, Alexandros;
KWIATKOWSKI, Stefan;
KUDUPOJE, Manoj, Bojappa;
MATNEY, Clayton;**

by means of this document assign(s) to

ALLTECH, INC

A company organized under the laws of

United States of America

Domiciled in

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356 (US),

all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention entitled and as fully set forth and described in:

SYNTHETIC MYCOTOXIN ADSORBENTS AND METHODS OF MAKING AND UTILIZING THE SAME

So far as the Republic of Colombia is concerned and any other country in which the application is filed.

Done and subscribed in

On the 22nd day of Feb of 20

MATNEY, Clayton

Clayton Matney

Signature of the inventors

CESION

**YIANNIKOURIS, Alexandros;
KWIATKOWSKI, Stefan;
KUDUPOJE, Manoj, Bojappa;
MATNEY, Clayton;**

por medio de la presente cedo (cedemos) a

ALLTECH, INC

Una compañía organizada bajo las leyes de

Estados Unidos de América

domiciliada en

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, Estados Unidos de América

todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención titulada y tal como describe en:

en lo que concierne a la República de Colombia y cualquier otro país del mundo en donde se presente la solicitud.

Dado y firmado en

A los 22 días del mes de Feb de 2012

MATNEY, Clayton

Clayton Matney

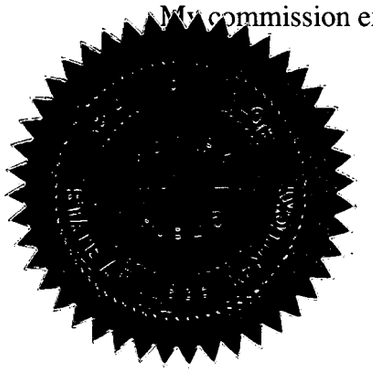
Firma de los inventores

STATE OF KENTUCKY)
)
COUNTY OF JESSAMINE)

The foregoing Deed of Assignment was acknowledged before me this 22nd day of February 2012, by the following individuals:

- Alexandros YIANNIKOURIS
- Stefan KWIATKOWSKI
- Manoj KUDPOJE
- Clayton MATNEY

My commission expires: March 2, 2015.



Abigail S Taylor, Notary Public
Kentucky, State-at Large

TRADUCCIÓN OFICIAL Nº 125/2012 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del traductor. Esta es una traducción oficial efectuada el día 20 de marzo de 2012 por la señora Teresa Jiménez de Montes, con cc 41.569.149 de Bogotá, traductora oficial según Resolución Nº 220 del 6 de febrero de 1978, expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

ESTADO DE KENTUCKY

CONDADO DE FAYETTE

Conforme a KRS 423.020, YO DONALD W. BLEVINS JR, Secretario del Condado de Fayette para el Estado de Kentucky, también Tribunal de Registro, CERTIFICO QUE:

LA COMISIÓN DE ABIGAIL S TAYLOR, COMO NOTARIA PUBLICA REGISTRADA EN EL LIBRO DE NOTARIOS 0124, PAGINA 0082 VENCERÁ EL 03/02/2015.

Cuyo nombre suscribe el certificado de prueba o reconocimiento del documento adjunto y expedido en esa fecha, era en la fecha de recibo de esa prueba o reconocimiento, una Notaria Pública para el Condado de Fayette, residente en la Ciudad de Lexington, debidamente comisionada, juramenta y autorizada para recibir dicha prueba. Certifico además que conozco la letra de esa notaria y creo firmemente que la firma de este certificado o prueba de reconocimiento es auténtica.

EN FE DE LO ANTERIOR, firmo y estampo el sello del citado Tribunal del Condado, a los 2 días del mes de marzo de 2012.

[Firmado]

Secretario, Tribunal del Condado de Fayette

[Firmado]

POR SU DELEGADO LEGÍTIMO CONFORME A KRS 61.035

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

CESIÓN

de

YIANNIKOURIS Alexandros;

KWIATKOWSKI, Stefan

KUDUPOJE, Manoj, Bojappa

MATNEY, Clayton

A

ALLTECH, INC

[Documento escrito en inglés y español]

Dado y firmado a los 22 días del mes de febrero de 2012.

Firmado, YIANNIKOURIS, Alexandros

Firma del Inventor

CESIÓN

de

YIANNIKOURIS Alexandros;

KWIATKOWSKI, Stefan

KUDUPOJE, Manoj, Bojappa

MATNEY, Clayton

A

ALLTECH, INC

[Documento escrito en inglés y español]

Dado y firmado a los 22 días del mes de febrero de 2012.

Firmado, KUDUPOJE, Manoj, Bojappa

Firma del Inventor

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

CESIÓN

de

YIANNIKOURIS Alexandros;

KWIATKOWSKI, Stefan

KUDUPOJE, Manoj, Bojappa

MATNEY, Clayton

A

ALLTECH, INC

[Documento escrito en inglés y español]

Dado y firmado a los 22 días del mes de febrero de 2012.

Firmado, Matney, Clayton

Firma del Inventor

ESTADO DE KENTUCKY

CONDADO DE JESSAMINE

El Documento de Cesión que antecede fue reconocido ante mi a los 22 días del mes de febrero de 2012, por las siguientes personas

- Alexandros YIANNIKOURIS
- Stefan KWIATKOWSKI
- Clayton MATNEY

Nombramiento valido hasta: marzo 2 de 2015.

Firmado

Abigail S. Taylor, Notario Pulbico

Kentucky, para todo el Estado

Sello

Abigail S Taylor

Notaria Pública para todo el estado de Kentucky

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

ESTADO DE KENTUCKY

Alison Lundergan Grime
SECRETARIA DE ESTADO

Para uso en Colombia

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

   Este documento público

2. ha sido firmado por Cindy Ridener

3. en su calidad de Subsecretario del Condado, Condado de Fayette, Estado de Kentucky

4. lleva el sello/timbre de Heather Pittman, Subsecretario del Condado, Condado de Fayette, Estado de Kentucky

CERTIFICADO

5. en Frankfort, Kentucky 6. el 2 de marzo de 2012

7. por Secretaria de Estado, Estado de Kentucky

8. No. 63366.104750.36004.96575

9. [Sello]
   ESTADO DE KENTUCKY

10. Firma
    [Firmado]
    Alison Lundergan Grimes
    Secretaria de Estado
    Estado de Kentucky

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

Teresa Jiménez de Montes
c.c. 41.569.149 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No.220 del
6 de febrero de 1978,
expedida por el Ministerio de Justicia.

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-048893- -00000-0000

Fecha: 2012-03-22 16:59:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐