

DISEÑO DE UN BIOSENSOR COMPETITIVO ELECTROQUÍMICO BASADO EN LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE EL DEOXINIVALENOL Y SU ANTICUERPO POLICLONAL

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



Universidad
Zaragoza



**SUSANA HERNÁNDEZ AGOIZ
TRABAJO FIN DE MÁSTER
JULIO 2012**



Dr. D. Juan Carlos Vidal, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza y Dra. Dña. Laura Bonel Sanmartín, investigadora de la empresa CAPHER IDI SL (Convenio de colaboración con el grupo de investigación GEAS),

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "**DISEÑO DE UN BIOSENSOR COMPETITIVO ELECTROQUÍMICO BASADO EN LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE EL DEOXINIVALENOL Y SU ANTICUERPO POLICLONAL**", presentada por **Dña. Susana Hernández Agoiz**, para superar el Máster de Investigación Química, ha sido realizada en el Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS) del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección.

Zaragoza, 21 de junio de 2012

Fdo. Juan C. Vidal Ibáñez

Fdo. Laura Bonel Sanmartín

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1. MICOTOXINAS

 1.1.1. Deoxinivalenol

 1.1.2. Toxicidad del deoxinivalenol

1.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL

 1.2.1 Metodología oficial para la determinación de deoxinivalenol

 1.2.2 Biosensores para la determinación de DON

 1.2.3 Inmunoensayos para la determinación de DON

 1.2.4 Inmunosensores electroquímicos competitivos

1.3. USO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN INMUNOENSAYO

1.4. APLICACIONES DE LOS ELECTRODOS SERIGRAFIADOS EN LA FABRICACIÓN DE INMUNOSENSORES

Capítulo 2: OBJETIVOS

Capítulo 3: EXPERIMENTAL

3.1. PROCEDIMIENTO DE CONJUGACIÓN DEL DON-HRP

3.2. ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE pAbDON Y DON-HRP POR RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (SPR)

 3.2.1. Materiales e Instrumentación

 3.2.2. Reactivos y tampones

 3.2.3. Procedimiento experimental

 3.2.4. Resultados y discusión

3.3. ESTUDIO DE LA REACCIÓN COMPETITIVA ENTRE DON-HRP Y DON MEDIANTE ELISA ESPECTROFOTOMÉTRICO (CONVENCIONAL Y CON PARTÍCULAS MAGNÉTICAS)

3.3.1. Materiales e Instrumentación

3.3.2. Reactivos y tampones

3.3.3. Procedimiento experimental

3.3.4. Resultados y discusión

3.4. ESTUDIO DE LA REACCIÓN COMPETITIVA ENTRE DON Y DON-HRP SOBRE pAbDON INMOVILIZADO SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

3.4.1. Materiales e Instrumentación

3.4.2. Reactivos y tampones

3.4.3. Procedimiento experimental

3.4.4. Resultados y discusión

Capítulo 4: CONCLUSIONES

ANEXOS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREVIATURAS

BSA	Albúmina Sérica Bovina
BSA-FB1	Conjugado BSA-Fumonisina B1
CRA	Cronoamperometría
DON	Deoxinivalenol
DON-HRP	Conjugado Deoxinivalenol-Peroxidasa
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
eaHRP	Peroxidasa funcionalizada con estreptavidina
EDC	1-Etil-3-(3-dimetillaminopropil) carbodiimida
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EA	Electrodo auxiliar
ER	Electrodo de referencia
ET	Electrodo de trabajo
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución/Espectrometría de masas
HPLC-UV	Cromatografía líquida de alta resolución/Ultravioleta- Visible
HQ	Hidroquinona
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSA	Albúmina serica humana
GC-ECD	Cromatografía de Gases/Detección por captura de electrones
LC-MS/MS	Cromatografía líquida/Espectrometría de masas
MBs	Partículas magnéticas
MBs-To	Partículas magnéticas funcionalizadas con el grupo tosilo
MBs-algG	Partículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo genérico
MBs-COOH	Partículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilo

MES	Tampón de ácido 2-(N-morfolino etano sulfónico)
MIPs	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
NHS	N-Hidroxisuccinimida
pAbDON	Anticuerpo policlonal específico para el DON
<i>p</i> BQ	<i>p</i> -Benzoquinona
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con Tween20
PMPI	p-maleimidofenil isocianato
SATA	N-succinimidil S-acetiltioacetato
SPCE	Electrodo serigrafiado de carbono
SPE	Electrodo serigrafiado
SPR	Resonancia de Plasmón Superficial
TMB	3, 3',5, 5' - tetrametilbencidina
VC	Voltametría Cíclica

RESUMEN:

El deoxinivalenol (DON) es una micotoxina producida por el hongo *Fusarium*, muy abundante en ciertos cereales como el trigo o el maíz y en sus granos procesados como la malta, la cerveza o el pan. Debido a la gran importancia de las micotoxinas en la contaminación de alimentos, la legislación española y europea, ha establecido límites muy estrictos para las concentraciones máximas permitidas de DON en diversos productos alimenticios, oscilando entre 200 y 1750 µg/kg, y la ingesta diaria tolerable es 1 mg/kg de peso corporal (Comisión Reguladora 1126/2007) por lo tanto, es necesario disponer de métodos analíticos cada vez más sensibles, que nos permitan su determinación.

Por ello el objetivo principal de este trabajo de investigación fue el desarrollo de un inmunosensor electroquímico competitivo para la determinación de DON en muestras de alimentos. Se han utilizado además diferentes tipos de partículas magnéticas (MBs) como soporte sólido del inmunosensor por las ventajas que esto conlleva (mejoras en lavados y preconcentración de reactivos entre otras). Se ha utilizado la técnica electroquímica de cronoamperometría (CRA) utilizando un salto de potencial entre 0 y -0,25 V para medir la extensión de la reacción enzimática que provoca la HRP con los sustratos de reacción añadidos sobre electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs).

Para este estudio nos hemos apoyado también en otras técnicas analíticas, como el SPR con el que se ha confirmado que el anticuerpo es capaz de reconocer de forma selectiva al DON, y el ELISA y ELISA magnético con los que se han optimizado las condiciones de trabajo.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1 MICOTOXINAS:

Las **micotoxinas** son metabolitos tóxicos secundarios producidos por hongos que crecen en los campos de cultivo o durante el almacenamiento de los productos agrícolas [1]. El grado de contaminación por micotoxinas de los productos de cultivo depende de las condiciones climáticas, de las buenas prácticas en el cultivo de cereales y de unas correctas condiciones de temperatura y humedad durante el almacenamiento.

Las micotoxinas [2] suelen entrar en la cadena alimentaria a través del consumo de productos de origen vegetal como frutas, cereales y frutos secos almacenados en malas condiciones de humedad y temperatura. También a través de productos de origen animal (leche, carne, huevos) si los animales han sido alimentados con productos vegetales contaminados.

Se han descrito más de 300 micotoxinas diferentes, que se clasifican atendiendo al tipo de hongo que las origina. Los principales hongos productores de micotoxinas son: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*.

Los **hongos *Fusarium*** [3] que se generan comúnmente en los suelos, son los responsables de producir un gran número de micotoxinas del grupo de los tricotecenos tanto de tipo A (con un sustituyente diferente de un grupo carbonilo en el carbono 8) como las toxinas T2 y HT2, como de tipo B (con un grupo carbonilo en el carbono 8) como el deoxinivalenol (DON), el 3-acetil-DON, el 15-acetil-DON, o el nivalenol (NIV) entre otros, y otras toxinas como la zearalenona o el grupo de las fumonisinas.

1.1.1 Deoxinivalenol:

El **deoxinivalenol (DON)** es una micotoxina del grupo de los tricotecenos de tipo B producido por el hongo *Fusarium*, muy abundante en ciertos cereales como el trigo, el maíz, la cebada, la avena o el centeno y en sus granos procesados como la malta, la cerveza o el pan, principalmente en Europa y en regiones con climas fríos y húmedos.

Su fórmula empírica es C₁₅H₂₀O₆ (12,13-epoxi-3,4,15-trihidroxitricotec-9-en-8-ona) y tiene un peso molecular de 296,32 g mol⁻¹.

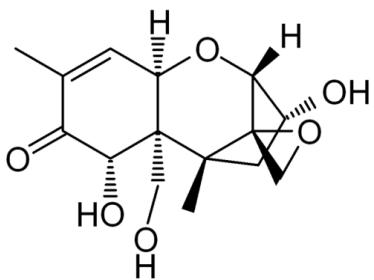


Figura 1: Estructura química del deoxinivalenol

El DON es un compuesto muy estable durante el almacenamiento o molienda de los cereales contaminados y durante su procesado o su cocinado, por lo que supone un gran riesgo para salud humana y animal.

1.1.2 Toxicidad deoxinivalenol

El DON, o también llamado comúnmente vomitoxina [4] es una micotoxina que en altas dosis causa vómitos y puede producir la reducción del consumo de alimentos provocando anorexia. También se ha observado inhibición en la síntesis de ADN, ARN, proteínas ribosómicas y produce un efecto hemolítico sobre los eritrocitos. Si el grado de toxicidad [2] es mayor puede aparecer necrosis en algunos órganos (tracto gastrointestinal o médula ósea).

Es una micotoxina que no presenta actividad mutagénica en pruebas *in vitro* pero es capaz de suprimir la actividad inmune por lo que se aumenta la susceptibilidad de contagio de enfermedades infecciosas. El DON no ha mostrado efectos teratogénicos en las pruebas realizadas sobre ratones, ratas y conejos, pero sí se ha observado que dependiendo de la concentración administrada produce descensos en la fertilidad.

Debido a la gran importancia de las micotoxinas en la contaminación de alimentos, y a los efectos tóxicos intrínsecos del deoxinivalenol en este caso, la legislación española y europea, [5, 6] ha establecido límites muy estrictos para las concentraciones máximas permitidas de DON en diversos productos alimentarios, **que oscilan entre 200 y 1750 µg kg⁻¹** dependiendo del tipo de producto (cereal o alimento procesado), y se ha establecido una ingesta diaria tolerable en humanos de 1 mg kg⁻¹ de peso corporal.

PRODUCTOS	[DON] µg kg ⁻¹
Cereales no elaborados (excepto trigo, maíz y avena)	1250
Trigo y avena no elaborados	1750
Maíz no elaborado	1750
Harina y pasta seca	750
Pan, cereales desayuno, galletas...	500
Alimentos para lactantes y niños	200

Tabla 1: Resumen Reglamento 1126/2007, de 28 de Septiembre de 2007 [6]

El creciente número de micotoxinas [7] que la legislación obliga a controlar y el hecho de que los límites permitidos cada vez sean más estrictos, **requiere la aparición de nuevos métodos analíticos** cada vez más sensibles para la evaluación de riesgos, la gestión de alimentos y piensos y para la [8] protección y prevención de fraudes en la industria alimenticia.

1.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL

1.2.1. Metodología oficial para la determinación de deoxinivalenol

Existen numerosos métodos de análisis para las micotoxinas [9] del grupo *Fusarium* rápidos, sencillos y de bajo coste, que permiten obtener de modo semicuantitativo la presencia o ausencia de los niveles máximos de la micotoxina en diversos tipos de alimentos (métodos *screening*).

Además de los métodos semicuantitativos, para la determinación de la concentración de deoxinivalenol se utilizan diversos métodos analíticos cuantitativos [10, 11] basados en separaciones cromatográficas (GC-ECD, HPLC-UV, LC-MS/MS, etc) y en métodos inmunoquímicos por sus buenas prestaciones analíticas [12] (alta sensibilidad y especificidad), o en nuevas tecnologías como los inmunoensayos de fluorescencia de polarización, el uso de polímeros de impronta molecular (MIPs), la espectroscopía UV o infrarroja o los sensores ópticos como la Resonancia de Plasmón Supericial (SPR).

El método oficial para la determinación de DON es **la cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV)**, ya que se trata de un método muy robusto y exacto. Por contra, el HPLC-UV necesita largos tiempos de análisis, [13] y es un método poco económico y ecológico debido al elevado consumo de reactivos y disolventes orgánicos que se precisan, [14] necesita instrumentación sofisticada, alta cualificación del personal técnico, etc.

Por estas razones, para la determinación de DON y de otras micotoxinas los métodos más comunes son los basados en inmunoensayos, [15, 16] sobre todo los **ensayos ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)** convencionales utilizando un anticuerpo (monoclonal o policlonal) selectivo al deoxinivalenol como elemento de biorreconocimiento y llevando a cabo una detección espectrofotométrica. Además aprovechando las reacciones de afinidad entre un anticuerpo y un antígeno y basándose en el procedimiento que ocurre en un ensayo ELISA, actualmente se están desarrollando diferentes **inmunosensores electroquímicos y ópticos**.

1.2.2. Biosensores para la determinación de DON

Un **biosensor** es un dispositivo [17] en el que materiales de origen biológico, como enzimas, tejidos animales o vegetales, antígenos, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc. son usados como elementos de biorreconocimiento para dotar al dispositivo de la selectividad y especificidad requeridas para la determinación de analitos de origen muy variado en el ámbito clínico, toxicológico, medioambiental, agroalimentario, etc.

Los **inmunosensores** son los que utilizan [18] un anticuerpo selectivo y específico a la molécula diana. En el caso que nos afecta se utiliza un anticuerpo policlonal anti-micotoxina (anti-DON, por ejemplo) como elemento de biorreconocimiento de forma similar a los ensayos ELISA.



Figura 2: Representación gráfica de un anticuerpo

Según el transductor usado, los sensores pueden ser clasificados como electroquímicos, ópticos o de masa. Además, los biosensores también se clasifican atendiendo a la biomolécula que se inmoviliza. Dependiendo de si se inmoviliza el anticuerpo o el antígeno, serán biosensores directos o indirectos respectivamente. Además de un tercer tipo de esquema más complejo y que utiliza dos anticuerpos para los casos en los que la molécula diana es de gran tamaño y contiene dos epítopos.

El desarrollo de **biosensores de afinidad** se trata de una tecnología emergente y ha recibido especial atención por parte de la comunidad científica en los últimos años. En la Figura 3 se representan los esquemas más habituales utilizados en el diseño de un inmunosensor:

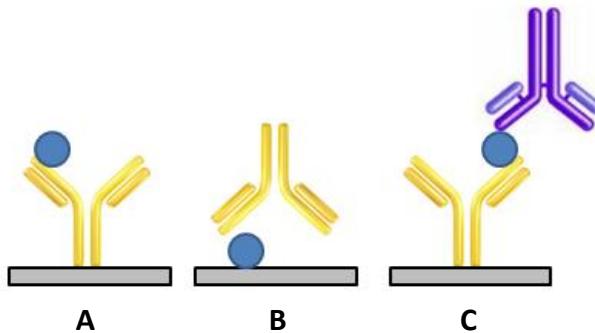


Figura 3: Diferentes esquemas para el desarrollo de un inmunosensor. A) esquema directo, B) esquema indirecto, C) esquema tipo sándwich

1.2.3. Inmunoensayos para la determinación de DON

Los inmunoensayos ya sean mediante ensayos tipo ELISA [16, 19] o con detección electroquímica [20] u óptica [21], son muy utilizados para la determinación de micotoxinas en muestras de alimentos.

Uno de los requisitos fundamentales en un inmunoensayo es la **especificidad del anticuerpo** [9].

Existen muchas publicaciones que describen el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para determinados analitos pero generalmente existe **reactividad cruzada** con moléculas de estructura química similar que el anticuerpo es capaz de reconocer, lo que generalmente conduce a errores por exceso y alta incertidumbre en la determinación. En el caso del deoxinivalenol [22] puede aparecer fuerte reactividad cruzada con dos derivados: 3-acetildeoxinivalenol y 15-acetildeoxinivalenol.

El problema principal de los inmunoensayos recae en que la inmovilización de anticuerpos sucede por azar por lo que es necesario controlar esta etapa para obtener la mayor sensibilidad posible. Para que un ELISA directo funcione correctamente es necesario inmovilizar los anticuerpos en su forma biológicamente activa y **en una única orientación sobre la región F_c, dejando la región F_{ab} libre y lejos de la superficie de inmovilización** para tener capacidad de interactuar con antígenos.

Los métodos ELISA son comunes [23] en diagnósticos rápidos y generales de detección de micotoxinas, por su sensibilidad, sencillez, facilidad de operación y la rápida interpretación de los resultados. Así pues, numerosas casas comerciales han desarrollado diferentes kits ELISA [24] que permiten la determinación cuantitativa de la concentración de DON en muestras contaminadas con diferentes prestaciones analíticas.

Los métodos ELISA disponibles comercialmente [25] para la determinación de DON tienen generalmente un formato típico con una placa con 48 o 96 pocillos de poliestireno sobre los cuales se inmoviliza el elemento de biorreconocimiento. Algunos de estos kits ELISA comerciales se recogen en la siguiente tabla:

Casa comercial	Pocillos	Tipo	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Recuperación
ROMER	96	Directo	200	250-5000	-
AGRAQUANT	48	Directo	200	250-5000	-
RISDASCREEN	96	Directo	3,7	3,7-100	85-110%
RISDASCREEN FAST	96	Directo	200	200-6000	-
ZEU INMUNOTECH	96	Directo	-	0,313-10	80-110%
NEUROGEN VERATOX HS	48	Directo	LOQ= 25	0-250	-
NEUROGEN VERATOX DON 5/5	48	Directo	100	0-2000	-
HELICA	96	Directo	0,15	0-200	-
ANTIBODIES ONLINE	96	Directo	<200	0-400	>80%

Tabla 2: Métodos de inmunoensayo ELISA comerciales para la determinación de DON

Los kits ELISA comerciales para la determinación de DON ofrecen numerosas ventajas mencionadas anteriormente, pero también presentan limitaciones. El principal inconveniente de estos kits está en el hecho de que son de uso individual lo que puede aumentar el coste económico, además de los largos tiempo de análisis, [26] y la gran cantidad de falsos positivos y falsos negativos que pueden aparecer. Los métodos ELISA se utilizan sobretodo como un método

de *screening* que siempre debe ser validado por el método oficial de determinación de DON (HPLC-UV).

Pese a los numerosos kits ELISA que hay disponibles, los inmunosensores para la determinación de DON en alimentos no son tan comunes. Entre los inmunosensores más importantes cabe destacar la técnica de **Resonancia de Plasmón Superficial** (inmunosensor óptico) y los **inmunosensores electroquímicos** basados en una reacción competitiva.

La **Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)** es una técnica óptica basada en el fenómeno de reflexión total interna dentro de un prisma o de una fibra óptica, recubiertos de una fina película de metal, generalmente de oro. La luz entra en el prisma con un ángulo determinado, **el ángulo crítico que produce reflexión total interna** [27] y parte de la luz incidente es absorbida por electrones libres en la fina capa de metal sobre la superficie del sensor; por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada disminuye.

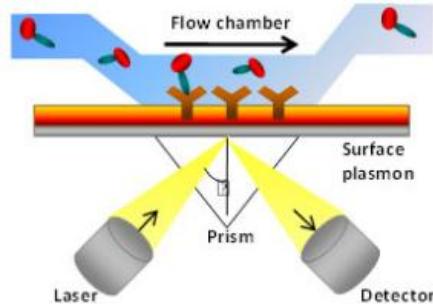


Figura 4: Esquema de la etapa de interacción antígeno-anticuerpo en SPR

En resumen, SPR es un biosensor en tiempo real que monitoriza cambios en la densidad óptica, que se traducen en cambios de masa sobre la superficie de la lámina sensora (chip), por lo que pueden medirse pequeñas variaciones en la masa depositada. Es un sensor muy útil [21] para observar interacciones entre moléculas como por ejemplo entre un antígeno y un anticuerpo.

Los ensayos SPR [28] se seleccionan dependiendo de la característica del analito, de la muestra analítica, y de la sensibilidad del instrumento. La detección directa es sólo útil para moléculas con alto peso molecular superior a 10 kDa. Sin embargo, las micotoxinas son compuestos químicos pequeños con masa insuficiente para provocar un cambio mensurable en el índice de refracción, por lo que si se realiza un ensayo directo es recomendable trabajar con la micotoxina conjugada a una molécula de alto peso molecular, por ejemplo una proteína.

La inmovilización directa de un conjugado micotoxina–proteína sobre la superficie del chip proporciona una superficie sensora muy estable en comparación con la inmovilización directa de anticuerpos, los cuales son susceptibles de desnaturización y la degradación [29].

Se ha descrito la determinación de DON utilizando el SPR mediante ensayos indirectos, obteniéndose suficiente sensibilidad ($\mu\text{g l}^{-1}$) [29] para la determinación de DON en muestras de trigo contaminadas. Este método es validado por LC-MS/MS [27] obteniéndose una correlación entre ambos métodos superior al 90%, por lo que se puede asegurar que se trata de un biosensor óptico perfectamente válido para determinaciones de este tipo.

Los inmunosensores más comunes en el campo que nos afecta siguen un esquema competitivo.

1.2.4. Inmunosensores electroquímicos competitivos:

Un **inmunosensor competitivo** se basa en la competición del anticuerpo por el analito presente en la muestra y el analito marcado generalmente con una enzima, que es capaz de transformar un sustrato en un producto con propiedades ópticas, electroquímicas, fluorescentes, etc [15].

De esta forma, cuanto mayor es la concentración de analito en la muestra, menor unión se va a producir entre el anticuerpo y el analito marcado enzimáticamente, y en consecuencia se obtendrá una menor señal analítica. En este tipo de inmunosensores, a diferencia que en un esquema tipo sándwich, la **señal es inversamente proporcional a la concentración del analito**. La ventaja que presentan es su elevada sensibilidad para concentraciones de analito muy bajas y cercanas al límite de detección.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo el diseño de un **inmunosensor electroquímico competitivo utilizando un esquema directo**, [30] para llevar a cabo la determinación de DON en muestras de alimentos (sobre todo en cereales).

Los inmunosensores electroquímicos competitivos para DON en muestras de alimentos, a diferencia de los numerosos ensayos ELISA no están muy desarrollados hasta el momento. Se han desarrollado diferentes sensores que utilizan técnicas electroquímicas, como la voltametría cíclica (VC) [31] o la cronoamperometría (CRA) [32] para llevar a cabo las determinaciones. Los resultados obtenidos con los sensores electroquímicos en muestras de alimentos (maíz, trigo, alimentos preparados de origen cereal, etc) demuestran que son unas potentes y novedosas herramientas analíticas para la determinación de DON, manteniendo una alta correlación con los resultados obtenidos con la metodología oficial (HPLC-UV).

Debido a la naturaleza compleja de las muestras de alimentos, generalmente aparecen fuertes interferencias de matriz que tienen un efecto negativo en los resultados. Dado que las **interferencias electroactivas son relativamente escasas**, la detección electroquímica para interacciones de tipo antígeno-anticuerpo, por ejemplo, pueden ser de gran utilidad en los análisis de alimentos dada su complejidad en las matrices [9].

En la mayoría de los casos los anticuerpos y antígenos son incapaces de reaccionar con un par redox, por lo que es necesario incluir en el ensayo un marcado enzimático a alguno de los componentes. En este caso se va a utilizar un conjugado de DON marcado con peroxidasa de

rábano picante (HRP). En el inmunosensor se va a llevar a cabo una **reacción competitiva entre el DON libre y el conjugado de DON-HRP**.

Además, esta tecnología se combina con el uso de micropartículas magnéticas modificadas con diferentes grupos funcionales (proteínas, tosilo, carboxilo, etc) como superficie sólida para llevar a cabo las etapas de inmovilización del anticuerpo, etapa de competición y los correspondientes lavados [33].

Con este enfoque, combinando la selectividad de los anticuerpos, la sensibilidad de la detección electroquímica y la posibilidad de concentrar las partículas magnéticas modificadas con los biorreactivos en la superficie del electrodo, aparece una interesante alternativa a los métodos microbiológicos y de inmunoensayo, con notables mejoras en análisis de micotoxinas en alimentos sobre los inmunoensayos clásicos como el ELISA [34].

Las principales ventajas de las detecciones electroquímicas sobre los procedimientos espectrofotométricos incluyen por ejemplo, la capacidad de miniaturización, el bajo coste de la instrumentación, la posibilidad de análisis *in situ*, la insensibilidad a las muestras turbias, etc [9].

1.3. USO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN INMUNOENSAYO

Las partículas magnéticas (MBs) se han convertido en una de las herramientas más versátiles para ser utilizadas como soporte sólido en inmunoensayo [35]. Se trata [36] de partículas de poliestireno con un núcleo de hierro que le proporciona su condición superparamagnética. Son partículas esféricas de tamaño micrométrico (diámetros 1 - 2,8 μm).

Comercialmente existen MBs modificadas con diversos grupos funcionales que pueden utilizarse para la captura de moléculas específicas y actualmente constituye una herramienta muy potente en una gran variedad de aplicaciones analíticas y biotecnológicas relacionadas con la determinación de contaminantes en alimentos [37].

Los anticuerpos pueden unirse a los grupos funcionales de la superficie de las MBs ya sea a través de un enlace covalente, o a través de diferentes funcionalidades (carboxilo, amino, proteínas, epoxi,...).

La funcionalización de partículas magnéticas, debido a su excelente compatibilidad con el elemento de biorreconocimiento, su estabilidad en el tiempo y a los protocolos de síntesis perfectamente establecidos, además de la reducción de tamaño (hasta niveles de micro- y nanopartículas) se está convirtiendo en uno de los más importantes modos de trabajo en inmunosensores para micotoxinas [38].

En el tema de estudio que estamos abordando las partículas magnéticas se van a utilizar como **superficie sólida sobre la que inmovilizar el elemento de biorreconocimiento**, con las ventajas

que esto conlleva: mejoran notablemente el rendimiento de la reacción inmunológica debido a un aumento de la superficie de biorreconocimiento, y poseen una cinética más rápida ya que las partículas están en suspensión y el analito no tiene que migrar muy lejos durante la transducción. Además, provocan una baja adsorción inespecífica y se minimiza el efecto matriz [14] debido a la alta eficiencia en la separación durante las etapas de lavado por acción de un campo magnético (es capaz de atraer las partículas magnéticas con los biorreactivos inmovilizados sobre las mismas y permite la eliminación del sobrenadante con los reactivos en exceso que no hayan reaccionado) [39].

En el **proceso de inmovilización**, en primer lugar las partículas magnéticas se preparan para las condiciones de incubación mediante lavados (eliminación de conservantes con tampones apropiados), a continuación se añade el elemento de biorreconocimiento (anticuerpo en este caso), se incuba mediante agitación según el tiempo y temperatura que se aconseje en el protocolo comercial y finalmente se elimina el anticuerpo en exceso con la ayuda de un campo magnético. Los siguientes pasos para llevar a cabo la reacción de competición se llevan a cabo de modo similar, como se muestra en el siguiente esquema:

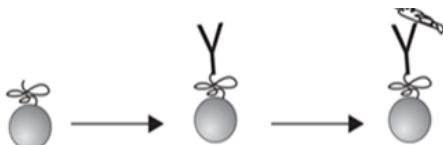


Figura 5: Esquema de trabajo sobre partículas magnéticas funcionalizadas con grupos reactivos

1.4. APPLICACIÓN DE LOS ELECTRODOS SERIGRAFIADOS EN LA FABRICACIÓN DE INMUNOSENSORES.

Desde principio de los años 90 la tecnología de serigrafiado (*screen-printing technology*) ha sido muy utilizada en la industria microelectrónica para aplicaciones electroquímicas [40].

Los electrodos serigrafiados (SPEs), son el equivalente miniaturizado de una célula electroquímica tradicional que incluye tres electrodos: electrodo de trabajo (ET), electrodo de referencia (ER) y electrodo auxiliar (EA). Los SPEs se fabrican mediante la impresión de diferentes tipos de tintas conductoras sobre sustratos de cerámica o de plástico. Si la tinta utilizada para el electrodo de trabajo es de carbono se conocen como ***screen-printed carbon electrodes (SPCEs)***.

En la mayoría de los casos el material del electrodo de trabajo (ET) proviene de tintas con base de carbono (grafito), debido a su bajo coste frente a tintas que contienen partículas metálicas de oro, plata, platino, etc, y a sus buenas propiedades electroquímicas (amplia ventana de electroactividad, velocidad rápida de transferencia de electrones sobre todo con moléculas orgánicas, etc).

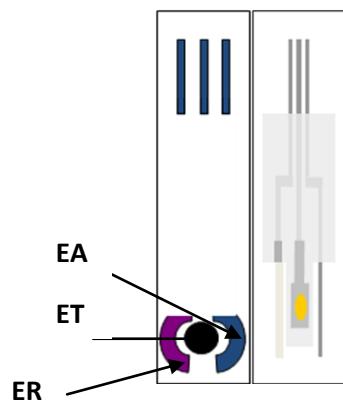


Figura 6: Electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs)

El uso de SPCEs permite la producción de electrodos en masa de forma más económica y reproducible [32]. Además debido a su pequeño tamaño, las determinaciones electroanalíticas requieren microvolúmenes (unos 60 μl) para cubrir completamente la superficie de los 3 electrodos, lo que reduce el consumo de reactivos, del orden de diez veces comparado con los métodos ELISA, permitiendo así la **miniaturización de la celda electroquímica** y del propio sensor.

En la bibliografía aparecen varios inmunosensores electroquímicos en los que se utilizan los SPCEs para la determinación de DON o de otros tipos de micotoxinas (aflatoxinas [41] u ocratoxina [42]), pero aun son escasos los inmunosensores electroquímicos que existen para el DON que utilizan los SPCEs como transductor electroquímico.

Uno de estos inmunosensores para DON recogidos en la bibliografía se trata de un ensayo realizado sobre una placa típica de un ELISA con detección electroquímica sobre los SPCEs. Se trata de un inmunosensor indirecto en el que se lleva a cabo la inmovilización de un conjugado de DON con albúmina sérica humana (HSA) con el que ha sido posible de forma satisfactoria la determinación de la concentración de DON de muestras de trigo y de alimentos de origen cereal [32].

Capítulo 2: OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo de investigación se centra en el **estudio de la reacción de afinidad entre el deoxinivalenol y un anticuerpo policlonal selectivo a esta molécula** para desarrollar un inmunosensor electroquímico competitivo que permita llevar a cabo la determinación de la concentración de DON en muestras de alimentos contaminados.

Teniendo en cuenta este objetivo general, se han formulado los siguientes objetivos más específicos:

1. Estudio **de la reacción de afinidad entre el anticuerpo policlonal y el conjugado DON-HRP mediante la técnica de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)**. Mediante la inmovilización del anticuerpo policlonal queremos estudiar su afinidad, selectividad y especificidad hacia la molécula de DON y hacia el conjugado DON-HRP.
2. Optimización de los diferentes parámetros que tienen un papel importante en el **desarrollo de un ELISA sobre partículas magnéticas**, como por ejemplo concentración de elemento de biorreconocimiento a inmovilizar (anticuerpo policlonal de DON), tiempo y temperatura de inmovilización, tampones usados en las diferentes etapas, tiempo y temperatura de competición, concentración del conjugado (DON-HRP), tiempo de la reacción enzimática, etc.
3. Trasladar las condiciones experimentales optimizadas mediante ELISA al **desarrollo de un inmunosensor electroquímico, basado en el mismo esquema de ensayo** que el que se ha optimizado mediante la técnica espectrofotométrica ELISA, con los sustratos hidroquinona y peróxido de hidrógeno (HQ y H₂O₂). Se ha utilizado la técnica electroquímica de cronoamperometría (CRA) para medir la extensión de la reacción enzimática sobre la superficie del electrodo de trabajo.

Capítulo 3: EXPERIMENTAL

3.1 PROCEDIMIENTO DE CONJUGACIÓN DON-HRP:

La síntesis del conjugado enzimático DON-HRP necesario para llevar a cabo la etapa de competición, se llevó a cabo en nuestro laboratorio según el siguiente procedimiento [43]:

Las conjugaciones **se realizaron en tampón A** [K_3PO_4 (50 mM), NaCl (150 mM) y EDTA (1mM)]. Se preparó a 2 pH diferentes: 7,8 y 6,8.

Primero se llevó a cabo la preparación del conjugado SATA-HRP. Para ello 1 mg SATA (N-succinimidil S-acetiltioacetato) fue disuelto en 50 μ l DMF y se mezcló con una disolución de HRP (1 mg ml⁻¹) en tampón A (pH 7,8) añadiendo la disolución de SATA sobre la de HRP. Se mantuvo durante 1 h con agitación y se realizó una diálisis extensiva para realizar un cambio del tampón A de pH=7,8 a pH = 6,8.

El segundo paso fue la preparación del conjugado DON-PMPI. Se tomó 1 mg de DON y se disolvió en 150 μ l de DMSO. A continuación se disolvieron 4,82 mg de PMPI (p-maleimidofenil isocianato) en 160 μ l de DMSO. Se realizó la mezcla de ambas disoluciones y se mantuvo con agitación durante 1 h a T ambiente.

El conjugado DON-HRP se sintetizó utilizando 130 μ l del complejo DON-PMPI y 1ml del complejo SATA-HRP pH= 6,8 sintetizados. Mantener con agitación durante 2 h a T ambiente.

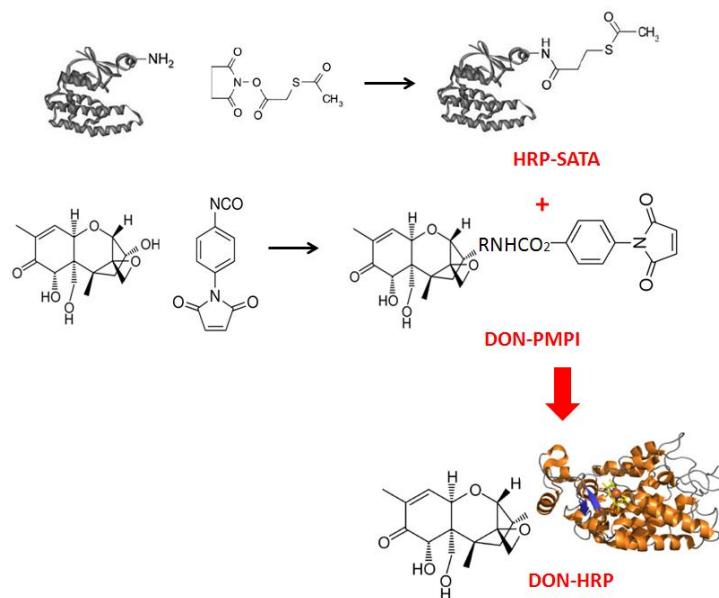


Figura 7: Reacciones necesarias en la síntesis de DON-HRP

El PMPI tiene la función de conjugar los grupos hidroxilo del DON con moléculas que contengan grupos sulfhidrilo. El reactivo SATA se usa para introducir un grupo sulfhidrilo en la enzima HRP, para después reaccionar con los grupos NH₂ de las proteínas y otras moléculas a través de su grupo N-hidroxisuccinimida (NHS). Entonces la HRP tiene un grupo sulfhidrilo protegido que puede ser almacenado sin degradarse. El éster activo NHS en el extremo del SATA permite reaccionar con los grupos amino de las proteínas y formar enlaces amida muy estables.

Para el conjugado sintetizado se ha calculado un **relación molar teórica DON/HRP = 13,48**

3.2 ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE AFINIDAD ENTRE pAbDON Y DON-HRP POR RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (SPR)

Se llevó a cabo el estudio de la reacción de afinidad entre el anticuerpo polyclonal y el DON mediante la técnica de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). Se realizó un esquema directo con inmovilización del anticuerpo sobre la superficie del chip, de la misma forma que se ha diseñado el inmunosensor electroquímico. Esta técnica no necesita de etiquetado enzimático para la transducción óptica de la medida.

Mediante la técnica SPR se produce un cambio de frecuencia debido al cambio de masa sobre la superficie del chip, por lo tanto, cuando se produce interacción entre el anticuerpo y el DON o el conjugado DON-HRP se observa un aumento de la señal registrada.

3.2.1 Materiales e instrumentación

- Biacore T200 (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England)



Figura 8: Instrumento de Resonancia de Plasmón Superficial (Biacore T200)

- Chip Serie S CM5 (superficie de oro recubierta de dextrano)



Figura 9: Chip Serie S CM5

- Micropipetas 5-50 µl, 50-200 µl y 200-1000 µl (Crison, Barcelona, España)
- Agitador tipo Vortex (Reax-control)

3.2.2 Reactivos y tampones

Reactivos de inmunoensayo:

- Anticuerpo policlonal selectivo a DON (pAbDON, 1000 mg l⁻¹. D01F-1 lote 1, Antiprot)
- Deoxinivalenol, >98 % (Sigma-Aldrich, referencia D0156)
- Enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). EC Nº 1.11.1.7 (Sigma-Aldrich)
- Conjugado DON-HRP (sintetizado en nuestro laboratorio)
- Albúmina serica bovina (BSA) EC Nº 232-936-2 (Sigma-Aldrich)

Reactivos de uso general:

- 1-Etil-3-(3-dimetillaminopropil)carbodiimida (EDC)
- N-hidroxisuccinimida (NHS)
- Etanolamina
- Agua MilliQ

Tampones:

- *Running Buffer*: HBS-EP, pH 7,4, HEPES (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (3 mM), Polysorbate20 (0.005%)
- Tampón de inmovilización: Acetato (0,1 M, pH 4).

3.2.3 Procedimiento experimental:

- Inmovilización pAbDON sobre la superficie del chip (dextrano)

Para llevar a cabo la inmovilización del elemento de biorreconocimiento sobre la superficie del chip fueron necesarias 3 etapas. En primer lugar se activó la superficie de dextrano del chip (método de la carbodiimida) mediante inyección manual de 50 µl de la mezcla EDC (200 mM) + NHS (50 mM). Tras la etapa de activación se injectó el pAbDON (1 µl en 130 µl tampón de inmovilización) a una velocidad de 10 µl/min durante 600 s.

Para finalizar correctamente la inmovilización del pAbDON se llevó a cabo el bloqueo de los sitios libres del chip con 60 µl de etanolamina (1 M pH 8,5) para evitar posibles uniones inespecíficas posteriores.

- Estudio de la reacción de afinidad entre el DON y DON-HRP con el anticuerpo policlonal

Para llevar a cabo el estudio de la reacción de afinidad entre el DON o DON-HRP con pAbDON fue necesaria la inyección de una disolución de DON para comprobar si existe unión al pAbDON inmovilizado. Para ello se realizaron inyecciones de DON (0 a 2 mg l⁻¹) en *Running Buffer*.

Además también se realizó el estudio con inyecciones de DON-HRP (concentración de DON de 0 a 2 mg l⁻¹) en *Running Buffer*.

3.2.4 Resultados y discusión:

- Inmovilización de pAbDON:

Tras las etapas de inmovilización de pAbDON sobre la superficie de dextrano del chip se obtuvo una señal de **7328,3 RU** correspondiente a la correcta inmovilización del anticuerpo.

A continuación se adjunta el sensograma de la inmovilización del pAbDON.

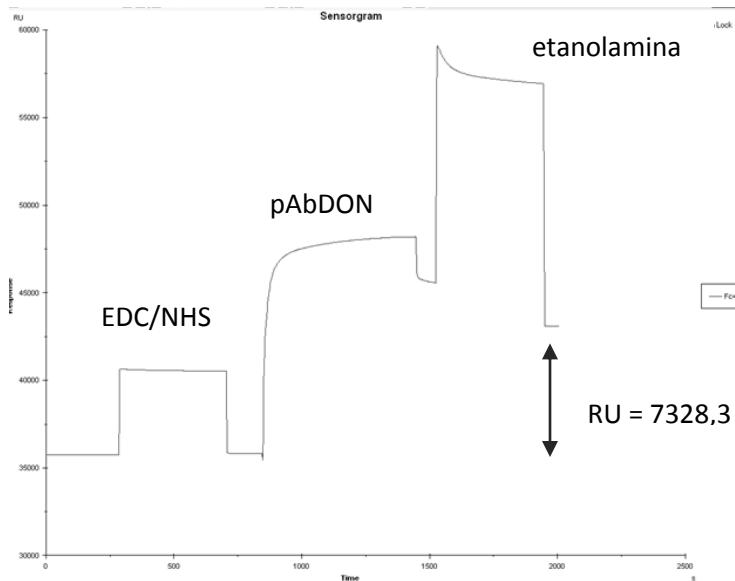


Figura 10: Sensograma obtenido en el proceso de inmovilización de pAbDON sobre el dextrano del chip CM5 en tampón acetato (0,1 M) pH 4

Una señal de inmovilización de 7328,3 RU es una señal adecuada para el estudio de la reacción de afinidad entre el DON y DON-HRP con el anticuerpo polyclonal.

- Estudio de la reacción de afinidad entre el DON y DON-HRP con el anticuerpo polyclonal

En primer lugar se estudió la reacción de **afinidad del DON por el anticuerpo inmovilizado** sobre la superficie del chip CM5, obteniéndose baja señal para todas las concentraciones de DON estudiadas ($\text{RU} < 4,5$). En principio, puede significar que existe una baja afinidad entre el DON y el anticuerpo polyclonal. Estas señales tan bajas también pueden ser debidas [28] al bajo peso molecular del DON (296,32 Da) y por lo tanto que el instrumento no sea capaz de detectar con la suficiente sensibilidad la presencia de esta molécula sobre la superficie del chip, y mucho menos de discernir entre las diferentes concentraciones.

Además se llevó a cabo el estudio de la reacción de afinidad de la HRP (PM = 44 kDa) sobre el pAbDON inmovilizado, para evaluar las posibles uniones inespecíficas producidas con el conjugado

DON-HRP. Se obtuvieron señales muy pequeñas ($\text{RU} < 3,8$) para todas las concentraciones de HRP estudiadas, por lo que se puede asegurar que **no existe afinidad entre la enzima HRP y el pAbDON**.

El siguiente paso fue comprobar la **afinidad del DON-HRP con el pAbDON**. Para ello se estudiaron varias concentraciones de DON-HRP en el rango de concentraciones entre 0 y 2 mg l^{-1} .

Los valores obtenidos (RU) para cada concentración estudiada se representan a continuación:

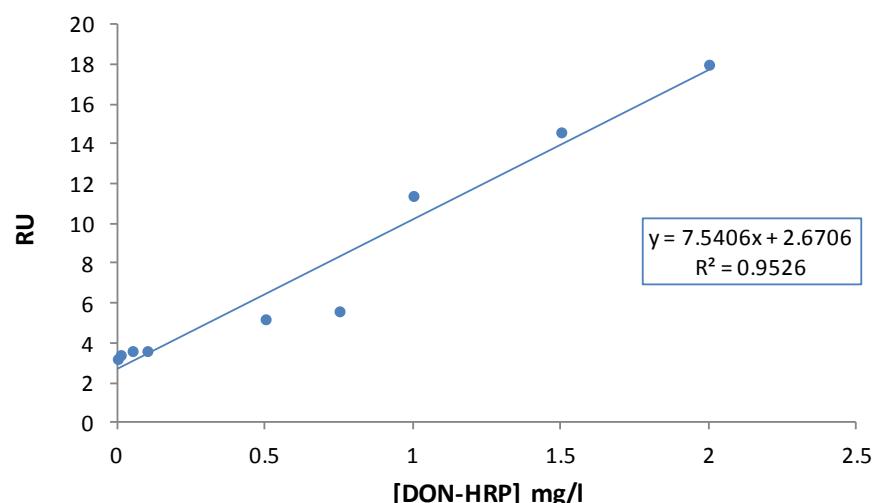


Figura 11: Ajuste lineal de las RU frente a DON-HRP ($0-2 \text{ mg l}^{-1}$) sobre pAbDON inmovilizado sobre el dextrano del chip CM5 en running buffer

Pese a obtenerse señales pequeñas se observó un aumento proporcional con el aumento de la concentración de DON-HRP con lo que puede afirmarse que existe **reacción de afinidad entre el DON-HRP y el anticuerpo policlonal selectivo a este analito**.

Se obtuvo una señal máxima de 18 RU para la concentración máxima de DON-HRP. Con el calibrado realizado se ha logrado un ajuste lineal con **un coeficiente de regresión lineal de 0,9760**.

3.3 ESTUDIO DE LA REACCIÓN COMPETITIVA ENTRE DON-HRP Y DON MEDIANTE ELISA ESPECTROFOTOMÉTRICO (CONVENCIONAL Y CON PARTÍCULAS MAGNÉTICAS)

En este apartado se describe la caracterización de la reacción de afinidad entre el anticuerpo policlonal y el DON y DON-HRP mediante la técnica espectrofotométrica ELISA. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron dos formatos diferentes de inmunoensayo, siendo los dos esquemas directos.

En el primero de ellos se realizó la inmovilización del elemento de biorreconocimiento **sobre la superficie de poliestireno de los pocillos ELISA** y a continuación se añadió el DON o DON-HRP en las concentraciones adecuadas para realizar las etapas de incubación. Posteriormente se añadió el sustrato de la reacción enzimática y en último lugar se paralizó dicha reacción y se llevó a cabo la detección espectrofotométrica a 450 nm.

En el segundo de los esquemas de trabajo que aquí se proponen se utilizaron **partículas magnéticas modificadas con grupos tosilo (MBs-To)** como superficie sólida para llevar a cabo la etapa de inmovilización del anticuerpo policlonal. Para ello fue necesario bloquear la superficie de poliestireno en primer lugar, y a continuación se llevaron a cabo las reacciones del inmunoensayo en el pocillo ELISA con las partículas magnéticas modificadas con el biorreactivo.

3.3.1 Materiales e instrumentación

- Lector de placas espectrofotométrico para ELISA (Biorad microplat reader, Modelo 680)



Figura 12: Lector de placas ELISA (Biorad microplat reader, Modelo 680)

- Placas ELISA de poliestireno 96 pocillos, con fondo liso (IWAKI, Japón)
- Micropipeta automática 8 canales (Labopette electronic, 5-100 µl)
- Micropipetas 5-50 µl, 50-200 µl y 200-1000 µl (Crison, Barcelona, España)
- Agitador tipo Vortex (Reax-control)
- Agitador Thermomixer Compact, para 24 viales eppendorf (Eppendorf Ibérica, Madrid, España)
- Separador magnético Z5342 (Promega, Madison, USA)

3.3.2 Reactivos y tampones

Reactivos de inmunoensayo:

- Micropartículas magnéticas Dynabeads Tosylactivated, MBs-To (30 mg ml⁻¹, Ø=2,8 µm) (Invitrogen)
- Deoxinivalenol (Sigma-Aldrich, >98 %, referencia D0156)
- Anticuerpo policlonal selectivo a DON (pAbDON, 1000 mg l⁻¹, D01F-1, lote 1, Antiprot)
- Conjugado DON-HRP (sintetizado en nuestro laboratorio)

Reactivos de uso general:

- Sales de sodio: NaHCO₃, Na₂CO₃, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl...
- Caseinato de sodio (Sigma Aldrich)
- Albúmina serica bovina (BSA) EC Number 232-936-2 (Sigma-Aldrich)
- 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina, TMB (Sigma-Aldrich)
- H₂SO₄ 95-97% (Merck, Madrid, España)
- Tween20 (Sigma-Aldrich)
- Agua Milli Q

Tampones:

- Tampón carbonato (CB): HCO₃⁻/CO₃⁻² 0,05M pH= 9,6
- Tampón fosfato (PBS): HPO₄⁻²/H₂PO₄⁻ (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4
- Tampón lavado (PBST): PBS con Tween20 (0,02% m/v)
- Tampón almacén: PBS con BSA (0,1 % m/v)

3.3.3 Procedimiento experimental***- ELISA convencional***

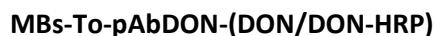
Se seleccionó esta técnica espectrofotométrica para estudiar la reacción de afinidad entre el pAbDON y el analito de interés DON, así como con el conjugado DON-HRP.

El procedimiento de trabajo [15] se recoge en el *Anexo I*.

- ELISA con partículas magnéticas

Se realizó un ensayo ELISA utilizando partículas magnéticas como superficie sólida donde se produce la etapa de inmovilización del elemento de biorreconocimiento (pAbDON). Se trabajó con partículas magnéticas modificadas con el grupo Tosilo de la casa comercial Invitrogen que permitió llevar a cabo la etapa de inmovilización del pAbDON.

El esquema de trabajo en este caso fue:



Se trata del esquema de un inmunosensor directo competitivo, por lo que el primer paso es la inmovilización del anticuerpo (elemento de biorreconocimiento) sobre las partículas magnéticas funcionalizadas con el grupo tosilo (MBs-To). Posteriormente se realizó una incubación competitiva entre DON y DON-HRP. El protocolo de inmovilización y reacciones posteriores se recogen en el *Anexo I*.

3.3.4 Resultados y discusión:

- ELISA convencional:

En el estudio de la reacción de biorreconocimiento del pAbDON con el conjugado DON-HRP, de forma general se observó que con el aumento de las concentraciones de pAbDON y DON-HRP se consiguen mayores valores de absorbancia, y conforme éstas van disminuyendo también lo hace la absorbancia, pero los valores obtenidos son demasiado bajos.

Se repitió el ensayo en las mismas condiciones, pero aplicando las siguientes variaciones [11, 14] con respecto al protocolo inicial de trabajo que se recoge en el *Anexo I: inmovilizar el anticuerpo sin agitación y a 4°C durante 24 h, y aumentar el tiempo de incubación del DON-HRP a 1 h.*

Los resultados obtenidos tras aplicar las variaciones fueron:

DON-HRP (mg l ⁻¹)	pAbDON (mg l ⁻¹)					
	2	1	0,5	0,25	0,125	0
5	0,866	0,533	0,508	0,363	0,437	0,374
2,5	0,417	0,204	0,173	0,143	0,094	0,114
1,25	0,318	0,115	0,053	0,030	0,050	0,022
0,625	0,348	0,040	0,028	0,005	0,006	0,005
0	0,066	0,042	0,007	0,003	-0,009	-0,012

Tabla 3: Resultados de absorbancia obtenidos inmovilizando pAbDON 24 h sin agitación y a T=4°C, utilizando CB (pH=9,6), bloqueo con caseínato (2% m/v) 30 min, incubación DON-HRP 1 h en PBS, 50 µl TMB 20 minutos a T ambiente, y 50 µl H₂SO₄ 0,5 M para parar la reacción. Medida absorbancia 450 nm.

Con las modificaciones realizadas sobre el procedimiento inicial se observó **un aumento considerable de las señales de absorbancia, con lo cual se consigue una mayor sensibilidad en las medidas.**



Figura 13: Fotografía del ensayo ELISA anterior tras la reacción con TMB

Con estos resultados experimentales se pudo comprobar la reacción de afinidad entre el pAbDON y el DON-HRP, sin tener en cuenta la etapa de competición posterior. Se observó, no obstante, una elevada unión no específica cuando no hay pAbDON sobre la superficie del pocillo (0,374 unidades de absorbancia para una concentración de DON-HRP de 5 mg l⁻¹).

-ELISA con partículas magnéticas:**- Optimización del volumen de MBs-To-pAbDON**

El volumen de partículas magnéticas que se utiliza en el ensayo *ELISA* inmunomagnético debe ser optimizado previamente ya que influye directamente en la cantidad de sitios de unión del anticuerpo y en su relación con la concentración necesaria del trazador DON-HRP. Para su optimización se ensayaron **volúmenes que oscilan entre 10 y 50 µl, añadiendo concentraciones crecientes de conjugado enzimático DON-HRP**. Al trabajar con un volumen pequeño de partículas magnéticas (10 µl) se observó que existe un gran exceso de DON-HRP unido sobre las MBs-To-pAbDON, provocando que no pueda eliminarse por completo en los lavados y no pueda medirse la absorbancia para altas concentraciones de DON-HRP. Por el contrario, con volúmenes mayores de MBs-To-pAbDON se necesita mayor cantidad de DON-HRP en el medio para completar todos los sitios de unión del anticuerpo.

Los mejores resultados observados se consiguieron para los volúmenes de 15 µl (0,06 µg pAbDON) y 20 µl (0,08 µg pAbDON). Se va fijar como **volumen óptimo 15 µl de MBs-To-pAbDON (0,06 µg pAbDON)**.

- Optimización de la concentración de DON-HRP:

La concentración de DON-HRP en relación a los sitios de unión del anticuerpo es el parámetro más importante para la optimización del inmunosensor. La concentración óptima (teórica) de DON-HRP es aquella que es equimolecular con el número de sitios de unión útiles del pAbDON en ausencia de DON.

Un exceso en la concentración de DON-HRP dificultará la etapa de competición entre el DON y DON-HRP. Otro efecto que puede provocar este exceso de DON-HRP es la presencia de una elevada unión no específica sobre las MBs-To a través de HRP por uniones hidrofóbicas. Si por el contrario el DON-HRP está en defecto en el esquema del inmunosensor, se conseguirá una menor señal y por lo tanto menor sensibilidad.

Para la optimización de la concentración de DON-HRP en relación con la concentración de pAbDON inmovilizada, se ensayó un rango de concentraciones de DON-HRP entre 0 y 1 mg l⁻¹:

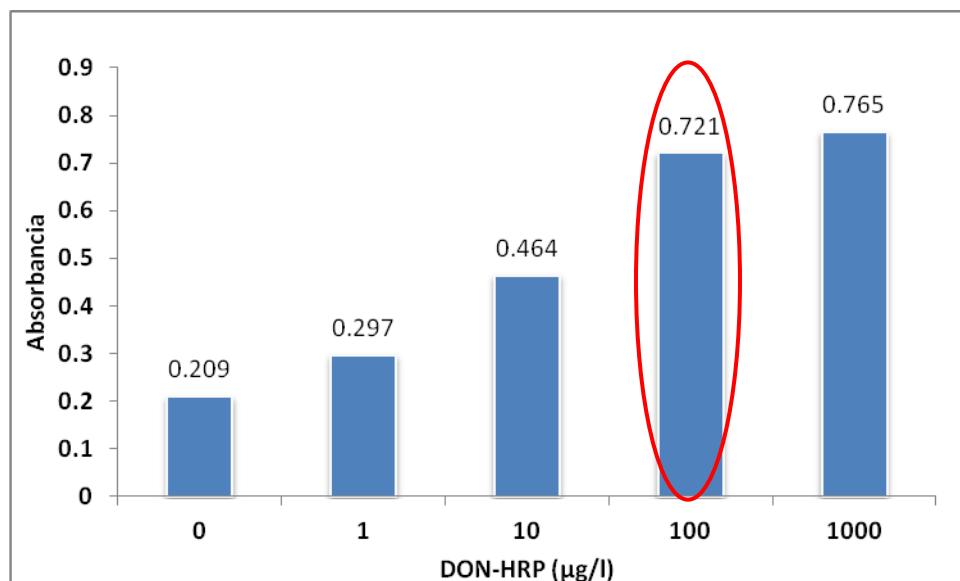


Figura 14: Resultados de absorbancia obtenidos en las experiencias anteriores, con $0,06 \mu\text{g pAbDON}$ y diferentes concentraciones de DON-HRP ($0 - 1 \text{ mg l}^{-1}$). Revelado $50 \mu\text{l TMB}$ 20 minutos a T ambiente, y $50 \mu\text{l H}_2\text{SO}_4 0,5 \text{ M}$ para parar la reacción. Medida absorbancia 450 nm.

A la vista de los resultados recogidos en la Figura 14 se puede decir que el **pAbDON está saturado a partir de DON-HRP ($100 \mu\text{g l}^{-1}$)**, por lo que no es necesario añadir una mayor concentración.

Se evaluaron diferentes concentraciones de DON-HRP en torno a **$100 \mu\text{g l}^{-1} (0,06-0,18 \text{ mg l}^{-1})$ en presencia y ausencia de DON libre**. Se busca que la diferencia de señales obtenidas en ausencia y en presencia de DON sea la máxima posible, lo que demostraría que hay reacción de afinidad entre el DON-HRP y el pAbDON. Si además se produce reacción de afinidad en presencia de DON, se verifica la etapa de competición del inmunoensayo.

La absorbancia fue medida a 450 nm para las diferentes concentraciones de DON-HRP estudiadas. En todos los casos, en presencia de una concentración de DON de 5 mg l^{-1} , se observó una disminución de la absorbancia medida superior a 0,1 unidades, lo que demuestra que se produce la etapa de reconocimiento y competición para todos los valores de concentraciones de DON-HRP.

En la Figura 15 se pueden ver los resultados obtenidos:

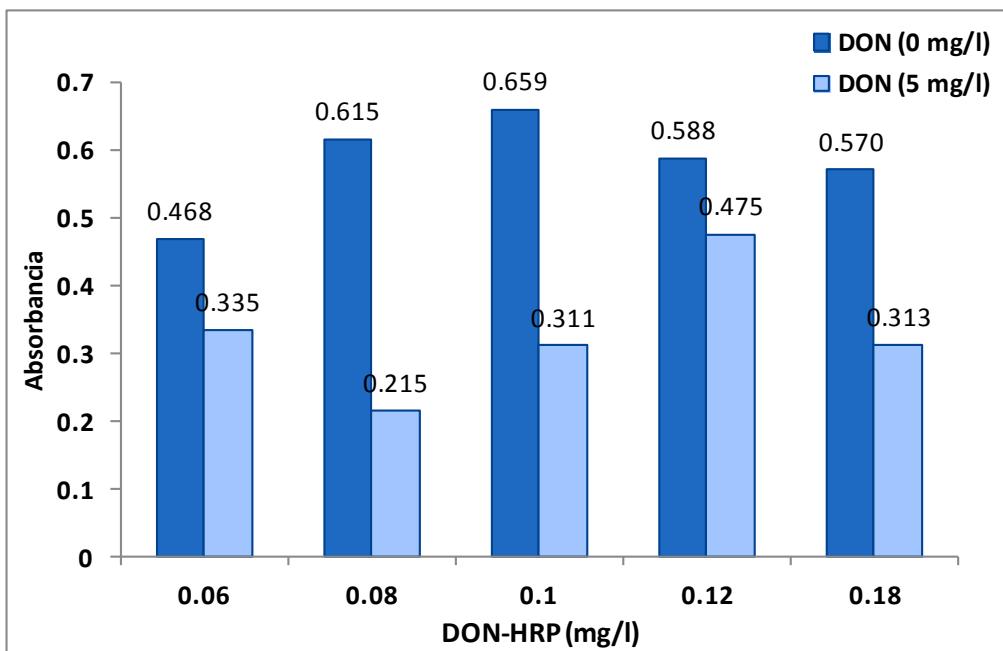


Figura 15: Comparativa de resultados de absorbancia obtenidos de las experiencias competitivas, con diferentes concentraciones DON-HRP, 0,06 µg pAbDON y experiencias con y sin DON. Revelado 50 µl TMB 20 minutos a T ambiente, y 50 µl H₂SO₄ 0.5 M. Medida absorbancia 450 nm.

Las mayores diferencias en la medida de la absorbancia se obtuvieron al trabajar con concentraciones de **DON-HRP de 0,08 mg l⁻¹ y 0,1 mg l⁻¹** con unos porcentajes de disminución de la señal de 65% y 53% respectivamente.

En principio no se descartó trabajar con ninguna de las 2 concentraciones de DON-HRP seleccionadas.

- Calibrado competitivo de DON:

Una vez optimizados los parámetros anteriores que permanecen fijos en el inmunosensor, se realizó un calibrado para concentraciones crecientes de DON en el rango 0 - 0,1 mg l⁻¹, para cada una de las 2 concentraciones de DON-HRP elegidas como óptimas **0,08 mg l⁻¹ y 0,1 mg l⁻¹:**

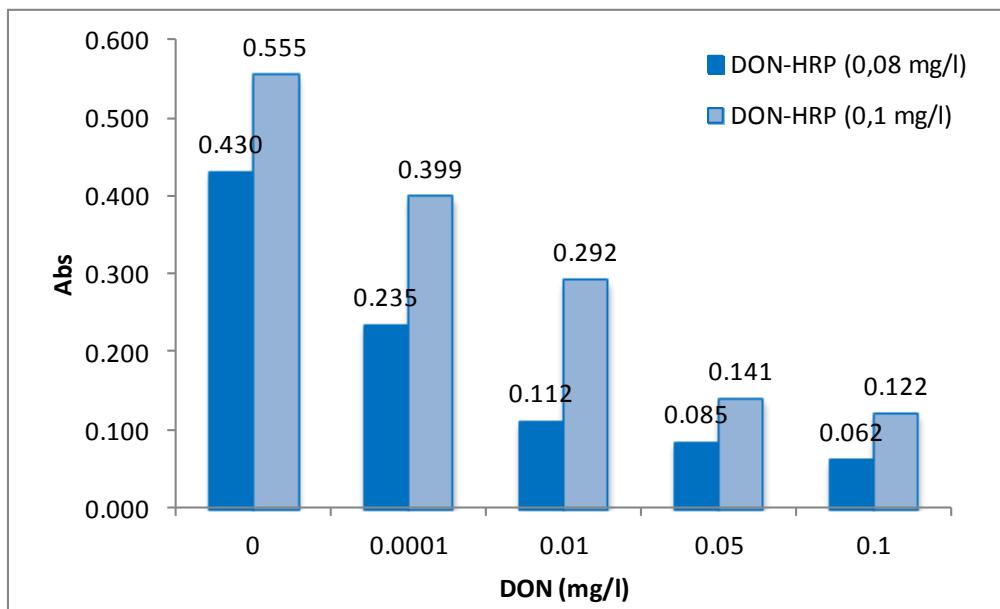


Figura 16: Resultados de absorbancia obtenidos de los calibrados competitivos, 0,06 µg pAbDON, DON-HRP (0,08 y 0,1mg l⁻¹). Revelado 50 µl TMB 20 minutos a T ambiente, y 50 µl H₂SO₄ 0.5 M.
Medida absorbancia 450 nm.

Los datos se ajustaron a una **curva sigmoidea** haciendo uso de la ecuación de los cuatro parámetros logísticos 4PL (ajuste típico en experiencias competitivas de este tipo) :

$$y = m_1 + \frac{(m_2 - m_1)}{(1 + \frac{x}{m_3})^{m_4}}$$

Donde:

m_1 = mínimo de señal de absorbancia

m_2 = máximo de señal de absorbancia

m_3 = punto de inflexión (factor EC₅₀)

m_4 = pendiente del tramo recto

El ajuste de los resultados obtenidos en los calibrados anteriores para ambas concentraciones de DON-HRP se muestra en la Figura 17:

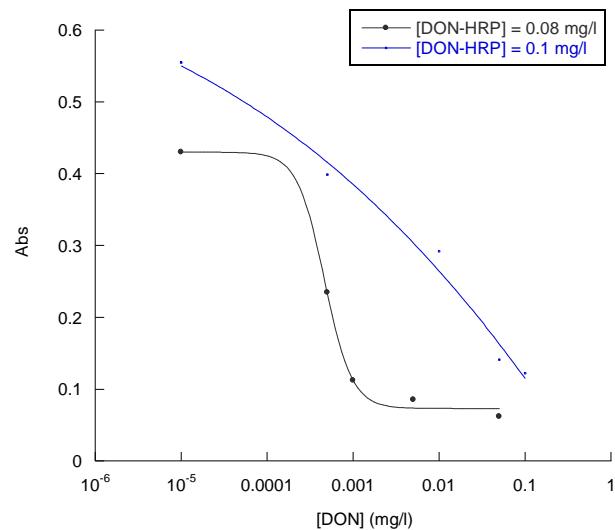


Figura 17: Ajuste sigmoideo los calibrados competitivos, 0,06 µg pAbDON, DON-HRP (0,08 y 0,1 mg l⁻¹). Revelado 50 µl TMB 20 minutos a T ambiente, y 50 µl H₂SO₄ 0,5 M. Medida absorbancia 450 nm.

Los parámetros obtenidos en el ajuste de ambas curvas son:

[DON-HRP] mg l ⁻¹	Abs max	Abs mín	Pendiente	EC ₅₀ (mg l ⁻¹)	R
0,08	0,430	0,073	-2,733	0,0005	0,9986
0,1	0,736	-1,661	0,155	89,11	0,9939

Tabla 4: Parámetros obtenidos en el ajuste sigmoideo

El mejor ajuste sigmoideo se obtuvo para una concentración de DON-HRP de 0,08 mg l⁻¹, consiguiendo un IC₅₀ de 0,0005 mg l⁻¹ y **un valor de sensibilidad (pendiente del tramo recto) de 2,733 l mg⁻¹**.

Por lo tanto, viendo los resultados obtenidos podemos concluir que realizando un calibrado competitivo utilizando **15 µl de MBs-To-pAbDON (0,06 µg pAbDON) y DON-HRP (0,08 mg l⁻¹) para concentraciones de DON (0- 0,1 mg l⁻¹)** se alcanza una elevada sensibilidad y se puede determinar una concentración de DON muy baja.

Además se observó que para concentraciones de DON mayores, la tendencia seguida se perdía, es decir, la reacción de **competición no es posible para concentraciones de DON superiores a 0,1 mg l⁻¹**.

3.4 ESTUDIO DE LA REACCIÓN COMPETITIVA ENTRE DON Y DON-HRP SOBRE pAbDON INMOVILIZADO SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Después del estudio y optimización mediante *ELISA* espectrofotométrico [44] se trasladaron las condiciones optimizadas para la determinación de DON mediante transducción electroquímica.

Se trata de un inmunosensor directo competitivo que se resume en:

MBs-pAbDON-(DON/DON-HRP)

Una vez que todas las reacciones se han llevado a cabo de forma semejante a las reacciones descritas en el *ELISA* magnético y tras las correspondientes etapas de lavado, el conjugado formado se resuspendió en un volumen pequeño (15 µl) consiguiendo así la **concentración de los reactivos sobre la superficie de la partícula**. Este pequeño volumen será el que se mida sobre el electrodo serigrafiado mediante una reacción electroquímica, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 18.

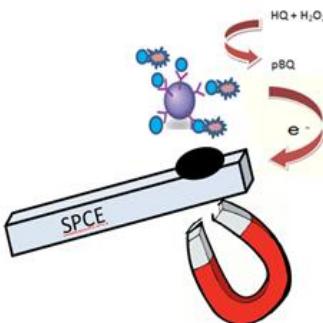


Figura 18: Esquema del inmunosensor electroquímico competitivo para DON

La reacción que se produce sobre el SPCE, consiste en una reacción enzimática (10 min) en la que la HRP del conjugado realiza la oxidación de la HQ a *p*-Benzoquinona (*p*BQ) en presencia de H₂O₂. Una vez oxidada la HQ, y por acción del barrido de potencial (o salto del impulso de potencial en cronoamperometría) se produce de nuevo la reducción de *p*BQ a HQ. En cronoamperometría se realizó la medida a los 80 s (señal estable) de aplicar un salto de potencial de 0 a -0,25 V, produciéndose la reducción catódica de la *p*BQ.

3.4.1 Reactivos e instrumentación

- Potenciómetro Autolab PGSTAT12, (Nº serie AUT71572)



Figura 19: Potenciómetro Autolab PGSTAT12

- SPCEs cerámicos (DropSens, Asturias, España)
- Agitador tipo Vortex (Reax-control)
- Agitador Thermomixer Compact, para 24 viales eppendorf (Eppendorf Ibérica, Madrid, España)
- Viales tipo *eppendorf* (500 y 1500 µl)
- Separador magnético Z5342 (Promega, Madison, USA)

3.4.2 Reactivos y tampones

Reactivos de inmunoensayo:

- Micropartículas magnéticas Dynabeads Tosylactivated, MBs-To (30 mg ml^{-1} , $\varnothing=2,8 \mu\text{m}$) (Invitrogen)
- Micropartículas magnéticas Dynabeads M-280 Sheep anti-rabbit IgG, MBs-algG (10 mg ml^{-1} , $\varnothing=2,8 \mu\text{m}$) (Invitrogen)
- Micropartículas magnéticas Dynabeads MyOne Carboxylic Acid, MBs-COOH (10 mg ml^{-1} , $\varnothing=1 \mu\text{m}$) (Invitrogen)
- Deoxinivalenol (Sigma-Aldrich, referencia D0156)
- Anticuerpo policlonal selectivo a DON (pAbDON), 1000 mg l^{-1} . D01F-1 lote 1 (Antiprot)
- Conjugado DON-HRP (sintetizado en nuestro laboratorio)
- Enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). EC Nº 1.11.1.7 (Sigma Aldrich)
- Extravidina Peroxidasa, eaHRP (Sigma-Aldrich)
- Albúmina serica bovina (BSA) EC Number 232-936-2 (Sigma-Aldrich)

Reactivos de uso general:

- Sales de sodio: NaH_2PO_3 , Na_2HPO_3 , NaCl ...
- Tween20 (Sigma-Aldrich)
- Agua Milli Q
- Hidroquinona (HQ), (Sigma-Aldrich)
- H_2O_2 30% (Sigma-Aldrich)

Tampones y disoluciones:

Para cada una de las partículas magnéticas, se recomienda el uso de unos tampones muy específicos, que se muestran en los anexos correspondientes junto a cada protocolo de trabajo.

3.4.3. Procedimiento experimental:

- Optimización de las condiciones de la reacción enzimática sobre el SPCE:

Las condiciones electroquímicas y las concentraciones de los sustratos del enzima HRP (HQ y H_2O_2) fueron optimizadas para obtener la mayor sensibilidad posible en la etapa de transducción electroquímica.

Debido a la inestabilidad de la HQ en disolución se va a utilizar una concentración relativamente baja. En la bibliografía [14, 45] se utiliza preferentemente una **concentración de HQ de 1,8 mM**, además de pasar una corriente de N₂ previamente y mantenerla en la oscuridad mientras se lleva a cabo el análisis. La HQ se oxida rápidamente en medios alcalinos (oxidación instantánea pH > 7), por ello la etapa de detección amperométrica se ha decidido realizar a un pH de 6,5 que aumenta la actividad enzimática de la HRP a la vez que previene en parte la oxidación de la HQ.

- *Inmunosensor con partículas magnéticas funcionalizadas con el grupo Tosilo (MBs-To)*

Tras la optimización de las condiciones del inmunosensor mediante ELISA magnético con el esquema MBs-To-pAbDON-DON-HRP/DON se quiere trasladar su medida a la técnica de cronoamperometría.

El procedimiento de inmovilización del pAbDON sobre las MBs-To y las reacciones posteriores se detalla en el *Anexo II*.

- *Inmunosensor con partículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo genérico (MBs-algG)*

Además del uso de MBs-To se decidió estudiar otros posibles esquemas directos competitivos utilizando otras partículas magnéticas modificadas con diferentes grupos reactivos. En este caso se utilizaron MBs funcionalizadas con un anticuerpo genérico algG.

El protocolo de trabajo llevado a cabo se resume en el *Anexo III*.

- *Inmunosensor con partículas magnéticas modificadas con grupos carboxilos (MBS-COOH)*

Con el objetivo de encontrar las condiciones de trabajo que proporcionen los mejores resultados, se llevó a cabo un nuevo esquema en el que el pAbDON se inmovilizó sobre partículas magnéticas modificadas con grupos carboxilos (MBS-COOH) y que por lo tanto tienen capacidad de unirse mediante enlace amida al grupo amino de los anticuerpos por el procedimiento de la carbodiimida.

El protocolo de trabajo que se realizó se resume en el *Anexo IV*.

3.4.4 Resultados y discusión:

- *Optimización de las condiciones de la reacción enzimática sobre el SPCE:*

Con el fin de caracterizar electroquímicamente uno de los sustratos de la reacción enzimática, se realizó una voltametría cíclica con HQ (1,8 mM) en las siguientes condiciones:

- Potencial inicial -0,6 V

- Potencial final: 1 V
- Velocidad de barrido de potencial: 50 mV s^{-1}

Con la voltametría cíclica realizada en primer lugar se provocó la oxidación de la HQ para posteriormente llevar a cabo la reducción, de igual forma que se realizará en la etapa final del inmunosensor sobre el SPCE.

El voltágrafo cíclico obtenido fue:

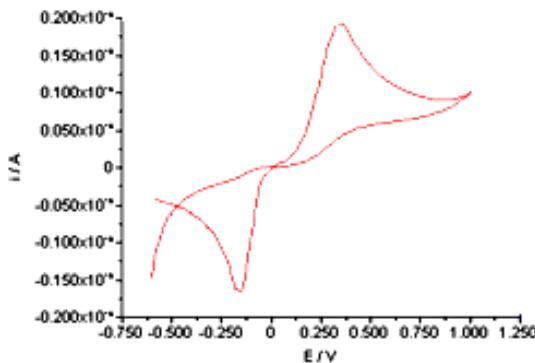


Figura 20: Voltametría cíclica HQ (1,8 mM) de -0,6 a 1 V a 50 mV s^{-1}

Con este voltágrafo se seleccionó el salto de potencial óptimo para realizar cronoamperometría para ello se tomó la posición del pico catódico (-0,16 V) y se eligió un **salto de potencial de 0 a -0,25 V (reducción)**. Es importante observar que al potencial inicial de la medida cronoamperométrica (0 V) todavía no se ha producido la oxidación electroquímica de la HQ debido a la irreversibilidad (separación de los picos anódico y catódico) del voltágrafo cíclico.

- Optimización concentración H_2O_2 :

Se realizaron diferentes experiencias para optimizar las concentraciones de reacción de la peroxidasa con HQ y H_2O_2 por cronomaperometría (salto de potencial desde 0 hasta -0,25 V). En primer lugar se evalúo la **reacción en ausencia del enzima** para constatar que la reacción no puede tener lugar.

Los valores de intensidad obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

EXPERIENCIA	Sin HQ	Con HQ (1,8 mM)
	I (μ A)	I (μ A)
H_2O_2 (0 mM)	-0,059	-0,134
H_2O_2 (0,4 mM)	-0,068	-0,110
H_2O_2 (0,6 mM)	-0,073	-0,085
H_2O_2 (1 mM)	-0,098	-0,142
H_2O_2 (1,8 mM)	-0,102	-0,143
H_2O_2 (2,4 mM)	-0,113	-0,140

Tabla 5: Resultados cronoamperometría entre 0 y -0,25 V con H_2O_2 (0 – 2,4 mM), en ausencia de HQ y con HQ (1,8 mM) y en ausencia de eaHRP

Se observó que la H_2O_2 en solitario, para cualquier concentración no produce señal electroquímica en ausencia de la enzima HRP (corrientes del orden de nA). Cuando se añadió además HQ (1,8 mM) y todavía en ausencia de la enzima HRP la corriente registrada aumenta, pero en principio no se puede considerar interferente (aprox. -0,1 μ A).

Este aumento en el valor de la corriente registrada en presencia de la HQ y el H_2O_2 fue debido a la oxidación espontánea de la HQ en el aire y la posterior reducción de la *p*-benzoquinona (*p*BQ) que se genera sobre la superficie del electrodo de trabajo, lo que demuestra la inestabilidad de la disolución de HQ que es preciso preparar justo antes de cada medida electroquímica.

Otro factor a tener en cuenta es el efecto de la presencia de la HQ o no en contacto con la HRP. En este caso se inmovilizó la enzima (eaHRP comercial, se tomó como patrón de la concentración de HRP) durante 24 h sobre la superficie del electrodo de trabajo (4 μ l) a 4°C, y se midió la corriente generada mediante la técnica de cronoamperometría tras **10 min de reacción enzimática**, contados desde la adición del H_2O_2 sobre el SPCE.

Tras la reacción enzimática catalizada por la HRP se produjo la oxidación de la hidroquinona (HQ) a *p*BQ, y posteriormente se realizó la reducción a HQ sobre el SPCE con el pulso producido con la cronoamperometría.

Los resultados obtenidos son:

EXPERIENCIA	Sin HQ	Con HQ (1,8 mM)
	I (μ A)	I (μ A)
H_2O_2 (0 mM)	-0,057	-0,023
H_2O_2 (0,4 mM)	-0,033	-0,421
H_2O_2 (0,6 mM)	-0,033	-0,831
H_2O_2 (1 mM)	-0,033	-1,52
H_2O_2 (1,8 mM)	-0,023	-2,34
H_2O_2 (2,4 mM)	-0,026	-2,44

Tabla 6: Resultados cronoamperometría entre 0 y -0,25 V con H_2O_2 (0 – 2,4 mM), en ausencia y con HQ (1,8 mM) y en presencia de eaHRP (0,13 μ g) tras 10 min de reacción

Con los resultados de la Tabla 6, quedó demostrado que para que la reacción enzimática se produzca tienen que intervenir los 3 reactivos (enzima + sustrato + mediador de transferencia de carga). En ese caso, se observó un aumento proporcional de la señal con el aumento de la concentración de H_2O_2 hasta la saturación de la señal a partir de H_2O_2 (1,8 mM).

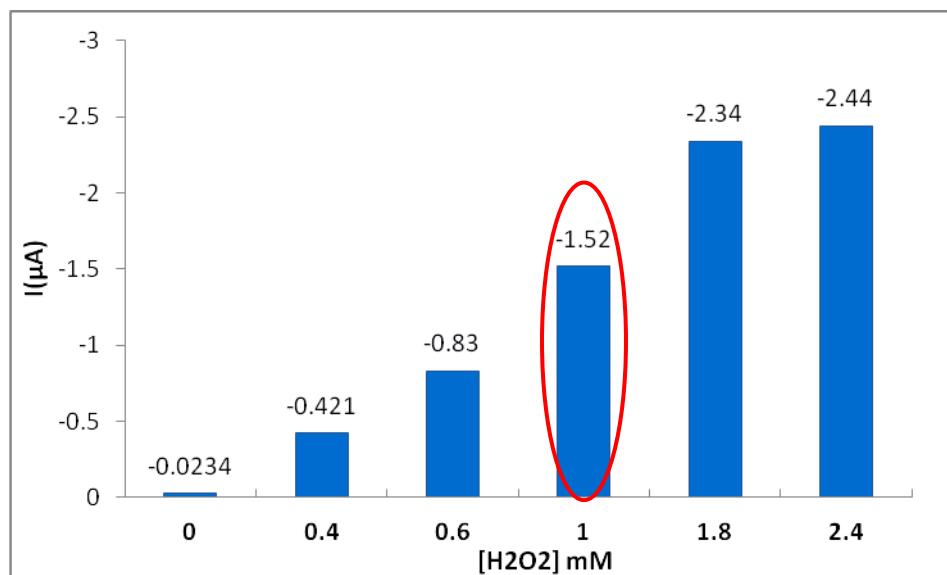


Figura 21: Resultados cronoamperometría entre 0 y -0,25 V con H_2O_2 (0 – 2,4 mM), con HQ (1,8 mM) y en presencia de *ea*HRP (0,13 μg) tras 10 min de reacción

A la vista de los resultados se seleccionó la concentración óptima del H_2O_2 (1 mM).

Las condiciones seleccionadas como óptimas que se van a utilizar en el desarrollo del inmunosensor son:

- HQ (1,8 mM)
- H_2O_2 (1 mM)
- Cronoamperometría (0 a -0,25 V)

Una vez decididas las condiciones se realizó un calibrado con un rango de concentraciones de **HRP entre 0,0001 y 2 mg l⁻¹**, poniendo cantidades crecientes de **DON-HRP** (se inmovilizó la concentración teórica deseada de HRP (DON-HRP) durante 24 h sobre la superficie del electrodo de trabajo (4 μl) a 4°C.

Los resultados obtenidos son:

[HRP] mg/l	Sin HQ	Con HQ (1,8 mM)
	I (μ A)	I (μ A)
0,0001	-0,108	-12,5
0,05	-1,40	-160
1	-1,76	-184
1,5	-2,33	-289
2	-2,55	-279

Tabla 7: Resultados cronoamperometría entre 0 y -0,25 V con H_2O_2 (1 mM), y HQ (1,8 mM) con concentraciones HRP (0,0001-2 mg l⁻¹). Reacción 10 min.

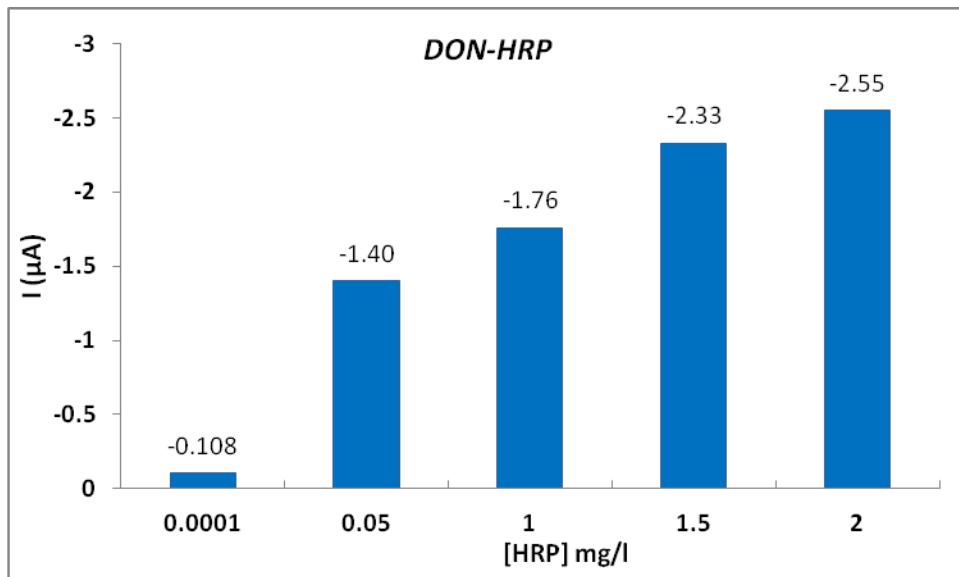


Figura 22: Resultados cronoamperometría entre 0 y -0,25 V con H_2O_2 (1 mM), y HQ (1,8 mM) con concentraciones DON-HRP ([HRP] 0,0001-2 mg l⁻¹). Reacción 10 min.

Se observó que en el caso del DON-HRP la señal de intensidad va aumentando de forma proporcional al aumento de la cantidad de HRP inmovilizada. En esta experiencia se confirmó que la reacción electroquímica entre el **DON-HRP con HQ (1,8 mM) y H_2O_2 (1 mM) por cronoamperometría (0 a - 0,25 V) sucede de forma satisfactoria, y existe una variación lineal en la señal con respecto al aumento de la concentración del conjugado.**

- Inmunosensor con partículas magnéticas funcionalizadas con el grupo Tosilo (MBs-To)

Antes de comenzar con reacciones competitivas en las condiciones óptimas se comprobó si la señal obtenida en la reacción enzimática entre HRP y los sustratos del enzima (HQ y H_2O_2) sobre el electrodo puede determinarse correctamente mediante transducción electroquímica.

Se estudiaron diferentes concentraciones del conjugado enzimático DON-HRP y su reacción de afinidad con el pAbDON inmovilizado sobre las MBs-To en las condiciones previamente optimizadas.

Las corrientes obtenidas se muestran en la gráfica siguiente:

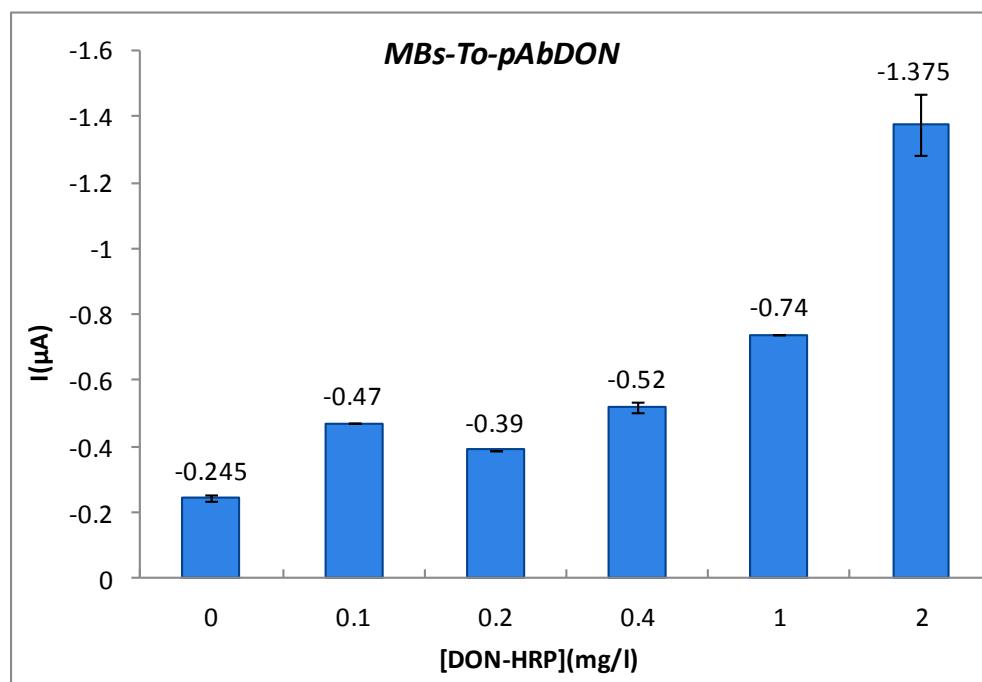


Figura 23: Estudio de diferentes concentraciones DON-HRP ($0\text{--}2 \text{ mg l}^{-1}$) incubadas sobre MBs-To-pAbDON, pAbDON ($0.06 \mu\text{g}$), 24 hora de inmovilización. Medida por cronoamperometría: HQ (1,8 mM), H_2O_2 (1mM), Cronoamperometría entre 0 y -0.25 V

La corriente de ruido de fondo es de $-0.245 \mu\text{A}$. La corriente aumentó proporcionalmente con la concentración de DON-HRP, hasta $-1.375 \mu\text{A}$ para una concentración de DON-HRP de 2 mg l^{-1} , pues la reacción enzimática se produce en mayor extensión.

Se realizó además un estudio de la unión no específica entre el DON-HRP y MBs-To sin modificar o bien modificadas con un elemento de biorreconocimiento (BSA-FB1) no selectivo y específico al DON. El resto de condiciones experimentales se mantuvieron igual.

Se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 24:

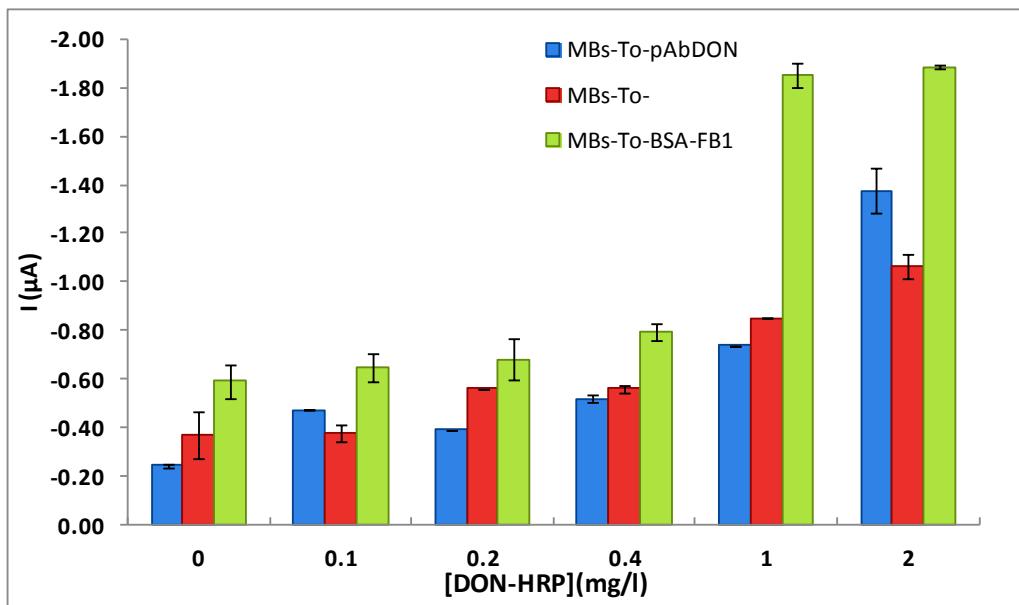


Figura 24: Estudio comparativo de concentraciones DON-HRP crecientes, incubadas sobre MBs-To- en ausencia y en presencia de pAbDON (0.06 µg) y con un elemento de biorreconocimiento no selectivo a DON. Medida por cronoamperometría: HQ (1,8mM), H₂O₂ (1mM), Salto 0 a -0.25 V

A la vista de los resultados (corrientes mayores en ausencia del elemento de biorreconocimiento, o con uno no selectivo al DON que con pAbDON) puede decirse que las señales obtenidas son debidas **exclusivamente a uniones inespecíficas del DON-HRP sobre las partículas magnéticas modificadas con el grupo tosilo**. La explicación a estos resultados puede ser que el anticuerpo polyclonal no reacciona por afinidad con el DON-HRP o bien que la inmovilización del mismo sobre las MBs-To no se produce en suficiente grado.

En los resultados experimentales que se han mostrado en los apartados 3.2 y 3.3 al estudiar la reacción de afinidad mediante las técnicas SPR y ELISA, se ha comprobado la reacción de afinidad entre el DON-HRP y el pAbDON, por lo que se descarta la primera explicación.

La inmovilización sobre MBs-To se basa en una reacción de desplazamiento de los grupos Tosilo. Además es bien sabido que la posición de inmovilización de los anticuerpos sobre superficies sólidas está basada en el azar. Si los anticuerpos no mantienen accesible sus regiones F_{ab} la reacción de afinidad con el antígeno no puede producirse, lo que significa que aunque se lleve a cabo la inmovilización del anticuerpo correctamente sobre las MBs-To, no lo haga con la orientación adecuada, y por lo tanto disminuye su capacidad de unión con el antígeno, en este caso el DON del conjugado enzimático DON-HRP.

Dados los malos resultados con este tipo de MBs con grupos tosilo, se decidió estudiar otros tipos de partículas magnéticas modificadas con algG y con COOH, que interactúen con el anticuerpo mediante reacciones de afinidad con grupos proteicos capaces de orientar correctamente los anticuerpos, o mediante reacciones de formación de enlaces más eficientes que con el grupo Tosilo.

- **Inmunosensor con partículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo genérico (MBs-algG)**

A la vista de los resultados de experiencias anteriores utilizando partículas magnéticas modificadas con el grupo tisilo se decidió estudiar otras **partículas magnéticas modificadas con un anticuerpo genérico algG**. La unión entre anticuerpos se produce siempre entre la región F_{ab} de uno de ellos, con la región F_c del otro, por lo que probablemente la unión del pAbDON sobre el anticuerpo algG permita que la región F_{ab} del pAbDON se mantenga libre para que la reacción de biorreconocimiento con el DON y el DON-HRP suceda satisfactoriamente.

Las concentraciones de DON-HRP estudiadas variaron entre la concentración estequiométrica de DON-HRP ($0,296 \mu\text{g l}^{-1}$) para la cantidad de pAbDON inmovilizado sobre las MBs-algG, suponiendo una relación molar 1:1, y otras dos concentraciones diferentes, una por encima ($0,50 \mu\text{g l}^{-1}$) y otra por debajo ($0,15 \mu\text{g l}^{-1}$) de este valor estequiométrico.

En primer lugar se llevó a cabo el estudio del tiempo de inmovilización del **pAbDON sobre las MBs-algG**. Se estudiaron dos tiempos diferentes: **10 y 60 min**, ya que son los que se recomiendan en las especificaciones de las partículas magnéticas.

Los valores de corrientes medidas son:

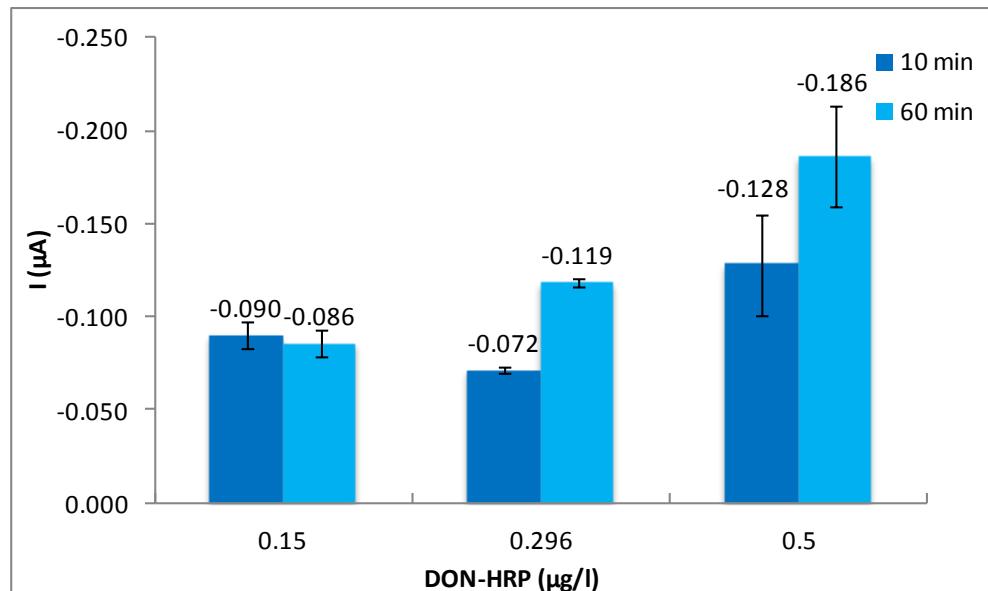


Figura 25: Comparación resultados cronoamperometría con concentraciones diferentes de DON-HRP (0.15 , 0.296 y $0.5 \mu\text{g/l}$), MBs-algG ($30 \mu\text{g}$) conjugado a pAbDON ($0.075 \mu\text{g}$), inmovilización $T=4^\circ\text{C}$ durante 10 min y 60 min, HQ ($1,8 \text{ mM}$) y H_2O_2 (1 mM), Cronoamperometría entre 0 y -0.25 V

Se observó que para la misma concentración de DON-HRP la corriente fue mayor para las experiencias que se llevaron a cabo con un tiempo de inmovilización de 60 min, obteniéndose casi un 50% de incremento en la corriente medida, lo que parece indicar que se inmovilizó aproximadamente el doble de pAbDON.

En segundo lugar se estudió la unión no específica entre el DON-HRP y las MBs-algG, comparando experiencias en ausencia y en presencia de pAbDON, para 3 concentraciones de DON-HRP.

Las corrientes medidas para cada una de las concentraciones fueron:

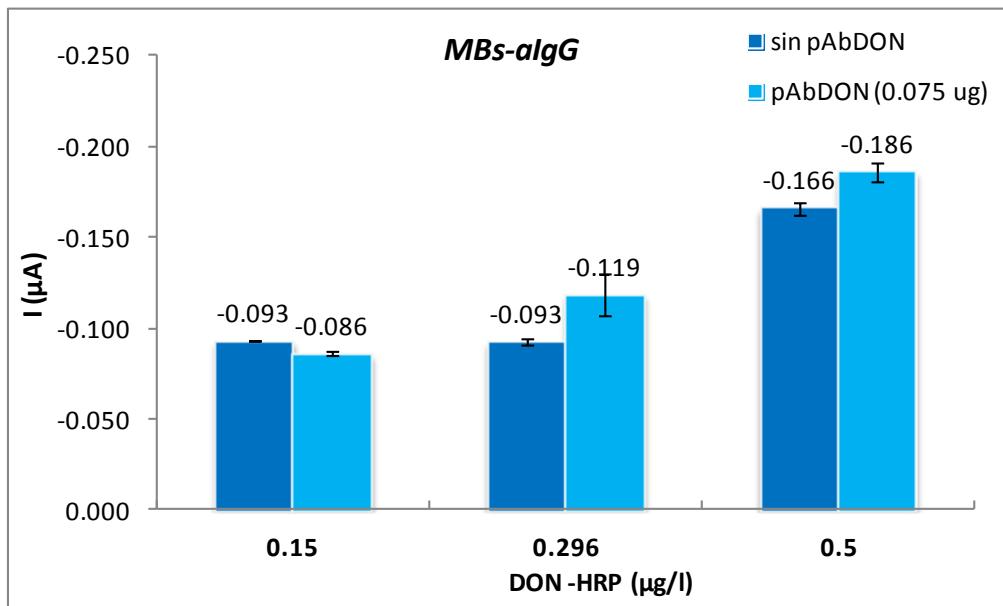


Figura 26: Comparación resultados cronoamperometría en presencia y ausencia de pAbDON (0,075 μg) y concentraciones diferentes de DON-HRP (0.15, 0.296 y 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$), inmovilización T=4°C durante 60 min, HQ (1,8 mM) y H_2O_2 (1 mM), Cronoamperometría entre 0 y -0.25 V

Se observó un ligero aumento de la intensidad a medida que aumenta la concentración de DON-HRP en el ensayo, aunque se observó una **fuerte unión inespecífica del conjugado enzimático DON-HRP sobre las MBs-algG** en las experiencias en ausencia de pAbDON.

La señal obtenida en presencia y ausencia de pAbDON fue muy similar, por lo que se concluyó que estas partículas magnéticas no eran adecuadas para llevar a cabo el desarrollo del inmunosensor.

- Inmunosensor con partículas magnéticas modificadas con grupos carboxilos (MBS-COOH)

En el proceso de optimización de la concentración de DON-HRP se trabajó con tres concentraciones diferentes (2,5, 6 y 10 $\mu\text{g l}^{-1}$). La concentración de 6 $\mu\text{g l}^{-1}$ correspondía con la cantidad estequiométrica en relación a los moles de pAbDON inmovilizados sobre las MBS-COOH (5,926 $\mu\text{g l}^{-1}$ de DON-HRP) suponiendo una relación molar 1:1 entre el pAbDON y el DON, y otras dos concentraciones diferentes, una por encima (10 $\mu\text{g l}^{-1}$) y otra por debajo (2,5 $\mu\text{g l}^{-1}$) de la teórica. Se evaluaron los resultados en presencia y ausencia del elemento de biorreconocimiento.

Las corrientes medidas para cada una de las concentraciones fueron:

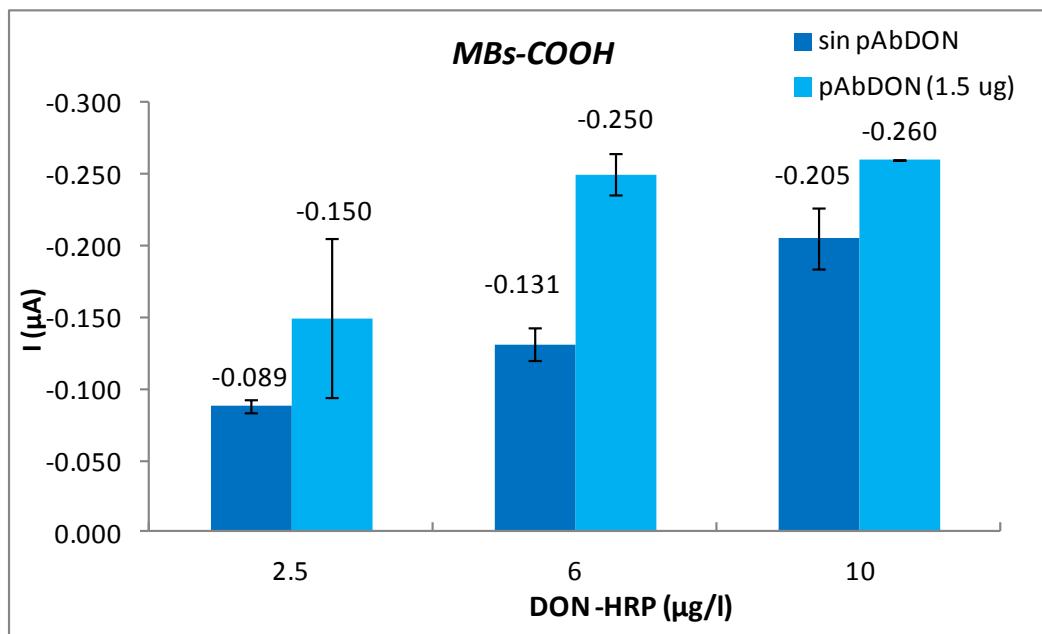


Figura 27: Comparación resultados obtenidos utilizando distintas concentraciones de DON-HRP, MBs-COOH (30 μg) en presencia y ausencia de pAbDON (1.5 μg), inmovilización T amb y 24 h, HQ (1,8 mM) y H_2O_2 (1 mM), Cronoamperometría entre 0 y -0.25 V

Se observó un aumento en las corrientes comparando las experiencias en presencia y ausencia de pAbDON, por lo que se puede asegurar que el pAbDON ha sido inmovilizado con la orientación adecuada sobre las MBs-COOH y por lo tanto mantiene su afinidad hacia el DON-HRP. Debido al carácter hidrofílico de la superficie externa de estas MBs, no hay problemas de adsorciones hidrofóbicas inespecíficas.

Cabe destacar que la mayor diferencia de corriente en presencia y en ausencia del pAbDON, se observó para **la concentración de DON-HRP de 6 $\mu\text{g l}^{-1}$** , que coincide con la concentración estequiométrica calculada para la concentración añadida de pAbDON (en función de la capacidad teórica de unión de las MBs-COOH). Se produjo un **aumento de intensidad del 47.6% entre la experiencia en ausencia y en presencia de pAbDON**. Esto es debido a que el número de funcionalidades de las MBs es superior a la capacidad teórica de unión de las MBs.

Viendo que las uniones inespecíficas del DON-HRP eran suficientemente pequeñas (-0,131 μA) para poder considerarlas despreciables se decidió realizar una **experiencia competitiva entre DON y DON-HRP** (concentración fija 6 $\mu\text{g l}^{-1}$). El rango de concentraciones de DON ensayadas para la competición fue entre 0 y 1 mg l^{-1} .

Las corrientes medidas fueron:

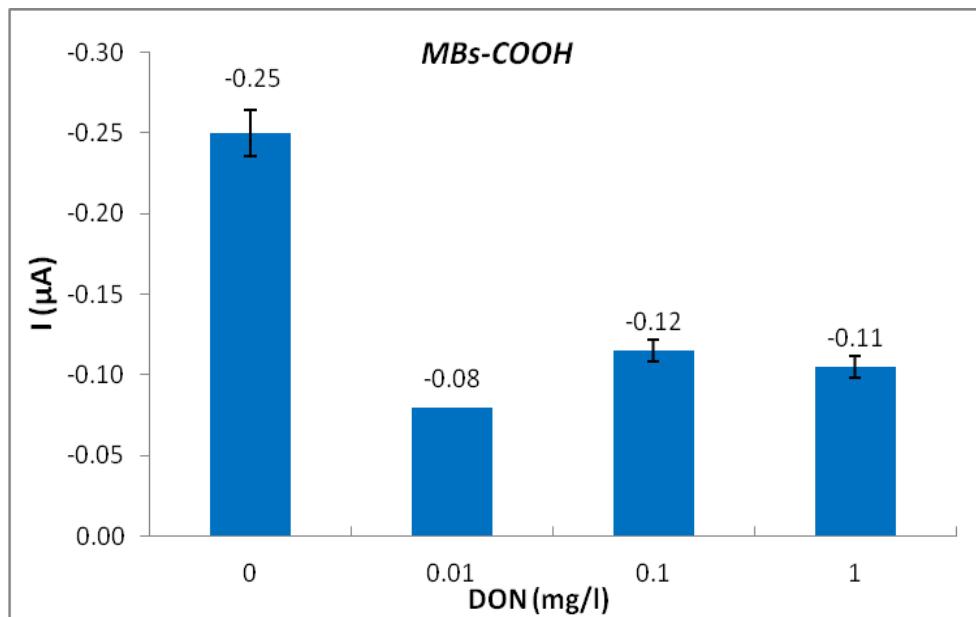


Figura 28: Resultados de competición de DON ($0\text{--}1 \text{ mg l}^{-1}$) y DON-HRP ($6 \text{ }\mu\text{g l}^{-1}$) con MBs-COOH ($30 \text{ }\mu\text{g}$) conjugado a pAbDON ($1,5 \text{ }\mu\text{g}$), inmovilización T amb y 24 h, HQ ($1,8 \text{ mM}$) y H_2O_2 (1 mM),
Cronoamperometría entre 0 y -0.25 V

Se observó una disminución de la señal en las experiencias en las que se les añadió DON, lo que indica que se produce competición entre DON y DON-HRP. Se ha producido una disminución de señal desde -0.25 hasta $-0.08 \mu\text{A}$ (**68% disminución**) entre la experiencia sin DON y la experiencia con DON (0.01 mg l^{-1}).

Las señales, a partir de 0.01 mg l^{-1} de DON tienen una tendencia a aumentar, por lo que se concluyó que **para concentraciones mayores de 0.01 mg l^{-1} la competición no se produce correctamente** (aunque se sigue observando menor intensidad que cuando no hay DON presente).

Debido a que la cantidad de anticuerpo que hay que inmovilizar (según la capacidad de unión de las MBs-COOH) es muy baja, la concentración de DON-HRP óptima también es pequeña ($6 \text{ }\mu\text{g l}^{-1}$) por lo que es lógico pensar que el **rango de competición en el que el DON puede reaccionar correctamente será a nivel de $\mu\text{g l}^{-1}$ (ppb)**.

Capítulo 4: CONCLUSIONES

En este trabajo Fin de Máster se ha realizado un estudio de las condiciones óptimas de trabajo con el objetivo de diseñar un inmunosensor electroquímico competitivo para la determinación de deoxinivalenol en muestras de alimentos empleando un anticuerpo policlonal.

Se estudió en primer lugar la reacción de afinidad entre la micotoxina y el anticuerpo para posteriormente optimizar la reacción competitiva del DON y el DON-HRP.

Las conclusiones de cada apartado del trabajo se resumen a continuación:

I) Estudio de la reacción de afinidad entre pAbDON y DON-HRP por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

- Se produce una correcta inmovilización del pAbDON sobre el chip de dextrano, como se deduce de las medidas RU en este proceso (7328,3 RU)
- En el estudio de la **afinidad del DON sobre el anticuerpo inmovilizado** sobre la superficie del chip se obtiene una señales muy bajas ($\text{RU} < 4,5$) para todas las concentraciones de DON estudiadas, debido a que la sensibilidad del SPR no es capaz de detectar el bajo peso molecular del DON (296,32 Da)
- No existen uniones inespecíficas entre el enzima HRP y el pAbDON ($\text{RU} < 3,8$)
- Se observa un aumento de señal proporcional a la concentración del conjugado DON-HRP, lo que significa afinidad del anticuerpo pAbDON sobre este conjugado que permite esquemas directos y competitivos de inmunoensayo

II) Estudio de la reacción competitiva entre DON-HRP y DON mediante ELISA (convencional y con partículas magnéticas)

- Se han optimizado las condiciones de medida del ELISA convencional. Se inmovilizó el pAbDON sobre el pocillo de poliestireno, sin agitación y a 4°C durante 24 h en tampón carbonatos (0,05 M pH 9,6). Además se aumentó el tiempo de incubación del DON-HRP durante 1 h con agitación y a T ambiente con lo que se consiguió un aumento notable de las señales de absorbancia
- Existe una elevada unión no específica en ausencia de pAbDON (0,374 unidades de absorbancia para una concentración de DON-HRP de 5 mg l^{-1}) sobre la superficie del pocillo de las placas ELISA, por lo que es necesario su bloqueo
- Se ha demostrado la **posibilidad de emplear partículas magnéticas en un sistema ELISA espectrofotométrico convencional**, en donde el consumo de anticuerpo y conjugados es menor

- Las condiciones optimizadas para el inmunoensayo competitivo entre DON y DON-HRP en el **ELISA con partículas magnéticas** son:

1. Inmovilización del pAbDON (2 µg según la capacidad teórica de unión) sobre las MBs-To
2. Volumen de MBs-To-pAbDON en 15 µl para cada experiencia como volumen óptimo de trabajo
3. Concentración óptima de DON-HRP ($0,08 \text{ mg l}^{-1}$) para la competición con concentraciones de DON entre 0 y $0,1 \text{ mg l}^{-1}$

- La sensibilidad del inmunosensor en las condiciones óptimas anteriores fueron: **IC₅₀ de 0,0005 mg l⁻¹ y la sensibilidad es de 2,733 l mg⁻¹ de DON.**

III) Estudio de la reacción competitiva entre DON y DON-HRP sobre pAbDON inmovilizado sobre partículas magnéticas mediante transducción electroquímica

- Se optimizaron las concentraciones óptimas de los sustratos de la HRP para la reacción enzimática (10 min) sobre el SPCE, que se han fijado en **HQ (1,8 mM) y H₂O₂ (1 mM)**. El salto de potencial óptimo empleado en cronoamperometría (de 0 a -0,25 V) permite la reducción electroquímica de la pBQ generada enzimáticamente, sin oxidación electroquímica del HQ.
- Se ha observado una alta **unión no específica del DON-HRP sobre las partículas magnéticas modificadas con el grupo tosilo**, debido probablemente a un bajo rendimiento de la inmovilización del pAbDON (defecto de pAbDON inmovilizado dejando grupos Tosilo de las MBs-To libres) o por una inmovilización con la zona de reconocimiento F_{ab} no accesible al antígeno
- Se estudiaron **MBs funcionalizadas con anticuerpo genérico algG**, capaces de unirse al pAbDON por su región F_c, dejando más accesible la parte F_{ab} del anticuerpo. Sin embargo, se observó una fuerte adsorción inespecífica del conjugado DON-HRP.
- Estudiando otras **MBs funcionalizadas con COOH**, se ha comprobado que la inmovilización del pAbDON sobre MBs-COOH mediante una reacción con EDC/NHS, para pAbDON ($1,5 \mu\text{g l}^{-1}$) y su reacción con DON-HRP ($6 \mu\text{g l}^{-1}$) producen una correcta reacción de biorreconocimiento y señales de competitividad con la que se obtiene un **aumento de intensidad del 47,6% entre la experiencia en ausencia y en presencia de pAbDON**.
- En las mismas condiciones se estudió la reacción de competición con DON ($0 - 1 \text{ mg l}^{-1}$). Se observa competición satisfactoria DON-HRP ($6 \mu\text{g l}^{-1}$) para concentraciones de DON ($0 - 0,01 \text{ mg l}^{-1}$), produciendo una **disminución de señal del 68% entre la experiencia libre de DON (corriente máxima obtenida -0,250 µA)**

- La continuación de este trabajo de investigación está ligado a la optimización del inmunosensor a partir de los estudios y conclusiones detalladas en esta memoria. En estos momentos se ha comenzado a trabajar con **un nuevo anticuerpo monoclonal altamente selectivo y específico para el DON y un conjugado DON-HRP que es reconocido eficientemente con este anticuerpo**. El nuevo conjugado además produce menores adsorciones inespecíficas.

Las bases establecidas en este trabajo y el comportamiento de las diferentes partículas magnéticas que se han descrito están permitiendo la rápida optimización de un nuevo inmunosensor de la micotoxina, en concentraciones menores a las permitidas por la legislación de la Unión Europea [6].

Un estudio posterior que se va a llevar a cabo como consecuencia de este trabajo es la determinación simultánea de varias micotoxinas (ocratoxina A y fumonisina B1 junto al deoxinivalenol) empleando sus diferentes anticuerpos como ligandos de afinidad selectivos.

ANEXOS

ANEXO I: PROTOCOLOS DE TRABAJO EN ENSAYOS ELISA

- *ELISA convencional*

Para realizar el ensayo *ELISA* convencional, inicialmente se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- 1.** Lavado de los pocillos con tampón CB (2 veces)
- 2.** pAbDON diferentes diluciones (50 µl por pocillo)
- 3.** Incubar 24 h con agitación a T ambiente
- 4.** Lavados con PBS 0,1 M (3 veces)
- 5.** Etapa de bloqueo con PBS 0,1 M con caseínato de sodio (2% m/v)), 200 µl por pocillo (30 minutos con agitación y a T ambiente)
- 6.** Lavados con PBS 0,1 M (3 veces)
- 7.** Adición DON-HRP desde 0 a 5 mg l⁻¹ (50 µl por pocillo)
- 8.** 30 minutos con agitación y a T ambiente
- 9.** Lavados con PBS 0,1 M (3 veces)
- 10.** 50 µl TMB: reacción con agitación 20 minutos a T ambiente.
- 11.** Adición de 50 µl H₂SO₄ 0,5 M para parar la reacción
- 12.** Medida de la absorbancia a 450 nm

- *ELISA con partículas magnéticas MBs-To:*

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-To:

- Tampón fosfato (PBS): HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻ (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4
- Tampón lavado (PBST): PBS con Tween20 (0,02% m/v)
- Tampón almacén y bloqueo: PBS con BSA (0,1 % m/v)

En primer lugar se llevó a cabo la inmovilización del pAbDON sobre las MBs-To teniendo en cuenta la capacidad de unión (20 µg de pAbDON por mg de MBs-To):

- 1.** Agitar durante 5 minutos las MBs-To y tomar la cantidad deseada (100 µg)
- 2.** Lavado y acondicionamiento de las MBs-To: 2 lavados con tampón PBST (0,02% m/v) y 1 lavado con tampón PBS
- 3.** Añadir 2 µl de pAbDON (1000 mg l⁻¹) en tampón PBS
- 4.** Agitar durante 24 h a temperatura ambiente
- 5.** Lavado de las MBs-To: 2 lavados PBST (0,02% m/v) y 1 lavado con tampón PBS
- 6.** Resuspender MBs-To-pAbDON en tampón de almacenamiento y bloqueo (PBS con BSA (0,1 % m/v)) y almacenar a 4°C hasta su uso

Una vez que las partículas magnéticas están modificadas con el pAbDON, se llevó a cabo el siguiente protocolo de trabajo:

ANEXOS

- 1.** Añadir un volumen fijo de MBs-To-pAbDON
- 2.** Lavado de las MBs-To: 2 lavados con tampón PBST (0,02% m/v) y 1 lavado con tampón PBS (0,1 M) con ayuda de un campo magnético
- 3.** Añadir concentraciones diferentes del conjugado enzimático DON-HRP según la experiencia (y DON si la experiencia es competitiva)
- 4.** Agitar durante 1 h T ambiente
- 5.** Lavado de las MBs-To: 2 lavados con tampón PBST (0,02% m/v) y 1 lavado con tampón PBS (0,1 M) con ayuda de un campo magnético
- 6.** Resuspender en el volumen de partida de MBs-To-pAbDON en PBS (0,1 M)
- 7.** Añadir un volumen fijo de MBs-To-pAbDON-DON-HRP/DON en cada pocillo
- 8.** Añadir 50 µl de TMB (preparado para usar en ELISA), y dejar reaccionar en el pocillo durante 20 minutos a T ambiente y agitación
- 9.** Añadir 50 µl de H₂SO₄ (0,5 M) como reactivo de parada de la reacción enzimática entre la HRP y el TMB
- 10.** Medir el valor de la absorbancia en un lector *ELISA* a una longitud de onda de 450 nm

ANEXOS

ANEXO II: PROTOCOLO DE TRABAJO CON MBs-To CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-To:

- Tampón fosfato (PBS): $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4
- Tampón lavado (PBST): PBS con Tween20 (0,02% m/v)
- Tampón almacén y bloqueo: PBS con BSA (0,1 % m/v)

En primer lugar se llevó a cabo la inmovilización del pAbDON sobre las MBs-To teniendo en cuenta la capacidad de unión (20 µg de pAbDON por mg de MBs-To).

El protocolo de inmovilización es semejante a la inmovilización realizada para el ELISA magnético:

1. Agitar durante 5 minutos las MBs-To y tomar la cantidad deseada (100 µg).
2. Lavado y acondicionamiento de las MBs-To: 2 lavados con tampón PBST (0,02% m/v) y 1 lavado con tampón PBS
3. Añadir 2 µl de pAbDON (1000 mg l^{-1}) en tampón PBS, **(2 µg pAbDON)**
4. Agitar durante 24 h a temperatura ambiente
5. Lavado de las MBs-To: 2 lavados PBST (0,02% m/v) y 1 lavado con tampón PBS
6. Resuspender la suspensión MBs-To-pAbDON en tampón de almacenamiento y bloqueo (PBS con BSA (0,1 % m/v) y almacenar a 4°C hasta su uso

Una vez que las partículas magnéticas están modificadas con el pAbDON, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Añadir un volumen fijo de MBs-To-pAbDON en cada vial *eppendorf*.
2. Lavado de las MBs-To: 2 lavados con tampón PBST (0,02% m/v) y 1 lavado con tampón PBS (0,1 M) con ayuda de un campo magnético
3. Añadir concentraciones diferentes del conjugado enzimático DON-HRP según la experiencia (y DON si la experiencia es competitiva)
4. Agitar durante 1 h T ambiente
5. Lavado de las MBs-To: 2 lavados con tampón PBST (0,02% m/v) y 1 lavado con tampón PBS (0,1 M) con ayuda de un campo magnético.
6. Resuspender en el volumen de partida de MBs-To-pAbDON en PBS (0,1 M, pH 7,4)
7. Depositar 10 µl de la suspensión de MBs-To-pAbDON sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE.
8. Añadir 25 µl de HQ (4,3 mM) y 25 µl de H_2O_2 (2,4 mM) para cubrir la superficie de los tres electrodos. Las concentraciones que quedan sobre el electrodo son HQ (1,8 mM) y 25 µl de H_2O_2 (1 mM)
9. Dejar la reacción enzimática durante 10 minutos.
10. Aplicar mediante la técnica electroquímica de cronoamperometría un salto de potencial desde 0 a -0.25 V y tomar el valor de la corriente a un tiempo constante de 80 s

ANEXOS

ANEXO III: PROTOCOLO DE TRABAJO CON MBs-algG CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-algG:

- Tampón lavado inicial de MBs-algG: NaH_2PO_4 (1,16 mM), Na_2HPO_4 (6,90 mM), NaCl (0,138 M) pH 7,4
- Tampón de reacción, PBS: $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (0,1 M) y NaCl (0,138 M) pH=7,4
- Tampón lavado PBST: PBS con Tween20 (0,02% m/v)

En este caso la capacidad unión es 2,5 μg por mg de MBs-algG.

El protocolo de trabajo que se siguió con estas partículas magnéticas se describe a continuación:

1. Agitar las partículas magnéticas durante 3 min.
2. Lavar las partículas magnéticas (30 μg) con el tampón de lavado (tres lavados con el tampón de lavado inicial MBs-algG)
3. Añadir el la cantidad necesaria pAbDON según la capacidad de unión de las MBs-algG (**0,075 μg pAbDON**)
4. Incubar la suspensión de MBs-algG con el pAbDON durante **10-60 min a T ambiente**
5. Separar las MBs-algG modificadas con el pAbDON con ayuda de un separador magnético
6. Realizar tres lavados con tampón PBS (0,1 M pH 7,4)
7. Añadir DON-HRP en tampón PBS (0,1 M, pH 7,4) según la experiencia (y DON si la experiencia es competitiva)
8. Agitar durante 1 h a T ambiente
9. Lavar las MBs-algG-pAbDON con tampón PBS (0,1 M, pH 7,4) por triplicado.
10. Resuspender las MBs-algG-pAbDON en tampón PBS (0,1 M, pH 7,4)
11. Depositar 10 μl de la suspensión de MBs-algG-pAbDON sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE.
12. Añadir 25 μl de HQ (4,3 mM) y 25 μl de H₂O₂ (2,4 mM) para cubrir la superficie de los tres electrodos. Las concentraciones que quedan sobre el electrodo son HQ (1,8 mM) y 25 μl de H₂O₂ (1 mM).
13. Dejar la reacción enzimática durante 10 minutos.
14. Aplicar mediante la técnica electroquímica de cronoamperometría un salto de potencial desde 0 a -0.25 V y tomar el valor de la corriente a un tiempo constante de 80 s.

ANEXOS

ANEXO IV: PROTOCOLO DE TRABAJO CON MBs-COOH CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA

En el Anexo IV se detalla el protocolo de trabajo seguido para la inmovilización del pAbDON sobre las MBs-COOH y reacciones de incubación posteriores, así como la detección electroquímica por cronoamperometría.

A continuación se recogen los tampones específicos necesarios para trabajar con MBs-COOH:

- Tampón MES (15 mM, pH 6)
- EDC, 10 mg ml⁻¹ en agua
- Tampón fosfatos: NaH₂PO₄ (1,88 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), NaCl (0,15 M) pH 7,4
- Tampón fosfatos con Tween20 (0,1% m/v)

En este caso la capacidad unión es 50 µg por mg de MBs-COOH.

La inmovilización del pAbDON se produce mediante una reacción con una carbodiimida (EDC) que activa los grupos carboxilo de las partículas magnéticas para **unirse con el anticuerpo mediante un enlace amida**. El producto de reacción entre el ácido carboxílico y la carbodiimida es muy lábil (se hidroliza rápidamente) por lo que la inmovilización del anticuerpo debe producirse inmediatamente después de la etapa de activación.

1. Resuspender las MBs-COOH con agitación durante 30 min
2. Colocar 30 µg de las MBs-COOH en un *eppendorf* y separarlas con ayuda de un bloque magnético para posteriormente retirar el sobrenadante.
3. Lavar las MBs-COOH por duplicado con 1 ml de tampón MES (15 mM, pH 6)
4. Resuspender en 100 µl de tampón MES (15 mM, pH 6)
5. Añadir 100 µl EDC (10 mg ml⁻¹ en H₂O mili Q)
6. Incubar durante 30 min con agitación a T ambiente
7. Añadir el pAbDON según la capacidad de unión indicada de las MBs-COOH (**1,5 µg pAbDON**)
8. Incubar durante **toda la noche a T ambiente** con agitación.
9. Lavar con tampón PBS-Tween (0,1% m/v) por duplicado durante 10 min con agitación y una vez con PBS (0,1 M)
10. Añadir los volúmenes necesarios de DON y DON-HRP para llevar a cabo la etapa de competición durante 1 h en tampón PBS
11. Lavar por duplicado con tampón PBS-Tween (0,1%) y 1 vez con tampón PBS
12. Resuspender las MBs-COOH en el volumen inicial
13. Depositar 10 µl de la suspensión de MBs-COOH-pAbDON sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE.
14. Añadir 25 µl de HQ (4,3 mM) y 25 µl de H₂O₂ (2,4 mM) para cubrir la superficie de los tres electrodos. Las concentraciones que quedan sobre el electrodo son HQ (1,8 mM) y 25 µl de H₂O₂ (1 mM)

ANEXOS

- 15.** Dejar la reacción enzimática durante 10 minutos
- 16.** Aplicar mediante la técnica electroquímica de cronoamperometría un salto de potencial desde 0 a -0.25 V y tomar el valor de la corriente a un tiempo constante de 80 s.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R. Krska, S. Baumgartner, R. Josephs, The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371(3) (2001) 285-299.
- [2] AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición).
- [3] J.C. Larsen, J. Hunt, I. Perrin, P. Ruckebauer, Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report, *Toxicology Letters* 153(1) (2004) 1-22.
- [4] M. Pascale, V. Lippolis, C.M. Maragos, A. Visconti, Recent Developments in Trichothecene Analysis, *Food Contaminants: Mycotoxins and Food Allergens* 1001 (2008) 192-210.
- [5] Recomendación 2006/583/CE, de 17 de Agosto de 2006.
- [6] Reglamento 1126/2007, de 28 de Septiembre de 2007.
- [7] M.K.A. Kadir, I.E. Tothill, Development of an electrochemical immunosensor for fumonisins detection in foods, *Toxins* 2(4) (2010) 382-398.
- [8] R. Koeppen, M. Koch, D. Siegel, S. Merkel, R. Maul, I. Nehls, Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations, *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(6) (2010) 1595-1612.
- [9] J.P. Meneely, F. Ricci, H.P. van Egmond, C.T. Elliott, Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 30(2) (2011) 192-203.
- [10] A. Visconti, M. Pascale, An Overview on Fusarium Mycotoxins in the Durum Wheat Pasta Production Chain, *Cereal Chemistry* 87(1) (2010) 21-27.
- [11] L. Schneider, H. Pichler, R. Krska, An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367(1) (2000) 98-100.
- [12] S. Folloni, G. Bellocchi, D.-M. Kagkli, S. Pastor-Benito, M. Aguilera, A. Mazzeo, M. Querci, G. Van den Eede, M. Ermolli, Development of an ELISA Reverse-Based Assay to Assess the Presence of Mycotoxins in Cereal Flour, *Food Analytical Methods* 4(2) (2011) 221-227.
- [13] L.M. Cahill, S.C. Kruger, B.T. McAlice, C.S. Ramsey, R. Prioli, B. Kohn, Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 859(1) (1999) 23-28.
- [14] A. Lermo, S. Fabiano, S. Hernandez, R. Galve, M.P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori, Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors, *Biosensors & Bioelectronics* 24(7) (2009) 2057-2063.
- [15] E. Usleber, E. Martlbauer, R. Dietrich, G. Terplan, Direct enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of the 8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in buffer solutions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39(11) (1991) 2091-2095.
- [16] N.S. Hill, P. Schwarz, L.S. Dahleen, S.M. Neate, R. Horsley, A.E. Glenn, K. O'Donnell, ELISA analysis for Fusarium in barley: Development of methodology and field assessment, *Crop Science* 46(6) (2006) 2636-2642.
- [17] C. dos Santos Riccardi, P.I. da Costa, H. Yamanaka, Amperometric immunosensor, *Química Nova* 25(2) (2002) 316-320.
- [18] B. Prieto-Simon, M. Campas, Immunochemical tools for mycotoxin detection in food, *Monatshefte Fur Chemie* 140(8) (2009) 915-920.
- [19] L. Santos, S. Marin, V. Sanchis, A.J. Ramos, Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(10) (2009) 1802-1807.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [20] L. Bonel, J.C. Vidal, P. Duato, J.R. Castillo, Ochratoxin A nanostructured electrochemical immunosensors based on polyclonal antibodies and gold nanoparticles coupled to the antigen, *Analytical Methods* 2(4) (2010) 335-341.
- [21] T. Kadota, Y. Takezawa, S. Hirano, O. Tajima, C.M. Maragos, T. Nakajima, T. Tanaka, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, Rapid detection of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using surface plasmon resonance immunoassay, *Analytica Chimica Acta* 673(2) (2010) 173-178.
- [22] E.K. Tangni, J.-C. Motte, A. Callebaut, L. Pussemier, Cross-Reactivity of Antibodies in Some Commercial Deoxynivalenol Test Kits against Some Fusariotoxins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(24) (2010) 12625-12633.
- [23] A. Zhang, Y. Ma, L. Feng, Y. Wang, C. He, X. Wang, H. Zhang, Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China, *Food Control* 22(11) (2011) 1723-1728.
- [24] Y. Li, W. Shi, J. Shen, S. Zhang, L. Cheng, Z. Wang, Development of a rapid competitive indirect ELISA procedure for the determination of deoxynivalenol in cereals, *Food and Agricultural Immunology* 23(1) (2012) 41-49.
- [25] N.W. Turner, S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky, Analytical methods for determination of mycotoxins: A review, *Analytica Chimica Acta* 632(2) (2009) 168-180.
- [26] E. Anklam, J. Stroka, A. Boenke, Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins, *Food Control* 13(3) (2002) 173-183.
- [27] A.J. Tudos, E.R. Lucas-van den Bos, E.C.A. Stigter, Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(20) (2003) 5843-5848.
- [28] Y. Li, X. Liu, Z. Lin, Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs, *Food Chemistry* 132(3) (2012) 1549-1554.
- [29] H. Schnerr, R.F. Vogel, L. Niessen, A biosensor-based immunoassay for rapid screening of deoxynivalenol contamination in wheat, *Food and Agricultural Immunology* 14(4) (2002) 313-321.
- [30] N. Paniel, A. Radoi, J.-L. Marty, Development of an Electrochemical Biosensor for the Detection of Aflatoxin M(1) in Milk, *Sensors* 10(10) (2010) 9439-9448.
- [31] Z.L. Wei, X.L. Sun, Z.J. Li, Y.J. Fang, G.X. Ren, Y.R. Huang, J.K. Liu, Highly sensitive deoxynivalenol immunosensor based on a glassy carbon electrode modified with a fullerene/ferrocene/ionic liquid composite, *Microchimica Acta* 172(3-4) (2011) 365-371.
- [32] D. Romanazzo, F. Ricci, G. Volpe, C.T. Elliott, S. Vesco, K. Kroeger, D. Moscone, J. Stroka, H. Van Egmond, M. Vehnainen, G. Palleschi, Development of a recombinant Fab-fragment based electrochemical immunosensor for deoxynivalenol detection in food samples, *Biosensors & Bioelectronics* 25(12) (2010) 2615-2621.
- [33] I.E. Tothill, Biosensors and nanomaterials and their application for mycotoxin determination, *World Mycotoxin Journal* 4(4) (2011) 361-374.
- [34] E. Delibato, M. Bancone, G. Volpe, D. De Medici, D. Moscone, G. Palleschi, Development and comparative evaluation of different screening methods for detection of *Staphylococcus aureus*, *Analytical Letters* 38(10) (2005) 1569-1586.
- [35] E. Palecek, M. Fojta, Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing, *Talanta* 74(3) (2007) 276-290.
- [36] G. Liu, C. Timchalk, Y. Lin, Bioelectrochemical magnetic immunosensing of trichloropyridinol: A potential insecticide biomarker, *Electroanalysis* 18(16) (2006) 1605-1613.
- [37] M. Hervas, M. Angel Lopez, A. Escarpa, Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food: An anticipated analytical tool for food safety, *Analytica Chimica Acta* 653(2) (2009) 167-172.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [38] R. Liu, J. Liu, L. Xie, M. Wang, J. Luo, X. Cai, A fast and sensitive enzyme immunoassay for brain natriuretic peptide based on micro-magnetic probes strategy, *Talanta* 81(3) (2010) 1016-1021.
- [39] E. Zacco, M.I. Pividori, S. Alegret, Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues, *Analytical Chemistry* 78(6) (2006) 1780-1788.
- [40] J. Wang, Decentralized Electrochemical Monitoring Of Trace-Metals - From Disposable Strips To Remote Electrodes - Plenary Lecture, *Analyst* 119(5) (1994) 763-766.
- [41] R.M. Pemberton, R. Pittson, N. Biddle, G.A. Drago, J.P. Hart, Studies towards the development of a screen-printed carbon electrochemical immunosensor array for mycotoxins: A sensor for aflatoxin B-1, *Analytical Letters* 39(8) (2006) 1573-1586.
- [42] M.A. Alonso-Lomillo, O. Dominguez-Renedo, A. Hernandez-Martin, M.J. Arcos-Martinez, Horseradish peroxidase covalent grafting onto screen-printed carbon electrodes for levetiracetam chronoamperometric determination, *Analytical Biochemistry* 395(1) (2009) 86-90.
- [43] S.-H. Wang, X.-Y. Du, Y.-M. Huang, D.-S. Lin, P.L. Hart, Z.-H. Wang, Detection of deoxynivalenol based on a single-chain fragment variable of the antideoxyxynivalenol antibody, *Fems Microbiology Letters* 272(2) (2007) 214-219.
- [44] P. Rene Perrotta, F. Javier Arevalo, N. Roberto Vettorazzi, M. Alicia Non, H. Fernandez, Development of a very sensitive electrochemical magneto immunosensor for the direct determination of ochratoxin A in red wine, *Sensors and Actuators B-Chemical* 162(1) (2012) 327-333.
- [45] E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori, Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk, *Biosensors & Bioelectronics* 22(9-10) (2007) 2184-2191.