

PERROTTA, PATRICIO R
Estudios de las prop

2012

71138

71108

MFN:
Clasif:
T-760

71108



CREER..CREAR..CRECER

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Química

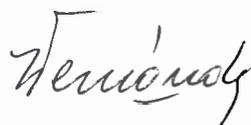
**“Estudios de las propiedades electroanalíticas y
desarrollo de dispositivos nanotecnológicos para la
cuantificación de ocratoxina A (OTA) en uvas y
subproductos”**

Patricio René Perrotta

JUNIO 2012

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto para optar el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Director:



Dr. Héctor FERNÁNDEZ

Co-Director:



Dra. María Alicia ZON

Miembros del Jurado:



Dra. Miriam ETCHEVERRY



Dra. Rosa Irene CATTANA



Dra. Patricia Inés ORTIZ

Río Cuarto, 8 de Junio de 2012.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Héctor Fernández y a la Dra. María Alicia Zon por su dirección y orientación en la presente tesis. Gracias por sus enseñanzas, sus consejos científicos y personales recibidos durante estos años.

Al Dr. Nelio R. Vettorazzi por la ayuda y enriquecedoras discusiones brindada durante estos años en la realización del trabajo.

A todos los integrantes del grupo de trabajo: Gerardo D. Chanique, Vanessa G. L. Zachetti, Sebastián N. Robledo, Fernando J. Arévalo, Adrián M. Granero, Alejandro E. Ramírez, Melisa Monerris, Álvaro Y. Tesio, Eliana M. Maza, Paulo C. Díaz Toro, Alejandro Arévalo, Marcela B. Moressi y Patricia B. Molina.

A todos los compañeros del departamento de Química que, de algún modo, han contribuido en este trabajo.

A las Dras. Sofía Chulze y Cecilia Grecco por su ayuda en la realización de esta tesis.

A toda mi familia: a la memoria de mis abuelos Américo y Cholo, a mis abuelas Alicia y Betty, a mis tíos y a mis hermanos Facundo, Pamela, Darío y Leonardo.

A mis padres, lo que llegamos a ser y en lo que nos convertimos, a ellos se lo debemos.

Finalmente, a mi compañera de vida, Cecilia, y al gran fruto de nuestro amor, Valentino, que son las personas que caminan a mi lado todos los días y me demuestran constantemente su gran amor...

“Estudios de las propiedades electroanalíticas y desarrollo de dispositivos nanotecnológicos para la cuantificación de ocratoxina A (OTA) en uvas y subproductos”

Patricio René Perrotta

2012

Objetivos

Objetivos Generales

Determinar las propiedades electroanalíticas de ocratoxina A (OTA). Implementar técnicas electroanalíticas más rápidas y más económicas que las actuales en vigencia para el análisis de OTA en vinos y sus materias primas.

Desarrollar dispositivos basados en materiales nanotecnológicos para la detección y cuantificación selectiva de OTA en uvas, mostos y vinos.

Objetivos Específicos

Determinar propiedades termodinámicas, difusionales y cinéticas de OTA mediante técnicas electroanalíticas. Implementar técnicas voltamperométricas de pulso y de redisolución adsorptivas para su determinación y cuantificación.

Desarrollar dispositivos basados en materiales nanotecnológicos (utilizando enzimas específicas y anticuerpos monoclonales) con detección electroquímica para determinar y cuantificar OTA en vinos y sus materias primas.

Resumen

En este trabajo de tesis doctoral se realizaron estudios por una parte, relacionados a las propiedades electroquímicas de ocratoxina A (OTA) sobre electrodos de oro desnudo, donde se definió un pre-pico de adsorción. Posteriormente, se estudió el proceso de oxidación de OTA sobre electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de diferentes tioles. La mejor respuesta electroquímica se obtuvo cuando el electrodo de oro se modificó con el 2-aminoetanotiol (cisteamina). Se realizaron estudios a distintos pH y se encontró que la respuesta voltamperométrica de la cupla redox superficial, se define mejor a pH 4,0 sobre el electrodo modificado que sobre el electrodo de oro desnudo. Dicha cupla redox superficial se caracterizó termodinámica y cinéticamente mediante voltamperometría de onda cuadrada y dio lugar al desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de OTA. Ello permitió poner a punto una técnica para cuantificar OTA en matrices reales. Dichas matrices fueron muestras de vino tinto, en las cuales se verificó la ausencia de la micotoxina por el método de referencia (HPLC, con detección por fluorescencia). Estas muestras de vino se contaminaron “ex profeso” con la micotoxina. Se desarrolló un método de extracción de la micotoxina basado en una doble extracción L||L y se determinaron las cifras de mérito del método, obteniendo una sensibilidad de 8760 A M^{-1} , un límite de detección (LD) de 0,004 ppb y un límite de cuantificación (LQ) de 0,012 ppb. A fin de evaluar la exactitud del método propuesto se realizaron, por un lado, ensayos de recuperación por el método de las adiciones estándares y, por otro lado, se comparó el método propuesto con el método oficial obteniendo alta concordancia.

Por último, se llevó a cabo el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para determinar OTA en muestras de vino tinto. El inmunosensor se basó en el uso de esferas magnéticas funcionalizadas con proteína G (MB), las cuales actúan como fase sólida para la reacción de afinidad entre OTA y OTA-HRP con el anticuerpo monoclonal de OTA (AcmOTA) y un sistema de electrodos de láminas impresas (ELI) usado como elemento de transducción electroquímico. El inmunosensor se basó en un inmunoensayo competitivo directo entre OTA presente en las muestras de vino tinto y OTA marcada con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (OTA-HRP). La performance obtenida con el inmunosensor electroquímico fue: un intervalo lineal de

0,01 a 20 ppb, un límite de detección de 0,008 ppb y un $IC_{50} = (0.272 \pm 0.081)$ ppb. Además, se obtuvo una muy buena precisión, con un coeficiente de variación (CV) de 5,56 % y una muy buena recuperación (92 al 110 %). Este inmunosensor presenta importantes ventajas respecto a los métodos comunes de determinación, tales como, medición directa sin pre-tratamiento de la muestra, pequeños volúmenes de muestras, tiempos cortos de análisis y un LD que está muy por debajo de lo establecido por la Comisión Reguladora de la Unión Europea (2 ppb).

Abstract

In this doctoral thesis it was carried out studies about electrochemical properties of ochratoxin A (OTA) on bare gold electrodes which defined an adsorption pre-peak was carried out. Then, we was studied the oxidation of OTA on gold electrodes modified with self-assembled monolayers of different thiols. The best electrochemical response was obtained when the gold electrode was modified with 2-aminoethane thiol (cysteamine). Studies were conducted at different pH and it was found that the redox couple was better defined at pH 4,0 on the modified electrode than on bare gold electrode. A full thermodynamic and kinetics characterization of the surface redox couple was performed by square wave voltammetry.

Moreover, OTA was determined in real matrices. These matrices were samples of red wine, which the absence of the mycotoxin was verified by the reference method (HPLC, with fluorescence detection). These wine samples were contaminated "expressly" with the mycotoxin. A method of extraction of the mycotoxin based on a double L||L, was applied. The figures of merit of the method, with a sensitivity of 8760 A M^{-1} , a limit of detection (LOD) of 0,004 ppb and a limit of quantification (LOQ) of 0,012 ppb. To assess the accuracy of the proposed method is performed on the one hand, recovery tests by the method of standard additions and, on the other hand, the proposed method was compared with the official method, obtaining a very good agreement.

Finally, an electrochemical immunosensor for the determination of OTA in red wine samples was developed. This immunosensor was based on protein G functionalized magnetic beads (MBs) as solid phase for affinity reaction between OTA and OTA monoclonal antibody (mAbOTA) and a screen printed-electrodes (SPE) system was used as the electrochemical transduction element. This immunosensor was based on a direct competitive assay between OTA in wine samples and OTA labeled with horseradish peroxidase (HRP) (OTA-HRP). The performance obtained for the electrochemical immunosensor was: a linear range from 0,01 to 20 ppb, LOD of 0.008 ppb, LOQ of $(0,010 \pm 0,006)$ ppb and $IC_{50} = (0,272 \pm 0,081)$ ppb. In addition, an acceptable accuracy with a coefficient of variation (CV) of 5,56 % and very good recoveries (92 to 110 %) were found. This electrochemical immunosensor has great advantages such as direct measurement of red wine samples without a prior

pretreatment, the small volume of sample, the short time consuming of experiences and LOD well below those established by the Regulatory Commission of the European Community (2 ppb).

ÍNDICE

Contenidos

Resumen	i
Abstract	iii
Indice	v
Contenidos	v
Figuras	x
Tablas	xvi
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTOS TEÓRICOS	1
1.1. Micotoxinas	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Vías de síntesis y estructuras químicas	2
1.1.3. Agentes productores de micotoxinas	4
1.1.4. Problemas asociados a las micotoxinas	6
1.1.4.1. Toxicidad	6
1.1.4.2. Pérdidas económicas	7
1.1.5. Regulaciones	8
1.1.6. Análisis de micotoxinas	9
1.1.7. Ocratoxina A	13
1.1.7.1. Generalidades	13
1.1.7.2. Datos químicos de ocratoxinas	14

1.1.7.3.	Fuentes fúngicas y biosíntesis	15
1.1.7.4.	Efectos tóxicos	16
1.1.7.5.	Regulaciones	17
1.1.7.6.	Determinaciones de ocratoxina A en vinos	18
1.2.	Sensores analíticos	19
1.2.1	Sensores químicos	18
1.2.2.	Biosensores	19
1.2.2.1.	Clasificación de biosensores	19
1.2.2.1.1.	Clasificación de los biosensores según el tipo de transductor utilizado	21
1.2.2.1.1.1.	Sensores biocatalíticos	21
1.2.2.1.1.2.	Sensores de Bioafinidad	21
1.2.2.1.1.2.1.	Inmunosensores	22
1.2.2.1.2.	Clasificación de los biosensores según el tipo de transductor utilizado	23
1.2.2.1.2.1.	Biosensores ópticos	23
1.2.2.1.2.2.	Biosensores nanomecánicos	23
1.2.2.1.2.3.	Biosensores calorimétricos	23
1.2.2.1.2.4.	Biosensores piezoeléctricos	24
1.2.2.1.2.5.	Biosensores electroquímicos	24
1.2.2.1.2.5.1.	Transductores conductimétricos	24
1.2.2.1.2.5.2.	Transductores potenciométricos	24
1.2.2.1.2.5.3.	Transductores amperométricos	25
1.2.2.2.	Características de los biosensores	25
1.3.	Monocapas autoensambladas (MAE)	26
1.3.1.	Generalidades de las MAE	26
1.3.2.	Preparación y características	27
1.3.3.	Aplicaciones	28
1.4.	Esferas magnéticas (EM)	29
1.4.1.	Generalidades	29
1.4.2.	Aplicaciones analíticas	30
1.5.	Aspectos básicos de la inmunidad	31
1.5.1.	Inmunidad	31
1.5.2.	Anticuerpos	31
1.5.2.1.	Anticuerpos monoclonales (Acm)	32
1.5.3.	Reconocimiento antigénico	34

1.5.4.	Inmunoensayos enzimáticos	35
1.5.4.1.	EIA heterogéneos	35
1.5.4.1.1.	ELISA de amplificación	35
1.5.4.1.2.	ELISA de modulación	36
1.6.	Enzimas	37
1.6.1.	Generalidades	37
1.6.2.	Clasificación	38
1.6.3.	Especificidad y catálisis	39
1.6.4.	Peroxidasas	39
CAPÍTULO 2		41
2.	FUNDAMENTOS Y MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	41
2.1.	Fundamentos electroquímicos	41
2.1.1.	Conceptos generales	41
2.1.2.	Variables asociadas a un sistema electroquímico	42
2.1.3.	Procesos de electrodos	42
2.1.3.1.	Procesos faradaicos	43
2.1.3.2.	Procesos no faradaicos	45
2.2.	Métodos electroquímicos	46
2.2.1.	Generalidades	46
2.2.2.	Voltamperometría cíclica	47
2.2.3.	Amperometría	51
2.2.3.1.	Cronoamperometría	52
2.2.4.	Voltamperometría de onda cuadrada	54
2.2.4.1.	Introducción	54
2.2.4.2.	Teoría de la voltamperometría de onda cuadrada	57
CAPÍTULO 3		64
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.1.	Instrumental electroquímico	64
3.1.1.	Celdas electroquímicas	64
3.1.2.	Electrodos	65

3.1.2.1.	Electrodos convencionales	65
3.1.2.1.1.	Electrodo de trabajo	65
3.1.2.1.1.1.	Tratamiento previo aplicado al electrodo de trabajo	66
3.1.2.1.2	Electrodo de referencia	66
3.1.2.1.3.	Contraelectrodo	67
3.1.2.2.	Sistema de electrodos de láminas impresas (ELI)	67
3.1.2.2.1.	Tratamiento previo aplicado al sistema de electrodos de láminas impresas	68
3.1.3.	Equipamiento	68
3.2.	Técnicas electroquímicas empleadas	69
3.3.	Materiales	69
3.3.1.	Reactivos	69
3.3.2.	Solventes y soluciones	70
3.3.3.	Esferas magnéticas (EM)	71
3.4.	Técnicas auxiliares	71
3.4.1.	Espectroscopia UV-Visible	71
3.4.2.	Cromatografía líquida de alta presión	72
3.5.	Otros equipamientos	72
3.6.	Procedimiento de ensayo para el inmunosensor electroquímico	72
3.7.	Extracción de ocratoxina	74
3.8.	Conjugación OTA-enzima	75
3.8.1.	Conjugación vía carbodiimida	75
3.8.2.	Conjugación vía carbonildiimidazol	76
3.8.3.	Conjugación vía formaldehido	77
3.9.	Estudios colorimétricos mediante ELISA	77
CAPÍTULO 4		79
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
4.1.	Comportamiento electroquímico de OTA	79
4.1.1.	Estudios de la oxidación electroquímica de ocratoxina A sobre electrodos de oro desnudo	79
4.1.1.1.	Pre-tratamiento del electrodo de trabajo	79
4.1.1.2.	Voltamperometría cíclica	80
4.1.1.3.	Voltamperometría de onda cuadrada	87

4.1.2. Estudios de la oxidación electroquímica de ocratoxina A sobre electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (MAE)	88
4.1.2.1. Electrodo de oro modificado con bencenotiol	88
4.1.2.2. Electrodo de oro modificado con el ácido 3-mercapto-propiónico	89
4.1.2.3. Electrodo de oro modificado con undecanotiol	90
4.1.2.4. Electrodo de oro modificado con la sal del ácido dietil ditiocarbámico y 2-(dietilamino) etanotiol	91
4.1.2.5. Electrodo de oro modificado con 4-amino-tiofenol	92
4.1.2.6. Electrodo de oro modificado con 2-amino-etanotiol (cisteamina)	93
4.1.2.6.1. Estudios realizados con voltamperometría cíclica	93
4.1.2.6.2. Estudios realizados con voltamperometría de onda cuadrada	96
4.2. Determinación de OTA	103
4.2.1. Determinación indirecta de OTA empleando el reactivo comercial	103
4.2.2. Comparación del método de extracción	105
4.2.3. Determinación indirecta de OTA en matrices reales	106
4.2.3.1. Exactitud del método	108
4.2.3.1.1. Ensayos de recuperación	108
4.2.3.1.2. Línea de identidad	110
4.3. Magneto inmunosensor electroquímico para la determinación de OTA	111
4.3.1. Estudio de la determinación del factor de dilución de AcmOTA y de los conjugados OTA-Enzima	112
4.3.1.1. Estudio con el conjugado OTA-FAL	112
4.3.1.2. Estudio con el conjugado OTA-HRP	114
4.3.2. Optimización del ELI	115
4.3.3. Estudio de la variación de masa de las esferas magnéticas	116
4.3.4. Optimización del volumen y concentración del sustrato enzimático y mediador redox	117
4.3.4.1. Concentración del sustrato enzimático	118
4.3.4.2. Volumen del sustrato enzimático	119
4.3.5. Detección directa de OTA en muestras de vino tinto	120
4.3.5.1. Curva de calibración	121
4.5.5.2. Determinación de OTA por HPLC	123

4.5.5.3.	Test de recuperación	124
CAPÍTULO 5		126
5.	CONCLUSIONES	126
5.1.	Estudios electroquímicos de ocratoxina A con electrodos de oro desnudo y modificado con MAE de cisteamina y su cuantificación ultrasensible en muestras de vino tinto	126
5.2.	Magneto inmunosensor electroquímico para la determinación directa de OTA en muestras de vino tinto	127
CAPÍTULO 6		129
6.	BIBLIOGRAFÍA	129

FIGURAS

FIGURA 1.1.	<i>Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.</i>	2
FIGURA 1.2.	<i>Estructura química de ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina C, 4-hidroxiocratoxina A y ocratoxina α.</i>	13
FIGURA 1.3.	<i>Estructura química de la micotoxina ocratoxina A (OTA).</i>	14
FIGURA 1.4.	<i>Ruta biosintética para la formación de OTA.</i>	16
FIGURA 1.5.	<i>Representación esquemática de las tres regiones de una MAE de tioles.</i>	28
FIGURA 1.6.	<i>Esquema general de la estructura de las esferas magnéticas.</i>	30
FIGURA 1.7.	<i>Estructura química de un anticuerpo.</i>	32

- FIGURA 1.8.** *Fuerzas atractivas de la unión Ag-Ac. La mitad del total de la fuerza de unión se debe a las interacciones hidrofóbicas.* 34
- FIGURA 1.9.** *Curva dosis – respuesta típica obtenida en un enzimoimmunoensayo.* 37
- FIGURA 2.1.** *Variables que afectan la velocidad de una reacción de electrodo. A: fuente de potencial, B: microamperímetro, C: electrodos, D: solución electrolítica.* 42
- FIGURA 2.2.** *Técnica de voltamperometría cíclica. (A) Circuito eléctrico empleado. CE, ER y ET son el contra-electrodo, el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, respectivamente. (B) perturbación aplicada al electrodo de trabajo y (C) respuesta corriente-potencial obtenida para una cupla redox simple (ec. 2.2).* 48
- FIGURA 2.3.** *Experimentos de cronoamperometría. Programa de salto de potencial (a), cambios en los perfiles de concentración con el tiempo (b) y respuesta de corriente – tiempo (c).* 53
- FIGURA 2.4.** *Programa de saltos de potencial aplicados al electrodo de trabajo en un experimento de VOC. ΔE_{oc} : amplitud de la onda cuadrada., ΔE_e : salto de escalera, τ : período de la onda cuadrada, t_p : tiempo de pulso. (●) Puntos donde se realiza el muestreo de la corriente.* 56
- FIGURA 2.5.** *Corrientes normalizadas directa, inversa y neta de un voltamperograma de OC para una cupla redox simple (ec.2.2) bajo control de difusión lineal semi infinita. $n \Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$; $n \Delta E_e = 10 \text{ mV}$.* 59
- FIGURA 2.6.** *Igual que en Figura 2.5, pero $n \Delta E_{OC} = 10 \text{ mV}$.* 60
- FIGURA 2.7.** *Igual que en Figura 2.5, pero $n \Delta E_{OC} = 0 \text{ mV}$.* 60
- FIGURA 2.8.** *Igual que en Figura 2.5, pero $n \Delta E_{OC} = 120 \text{ mV}$.* 61
- FIGURA 2.9.** *Relación entre la corriente de pico neta normalizada y el producto $n W_{1/2}$ para $\Delta E_e =$ A) 2,5; B) 10 y C) 25 mV.* 62

FIGURA 3.1. Esquema de la celda electroquímica utilizada. ET: Electrodo de trabajo. CE: Contra electrodo. ER: Electrodo de referencia., que termina en un capilar de Luggin-Haber. 65

FIGURA 3.2 Representación esquemática de un sistema de electrodos de lámina impresa. Electrodo de trabajo (ET); contra electrodo (CE); electrodo de pseudo-referencia (SR). 68

FIGURA 3.3. Representación esquemática del inmunosensor para OTA basado en un ensayo competitivo usando detección electroquímica. 73

FIGURA 3.4 Desde A hasta H se cargaron las distintas diluciones de AcmOTA y desde 1 hasta 12 los conjugados en dilución seriada. 78

FIGURA 4.1 Voltamperograma cíclico del electrodo de oro en 0,5 M H₂SO₄ acuoso. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. 80

FIGURA 4.2. Voltamperogramas cíclicos del blanco (línea de puntos) y dos repetitivos de OTA (línea continua y discontinua) registrados sobre el electrodo de oro desnudo en 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M}$, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$. 81

FIGURA 4.3. Voltamperogramas cíclicos del blanco (●) y dos repetitivos de OTA (voltamperogramas cíclico 1 (●) y 2 (●)). Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 4.2. 83

FIGURA 4.4. Voltamperogramas cíclicos del pre-pico de adsorción a distintas v . Las demás condiciones experimentales son idénticas a las de la Figura 4.2. $v = 25$ (●); 50 (●); 75 (●); 100 (●); 125 (●); 150 (●); 175 (●); 200 (●) mV s^{-1} . 84

FIGURA 4.5. Dependencia de la corriente de pico anódica con la velocidad de barrido del potencial. Los parámetros de la regresión lineal fueron: ordenada = $(0,033 \pm 0,006) \mu\text{A}$; pendiente = $(5,32 \pm 0,05) \mu\text{A V}^{-1} \text{ s}$; coeficiente de correlación lineal, $r = 0,9998$. 85

FIGURA 4.6. Voltamperogramas cíclicos del proceso redox superficial obtenidos en 20% ACN + 80% soluciones reguladoras de distintos valores de pH (línea discontinua pH 4, línea de puntos pH 7, línea continua pH 8) sobre el electrodo de oro desnudo.

$$c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M. } v = 25 \text{ mV s}^{-1}. \quad 86$$

FIGURA 4.7. Los tres registros de corrientes obtenidos para un voltamperograma de onda cuadrada del sistema redox superficial sobre el electrodo de oro desnudo, pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M. } \Delta E_{OC} = 50 \text{ mV; } \Delta E_e = 10 \text{ mV y } f = 10 \text{ Hz.}$

87

FIGURA 4.8. Dependencia de la corriente de pico anódica neta con la frecuencia. Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 4.7.

88

FIGURA 4.9. Voltamperogramas cíclicos de: (—) blanco sobre el oro desnudo; (---) blanco sobre el oro modificado con el bencenotiol; (—) OTA sobre el electrodo modificado, $t_{ac} = 60 \text{ s}$ y (—) OTA sobre el electrodo de oro desnudo. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución amortiguadora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M. } v = 25 \text{ mV s}^{-1}.$

89

FIGURA 4.10. Voltamperogramas cíclicos del blanco sobre el electrodo de oro desnudo (—) y modificado por el ácido 3-mercapto propiónico a $E_\lambda = 700 \text{ mV}$ (—) y 500 mV (—), respectivamente. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}.$

90

FIGURA 4.11. Voltamperogramas cíclicos del blanco (●) y de soluciones de OTA (primer barrido (●); segundo barrido (●); cuarto barrido (●)) sobre un electrodo de oro modificado con el undecanotiol. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M. } v = 50 \text{ mV s}^{-1}.$

91

FIGURA 4.12. Voltamperogramas cíclicos del blanco (1) y de la solución de OTA (2) sobre el electrodo de oro modificado con la sal del ácido dietil ditiocarbámico. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M. } v = 25 \text{ mV s}^{-1}.$

92

FIGURA 4.13. Voltamperogramas cíclicos del blanco (1) y de la solución de OTA (2) sobre el electrodo de oro modificado con el 4-amino-tiofenol. Solución de blanco 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 93

FIGURA 4.14. Voltamperogramas cíclicos de OTA sobre el electrodo de oro desnudo (1) y modificado por la cisteamina (2). Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$. 94

FIGURA 4.15. Voltamperogramas cíclicos del pre-pico de oxidación de OTA a distintos valores de pH sobre el electrodo de oro modificado con la cisteamina. pH 4 (●); pH 7 (●); pH 8 (●). Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 4.14. 95

FIGURA 4.16. Voltamperogramas cíclicos del pre-pico de oxidación de OTA sobre 1) electrodo de oro desnudo y 2) modificado con la cisteamina. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0. $c_{OTA}^* = 3,10 \times 10^{-5} \text{ M}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 96

FIGURA 4.17. Registros de las corrientes directa (I_d), inversa (I_i) y neta (I_n) de un voltamperograma de OC del pre-pico de oxidación de OTA sobre el electrodo de oro modificado con la cisteamina. $c_{OTA}^* = 6,20 \times 10^{-6} \text{ M}$. $\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_e = 10 \text{ mV}$ y $f = 10 \text{ Hz}$. 97

FIGURA 4.18. Gráficos de la relación entre la corriente de pico neta y la frecuencia en función de la frecuencia. Medio de reacción: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0. $c_{OTA}^* = 6,20 \times 10^{-6} \text{ M}$. $\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_e = 10 \text{ mV}$. 98

FIGURA 4.19. Registros de las corrientes neta (I_n), directa (I_d) e inversa (I_i) de voltamperogramas de OC de la cupla redox superficial en 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0. $c_{OTA}^* = 6,20 \times 10^{-6} \text{ M}$. $f = 10 \text{ Hz}$, $\Delta E_e = 10 \text{ mV}$ y $\Delta E_{OC} =$ a) 25 mV; b) 75 mV y c) 100 mV. 100

FIGURA 4.20. Registros de las corrientes neta, directa e inversa de un voltamperograma de OC del pre-pico de oxidación de OTA sobre el electrodo de oro

modificado con la cisteamina en 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0. $c_{OTA}^* = 6,47 \times 10^{-10}$ M. $f = 10$ Hz, $\Delta E_e = 10$ mV y $\Delta E_{OC} = 50$ mV. 104

FIGURA 4.21. Curva de calibración. Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la Figura 4.20. Los parámetros de la regresión lineal fueron los siguientes: ordenada = $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-7}$ A; pendiente = (730 ± 37) A M^{-1} y $r = 0,9947$. 105

FIGURA 4.22. Los parámetros de la regresión lineal fueron los siguientes: ordenada = $(-0,048 \pm 0,077)$ ng mL^{-1} ; pendiente = $(0,99 \pm 0,11)$ y $r = 0,9934$. 106

FIGURA 4.23. Curva de calibración correspondiente a los extractos generados a partir de muestras de vino a las que se les había agregado "ex profeso" una determinada concentración de OTA. Los parámetros de la OC fueron los mismos que los indicados en la Figura 4.20. 107

FIGURA 4.24. Variación de la absorbancia con el factor de dilución de OTA-FAL y con diferentes diluciones del AcmOTA: (■) AcmOTA 1/500; (●) AcmOTA 1/1000; (▲) AcmOTA 1/2000 y (▼) AcmOTA 1/5000. 113

FIGURA 4.25. Variación de la absorbancia con el factor de dilución de OTA-HRP y con diferentes diluciones del AcmOTA: (■) AcmOTA 1/1000; (●) AcmOTA 1/2000. 114

FIGURA 4.26. Voltamperogramas cíclicos del pirocatecol sobre ELI en una solución 1 mM de H_2Q en SACF. 1) (línea continua) antes de la activación y 2) (línea discontinua) después de la activación. $v = 100$ mV s^{-1} . 115

FIGURA 4.27. Efecto de la variación de la masa de las EM sobre la respuesta en corriente. Los factores de dilución de OTA-HRP y AcmOTA fueron 1/64 y 1/1000, respectivamente. 117

FIGURA 4.28. VOC de una solución 100 μM H_2Q . La línea sólida representa la corriente obtenida para la reducción de la benzoquinona (Q), producida tanto por el producto enzimático como por la oxidación electroquímica del pirocatecol (H_2Q). La

línea discontinua representa la corriente de reducción de la benzoquinona (Q) generada electroquímicamente. 118

FIGURA 4.29. *Variación de la $I_{p,n}$ con la concentración del sustrato enzimático (H_2O_2) y mediador redox (H_2Q). En el inserto se muestran los voltamperogramas de onda cuadradas correspondientes a cada punto de la figura.* 119

FIGURA 4.30. *Estudio de las variaciones del volumen del sustrato enzimático en el inmunosensor desarrollado.* 120

FIGURA 4.31. *Curva de calibración de OTA obtenida de los extractos de vino tinto con el inmunosensor electroquímico. B/Bo es el porcentaje de unión. Los parámetros de la curva fueron los siguientes: $IC_{50} = (0,272 \pm 0,081)$ ppb, Hill-Slope = $-(0,45 \pm 0,07)$, con un coeficiente de correlación, $r = 0,9942$. Las medidas amperométricas fueron realizadas a $37^\circ C$ en SACF, conteniendo $10 \mu M$ de H_2O_2 y $10 \mu M$ de H_2Q . Cada punto es un promedio de tres medidas replicadas.* 122

FIGURA 4.32. *Correlación entre los valores de concentración de OTA obtenidos del inmunosensor electroquímico (IE) y aquellos obtenidos por el método oficial.* 124

TABLAS

Tabla 1.1. *Principales micotoxinas agrupadas de acuerdo a su origen bio-sintético.* 4

Tabla 1.2. *Clasificación de las micotoxinas según la IARC.* 7

Tabla 1.3. *Fases del laboratorio en el análisis de micotoxinas.* 10

Tabla 1.4 *Clasificación de los biosensores.* 20

Tabla 4.1. *Potenciales de pico anódico ($E_{p,a}$) y catódico ($E_{p,c}$), corrientes de pico anódica ($I_{p,a}$) y catódica ($I_{p,c}$) para los picos desdoblados, la relación entre la $I_{p,a}$ y $I_{p,c}$, los valores $(1-\alpha)$, como así también los valores promedios del potencial formal, \bar{E}_f , de*

la relación entre las corrientes de pico anódica y catódica, $(\overline{I_{p,a}} / \overline{I_{p,c}})$ y del coeficiente de transferencia, $(\overline{1-\alpha})$ para la cupla redox superficial obtenida en 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0 sobre el electrodo de oro modificado con cisteamina.

$c_{OTA}^* = 6,20 \times 10^5 \text{ M.}$ 102

Tabla 4.2. Ensayos de recuperación. 109

Tabla 4.3. Análisis estadístico de la respuesta del inmunosensor para tres muestras de vino tinto enriquecidas con diferentes cantidades de OTA. Cada punto es un promedio de tres medidas replicadas. 125

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. Micotoxinas

1.1.1. Generalidades

Las micotoxinas son compuestos orgánicos biológicamente activos producidos por hongos de diferentes especies. Estos compuestos tienen lugar cuando la fase de crecimiento del hongo llega a su etapa final y alcanza la fase estacionaria, en la cual las micotoxinas son liberadas [1] (Figura 1.1). Ellas son potencialmente peligrosas para el hombre y los animales. Las intoxicaciones de estos últimos, asociadas con los alimentos, han sido reconocidas o sospechadas durante muchos años. Sin embargo, la implicancia de las micotoxinas producidas por hongos se reconoció recién a principios de la década de los sesenta, con el descubrimiento de las aflatoxinas [2, 3].

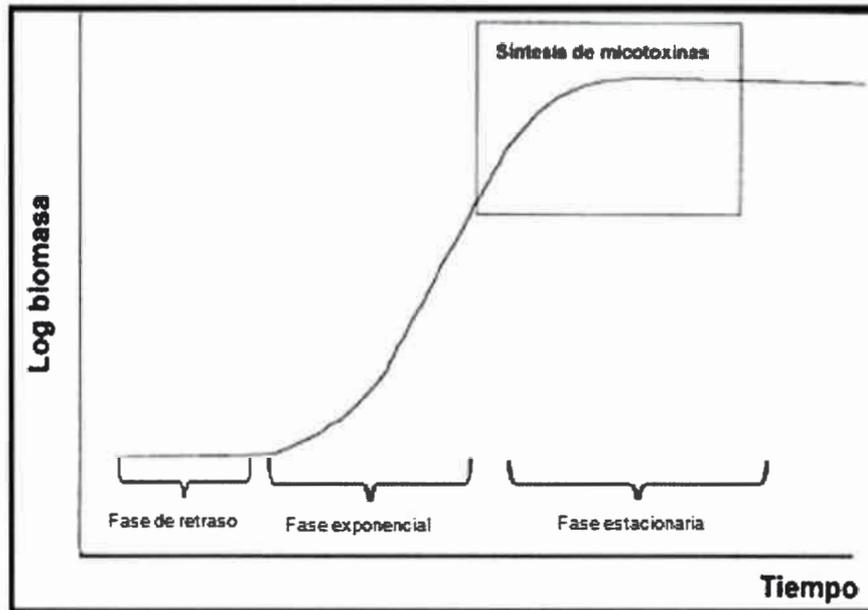


FIGURA 1.1. *Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.*

El nombre "micotoxina" se deriva de las palabras "mykes" y "toxina", que significan hongo y veneno, respectivamente. El término micotoxina se reserva para productos químicos tóxicos pequeños (PM~700) formados como metabolitos secundarios por algunos hongos que colonizan fácilmente el cultivo en el campo o durante la cosecha. La contaminación puede ocurrir pre- o pos-cosecha. Generalmente, las cosechas que son almacenadas por más tiempo que lo recomendado llegan a ser un blanco potencial para el crecimiento de hongos y la subsiguiente formación de micotoxinas. Estas pueden aparecer en diferentes condiciones ambientales, dependiendo de la especie del hongo.

1.1.2. Vías de síntesis y estructuras químicas

Los metabolitos secundarios de origen fúngico poseen estructuras químicas extremadamente diversas. Además, son producidos por grupos taxonómicos restringidos, no son esenciales para el organismo que los produce y son sintetizados por diferentes vías a partir de uno o más metabolitos generales (del metabolismo primario fúngico). En la naturaleza hay una enorme variación en el metabolismo

secundario. Esta variación puede ser intergenérica, intraespecífica y aún entre cepas de la misma especie [4]. Los compuestos orgánicos producidos por hongos han sido categorizados en base a su origen biosintético [5,6]. Dicha clasificación pone énfasis en el hecho de que, los metabolitos fúngicos, a pesar de su enorme diversidad de estructuras y actividades, derivan de unas pocas vías bio-sintéticas. El intermediario más importante en el metabolismo secundario de los hongos es la acetil coenzima A (acetil-CoA). La condensación de acetil-CoA con malonil-CoA lleva a la formación de policétidos o de ácidos grasos. En base a la taxonomía química, los metabolitos secundarios se clasifican en 7 grupos, 3 de los cuales involucran directamente a la acetil-CoA: a) los derivados de los ácidos grasos, b) los terpenos y esteroides, c) los policétidos.

Otros grupos comprenden a los metabolitos, en cuyo camino bio-sintético no interviene el acetato (son los derivados de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos) y los metabolitos derivados de aminoácidos. Por último, hay una categoría de compuestos no clasificados, dado que tienen un origen mixto, o bien porque no se conoce completamente su origen bio-sintético. La Tabla 1.1 muestra las principales micotoxinas y su origen bio-sintético.

Tabla 1.1. Principales micotoxinas agrupadas de acuerdo a su origen bio-sintético.

CATEGORIA BIOSINTÉTICA	MICOTOXINAS REPRESENTATIVAS
Policétidos	
Di-	Moniliformina
Tetra-	Patulina, ácido penicílico
Penta-	Ocratoxinas, citrinina, diplosporina
Hexa-	Maltoricina
Hepta-	Rugulosina, viomellina, viriditoxina, xantogmenina
Octa-	Ergocromos, luteoskirina
Nona-	Citreoviridina, citocalasinas, fumonisinas, zearalenona
Deca-	Aflatoxinas, ácido norsolorínico
Ácido tetrámico	
	Acido ciclopiazónico, ácido tenuazónico
Péptidos	
	Ergotamina, fomopsina
Aminoácidos	
Simples	Ácido aspergílico
Modificados	Brevianamida, alcaliodes del ergot, roquefortina
Terpenos	
Mono-	Viridicatum toxina
Sesqui-	Tricotecenos
Di-	Paspalina, penitrem, paxilina

1.1.3. Agentes productores de micotoxinas

Tres géneros fúngicos aparecen como los mayores productores de micotoxinas: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. La mayoría de las especies productoras de micotoxinas son saprófitas (especies no patógenas que se alimentan de materia orgánica); unas pocas son patógenos facultativos de plantas [7]. Sin embargo, establecer que una toxina específica es la causante de una "micotoxicosis" es una tarea bastante difícil [8]. La "micotoxicosis" puede definirse como los síndromes

de la toxicidad resultante de la absorción de micotoxinas por el hombre y por los animales, generalmente por ingestión. Tanto la materia prima como los subproductos destinados a la alimentación humana o animal pueden estar expuestos a la contaminación fúngica. La naturaleza y el grado de contaminación con hongos toxicogénicos determinarán la presencia o ausencia de micotoxinas en el producto. La identificación de los hongos contaminantes por sí sola, tiene un valor limitado en el diagnóstico de las "micotoxicosis", ya que las conclusiones finales sólo pueden ser obtenidas una vez realizadas la extracción e identificación de las toxinas. Esto es debido a que:

- La presencia del hongo no asegura que se haya producido la toxina.
- Una toxina determinada puede persistir en un producto, aunque el hongo no esté presente.
- Un hongo puede ser capaz de producir más de una toxina.
- La producción de una micotoxina particular depende de diferentes factores, tanto biológicos, químicos y/o físicos.
- Una toxina dada puede ser producida por más de un género fúngico.

Es importante destacar que la presencia de un hongo toxicogénico en un alimento es, sin duda, un llamado de atención del peligro de encontrar micotoxinas [9]. Entre los sustratos más apropiados para la biosíntesis de micotoxinas figuran los productos de origen vegetal (cereales y oleaginosas), ricos en proteínas y calorías, que constituyen un valioso aporte a la dieta de la gran mayoría de la población mundial. El crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas pueden ocurrir en los granos, durante el desarrollo de los mismos en la planta, durante su almacenamiento o en cualquier otra etapa de la cadena alimentaria.

1.1.4. Problemas asociados a las micotoxinas

1.1.4.1. Toxicidad

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de especies animales.

Los efectos adversos pueden afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario. Los síntomas causados por las micotoxinas suelen ser tan diferentes unos de otros como lo son las propias estructuras químicas de dichas toxinas [10 -12].

En términos generales, el riesgo de intoxicación aguda por micotoxinas en el hombre es bajo o moderado en comparación con intoxicaciones de origen microbiológico o por contaminantes químicos. No obstante, según Kuipper-Goodman [13] en la exposición crónica y, teniendo en cuenta la severidad de las lesiones crónicas (especialmente el cáncer), las micotoxinas presentan mayor riesgo tóxico que los contaminantes de origen antropogénico, aditivos alimentarios y plaguicidas.

En cuanto a la toxicidad crónica, la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC; *Internacional Agency for Research on Cancer*) [14] clasifica varias micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre:

- **Grupo 1:** el agente es carcinogénico en humanos.
- **Grupo 2A:** agente probablemente carcinogénico en humanos. Existe limitada evidencia sobre humanos, pero suficiente con animales.
- **Grupo 2B:** agente posiblemente carcinogénico; la evidencia en humanos es limitada y, tampoco, hay suficiente evidencia con animales de experimentación.
- **Grupo 3:** el agente no es clasificable como carcinogénico para humanos y no puede incluirse en otro grupo.
- **Grupo 4:** el agente, probablemente, no es carcinogénico en humanos. La evidencia disponible, tanto en humanos como en animales de experimentación así lo sugiere.

En la Tabla 1.2 se resume la evaluación realizada por la IARC en relación al poder carcinogénico de algunas micotoxinas.

Tabla 1.2. Clasificación de las micotoxinas según la IARC.

MICOTOXINAS	IARC
Aflatoxina B ₁	1
Aflatoxina M ₁	2B
Ocratoxina A	2B
Fumonisina B ₁	2B
Esterigmatocistina	2B
Citrinina	3
Patulina	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium sporotrichioides</i> (Toxina T-2)	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. rookwellense</i> (zearalenona, Deoxinivalenol, nivalenol y fusarenona X)	3

1.1.4.2. Pérdidas económicas

Otro de los problemas debido a la presencia de micotoxinas en productos vegetales son las pérdidas económicas que originan. La Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (OAANU) estima que un 25 % de la producción agrícola destinada al consumo de alimentos es afectada por micotoxinas cada año.

La presencia de micotoxinas produce pérdidas económicas directas, que resultan en la disminución de la producción, en la calidad de los granos, en la productividad de los animales y en el comercio nacional e internacional. A esto se

debe agregar el costo que presenta el diseño de programas de monitoreo y la necesidad de establecer regulaciones que determinan los niveles máximos permitidos, a fin de minimizar los riesgos para la salud humana y animal. Además, se deben considerar las pérdidas económicas indirectas, las cuales si bien son difíciles de cuantificar, son las mayores. Los productores pueden recibir baja rentabilidad por rechazo de sus productos en los mercados internos y externos [15].

1.1.5. Regulaciones

En los últimos años la creciente preocupación que, desde el punto de vista de seguridad alimentaria, ha supuesto la presencia de micotoxinas en los alimentos, se ha traducido a nivel legislativo en un incremento del número de normativas que regulan no sólo los niveles máximos para cada micotoxina en diferentes alimentos, sino también los protocolos de toma de muestras y las especificaciones requeridas a los métodos de análisis a utilizar para las determinaciones analíticas. Muchos organismos internacionales están tratando de lograr una estandarización universal de los límites reglamentarios para las micotoxinas. Esta es una tarea extremadamente difícil, puesto que deben considerarse muchos factores para decidir las normas reglamentarias.

Además de los factores científicos y técnicos, tales como la evaluación del riesgo y la exactitud analítica, hay factores económicos y políticos tales como los intereses comerciales de cada país y la permanente necesidad de un suministro suficiente de alimentos que también juegan un determinado rol en el proceso de toma de decisión. Todo el proceso se complica aún más por el hecho de que los niveles de acción pertenecen a la contaminación por una sola micotoxina, pero en la vida real las micotoxinas suelen presentarse en combinación y de esta forma los niveles de acción son más bajos. Medir los efectos toxicológicos de una diversidad de combinaciones de micotoxinas, como se presentan en la naturaleza, es una tarea gigante y tal vez imposible, especialmente considerando que puede haber presencia de micotoxinas aún no identificadas. Además, la nutrición, la gestión, el ambiente y las especies contribuyen todos a determinar el efecto de la combinación de micotoxinas sobre la salud de las personas y los animales susceptibles.

La evaluación del peligro ocasionado por las micotoxinas conduce a la estimación de las dosis consideradas como seguras, tales como la ingesta provisional tolerable semanal (PTWI, del inglés *provisional tolerable weekly intake*) y la ingesta provisional tolerable diaria (PTDI, del inglés *provisional tolerable daily intake*) [16].

A pesar de estos desafíos, la mayoría de los países de la Unión Europea han llegado a un acuerdo común sobre una política estandarizada para la regulación de los principales niveles de micotoxinas en distintos alimentos e ingredientes de alimentos [17,18]. La meta ideal es eliminar las micotoxinas de la cadena alimentaria. Sin embargo, a nivel práctico, esto es imposible. Los niveles de tolerancia publicados por los países de la Unión Europea se basan, fundamentalmente, en estudios sobre toxinas individuales.

1.1.6. Análisis de micotoxinas

El análisis de micotoxinas hace su aparición en el proceso productivo cuando empieza el almacenamiento de los granos y, es aquí, donde comienza la responsabilidad de la industria agropecuaria. Se debe comprar grano de buena calidad y evitar así que el insumo contaminado llegue a los animales. Además, se debe tener un programa adecuado de manejo de materiales para disminuir la posibilidad de que el grano y el alimento lleguen a contaminarse. Dentro de este programa, es importante contar con métodos de análisis químico que sean confiables.

Por consiguiente, el análisis de las micotoxinas adquiere una gran importancia, pues cualquier acción a tomar, ya sea un reclamo al vendedor de granos o una modificación en la dieta o manejo, está fundamentada en el valor informado por los laboratorios.

La determinación de micotoxinas no es algo simple, dado que ellas se encuentran distribuidas de manera heterogénea en el insumo. Sin embargo, de manera simple, en la Tabla 1.3. se muestra como el análisis puede dividirse en tres etapas cruciales.

Tabla 1.3. Fases del laboratorio en el análisis de micotoxinas.

Fase Pre-analítica	Fase Analítica	Fase Pos-analítica
<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones de toma de muestras. • Identificación de muestras. • Manipulación y conservación de muestras. • Recepción de muestras. 	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas estandarizadas. • Equipos calibrados. • Calidad de reactivos. • Utilización de estándares, calibradores y controles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Validación de resultados. • Transcripción de resultados. • Elaboración (entrega) de informes. • Archivo de informes.

El primer factor que llega a tener una influencia directa en el resultado es el muestreo. El problema del muestreo es, en el caso de las micotoxinas, un problema importante y representa la mayor fuente de error en los resultados [19]. En este aspecto, hay consenso respecto a que un mal procedimiento de muestreo lleva a resultados que difieren de un laboratorio a otro. Por lo tanto, se recomienda seguir un procedimiento de muestreo establecido y que el tamaño de muestra para el análisis en granos no sea inferior a 5 kg [20]. El envío de la muestra al laboratorio debe hacerse en bolsa de papel "Kraft" para el caso de granos y alimentos.

Una vez que la muestra llega al laboratorio, ésta pasa por un proceso de preparación que consiste en la molienda y el cuarteo para obtener una sub-muestra pequeña, pero representativa para ser analizada. Luego, se lleva a cabo un proceso de extracción mediante el uso de solventes orgánicos o mezclas de ellos con agua. La eficiencia de la extracción de las micotoxinas va a depender del tipo de solvente utilizado. Posterior a esto, en algunos métodos, se realiza un proceso de limpieza o purificación para eliminar las impurezas que pueden interferir en la cuantificación.

Debido a las variadas estructuras de estos compuestos, no es posible el uso de una técnica estándar para detectar todas las micotoxinas, cada una de ellas requiere un método diferente. Lo que funciona bien para algunas moléculas podría ser inapropiado para otras de características similares, o para la misma molécula en un entorno (matriz) diferente [21]. Debido a esto, para la cuantificación existen diferentes métodos de análisis que pueden ser utilizados y el hecho de que la mayoría de las micotoxinas son tóxicas en concentraciones muy bajas, la selección siempre se debe

basar en que el método a emplear sea confiable, aplicable y práctico [21, 22]. La confiabilidad se refiere a su exactitud en la determinación y a su variabilidad o precisión y es el parámetro más importante a considerar desde el punto de vista analítico. Además, es necesario que el método se aplique a una variedad amplia de muestras y que sea práctico con respecto al costo, tiempo de análisis y capacitación para su realización. El método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) es un método exacto y preciso que ha sido aceptado como método oficial por la AOAC (International 994.08) y, como método de referencia, para algunas micotoxinas. Otros métodos de referencia son la cromatografía de gases (GC), que se utiliza para el análisis de tricotecnos y la cromatografía de capa fina (TLC). Sin embargo, estos métodos no son ampliamente utilizados, pues requieren de instrumentación de elevado costo y de una alta capacitación del usuario.

Por consiguiente, en los últimos años se han desarrollado métodos inmunoquímicos para facilitar el análisis. La ventaja de estos métodos es que son rápidos, simples y de bajos requerimientos instrumentales. Por consiguiente, en el caso de un gran número de análisis a realizar, los métodos inmunoquímicos representan una buena alternativa. Sin embargo, su mayor desventaja es que se presentan interferencias que ocasionan falsos positivos que conllevan a una interpretación problemática. Por lo tanto, los valores positivos obtenidos con estos métodos conviene que sean confirmados mediante un método de referencia.

Los métodos inmunoquímicos comerciales se pueden dividir, básicamente, en métodos que utilizan columnas de inmunoafinidad o métodos ELISA (ensayos inmuno-adsorbentes unidos a enzimas). Aunque el método de columnas de inmunoafinidad fue originalmente desarrollado para la cuantificación mediante fluorimetría, en la actualidad las columnas han sido utilizadas para la purificación y concentración de las micotoxinas, para su posterior detección mediante HPLC, GC y TLC. Los métodos ELISA son generalmente utilizados como monitoreo rápido. Otro aspecto importante es que el método analítico utilizado por el laboratorio haya sido desarrollado y validado para el tipo de insumo analizado.

El uso de métodos electroquímicos para la detección de micotoxinas no ha sido igualmente generalizado, a pesar de que éstos, como métodos de detección, pueden implicar una mejora sustancial en los límites de detección cuando se los compara con las técnicas colorimétricas en general, o bien, frente a los detectores ultravioletas en

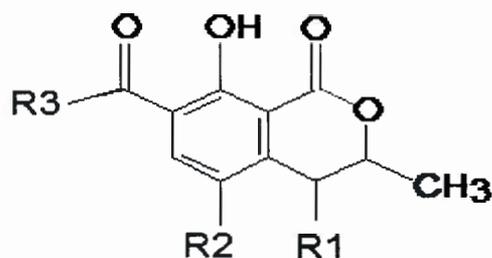
HPLC. Además, con sensibilidades comparables, pueden implicar un sustancial ahorro de tiempo y equipamiento, no obstante la dificultad principal que, en principio, han presentado los detectores electroquímicos, ha sido la de lograr las condiciones más adecuadas del medio utilizado (solvente, electrolito soporte, acidez, temperatura, etc.) para obtener una señal eléctrica apropiada. Es sabido que el medio de reacción influye marcadamente sobre las distintas etapas del mecanismo de oxidación y/o reducción de contaminantes y, por ende, sobre la respuesta electroquímica obtenida [23,24]. En 1987, Hayes y col. utilizaron electrodos de carbono vítreo como detectores electroquímicos en cromatografía HPLC para determinar compuestos fenólicos en bebidas [25]. Clough efectuó determinaciones analíticas de tocoferoles utilizando la voltamperometría de onda cuadrada (VOC) sobre electrodos convencionales [26]. En 1999, Nevado y col., [27] realizaron determinaciones de hormonas en medicamentos utilizando VOC sobre electrodos de carbono vítreo. Por otra parte, en nuestro laboratorio se han puesto a punto previamente técnicas electroanalíticas sobre matrices reales vinculadas a alimentos [28]. Así, se han determinado antioxidantes sintéticos presentes en aceites vegetales comestibles mediante barrido lineal de potencial [29] y VOC sobre ultramicroelectrodos de fibra de carbono [30].

Además, la determinación electroanalítica de micotoxinas en matrices naturalmente contaminadas ha sido exitosamente realizada muy recientemente en nuestro laboratorio [31,32] Estos, entre otros muchos casos, avalan la importancia de las técnicas electroquímicas y, fundamentalmente, las técnicas de pulso de potencial en las determinaciones de analitos a niveles de trazas. También, cabe destacar la importancia de las determinaciones mediante el método de las adiciones estándar a la muestra a analizar, método que ha arrojado, entre otros, resultados sumamente alentadores y competitivos para la detección de antioxidantes sintéticos en muestras de aceites vegetales comestibles [28-30] y de micotoxinas en matrices contaminadas [31,32]. Cabe indicar, además, la importancia que corresponde prestar a las etapas de extracción y posterior concentración del analito, dado que puede implicar la pérdida de muestra y, de esa manera, afectar los porcentajes de recuperación de analito y, por ende, la calidad del análisis.

1.1.7. Ocratoxina A

1.1.7.1. Generalidades

Las ocratoxinas constituyen una familia de micotoxinas, cuya estructura química se compone de un núcleo de isocumarina unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida. La ocratoxina A (OTA) es el miembro más tóxico de esta familia, la cual está constituida por cinco miembros. En la Figura 1.2. se muestra la estructura química de las ocratoxinas [21,33].



Ocratoxina	R1	R2	R3
OTA	H	Cl	-NH-CH-(COOH)-CH ₂ -fenil
OTB	H	H	-NH-CH-(COOH)-CH ₂ -fenil
OTC	H	Cl	-NH-CH-(COOC ₂ H ₅)-CH ₂ -fenil
4-hidroxiocratoxina A	H	Cl	-OH
OTα	OH	Cl	-NH-CH-(COOH)-CH ₂ -feni

FIGURA 1.2. Estructura química de ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina C, 4-hidroxiocratoxina A y ocratoxina α.

OTA fue descubierta en el año 1965 como un metabolito fúngico que mostró una conducta tóxica en animales que consumían alimentos contaminados [21, 34]. Principalmente, se la encuentra en alimentos inapropiadamente almacenados, tales como [34-38]:

- Cereales (cebada, trigo, centeno).
- Frutas secas (almendras, avellanas, castaños, nueces, pistachos).
- Bebidas tales como vino y cerveza.

- Uva
- Café en todas sus variantes.
- Tejidos de animales, sangre, leche materna.

Se considera a esta micotoxina como una de las más frecuentes en la contaminación de los granos de cereales junto a las aflatoxinas y las toxinas del género *Fusarium* y *Alternaria* [39-41].

1.1.7.2. Datos químicos de ocratoxinas

La nomenclatura según la IUPAC es: 7-(L-β-fenilalanil-carbonilo)-carboxilo-5-cloro-8-hidroxi-3R-metilisocumarina y su estructura química se muestra en la Figura 1.3. Su configuración química se determinó utilizando espectroscopía de dispersión óptica rotatoria [42,43]. La fórmula empírica es $C_{20}H_{18}O_6NCl$ y su peso molecular es de $403,82 \text{ g mol}^{-1}$.

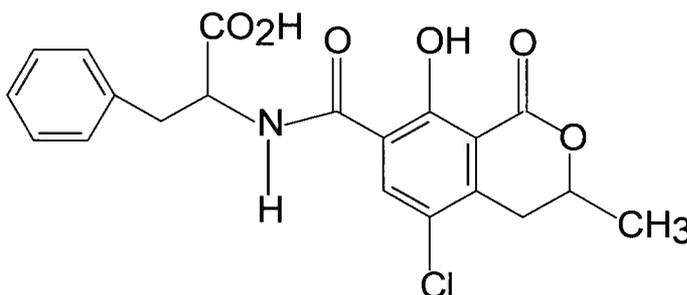


FIGURA 1.3. Estructura química de la micotoxina ocratoxina A (OTA).

OTA es un compuesto de color blanco, cristalino, altamente soluble en solventes orgánicos polares y ligeramente soluble en agua y en NaCO_3H . Los puntos de fusión son de 90 y 171°C cuando se recristaliza en benceno o xileno, respectivamente [44]. OTA exhibe absorción en la región UV-visible del espectro electromagnético, con un máximo de absorción a $\lambda_{\text{max}} = 333 \text{ nm}$ en metanol y un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $6400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [45]. Además, tiene un máximo de emisión de fluorescencia a $\lambda = 467 \text{ nm}$ (en 96 % de etanol) y a $\lambda = 428 \text{ nm}$ en etanol absoluto. El espectro infrarrojo en cloroformo presenta bandas de absorción a 3380 , 1723 , 1678 y 1655 cm^{-1} [46].



OTA tiene propiedades de ácido débil, los valores de pK_a informados en la literatura se encuentran en el intervalo de 4,2 – 4,4 y 7,0 – 7,3 para el grupo carboxilo de la –fenilalanina y para el grupo hidroxifenólico de la isocumarina, respectivamente [47-49].

1.1.7.3. Fuentes fúngicas y biosíntesis

Aspergillus ochraceus y *Penicillium verrucosum* son las especies de hongos por excelencia productoras de OTA [50]. La aparición de estos hongos es ampliamente extendida, ya que ambas especies crecen en un amplio espectro de condiciones (sustrato, pH, humedad, temperatura, actividad de agua, etc.) [51-55]. En climas tropicales o semi tropicales, OTA es producido por *Aspergillus ochraceus*, mientras que en climas fríos o templados es producida por *Penicillium verrucosum* [33]. Hay otras especies de hongos con capacidad para producir OTA que pertenecen al género *Aspergillus*. Abarca y col. [56] describieron por primera vez la producción de OTA por *Aspergillus niger* y, desde entonces, son numerosos los estudios en los que se describe la producción de OTA por otras especies de *Aspergillus* (sección *Nigri*). Entre las especies de este grupo, *Aspergillus carbonarius* muestra el mayor potencial ocratoxigénico, ya que la mayor parte de los inóculos tienen capacidad para producir OTA en medios de cultivo [57,58].

En cuanto a la biosíntesis de OTA, si bien aún la vía no se ha determinado completamente, diferentes experimentos demostraron que la fracción de L-fenilalanina se origina en la vía siquimato y la isocumarina por la vía de la enzima policétido sintetasa, ver Figura 1.4. [33,35].

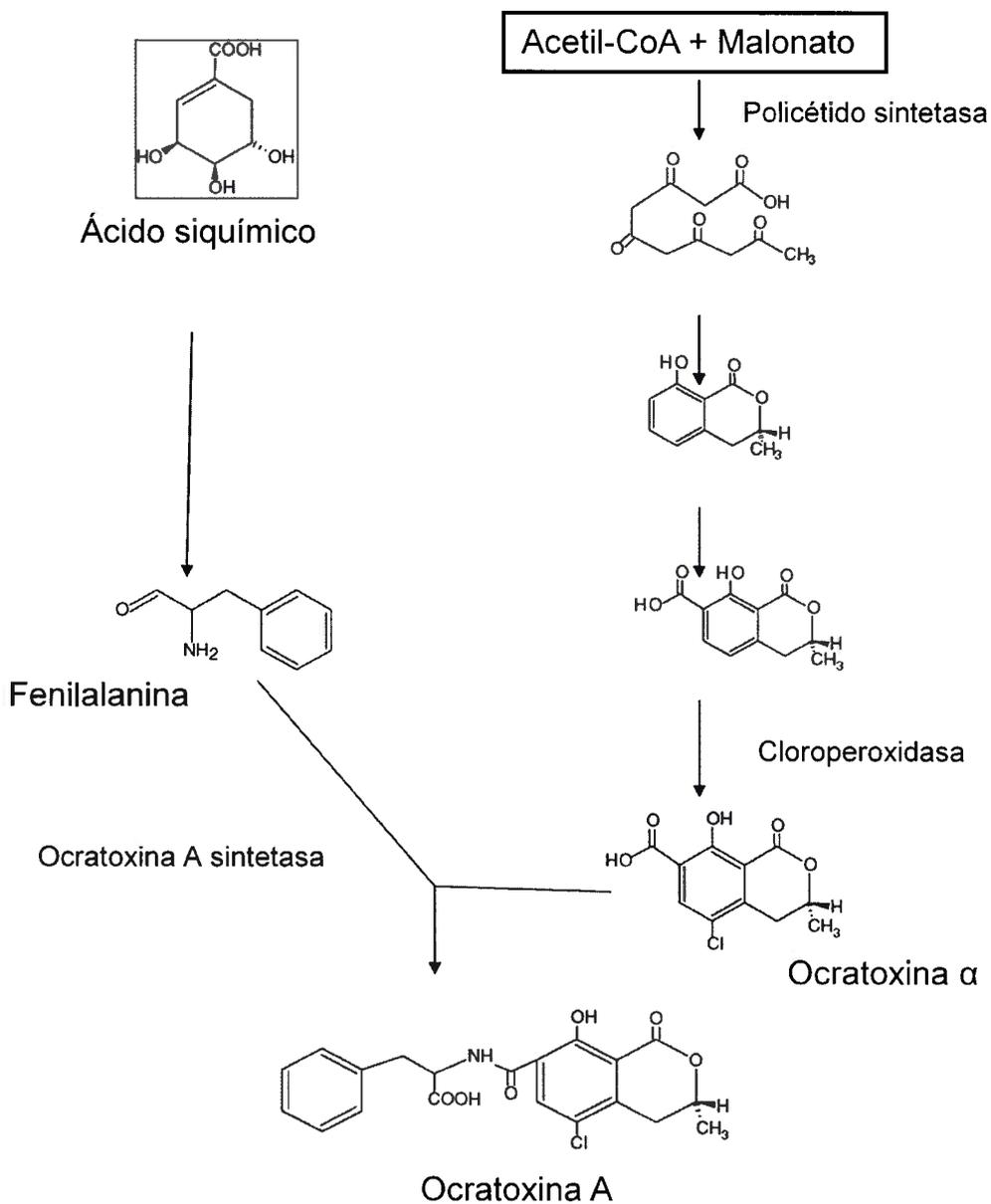


FIGURA 1.4. Ruta biosintética para la formación de OTA.

1.1.7.4. Efectos tóxicos

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, OTA se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y, ya en suero, presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, lo que determina una larga persistencia en el organismo. OTA luego se re-absorbe en el intestino y vuelve a la circulación como consecuencia de la recirculación biliar, lo que favorece la redistribución sistémica de OTA hacia diferentes

tejidos. En los riñones, OTA se acumula y produce lesiones agudas y crónicas por la inducción de un defecto en el mecanismo de transporte de aniones [33]. Los principales metabolitos son el producto de hidrólisis del enlace amida, los derivados hidroxilados (4-OH-OTA y 10-OH-OTA) y los productos de conjugación, entre otros. Se elimina por vía renal y hepato-biliar, así como también a través de la secreción láctea.

La toxicidad aguda que presenta OTA es relativamente baja y muestra variaciones entre especies. En cuanto a la toxicidad crónica, a OTA se la ha asociado con propiedades nefrotóxicas, hepatotóxicas y, en roedores, es un potente carcinógeno [34,59-61]. Los riesgos para la salud humana originados por la exposición a OTA se han localizado históricamente en los Balcanes, donde OTA ha sido asociada con la nefropatía endémica, una enfermedad inflamatoria diseminada y degenerativa del riñón, en la cual los pacientes sufren de tumores en el tracto urinario [62-64].

En cuanto a su genotoxicidad, OTA promueve el estrés oxidativo [65,66], daño oxidativo de bases [66] y la ruptura del ADN de cadena simple a través de la producción de especies de oxígeno reactivas [67,68].

Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual OTA induce la formación de tumores y se han publicado resultados conflictivos en cuanto a la capacidad que tiene OTA para unirse al ADN. Por ejemplo, se ha demostrado que, “*in vivo*”, OTA es pobremente metabolizada y no se ha detectado ningún intermediario reactivo que sea capaz de interactuar con el ADN [69]. Contrario a esto, se ha publicado que, “*in vitro*”, la oxidación electroquímica de OTA produce la formación de un aducto OTA-deoxi-guanosina y la aparición de una cupla redox quinona-hidroquinona, que se sugiere que sería la especie involucrada en la carcinogenicidad de OTA [70].

1.1.7.5. Regulaciones

Hay una gran variedad de productos a los que se les regula el nivel máximo de OTA permitido para su consumo. Estos productos varían desde cereales, frutas secas, cafes en todas sus variantes, vinos, jugos de uvas, uvas, alimentos para recién nacidos y niños de poca edad, alimentos dietéticos, especias y licores (entre otros).

Los máximos niveles que legisla la Comisión Reguladora de la Unión Europea (UE) se encuentran entre los $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ (para extractos de licores) a los $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (alimentos para recién nacidos, niños de poca edad y para alimentos dietéticos) [17,18].

De acuerdo a estudios recientes realizados por varios grupos de investigación dentro de la UE, los cereales son la principal fuente de contaminación por OTA, seguida por los vinos, particularmente, los vinos tintos [71,72]. El Comité sobre cadena alimentaria y salud animal de la UE ha emitido opinión favorable a la propuesta de la Comunidad Europea para establecer un máximo nivel de OTA en café, vino y bebidas a base de mosto de uva y jugo de uvas de $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2 ppb) [17,73].

1.1.7.6. Determinaciones de ocratoxina A en vinos

Dado que la presencia de OTA en vino tiene importantes implicancias tanto en la salud humana como en las economías regionales y nacionales, actualmente se intenta eliminar o, al menos, minimizar la presencia de OTA en vinos, lo que, al mismo tiempo, plantea la necesidad de investigar nuevas metodologías de detección y cuantificación más rápidas, económicas y de límites de detección menores [74].

Existen varios métodos para la determinación de OTA en muestras de vino [21], uno de los más utilizados es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con diferentes métodos de extracción y diferentes detectores [37,74-81]. Aunque la técnica más utilizada para la detección de OTA es la cromatografía HPLC con detector de fluorescencia, debido al hecho de que OTA posee fluorescencia [82], otros métodos analíticos han sido desarrollados tales como electroforesis capilar [83], radio-inmunoensayos [84], enzimo-inmunoanálisis (ELISA) [85-87] e inmunosensores y sensores electroquímicos [88-93].

Debido a su alta sensibilidad, los métodos voltamperométricos se han propuestos para la detección y cuantificación de OTA [94,95].

1.2. Sensores analíticos

1.2.1 Sensores químicos

Un sensor químico es un pequeño dispositivo que puede ser utilizado para medidas directas de un sustrato en la matriz de una muestra. Idealmente, tales dispositivos son capaces de responder de manera continua y reversiblemente y no perturban la muestra [96]. Estos dispositivos consisten de un elemento de transducción, cubierto con una capa de reconocimiento biológica o química. Esta capa interactúa con el sustrato de interés y los cambios químicos resultantes de esta interacción son convertidos por el elemento de transducción en señales medibles, las cuales pueden ser ópticas, acústicas, electroquímicas, etc.

1.2.2. Biosensores

Un biosensor se define, según un documento reciente de la IUPAC, como un tipo específico de sensor químico que comprende un elemento de reconocimiento biológico y un transductor físico-químico. El elemento biológico es capaz de reconocer la presencia, actividad o concentración de un analito específico en la solución o medio en que se encuentre.

El reconocimiento puede ser ya sea un a través de un equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor (biosensor basado en la afinidad ligando, cuando el elemento de reconocimiento es, por ejemplo, un anticuerpo, un segmento de DNA o receptor celular) o una reacción biocatalítica (biosensor basado en enzimas). De la interacción del elemento de reconocimiento con un analito resulta un cambio mensurable en una propiedad de solución, como la formación de un producto [97,98].

1.2.2.1. Clasificación de los biosensores

Los biosensores se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza del elemento de reconocimiento biológico, al tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito, al método utilizado para detectar dicha interacción o del

sistema de transducción. En la Tabla 1.4. se muestra un resumen de los diferentes tipos de biosensores [96].

Tabla 1.4 *Clasificación de los biosensores.*

Tipo de interacción	Detección de la interacción
<ul style="list-style-type: none"> • Biocatalítica • Bioafinidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Directa • Indirecta
Elemento de reconocimiento	Sistema de traducción
<ul style="list-style-type: none"> • Enzima • Orgánulo o célula completa • Receptor biológico • Anticuerpos • Ácidos nucleicos • Polímeros de impresión molecular • Ácidos nucleicos peptídicos • Aptáremos 	<ul style="list-style-type: none"> • Electroquímico • Óptico • Piezoeléctrico • Termométrico • Nanomecánico

Existen múltiples elementos de reconocimiento y sistemas de transducción. Teóricamente estos componentes admiten diversas combinaciones. En la práctica, la elección del material biológico depende de las características del compuesto a analizar.

La elección del transductor está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que éste determina cual será la variación en las propiedades físico-químicas que ocurra como consecuencia de la interacción.

1.2.2.1.1. Clasificación de los biosensores según el tipo de transductor utilizado

1.2.2.1.1.1. Sensores biocatalíticos

Son los biosensores mejor conocidos y los más estudiados. Se basan en la utilización de biocatalizadores, que son elementos que favorecen que ocurra una reacción química en la cual a partir de uno o varios sustratos se forman uno o varios productos conocidos sin consumo del biocatalizador, que se regenera y puede ser utilizado nuevamente. Estos biocatalizadores pueden ser sistemas que contienen diferentes elementos de reconocimiento, como ser: enzimas o sistemas multienzimáticos aislados, orgánulos celulares, células completas o tejidos animales o vegetales en los que estos sistemas se encuentran en su medio natural [99].

Pueden utilizarse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, mediante la detección de la desaparición de algún cosustrato conocido, distinto de aquel que se quiere detectar o bien, por la aparición de algún producto conocido. Existen sustancias tóxicas, como insecticidas o herbicidas, que inhiben la actividad de determinados sistemas enzimáticos de manera selectiva, de modo que estos sistemas se utilizan para detectar su presencia. Si, en presencia de los sustratos adecuados, no se produce la aparición de los productos correspondientes o esto ocurre en menor extensión de lo esperado, significa que en la muestra existe una sustancia tóxica que inhibe la reacción que favorece el biocatalizador

1.2.2.1.1.2. Sensores de bioafinidad

Los sensores de bioafinidad se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que exista transformación catalítica, sino que se produce una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor [99]. Para medir la interacción, ya que no existe consumo de sustratos ni generación de productos, se suele utilizar un receptor marcado o bien un elemento que compita con el analito por la unión al receptor, con una enzima que da una reacción biocatalítica complementaria, que es la que se detecta por el sistema de transducción.

El inconveniente que plantea este tipo de sistema es que se requieren pasos posteriores de lavado y separación del exceso de moléculas marcadas y la adición de sustratos para que ocurra la reacción que cataliza la enzima que se usa como marcador [99]. Puede utilizarse también un sistema de detección directa de la interacción entre el receptor y el analito, basándose en los cambios que se producen en la masa de la superficie, o bien por los cambios en las propiedades de la luz que se producen como consecuencia de esta unión. Este tipo de interacción presenta, en ocasiones, un intervalo de operación de concentración estrecho, debido a que se puede producir una saturación del receptor y, a menudo, no permiten un monitoreo continuo de la concentración del analito. El elemento de reconocimiento debe estar en contacto directo con la muestra y no se puede incorporar una membrana exterior para separar el elemento receptor de la matriz de la muestra, de modo que algunos de estos biosensores tienen dificultades para operar en matrices complejas. Se pueden utilizar para la detección de material genético de microorganismos, para detectar la presencia de patógenos o pesticidas o de cualquier tipo de sustancias que puedan causar una respuesta inmune (y, por tanto, permitir el desarrollo de anticuerpos).

Existen distintos tipos de receptores de bioafinidad como anticuerpos, lecitinas, células completas, ácidos nucleicos, polímeros de impresión molecular (PIMs) aptámeros y ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

1.2.2.1.1.2.1. Inmunosensores

Los inmunosensores son sensores de bioafinidad capaces de dar una señal analítica a partir del evento de formación del complejo inmunológico. Combinan un agente de reconocimiento biológico (antígeno o anticuerpo) que le confiere selectividad, con un transductor, que confiere sensibilidad y que convierte el evento de reconocimiento inmunológico en una señal eléctrica amplificable. La especificidad y afinidad de la interacción antígeno–anticuerpo determinan la selectividad y la sensibilidad del inmunosensor así como la posibilidad de su regeneración [96].

1.2.2.1.2. Clasificación de los biosensores según el tipo de transductor utilizado

Dependiendo de la técnica usada en la etapa de transducción de la señal, los biosensores pueden ser clasificados en ópticos, de masa, nanomecánicos, bioluminiscentes, térmicos, electroquímicos y piezoeléctricos [100,101].

1.2.2.1.2.1. Biosensores ópticos

Los biosensores ópticos son particularmente atractivos para su aplicación en sistemas de detección directa. Estos sensores se basan en la medición de la luz absorbida o emitida como resultado de una reacción biológica y/o química. Los transductores que tienen propiedades ópticas son muy variados, incluyendo sensores de fibra óptica, sensores de resonancia de plasmones superficiales y sensores de onda evanescentes.

1.2.2.1.2.2. Biosensores nanomecánicos

Los biosensores nanomecánicos están basados en el hecho de que el elemento de reconocimiento biológico, generalmente anticuerpos, se inmoviliza sobre la superficie de una microplaca de silicio, que se sumerge en una muestra líquida. La interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito produce un cambio diferencial en la tensión superficial del líquido y la micropalanca sufre una respuesta de tipo nanomecánico que consiste en un cambio de la frecuencia de resonancia [102].

1.2.2.1.2.3. Biosensores calorimétricos

Los biosensores calorimétricos detectan sustratos sobre la base de la posibilidad de desarrollar calor por reacciones bioquímicas del analito con una sustancia biológica activa conveniente, como puede ser una enzima [103].

1.2.2.1.2.4. Biosensores piezoeléctricos

Los biosensores piezoeléctricos operan sobre el principio de cubrir la superficie del biosensor selectivamente con una sustancia biológicamente activa. Los materiales que se utilizan para el diseño de este tipo de biosensores son del tipo piezoeléctricos, que son aquellos que entran en resonancia por la aplicación de un campo eléctrico alterno externo. La superficie cubierta es colocada en una solución que contiene analitos que se unen covalentemente a dicha sustancia. Así, la masa del cristal se incrementa, mientras que la frecuencia de resonancia de oscilación decrece proporcionalmente [104].

1.2.2.1.2.5. Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos son la clase de biosensores más comúnmente usados. Éstos combinan el poder analítico de la técnica electroquímica con la especificidad del proceso de reconocimiento biológico [105]. Dependiendo de la propiedad electroquímica a ser medida por el detector del sistema, los transductores electroquímicos pueden ser divididos en conductimétricos, potenciométricos o amperométricos.

1.2.2.1.2.5.1. Transductores conductimétricos

Este tipo de transductores miden los cambios en la conductancia (o alguna propiedad asociada a ésta) entre un par de electrodos como consecuencia de un componente biológico [106]. En algunos casos, se puede llegar a medir cambios de conductividad del propio analito [107]. Las medidas de resistividad en corriente continua son las más comunes para el funcionamiento de estos sensores, aunque para registrar medidas de impedancia se utiliza corriente alterna [108].

1.2.2.1.2.5.2. Transductores potenciométricos

Éstos se basan en realizar medidas de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia [109,110]. Ellos funcionan en condiciones de equilibrio y monitorean la acumulación de carga, generada por la unión

selectiva del analito a la biomolécula sobre la superficie del electrodo. Los transductores potenciométricos son el grupo de dispositivos más desarrollados y estudiados. El origen de los sensores químicos se remonta a principios del siglo XX con el desarrollo del electrodo de vidrio, uno de los sensores potenciométricos más utilizados. La mayor aplicación de este tipo de sensores es la fabricación de electrodos selectivos de iones [111], donde se modifica el electrodo de trabajo con una membrana selectiva a un ión determinado.

1.2.2.1.2.5.3. Transductores amperométricos

Estos transductores miden los cambios en la corriente en el electrodo de trabajo debido a la oxidación o reducción de los productos de las reacciones bioquímicas cuando se aplica un potencial adecuado. Las señales amperométricas son linealmente dependientes de la concentración del analito o de un grupo de analitos [105].

1.2.2.2. Características de los biosensores

Debido a las diferentes aplicaciones de los biosensores en análisis clínicos, industriales, medio ambientales y agroalimentarios [96], es deseable que estos dispositivos cuenten con las siguientes características:

- Alta sensibilidad, *para el análisis de los analitos que se encuentran en concentraciones trazas (ppb).*
- Alta selectividad, *para que el dispositivo interaccione selectiva o específicamente con el analito de interés.*
- Alta fiabilidad, *para que el dispositivo se altere lo mínimo posible o en el mejor de los casos no se altere.*
- Bajo costo de construcción, producción y mantenimiento. *Los biosensores pueden fabricarse a escala industrial, lo cual redundaría en un más que considerable abaratamiento de los costos de producción.*
- Tiempo de vida largo, *que no obligue al empleo del dispositivo en un período de tiempo corto desde su fabricación. La estabilidad química, física y mecánica del elemento de reconocimiento condiciona su duración. Los componentes*

biológicos, por su propia naturaleza, cuentan con una vida media limitada, pero las nuevas alternativas basadas en moléculas biomiméticas no presentan este inconveniente.

- *Tiempo de análisis cortos, para que posibilite una medición rápida, facilitando así, por ejemplo, la retirada de materias primas o productos contaminados o deteriorados antes de su uso o venta o la intervención para corregir algún parámetro en un proceso industrial.*
- *Pre tratamiento de la muestra innecesario, lo que supone un ahorro de tiempo, materiales y reactivos.*
- *Miniaturización. Debido a los desarrollos en microelectrónica y nanotecnología se han logrado reducir las dimensiones de estos dispositivos. Así, pueden ensamblarse varios de ellos en un mismo sistema para que realice varias tareas a la vez.*
- *Fácil de automatizar. Prescindir del control manual de estas unidades facilita su integración dentro de los sistemas que monitorean los procesos industriales.*
- *Capacidad multi-análisis. Ciertos biosensores llevan a cabo la determinación de diferentes analitos en forma simultánea.*

1.3. Monocapas Autoensambladas (MAE)

1.3.1. Generalidades de las MAE

Desde hace más de dos décadas, las películas de moléculas auto-organizadas o auto-ensambladas (MAE o SAMs, de su sigla en Inglés: self-assembled monolayers) han despertado un gran interés en la química electroanalítica debido a sus potenciales aplicaciones [112]. Las motivaciones de sus usos se deben a que mejora las propiedades electrocatalíticas, evita los problemas de suciedad superficial y previenen reacciones indeseables [113]. Por otro lado, la construcción de sensores electroquímicos con electrodos modificados con MAE mejora la selectividad, sensibilidad y disminuye tanto los tiempos de respuesta como los sobrepotenciales [113,114].

Las MAE están constituidas por una monocapa simple de moléculas adecuadas (generalmente, tioles, disulfuros, etc.) sobre un sustrato (más comúnmente oro, plata, mercurio, etc.), en las que las moléculas exhiben un alto grado de

orientación, orden molecular y empaquetamiento, generando superficies ordenadas, compactas y estables. Estas monocapas se caracterizan por ser fáciles de fabricar, caracterizar y manipular [115,116]. Una forma comúnmente utilizada para determinar la cantidad del tiol adsorbido sobre electrodos de oro es estudiar su desorción en medio alcalino (solución 0,5 M KOH acuosa). La posición del pico de desorción depende de la longitud de la cadena alquílica (en el caso de que el grupo espaciador sea un alcano), siendo más negativo el potencial del pico de desorción mientras más larga sea la cadena hidrocarbonada. Además, a partir del área del pico de desorción es posible determinar el número de moles de tiol adsorbido por área del electrodo utilizando la Ley de Faraday, siendo un valor comúnmente aceptado el de $(90 \pm 7) \mu\text{C cm}^{-2}$ [117].

1.3.2. Preparación y características

Las MAE se pueden obtener de dos formas: por deposición desde la fase vapor sobre un determinado sustrato o bien a partir de la inmersión del sustrato en una solución que contiene las moléculas adecuadas, las que, luego de un proceso de quimi-adsorción, originan un arreglo tri-dimensional del adsorbato [115].

Dichas moléculas son capaces de auto-organizarse, no sólo por la formación de enlaces químicos (enlaces covalentes) con el propio sustrato, sino también por la interacción entre ellas (fuerzas de van de Waals, interacciones puente hidrógeno, interacciones π , etc.), permitiendo así un empaquetamiento ordenado en su estructura molecular [115,117]. La reacción propuesta para la formación del enlace químico entre los tioles/disulfuros y la superficie de electrodos de oro es la siguiente [117,118]:



donde RSH representa la molécula de un tiol o de un disulfuro.

Las MAE, en general, poseen tres regiones, una región representada por el "grupo cabeza o grupo de anclaje", que es el que se enlaza químicamente al sustrato, otra representada por un "grupo espaciador", que puede ser una cadena alifática (saturada o insaturada) o aromática que estabiliza al adsorbato una vez que la película se formó completamente y otra región representada por el "grupo funcional terminal",

que es el grupo expuesto a la solución electrolítica y cuya estructura química puede ser modificada de acuerdo al tipo de interacción que se desee favorecer en la reacción bajo estudio [116]. Dichos grupos funcionales pueden ser grupos $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ de alcoholes o fenoles, $-\text{NH}_2$, etc. Ver Figura 1.5.

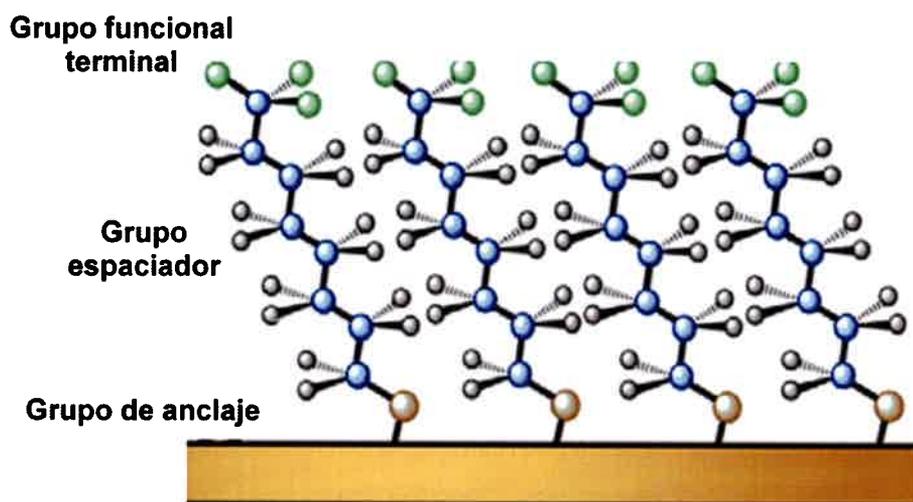


FIGURA 1.5. Representación esquemática de las tres regiones de una MAE de tioles.

1.3.3. Aplicaciones

Desde su descubrimiento, se ha buscado el diseño de películas específicas para aplicaciones tecnológicas, como por ejemplo, en el desarrollo de biosensores [119], en optoelectrónica [120], como películas inhibidoras de la corrosión [121], en el modelado de membranas celulares [122] y, entre otras, como películas lubricantes capaces de modificar la adhesión y la fricción de las superficies [123].

El diseño y construcción de materiales con superficies caracterizadas por arreglos ordenados y compactos de grupos funcionales orgánicos, ha sido uno de los objetivos principales de diversos grupos de investigación alrededor del mundo [124]. La importancia en el desarrollo de protocolos para la preparación de este tipo de superficies es evidente cuando se consideran sus numerosas aplicaciones [118]. Se destacan la investigación de reacciones orgánicas superficiales [125], estudios detallados de procesos de transferencia electrónica [126], el desarrollo de sensores

electroquímicos basados en fenómenos de reconocimiento molecular [127,128] y el diseño y construcción de dispositivos electrónicos a escala nano-métricas [129].

1.4. Esferas magnéticas (EM)

1.4.1. Generalidades

Las separaciones magnéticas fueron descritas por primera vez en el año 1792 cuando Willian Fullarton usó un imán para separar partículas de hierro [130]. Desde entonces, se describen en la literatura varias aplicaciones del uso del imán como herramienta para realizar separaciones. Las suspensiones de las esferas magnéticas (EM), son comúnmente usadas en técnicas de separaciones en bioanalítica. Estas consisten de un núcleo magnético, comúnmente óxidos de hierro, tales como magnetita (Fe_3O_2), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), metales puros (Fe, Co) o aleaciones (CoPt_3 , FePt) [131,132] el cual se encuentra rodeado por un polímero inerte (copolímero de estireno y divinilbenceno) el cual le ofrece protección contra las condiciones ambientales no deseables, previniendo la oxidación y disolución en medios ácidos [133]. Este polímero inerte se puede encontrar funcionalizado por grupos químicos ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, epoxi, toxil) o biológicos (proteínas tales como proteína A, proteína G, avidina, biotina, enzimas, anticuerpos y material genético como ADN) los cuales son los responsables del proceso de separación, el cual puede ocurrir por biocompatibilidad, reconocimiento de forma, detección antigénica o fisisorción (Figura 1.6.) [131]. Estas partículas presentan grandes ventajas, tales como: fácil manipulación, capacidad de reutilización, escasa formación de agregados, etc.

Las reacciones de las esferas magnéticas con el analito a separar se caracterizan por su elevada sensibilidad, elevada cinética de reacción, una muy buena reproducibilidad y por la ampliación del intervalo de trabajo para un determinado analito debido a la modulación de la cantidad de esferas utilizadas. No obstante, las características más importantes que ofrecen las esferas magnéticas son su capacidad de concentración y la minimización del efecto matriz [132-135].

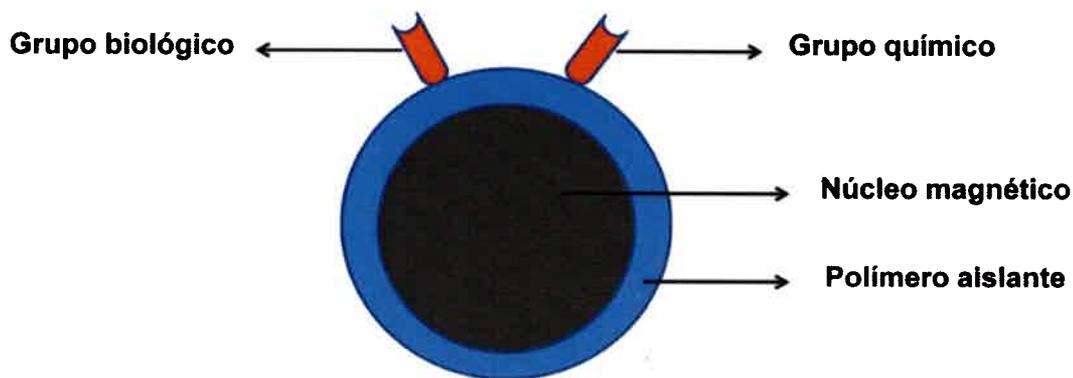


FIGURA 1.6. *Esquema general de la estructura de las esferas magnéticas.*

Existen diferentes métodos de síntesis tales como co-precipitación, por descomposición térmica, microemulsión y por tecnologías hidrotérmicas. De todas ellas, la co-precipitación y descomposición térmica son las más ampliamente utilizadas [131]. El tamaño de estas son variables, su diámetro va desde los 0,7 μm a los 5 μm [136] y presentan la propiedad de ser paramagnéticas, es decir, presentan comportamiento magnético en presencia de un campo magnético y, si el mismo se retira, el magnetismo desaparece [132].

1.4.2. Aplicaciones analíticas

Las EM tienen importantes aplicaciones en diferentes áreas, tales como biología, bioquímica y en la química analítica [132]. Los principales usos que se les da son la pre-concentración, separaciones magnéticas y en sistemas de análisis y detección para la construcción de sensores y biosensores con el objetivo de identificar y cuantificar aminoácidos [137], proteínas [138,139], ácidos nucleicos [132], orgánulos celulares [132], analitos orgánicos e inorgánicos [135,140-142].

Este tipo de elemento representa un importante método de separación, ya que evita la necesidad de pre-tratamiento de la muestra y, por lo tanto, disminuye el tiempo de análisis y la aparición de interferentes.

1.5. Aspectos generales de la inmunidad

1.5.1. Inmunidad

Científicamente, el término inmunidad significa protección frente a las enfermedades. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y la respuesta global coordinada a la introducción en un organismo de sustancias extrañas (antígenos), es la respuesta inmunitaria. Esta respuesta puede ser tanto humoral como celular. Mientras que la inmunidad celular está mediada por los linfocitos T, la inmunidad humoral está mediada por los linfocitos B que reconocen al antígeno a través de la síntesis de inmunoglobulinas (anticuerpos) [143,144].

1.5.2. Anticuerpos

Los anticuerpos son glicoproteínas que elaboran los vertebrados al ser estimulados con un antígeno y que tienen capacidad para reaccionar específicamente con el inductor. La estructura básica de los anticuerpos consiste en cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, iguales entre sí y unidas por puentes disulfuros. Basándose en sus características físico-químicas, en su actividad fisiológica y en pequeñas variaciones en la secuencia de los aminoácidos, se pueden distinguir cinco tipos principales de inmunoglobulinas, denotándose cada una de ellas con una letra: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las inmunoglobulinas G (IgG) son las más utilizadas en los inmunoensayos. En la Figura 1.7. se muestra la estructura básica de una inmunoglobulina [143,144].

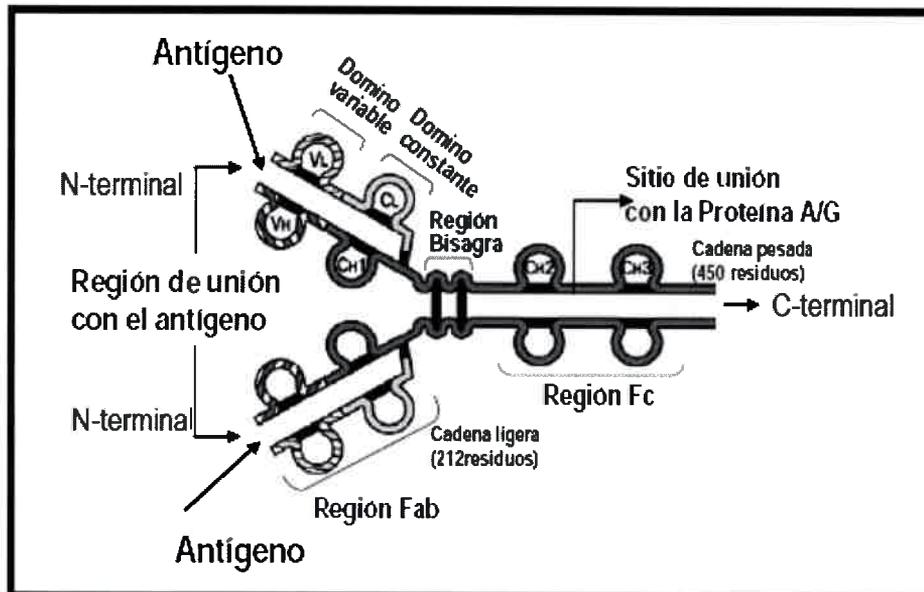


FIGURA 1.7. Estructura química de un anticuerpo

1.5.2.1. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (Acm) son moléculas idénticas (químicamente homogéneos) que poseen la misma especificidad (misma región variable) hacia el antígeno. La población de Acm reacciona en forma idéntica a cualquier molécula individual en esa población. La gran homogeneidad de estos anticuerpos permite el análisis que no son posibles con antiseros (anticuerpos policlonales) debido a las reacciones cruzadas que estos presentan.

Su obtención se puede llegar a hacer en forma constante y renovable. Las técnicas de producción de cantidades prácticamente ilimitadas de moléculas de anticuerpos idénticas y específicas para una determinada región de un antígeno han revolucionado la inmunología y ha tenido un extraordinario impacto sobre la investigación en diferentes campos que requieren anticuerpos como reactivos. La producción de los Acm se puede realizar de dos formas, "*in vivo*" o "*in vitro*" [145].

- ***In vivo***: el primer método para la producción de anticuerpos homogéneos o monoclonales fue descrito por Köhler y Milstein en 1975 [143], y se basa en el hecho de que cada linfocito B (células del sistema inmunitario) produce un único

tipo de anticuerpo con una única especificidad. Así, aislando una célula e hibridizandola mediante fusión celular con una célula cancerígena de mieloma, se pueden obtener anticuerpos idénticos e ilimitadamente. Estas líneas celulares derivadas de la fusión, inmortalizadas y productoras de anticuerpos, se denominan hibridomas, y los anticuerpos que producen reciben el nombre de anticuerpos monoclonales.

- ***In vitro***: se producen por el método de cultivo de tejidos. Se han desarrollado varios dispositivos para el cultivo "*in vitro*" en el mercado. Estos dispositivos varían en las instalaciones requeridas para su funcionamiento, la necesidad de operadores entrenados, la complejidad de los procedimientos de operación, la concentración final de anticuerpos que uno quiera alcanzar, el costo, etc.

La homogeneidad y monoespecificidad de los Acm los convierte en reactivos y herramientas de elección para una gran variedad de propósitos, tanto para su uso "*in vitro*" como "*in vivo*", especialmente en el campo de los productos terapéuticos y de diagnóstico. Algunas de sus aplicaciones son las siguientes [143,145]:

- **Purificación de proteínas**: se pueden producir Acm contra componentes minoritarios de una mezcla de proteínas y poder purificarla.
- **Identificación y aislamiento de células, subpoblaciones y clones celulares**: se encuentran aquí los denominados anticuerpos clonotípicos, los que cobran importancia en la identificación y caracterización de células T.
- **Detección de tumores**: Acm contra antígenos de membranas de células tumorales pero ausentes (los antígenos, Ag) en células normales.
- **Aplicaciones básicas**: uso de Acm para el estudio de su estructura y posibles modificaciones debido a mutaciones puntuales.
- **Construcción de biosensores**: usos de Acm para la construcción de inmunosensores, en la cual el anticuerpo se acopla a un transductor físico-químico y del evento de formación del complejo Ag-Acm el transductor convierte esta interacción en una señal eléctrica cuantificable [96,146].
- **En la bioquímica moderna**: clasificación de células por citometría de flujo, en el diagnóstico de diversos métodos inmunoquímicos para la detección de proteínas, etc.

1.5.3. Reconocimiento antigénico

Los anticuerpos son altamente específicos, siendo capaces de discernir entre pequeñas variaciones del antígeno (Ag), tanto en la estructura primaria como de su conformación espacial. La zona de enlace de un anticuerpo (paratope, Ac) interacciona con la zona complementaria del antígeno (epitope). La unión antígeno-anticuerpo es un equilibrio dinámico y se representa por la siguiente ecuación:



Siendo AcAg el complejo inmunológico antígeno-anticuerpo y K la constante de afinidad del complejo inmunológico [143,144]. Las fuerzas que facilitan esta unión son interacciones débiles (no covalentes), lo que permite que en ciertas condiciones se disocie el complejo Ag-Ac. En la Figura 1.8., se esquematizan las fuerzas participantes de la formación del complejo Ag-Ac [143].

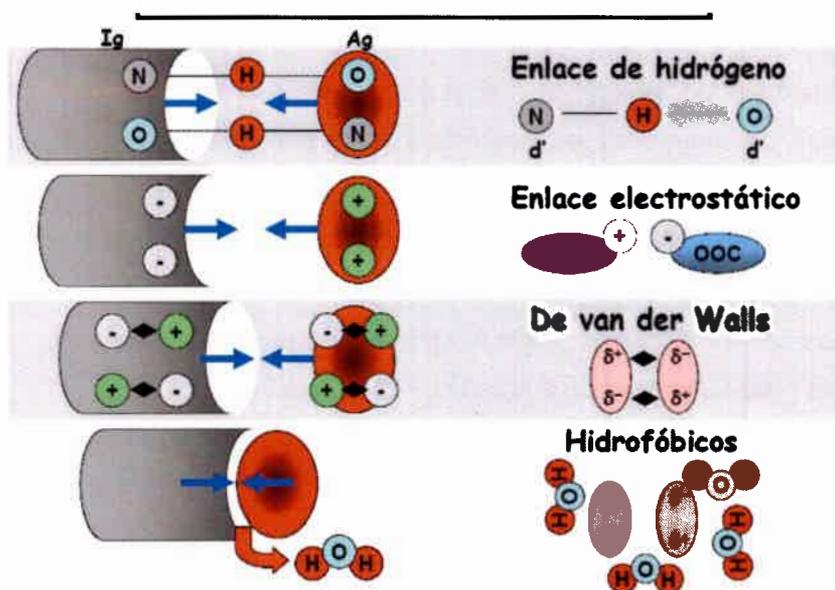


FIGURA 1.8. Fuerzas atractivas de la unión Ag-Ac. La mitad del total de la fuerza de unión se debe a las interacciones hidrofóbicas.

1.5.4. Inmunoensayos enzimáticos

Los enzimoimmunoanálisis (EIA) o ELISA ("Enzyme-Linked Sorbent Assay") se basan en dos fenómenos biológicos importantes:

- I. La elevada especificidad de los Ac.
- II. Alta actividad de algunas enzimas usadas en estos tipos de ensayos.

Por otro lado, los EIA comprenden dos etapas generales:

- 1) La reacción de un inmunoreactante con un Ag o un Ac.
- 2) La detección de ese inmunoreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático.

La sencillez de los test ELISA, sumada a la potencialidad de los anticuerpos monoclonales (Acm), hace que día a día se impongan sobre otros métodos analíticos.

Las técnicas de inmunoensayos enzimáticos se pueden clasificar en dos grandes grupos: EIA homogéneos y EIA heterogéneos. Los primeros se realizan exclusivamente en fase líquida, mientras que en los segundos se emplea un soporte sólido para inmovilizar a uno de los inmunoreactantes (antígeno o anticuerpo) [143]. Por cuestiones de aplicabilidad y sencillez, se dedicará el estudio a los EIA heterogéneos.

1.5.4.1. EIA heterogéneos

En este tipo de análisis, una de las especies inmunológicas se encuentra inmovilizada en la superficie de una fase sólida. Se pueden diferenciar dos tipos: los no competitivos o de amplificación de actividad y los competitivos o de modulación de actividad [143,144].

1.5.4.1.1. ELISA de amplificación

Se utilizan dos tipos de Ac en exceso, cada uno capaz de reconocer un epítoto diferente del mismo Ag. En el formato clásico, uno de los Ac está inmovilizado en la

superficie de la fase sólida (Ac de captura), se captura el Ag y se revela su presencia con el otro Ac conjugado a una enzima.

1.5.4.1.2. ELISA de modulación

En este tipo de ELISA, se modula la actividad del conjugado enzimático por competición con el analito. Menores cantidades del conjugado enzimático permiten obtener una detectabilidad mayor, ya que pequeñas cantidades del competidor tienen un gran impacto sobre la actividad enzimática detectada en la fase sólida. El analito a determinar (Ag) compite con una cantidad fija del mismo analito marcado con una enzima (Ag-E) por los sitios de unión al anticuerpo (Ac), el cual se encuentra inmovilizado en una superficie. La señal obtenida del complejo enzima antígeno-anticuerpo (E-Ag-Ac) es inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre (Ag).

Los resultados obtenidos en un ensayo competitivo directo o de modulación, se ajustan a una curva de forma sigmoidea, denominada curva dosis-respuesta, según la siguiente ecuación [143]:

$$y = D + \frac{A - D}{[1 + 10 \exp((\log IC_{50} - \log x)(Hill - Slope))]} \quad (1.3)$$

donde A y D son los valores máximo y mínimo asintóticos de la curva sigmoidea, respectivamente, IC_{50} es la concentración de Ag que produce un 50% de la señal máxima, x es la concentración de Ag y "*Hill-Slope*" es la pendiente de la parte lineal de la curva sigmoidea (Figura 1.9.).

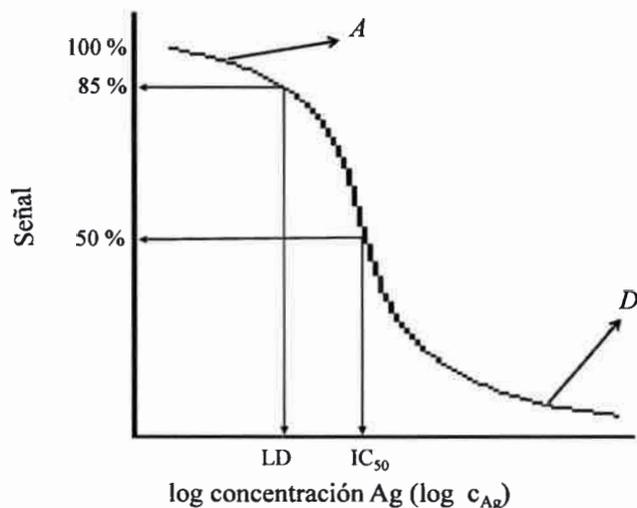


FIGURA 1.9. Curva dosis – respuesta típica obtenida en un ensayo de inmunoenzimas.

La curva de competición permite caracterizar al ensayo en dos parámetros ampliamente utilizados: sensibilidad y límite de detección (LD).

La sensibilidad en una curva dosis-respuesta está dada por el índice IC_{50} : cuanto menor es el IC_{50} , más sensible es el sistema [143]. En un ensayo competitivo directo, se define el LD como la concentración de Ag que produce un 85 % de la señal máxima, es decir, la cantidad de Ag que produce una inhibición del 15 % de la unión del Ag-E al Ac [135].

1.6. Enzimas

1.6.1. Generalidades

Las enzimas son, en su gran mayoría, proteínas globulares sintetizadas por células para catalizar reacciones bioquímicas específicas en los seres vivos. Por otra parte, los catalizadores son sustancias que incrementan la velocidad de las reacciones químicas que catalizan, sin cambiar el proceso. Las enzimas, al igual que los catalizadores, aumentan la velocidad de las reacciones en la cual participan, pero las

enzimas pueden unirse de forma temporal a la molécula que se está transformando, liberándose al final, esto es, regenerándose de nuevo, a la vez que se libera el producto de reacción [147]. El nombre de enzima, que fue propuesto en 1867 por el fisiólogo alemán Wilhelm Kühne (1837-1900), deriva de la frase griega *en zyme*, que significa "en fermento" [148]. Las características más sobresalientes de las enzimas son su poder catalítico y su especificidad.

Las enzimas están formadas por una parte proteica, llamada apoenzima o apoproteína, la cual es inactiva desde el punto de vista catalítico. La unión covalente de un grupo prostético o cofactor a la apoenzima da lugar a lo que se denomina holoenzima, la cual presenta actividad catalítica. Los cofactores son moléculas pequeñas, de origen inorgánico u orgánico, los cuales son requeridos para que la enzima presente actividad catalítica. Los cofactores de origen inorgánico por lo general están constituidos por uno o varios iones, como ser hierro, magnesio, cinc, cobre, manganeso, etc. Los cofactores de origen orgánico suelen ser compuestos metalo-orgánico a los cuales se les da el nombre de coenzimas [147].

1.6.2. Clasificación

La International Union of Biochemistry estableció un sistema que clasifica a las enzimas en seis grupos diferentes, de acuerdo al tipo de reacción química que catalicen. A cada enzima se le asigna un número precedido de las siglas EC (Enzyme Commission), este número está compuesto por cuatro dígitos y un nombre sistemático para identificar la reacción que cataliza [149]:

1. Oxido-reductasas: reacciones de transferencia de electrones.
2. Transferasas: transferencias de grupos funcionales.
3. Hidrolasas: reacciones de hidrólisis.
4. Liasas: adición de los dobles enlaces.
5. Isomerasas: reacciones de isomerización.
6. Ligasas: formación de enlaces con escisión de moléculas de ATP.

1.6.3. Especificidad y catálisis

Dos modelos principales se han ideado de manera de describir el proceso de unión entre sustrato y enzima; en el primer modelo la especificidad entre el sustrato y la enzima se ha concebido como la relación de una “llave” y su “cerradura”. Aquí, la molécula del sustrato constituye la llave y la proteína constituye la cerradura; en la superficie de la proteína existe una zona específica, denominada sitio activo o catalítico, a la cual se une la molécula del sustrato para experimentar la transformación catalítica. En este modelo “llave-cerradura” se supone un alto grado de semejanza entre la forma del sustrato y la geometría del centro de unión de la enzima.

En el segundo modelo, llamado de “ajuste inducido”, se tiene en cuenta el hecho de que las proteínas tienen cierta flexibilidad tridimensional. Es así que la unión del sustrato induce un cambio conformacional en la enzima y, de esta manera, la forma del sitio activo complementa la forma del sustrato sólo después de que éste se une a la enzima [148].

1.6.4. Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son glicoproteínas que contienen un grupo hemo b (protoporfirina IX) como grupo prostético, con hierro (+3) pentacoordinado que constituye el centro activo de la enzima [150], cuya función es la de oxidar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual actúa como molécula aceptora de electrones, por lo que pertenecen al grupo de las oxido-reductasas [151]. Estas proteínas tienen un peso molecular comprendido en el intervalo entre 30 y 150 kDa [152].

Estas enzimas han sido agrupadas en dos superfamilias, cuyos integrantes difieren en estructura y origen. Una superfamilia incluye a las peroxidasas de origen animal, mientras que, la otra, agrupa a las peroxidasas de plantas, hongos y bacterias. A su vez, según la clasificación de Welinder [153], esta última superfamilia se subdivide en tres clases, según las propiedades estructurales de las proteínas:

- **Clase I:** peroxidasas de origen procariota, que incluyen aquellas de ubicación molecular, tales como: la citocromo c peroxidasa y la ascorbato peroxidasa, que han sido asociadas con funciones antioxidantes.

- **Clase II:** peroxidasas secretorias de hongos. En esta clase se agrupan enzimas tales como las lignina y manganeso peroxidasas.
- **Clase III:** peroxidasas secretorias de plantas, entre las cuales la peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase o HRP) es el ejemplo mejor conocido.

Las funciones que llevan a cabo este tipo de enzimas se deben principalmente a la capacidad de convertir el H_2O_2 en H_2O a través de un ciclo catalítico típico, denominado ciclo peroxidativo, que incluye las reacciones que se describen a continuación, a través de las cuales se forman dos compuestos intermediarios, CoI y $CoII$:



donde RH y $R\cdot$ son el sustrato dador de electrones en su forma reducida y oxidada, respectivamente y k_1 , k_2 y k_3 las constantes de velocidad de cada una de las etapas de la reacción. El ciclo catalítico básico de las peroxidasas involucra tres etapas:

- 1) la oxidación de la enzima férrica nativa (con el Fe en estado de oxidación +3) por el peróxido de hidrógeno para formar un grupo oxiferrilo ($Fe^{IV} = O$) y un catión radical π de la porfirina (llamado compuesto I, CoI) intermediario (ec. 1.4)
- 2) la reducción del catión radical del compuesto I por un dador monoelectrónico para dar el compuesto intermediario II, $CoII$ (ec 1.5).
- 3) la reducción del grupo oxiferrilo por una segunda molécula del dador monoelectrónico para convertir la enzima a su estado nativo férrico [154] (ec. 1.6).

CAPÍTULO 2

2. FUNDAMENTOS Y MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

2.1. Fundamentos electroquímicos

2.1.1. Conceptos generales

La química electroanalítica abarca un grupo de métodos analíticos cuantitativos basados en las propiedades eléctricas de una solución de un analito cuando este forma parte de una celda electroquímica (conjunto de interfaces, al menos dos electrodos y un electrolito). Las dos tipos de medidas electroanalíticas principales son:

- Potenciométricas
- Potenciostáticas

Las técnicas a potencial controlado (potenciostáticas) trabajan en condiciones de corriente que son distintas a cero. En estos casos, el potencial se utiliza para producir una reacción de transferencia de electrones en la superficie del electrodo, originando así una oxidación o reducción de la especie electroactiva. Esta técnica presenta ciertas ventajas con respecto a las potenciométricas, tales como, alta sensibilidad, selectividad hacia especies electroactivas, mayor intervalo lineal, límites de detección menores (en el orden de nanomolares o menores), pequeños volúmenes de muestra, acoples con procesos cromatográficos, etc [96].

2.1.2. Variables asociadas a un sistema electroquímico

Un sistema electroquímico en condiciones potencioestáticas puede ser estudiado perturbando las condiciones iniciales de este a través de ciertas funciones eléctricas aplicadas a la celda electroquímica, que se constituyen en variables controladas [155]. En la Figura 2.1. se muestran las variables controlables asociadas a un sistema electroquímico.

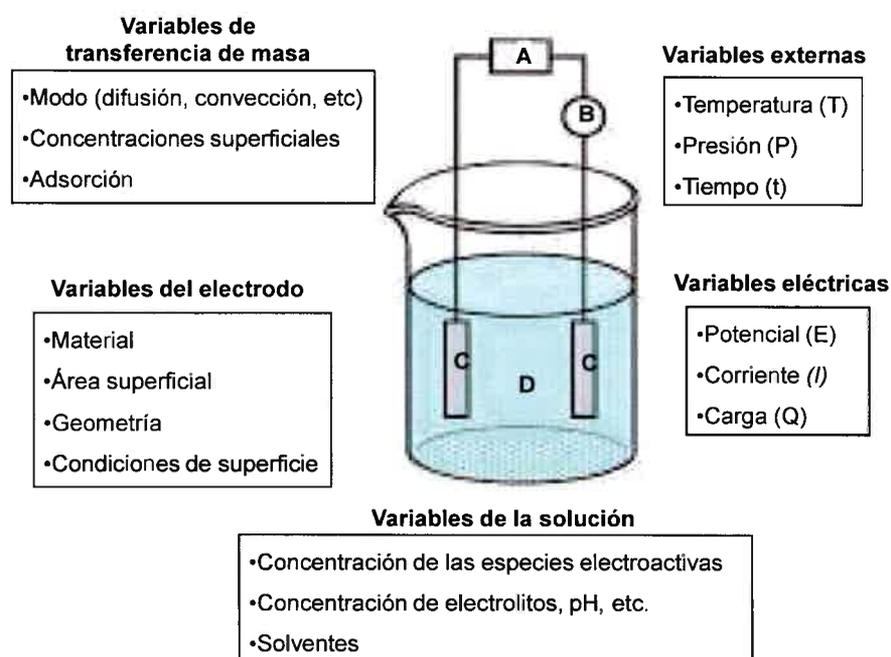


FIGURA 2.1. Variables que afectan la velocidad de una reacción de electrodo. A: fuente de potencial, B: microamperímetro, C: electrodos, D: solución electrolítica.

2.1.3. Procesos de electrodo

Cuando dos fases de naturaleza diferente se ponen en contacto, como es lo que ocurre cuando la superficie de un electrodo entra en contacto con una solución, entre ellas puede ocurrir una transferencia de carga que se clasifica como heterogénea, mientras que las transferencias de carga que ocurren dentro de una misma fase se clasifican como homogéneas. Para mantener la electroneutralidad del sistema heterogéneo en estudio deben ocurrir, al menos, dos hemireacciones de

transferencia de carga en direcciones opuestas. Si se aplica una diferencia de potencial externa entre dos electrodos, sumergidos en una solución electrolítica, en uno de los electrodos se favorece, mediante la electrólisis, una dada reacción (oxidación o reducción) y en el otro electrodo ocurre el proceso inverso, mientras que en ambos electrodos las interfaces sólido (o líquido) – líquido experimentan una distribución de cargas diferentes a la del seno de la solución.

La corriente (I) que circula por el circuito externo es la carga (Q) por unidad de tiempo (t) que llega al electrodo de área A , la que también es proporcional al flujo de materia (j) que durante ese intervalo de tiempo llega a la superficie del electrodo es:

$$\frac{I \left[\frac{C}{seg} \right]}{n \left[\frac{equiv}{mol} \right] F \left[\frac{C}{equiv} \right] A \left[cm^2 \right]} = j \left[\frac{mol}{seg \ cm^2} \right] \quad (2.1)$$

donde n es el número de electrones por molécula oxidada o reducida y F es la constante de Faraday.

Dos fenómenos fisicoquímicos característicos pueden dar origen a la corriente registrada. Ellos son los procesos faradaicos y no faradaicos [155].

2.1.3.1. Procesos faradaicos

El objetivo de los experimentos a potencial controlado es el de obtener una respuesta en corriente que esté relacionada con la concentración del analito de interés. Tal objetivo es cumplido monitoreando la transferencia de electrones durante el proceso redox del analito:



donde O y R son las formas oxidada y reducida, respectivamente, de la cupla redox. Así, una reacción puede ocurrir en una región de potencial donde la transferencia electrónica es termodinámicamente o cinéticamente favorable. Para los sistemas controlados por las leyes de la termodinámica, el potencial del electrodo puede ser usado para establecer las concentraciones de las especies electroactivas sobre la superficie del electrodo ($c_O(0,t)$ y $c_R(0,t)$) de acuerdo a la ecuación de Nernst:

$$E = E^{\circ} + \frac{2,3 RT}{nF} \log \frac{c_O(0,t)}{c_R(0,t)} \quad (2.3)$$

donde E° es el potencial estándar de la reacción redox, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin, n es el número de electrones transferidos en la reacción y F es la constante de Faraday.

Esa corriente que resulta de un cambio del estado de oxidación de la especie electroactiva se denomina corriente faradaica porque obedece la ley de Faraday. La corriente faradaica es una medida directa de la velocidad de la reacción redox. La corriente (I) vs el potencial (E) se denomina voltamperograma y la forma de este último depende de la técnica electroanalítica que se use. El camino que puede llevar a cabo la reacción sobre el electrodo puede ser bastante complicado e involucrar una secuencia de varios pasos. La velocidad de las reacciones está determinada por la etapa de velocidad más lenta en la secuencia. En el caso de las reacciones electroquímicas más sencillas, que involucran la presencia de una especie en solución y, en ausencia de reacciones químicas homogéneas o reacciones superficiales acopladas, la velocidad de la reacción de electrodo (o la corriente) está gobernada por la velocidad de los siguientes procesos:

- El transporte de materia desde el seno de la solución hacia el electrodo.
- La transferencia de carga a través de la interfaz sólido (o líquido) – líquido.
- El posterior transporte de los productos desde el electrodo hacia el seno de la solución.

En otros modelos más complejos pueden existir reacciones de transferencia de carga con complicaciones cinéticas o superficiales que anteceden o suceden a la etapa de transferencia de carga de cada compuesto presente en solución. Cuando la reacción total es controlada por la velocidad con que la especie llega o deja la superficie del electrodo, se la clasifica como reacción “controlada por difusión” (cuando éste es el principal modo de transporte de materia). Si la etapa determinante de la velocidad de la reacción global es la transferencia de carga, se clasifica a la reacción como de “control activado”. La velocidad neta de la reacción y, por ende, la corriente medida, puede estar limitada por cualquiera de estos procesos enumerados anteriormente.

El transporte de masa hacia y desde la superficie del electrodo puede acontecer de tres maneras diferentes [155]:

- **Difusión:** es el movimiento espontáneo que se produce bajo la influencia de un gradiente de concentración, desde regiones de alta concentración a regiones de baja concentración, tendiente a minimizar estas diferencias de concentración.
- **Convección:** transporte hacia el electrodo por un movimiento totalmente físico; la mayor fuerza para la convección es una energía mecánica externa asociada con la agitación o flujo de la solución o rotación o vibración del electrodo. La convección puede ocurrir naturalmente debido a un gradiente de densidad, provocado, por ejemplo, por variaciones de temperatura.
- **Migración:** es el movimiento de las partículas cargadas a lo largo de un campo eléctrico.

2.1.3.2. Procesos no faradaicos

Son aquellos que ocurren sin transferencia de electrones a través de la interfaz electrodo-solución para un dado intervalo de potencial aplicado, debido a condiciones termodinámicas o cinéticas desfavorables, aunque pueden ocurrir fenómenos capaces de modificar la superficie del electrodo con el cambio de potencial aplicado, tales como la adsorción y/o desorción de reactivos, solventes, etc. Bajo estas circunstancias, aún cuando no existan reacciones netas de transferencia de electrones, se pueden originar corrientes capacitivas transitorias capaces de influenciar significativamente la respuesta electroquímica cuando se produzcan cambios en el área del electrodo, el potencial o la composición de la interfaz.

Si bien los procesos faradaicos son los que cobran mayor interés en la realización de estudios electroquímicos, debe considerarse que la influencia de los procesos no faradaicos pueden afectar el análisis de los resultados obtenidos, tanto si el estudio se realiza con fines de obtener información correcta de la transferencia de carga del analito de interés y de los posibles mecanismos asociados a esta transferencia electrónica, como si se pretende correlacionar la respuesta faradaica

obtenida con la concentración de la sustancia en estudio, a los fines de obtener una curva de calibración repetitiva y selectiva. En todos los casos es necesario que la corriente no faradaica o corriente de blanco influya de la menor manera posible sobre la respuesta faradaica. Se entiende por blanco de la solución a la respuesta $I-E$ obtenida cuando se realiza la experiencia en iguales condiciones experimentales, pero sin la sustancia responsable de la respuesta faradaica (sustancia electroactiva). La sustracción de la corriente de blanco de aquella lograda en la presencia de la sustancia electroactiva, permite minimizar todos los componentes de corriente que no sean de interés analítico.

2.2. Métodos electroquímicos

2.2.1. Generalidades

Las técnicas electroanalíticas pueden definirse como el resultado de la combinación entre la electricidad y la química, a través de la correlación de parámetros químicos con cantidades cuantificables que derivan de propiedades eléctricas, tales como la corriente, la carga y el potencial eléctrico [96,156]. En contraste a muchas medidas químicas, las cuales involucran procesos en el seno de la solución, los procesos electroquímicos toman lugar en la interfaz electrodo-solución. La implementación de las distintas técnicas electroquímicas implica, desde un punto de vista eléctrico, el manejo de las tres variables principales: potencial (E), corriente (I) y tiempo (t). No se puede imponer a un sistema electroquímico el valor de la corriente y potencial simultáneamente. Siempre que se condicione una, la otra queda como grado de libertad y evoluciona según las características del sistema electroquímico en estudio. Según la dependencia con el tiempo, podemos clasificar a los procesos electroquímicos en dos grandes grupos [155]:

- **Estado estacionario:** se dice que un sistema electroquímico se encuentra en estado estacionario cuando sus variables E , I y concentración (c) no dependen del tiempo. Lo mismo ocurre en el estado de equilibrio.
- **Estado no estacionario:** en general, es posible aplicar a un sistema en equilibrio o en estado estacionario un estímulo o perturbación adecuada durante un cierto tiempo. Según sea la naturaleza y duración de la perturbación, el sistema retorna al equilibrio o evoluciona a un nuevo estado estacionario.

Por otra parte, dependiendo del tipo de control eléctrico que se ejerza sobre el sistema, las técnicas electroquímicas se clasifican en:

- **Potenciostáticas:** aquellas en las que se controla el potencial, aplicando una perturbación según una función perfectamente conocida en el tiempo, característica de cada técnica.
- **Galvanostáticas:** en las que se controla la corriente y el potencial es la variable independiente. Ambos tipos de técnicas requieren al menos dos electrodos (conductores) y una solución electrolítica en contacto con ellos, constituyendo de esta manera una celda electroquímica.

Es muy común el uso de celdas de tres tipos de electrodos:

- **Electrodo de trabajo o indicador:** es el electrodo en el cual ocurren las hemireacciones de interés.
- **Electrodo auxiliar o contraelectrodo:** es el encargado de cerrar el circuito eléctrico y permitir el pasaje de corriente eléctrica. Allí ocurren las hemireacciones complementarias.
- **Electrodo de referencia:** es el electrodo encargado de proveer un potencial estable y reproducible (independientemente de la composición de la solución), comparado contra el potencial del electrodo de trabajo.

2.2.2. Voltamperometría cíclica

En la Figura 2.2.A se muestra un diagrama de bloques del circuito empleado en la técnica de voltamperometría cíclica (VC). Se muestra, además, el programa de potencial aplicado al electrodo de trabajo (Figura 2.2.B) y la respuesta corriente-potencial obtenida (Figura 2.2.C) [96,155,157].

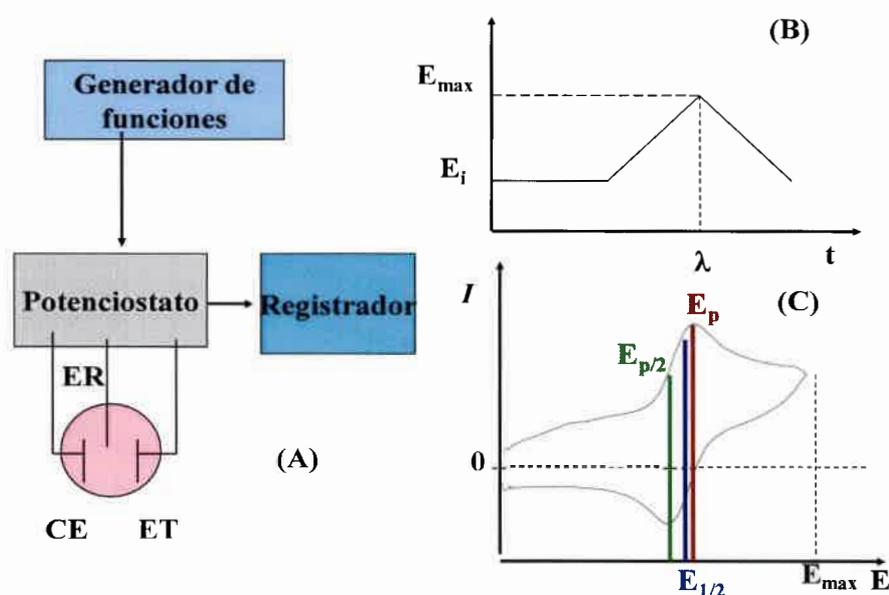


FIGURA 2.2. Técnica de voltamperometría cíclica. (A) Circuito eléctrico empleado. CE, ER y ET son el contra-electrodo, el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, respectivamente. (B) perturbación aplicada al electrodo de trabajo y (C) respuesta corriente-potencial obtenida para una cupla redox simple (ec. 2.2).

El perfil de la curva I - E puede explicarse de la siguiente manera. Asumamos una cupla redox simple:



con un potencial estándar de E° . El potencial aplicado en esta técnica es función del tiempo, y su variación se puede expresar con las siguientes ecuaciones [155]:

$$E = E_i - v t \quad \text{para } 0 < t \leq \lambda \quad (2.4)$$

y

$$E = E_i - 2v \lambda + v t \quad \text{para } t > \lambda \quad (2.5)$$

donde v es la velocidad a la cual se varía el potencial y λ el valor del potencial al cual se invierte la dirección del barrido.

A medida que el potencial del electrodo de trabajo se hace más negativo (comenzando desde un valor de potencial, E_i , donde no se registra corriente faradaica), la concentración de la especie electroactiva O en la interface disminuye, incrementándose el flujo de ésta hacia la superficie del electrodo y, por lo tanto, la corriente. Aparece un pico en lugar de una corriente límite, debido a la reducción superficial de O, ya que el aporte difusional no compensa su consumo vinculado al rápido cambio de potencial. En VC, la existencia de la onda anódica (barrido inverso) se explica si se tiene en cuenta que, al potencial en el cual la dirección del barrido de potencial se invierte (E_λ), existe un exceso de R en la interfaz electrodo-solución (ver Figura 2.2.C).

Para reacciones controladas por difusión, la solución implica el planteo de las dos leyes de la difusión de Fick y el balance del flujo de las especies electroactivas O y R sobre la superficie del electrodo ($x = 0$). Así, la corriente está determinada por el flujo de O hacia la superficie del electrodo y, si se considera que la velocidad de transferencia de carga es alta, se cumple la ecuación de Nernst a $x = 0$ [155].

La solución matemática del problema en este caso es más compleja que en otras técnicas electroquímicas, no pudiendo emplearse el método de la Transformada de Laplace para arribar a una solución analítica exacta. Este problema fue abordado primero por Randles [158] y Sevcik [159] y, posteriormente, por Nicholson y Shain [160]. Haciendo uso del teorema de la convolución, fue posible arribar sólo a una solución numérica, donde la corriente puede ser expresada por:

$$I = nFAc_o^*(\pi D_o \sigma)^{1/2} \chi(\sigma, t) \quad (2.6)$$

donde $\sigma = (nF/RT)v$ y $\chi(\sigma, t)$ es la función corriente, D_o es el coeficiente de difusión de la especie O y c_o^* es la concentración de O en el seno de la solución, A el área del electrodo y los demás términos tienen su significado usual. $\chi(\sigma, t)$ puede ser obtenida a través de la siguiente ecuación [155]:

$$\int_0^{\sigma} \frac{\chi(z)}{(\sigma - z)^{1/2}} dz = \frac{1}{1 + \xi \theta S(\sigma)} \quad (2.7)$$

$$\text{con: } \chi(z) = \frac{g(z)}{c_o^* (\pi D_o \sigma)^{1/2}} = \frac{I(\sigma)}{nFAc_o^* (\pi D_o \sigma)^{1/2}}; \quad \xi = \left(\frac{D_R}{D_o} \right)^{1/2};$$

$$\theta = \exp \left[\frac{nF}{RT} (E_t - E) \right]; \quad S(\sigma) = \exp(-\sigma), \quad \text{y} \quad \sigma = \left(\frac{nF}{RT} \right) v$$

Así, para cualquier valor de $S(\sigma)$, la cual es función del potencial, se puede obtener la función $\chi(\sigma)$ por solución de la ec. (2.7) y, a partir de ella, se puede determinar la corriente (ec. 2.6). Nótese que la función $\chi(\sigma)$ en cualquier punto dado es un número puro, de modo que la ec. (2.6) da la relación funcional entre la corriente en cualquier punto y las variables experimentales. Específicamente, la I es proporcional a c_o^* y a $v^{1/2}$.

Para un sistema reversible simple, como se ha definido al comienzo, la función corriente ($\chi(\sigma, t)$) alcanza un valor máximo, igual a 0,4463 (a 25 °C) a $n(E_p - E_{1/2}) = -28,50$ mV, siendo E_p el valor de potencial donde la corriente alcanza su valor máximo y $E_{1/2}$ el potencial de media onda del sistema. Así, la corriente de pico (I_p) está definida por:

$$I_p = 0,4463 nFAc_o^* D_o^{1/2} \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2} \quad (2.8)$$

ó, a 25 °C, la corriente queda expresada por [73]:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A c_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (2.9)$$

donde A es expresada en cm^2 , D_o en $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$, c_o^* en moles cm^{-3} y v en V s^{-1} ,

y

$$E_p - E_{1/2} = E_p - E^{o'} + \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \xi = -1,109 \left(\frac{RT}{nF} \right) \quad (2.10)$$

donde E° es el potencial formal y $-1,109 (RT/nF) = -28,50$ mV a 25 °C. En algunos casos, es conveniente informar el valor de potencial al cual la corriente es la mitad de la corriente de pico ($E_{p/2}$):

$$E_{p/2} = E_{1/2} + 1,109 \left(\frac{RT}{nF} \right) = E_{1/2} + 28,0/n \text{ mV a } 25^\circ \text{C} \quad (2.11)$$

Así, el $E_{1/2}$ polarográfico está localizado aproximadamente en el punto medio entre el E_p y el $E_{p/2}$, de modo que un criterio de diagnóstico para una onda nernstiana es:

$$[E_p - E_{p/2}] = 56,5/n \text{ mV a } 25^\circ \text{C} \quad (2.12)$$

Nicholson [161] sugirió que la relación entre las corrientes de pico anódica ($I_{p,a}$) y la de pico catódica ($I_{p,c}$) puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}} = \frac{(I_{p,a})_0}{I_{p,c}} + \frac{0,485(I_{s,p})_0}{I_{p,c}} + 0,086 \quad (2.13)$$

donde $(I_{p,a})_0$ es la corriente de pico anódica medida con respecto al cero de corriente, $(I_{s,p})_0$ es la corriente al potencial E_λ medida también respecto del cero de corriente e $I_{p,c}$ es la corriente del pico catódico, medida también respecto del cero de corriente. La relación $\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}}$ (ec. 2.13) es igual a 1 para una cupla redox simple (ec. 2.2).

La desviación de esta relación del valor unitario es indicativa de complicaciones cinéticas u otro tipo de complicaciones en el proceso de electrodo. Por otro lado, la diferencia entre los potenciales de pico anódico ($E_{p,a}$) y de pico catódico ($E_{p,c}$), ΔE_p , es también otro criterio de diagnóstico útil para un proceso nernstiano. Así, $\Delta E_p = (E_{p,a} - E_{p,c}) = 2,3RT/nF$ (ó $59/n$ mV a 25 °C [155]).

2.2.3. Amperometría

En amperometría el potencial aplicado al electrodo de trabajo es mantenido a un valor constante en el tiempo y se mide la corriente resultante de la oxidación o reducción de la especie en estudio [96,155]. Las determinaciones analíticas se realizan midiendo directamente la corriente, la cual es proporcional a la concentración de la especie electroactiva.

2.2.3.1. Cronoamperometría

Consiste en la aplicación de un salto de potencial desde un valor al cual no ocurre reacción faradaica (E_i) hasta un potencial (E_f) al cual la concentración superficial de la especie electroactiva se hace efectivamente cero, al ser esta consumida en la reacción faradaica que ocurre a ese potencial (Figura 2.3a). En esta técnica se utiliza un electrodo de trabajo estacionario y soluciones sin agitar. Como el transporte de masa bajo estas condiciones es sólo por difusión, la curva corriente-tiempo refleja los cambios en la concentración del analito en las vecindades del electrodo de trabajo. Esto involucra una gradual expansión de la capa difusa asociada con la disminución de concentración y, así, decrece la pendiente del perfil de concentración con el tiempo (Figura 2.3b). De acuerdo con el decaimiento de la corriente (sobre un electrodo plano) con el tiempo, dado por la ecuación de Cottrell (Figura 2.3c), tenemos [155]:

$$I(t) = \frac{nFAcD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2} \quad (2.14)$$

donde n , F , A , c , D y t son el número de electrones, la constante de Faraday, el área del electrodo, la concentración de analito en el seno de la solución, el coeficiente de difusión y el tiempo, respectivamente.

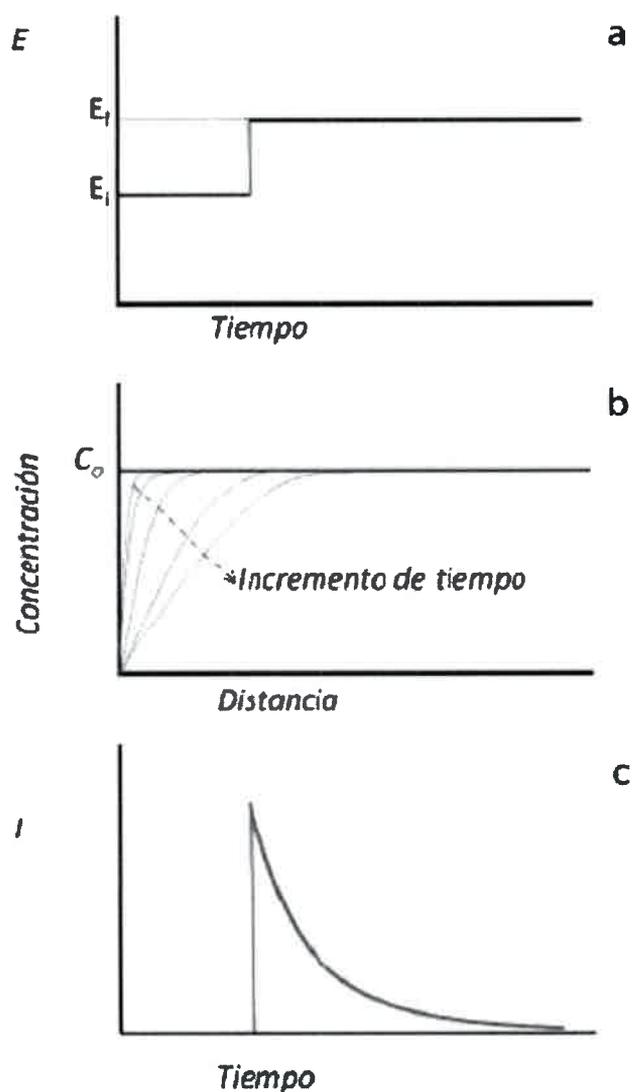


FIGURA 2.3. Experimentos de cronoamperometría. Programa de salto de potencial (a), cambios en los perfiles de concentración con el tiempo (b) y respuesta de corriente – tiempo (c).

La cronoamperometría es a menudo usada para la determinación de los coeficientes de difusión de especies electroactivas o las áreas de los electrodos de trabajo. También la cronoamperometría puede ser utilizada para el estudio de mecanismos de procesos de electrodo. Son particularmente atractivos, para esta tarea, los experimentos de cronoamperometría de doble salto de potencial [96].

Los experimentos de salto de potencial pueden ser usados también para registrar la dependencia de la carga con el tiempo en un experimento cronoamperométrico. Esto es logrado por integración de la corriente obtenida del salto de potencial aplicado, la que resulta de la suma de tres componentes, la carga faradaica, la carga debido al cargado de la doble capa (Q_{dl}) y la correspondiente a la reacción de posibles especies adsorbidas (Q_{ads}) [155].

$$Q = \frac{2nFACD^{1/2}t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{dl} + Q_{ads} \quad (2.15)$$

2.2.4. Voltamperometría de onda cuadrada

2.2.4.1. Introducción

El desarrollo de las técnicas de pulsos de potencial ha tenido como objetivo principal el reducir los efectos producidos por las corrientes capacitivas en las respuestas voltamperométricas.

Barker y col. [162] fueron los primeros en desarrollar las técnicas voltamperométricas que emplean cambios de potencial en saltos repetitivos. Ellos emplearon una onda cuadrada simétrica de 225 Hz superpuesta sobre un muy lento barrido de potencial. Este desarrollo fue precedido por Kalousek, [163] quien utilizó una computadora para aplicar cambios repetitivos y discontinuos de potencial a una frecuencia de 5 Hz. Sin embargo, la polarografía de onda cuadrada mecánica fue empleada por primera vez por Kemula [164]. Pero, fueron Fujinaga y col. [165] en la época de los cincuenta, quienes destacaron la importancia analítica que poseían los polarogramas diferenciales, lo que podía explicarse con la ventaja que se obtiene cuando se emplea la diferencia de la corriente obtenida durante dos hemi-ciclos consecutivos. El instrumento que ellos empleaban operaba a frecuencias mucho menores ($\cong 14$ Hz) que el de Barker y Jenkins, pero, en realidad, tenía muchas de las mismas características mejoradas respecto de las otras técnicas en vigencia en esa época. Este desarrollo fue seguido inmediatamente por el tratamiento teórico de la voltamperometría de onda cuadrada para sistemas reversibles desarrollado por Kambara [166].

Fue Barker [167] quien primero propuso el empleo de una onda de escalera potencial-tiempo y muestrear la corriente al final de la onda, donde las corrientes capacitivas habían decaído a un valor prácticamente despreciable, a los efectos de evitar el inconveniente que las corrientes capacitivas producían en las voltamperometrías de barrido lineal y cíclica. Alentados por estos desarrollos, Ramaley y Krause [168] propusieron que la onda cuadrada se aplicara sobre un barrido de escalera ("staircase") más que sobre un barrido de potencial lento lineal. Sus resultados fueron comparables a los obtenidos por Barker en el modo de estado estacionario.

Lo expuesto anteriormente expresa la historia esencial de las ideas involucradas en el desarrollo de la voltamperometría de onda cuadrada (VOC).

Es así importante diferenciar la VOC del tipo Barker (en la cual una modulación de onda cuadrada se aplica a un potencial constante o prácticamente constante y en donde la corriente es muestreada al final de los hemi-ciclos sucesivos de la onda cuadrada) de la VOC tipo Osteryoung [169], que está basada en el trabajo original de Ramaley y Krause y es la que actualmente se aplica al estudio de distintos sistemas experimentales. El programa de potencial que se aplica a la VOC tipo Osteryoung (definida a continuación como VOC) se muestra en la Figura 2.4. La forma de onda consiste en una onda cuadrada de amplitud, ΔE_{OC} , superpuesta sobre un barrido de escalera (ΔE_e), donde un período completo de la OC ocurre para cada período, T , del barrido de escalera. Así, el ancho de pulso o tiempo de pulso, igual a $T/2$ se designa como t_p y la frecuencia, igual a $1/T$, como f .

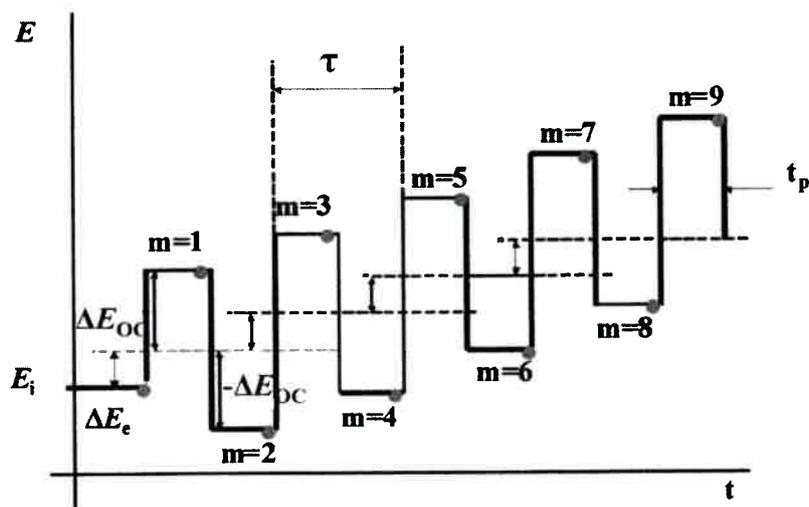


FIGURA 2.4. Programa de saltos de potencial aplicados al electrodo de trabajo en un experimento de VOC. ΔE_{oc} : amplitud de la onda cuadrada., ΔE_e : salto de escalera, τ : período de la onda cuadrada, t_p : tiempo de pulso. (●) Puntos donde se realiza el muestreo de la corriente.

El diagrama completo de la forma de la onda se puede expresar como [170]:

$$E_m = E_i - \left[\frac{m+1}{2} \right] \Delta E_e - \Delta E_{oc} (1 + (-1)^{m+1}) \quad (2.16)$$

de modo que todos los ciclos son idénticos. Otra forma de expresar la ec. (2.16) es [170]:

$$E_m = E_i - \left[\frac{m+1}{2} \right] \Delta E_e + (-1)^m \Delta E_{oc} \quad (2.17)$$

en donde la cantidad $[(m+1)/2]$ es la parte entera de $(m+1)/2$. La ec. (2.17) define sólo los valores de E_m para $m > 1$ [170].

La corriente es muestreada durante la última porción de cada hemi-ciclo. Las corrientes de los hemi-ciclos directos, con $m = 1, 3, 5, \dots$, se llama corriente directa (I_d), aquellas de los hemi-ciclos inversos, $m = 2, 4, 6, \dots$, se llama corriente inversa (I_i) y, la corriente diferencial o neta (I_n) para cada ciclo se define como $I_n = I_d - I_i$.

En la práctica, los valores característicos que se emplean en VOC son $n \Delta E_{OC} = 50$ mV (donde n es el número de electrones transferidos) y $n \Delta E_e = 10$ mV. La f se puede variar, para un electrodo de tamaño convencional, entre 10 y 200 Hz [169]. La velocidad de barrido está definida por, $v = \Delta E_e f$, de modo que si: $\Delta E_e = 10$ mV y $f = 100$ Hz, una $v = 1$ Vs⁻¹ puede ser fácilmente obtenida, lo que demuestra que esta técnica es de barrido rápido y de gran amplitud, siendo estas dos características las principales diferencias con la VOC tipo Barker, la cual trabaja en estado estacionario, con pequeñas amplitudes y v tan bajas como 2 mVs⁻¹.

La implementación experimental de la VOC requiere del empleo de una computadora y un software adecuado para su control. Como herramienta analítica rutinaria, la VOC se hizo popular con la aparición de los modernos equipos electrónicos.

2.2.4.2. Teoría de la voltamperometría de onda cuadrada

La solución de las ecuaciones de difusión para varios sistemas químicos por VOC es compleja, pero fue posible arribar a soluciones, al menos en algunos casos, debido al gran número de teorías generales disponibles para condiciones potencioestáticas. Para casos que involucran una reacción electroquímica reversible, se emplea la aproximación de Kambara [166], la cual usa el teorema de la superposición. Para casos más complejos, la aproximación de Rifkin y Evans [170], la cual emplea una forma de onda de excitación arbitraria, puede ser generalizada usando la ecuación integral apropiada.

Para una cupla redox simple, como la representada en la ec. (2.2), tanto Ramaley y Krause [168] como Christie y col. [171] han presentado una solución analítica general bajo condiciones de difusión lineal semi infinita. Las corrientes adimensionales (Ψ) se definen [169]:

$$\psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi p}}{nFA\sqrt{D_O} c_O^*} \quad (2.18)$$

y

$$\Delta\psi_j = \Delta I_j \frac{\sqrt{\pi t_p}}{nFA\sqrt{D_o} c_o^*} \quad (2.19)$$

Además, es posible definir Ψ_j (o $\Delta\Psi_j$) en términos de $T^{1/2}$ o $1/(t_p)^{1/2}$:

$$\psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi\tau}}{nFA\sqrt{D_o} c_o^*} = \psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{D_o f} c_o^*} \quad (2.20)$$

$$\Delta\psi_j = \Delta I_j \frac{\sqrt{\pi\tau}}{nFA\sqrt{D_o} c_o^*} = \Delta\psi_j = \Delta I_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{D_o f} c_o^*} \quad (2.21)$$

Ambas definiciones se encuentran en la Bibliografía. Sin embargo, es preferible usar las ecs. (2.20) y (2.19), debido a que ellas proveen una comparación directa con un experimento cronoamperométrico de simple pulso. En otras palabras, el tiempo característico en un experimento de VOC es $t_p = T/2$.

La corriente normalizada, $\Delta\Psi_j$, alcanza su valor máximo cuando el j -ésimo término es igual a cero, o cuando $E_j = E_{1/2}^r$. Así, la ventaja de elegir un potencial indexado como $E_j = E_i - [j/2] \Delta E_s$ es que el voltamperograma de OC está centrado alrededor del $E_{1/2}^r$.

En la Figura 2.5 se muestran las corrientes normalizadas directa (Ψ_d), inversa (Ψ_i) y neta (Ψ_n) calculadas para $n \Delta E_{OC} = 50$ mV. Para amplitudes de la OC mucho menores que $n \Delta E_{OC} = 50$ mV, para las cuales la corriente depende casi linealmente con el potencial, la corriente inversa muestra una forma sigmoidea y la corriente neta es menor que la corriente directa (ver Figura 2.6). A medida que $n \Delta E_{OC} \rightarrow 0$ y $\Delta E_e \rightarrow 0$ a $\Delta E_e / T$ constante, la corriente inversa claramente se aproxima a la de la voltamperometría de barrido lineal, pero la respuesta diferencial mantiene las características de simetría y de posición como se describió previamente (ver Figura 2.7). Para valores muy grandes de $n \Delta E_{OC}$, el salto de potencial puede atravesar completamente la onda, la respuesta de la corriente neta muestra una señal

deformada (ver Figura 2.8). Así, la Figura 2.5 es la que muestra el comportamiento deseable sobre un intervalo normal de elección de los parámetros característicos de la técnica.

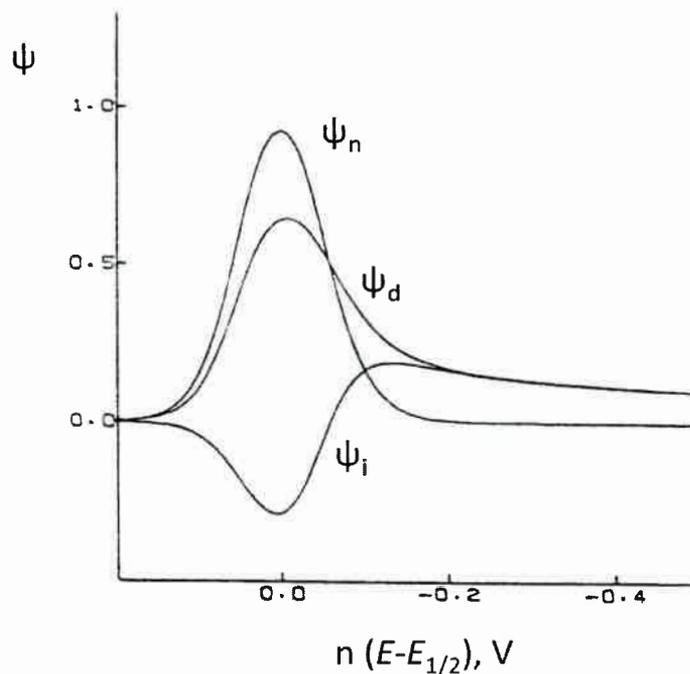


FIGURA 2.5. Corrientes normalizadas directa, inversa y neta de un voltamperograma de OC para una cupla redox simple (ec.2.2) bajo control de difusión lineal semi infinita. $n \Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$; $n \Delta E_e = 10 \text{ mV}$.

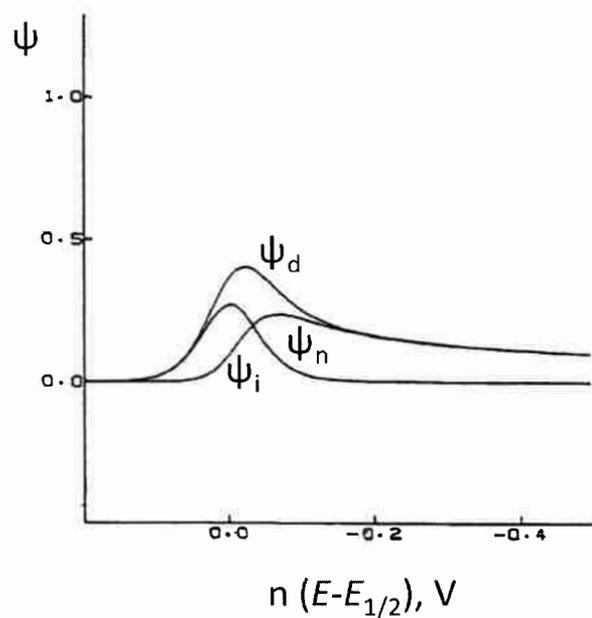


FIGURA 2.6. Igual que en Figura 2.5, pero $n \Delta E_{OC} = 10 \text{ mV}$.

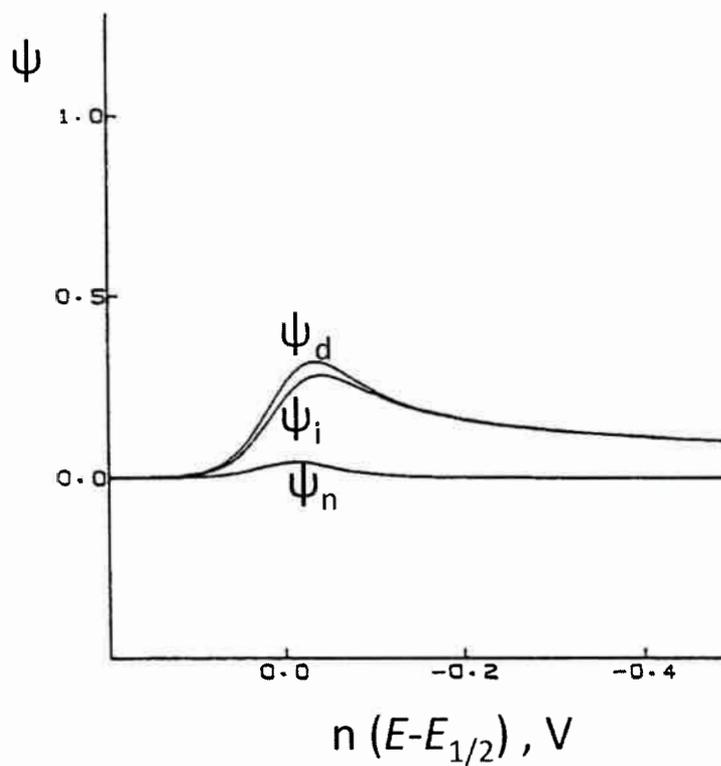


FIGURA 2.7. Igual que en Figura 2.5, pero $n \Delta E_{OC} = 0 \text{ mV}$.

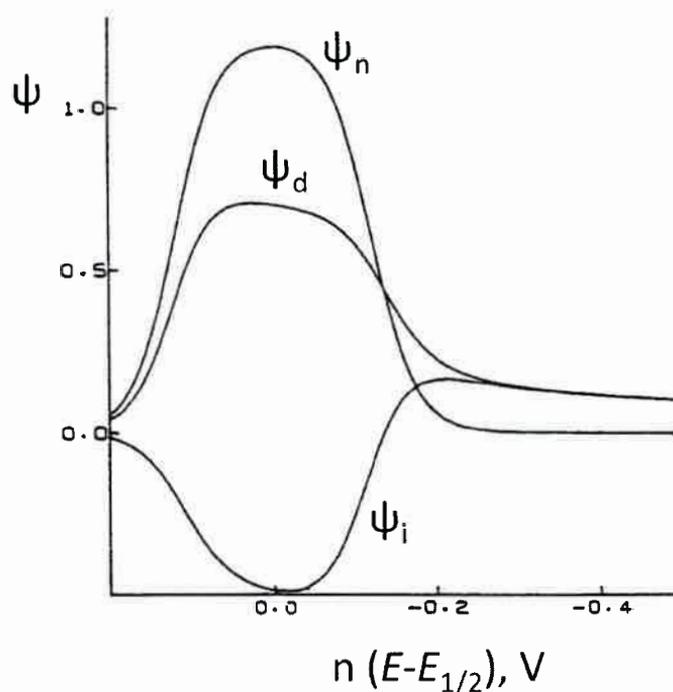


FIGURA 2.8. Igual que en Figura 2.5, pero $n \Delta E_{OC} = 120 \text{ mV}$.

Como ha sido informado por Ramaley y Krause [168], el ancho del pico neto a la mitad de su altura, $W_{1/2}$, es $(90,5/n) \text{ mV}$ para pequeños valores de la amplitud de la OC. El ancho del pico aumenta a medida que aumenta la amplitud y se aproxima a $2 \Delta E_{OC}$ para valores grandes de ΔE_{OC} . Sin embargo, para maximizar la respuesta de la corriente neta, es más razonable maximizar la relación entre la corriente de pico neta normalizada ($\Delta\psi_{p,n}$) y $W_{1/2}$, $(\Delta\psi_{p,n} / nW_{1/2})$, la cual en términos analíticos está relacionada con la mejor sensibilidad y resolución. En la Figura 2.9 se muestran cálculos típicos de esta relación para tres valores ΔE_e .

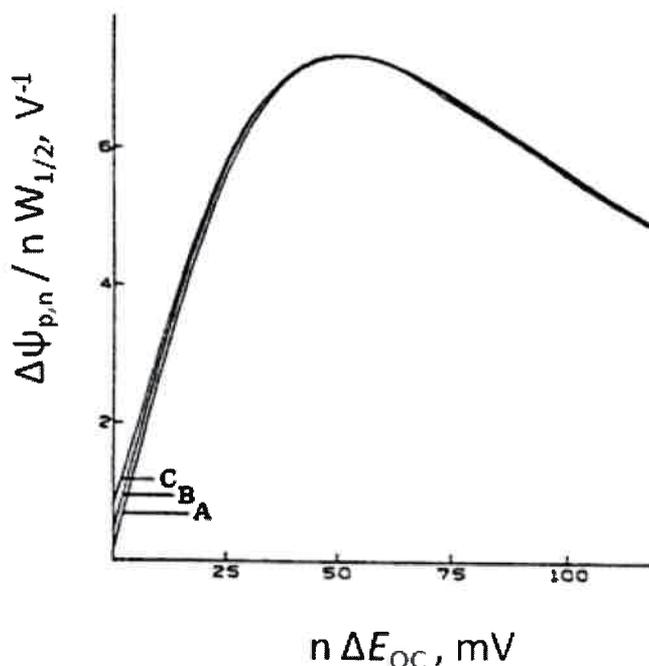


FIGURA 2.9. Relación entre la corriente de pico neta normalizada y el producto $n W_{1/2}$ para $\Delta E_e = A) 2,5; B) 10$ y $C) 25 \text{ mV}$.

Los resultados mostrados en la Figura 2.9 muestran que la relación $\Delta \psi_{p,n} / n W_{1/2}$ es prácticamente independiente de ΔE_e en el intervalo estudiado y que el valor $n \Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$ es el óptimo. El salto de escalera generalmente elegido es $n \Delta E_e = 10 \text{ mV}$.

En cualquier técnica voltamperométrica de pulso, la corriente se puede expresar en términos de una función corriente adimensional (ψ). En VOC, la corriente de pico neta ($I_{p,n}$) puede expresarse en función de la corriente de pico neta adimensional ($\psi_{p,n}$) por:

$$I_{p,n} = \frac{nFA\sqrt{D_O}c_O^*}{\sqrt{\pi t_p}} \psi_{p,n} \tag{2.22}$$

donde $\psi_{p,n}$ es el valor máximo de la función y t_p es el tiempo de pulso característico del experimento. Así, las funciones corrientes proveen una buena medida de la sensibilidad relativa de las técnicas. Los valores $\psi_{p,n}$ dependen de los valores $n \Delta E_{OC}$ y $n \Delta E_e$ y están tabulados en la Tabla 1 de la Ref. [169]. Para valores de $\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$

y $n \Delta E_e = 10$ mV, el valor de $\psi_{p,n}$ es 0,93. Para la voltamperometría de pulso normal el valor de ψ es 1 y en la voltamperometría de pulso diferencial, $\psi = (\sigma-1)/(\sigma+1)$, siendo $\sigma = \exp(nF\Delta E/2RT)$. Este valor, que depende de n y de la amplitud del pulso (ΔE) aplicado es siempre menor que 1 [155]. Para $n \Delta E = 100$ mV, el cual corresponde a $n \Delta E_{oc} = 50$ mV, el valor de $(\sigma-1)/(\sigma+1)$ es 0,75, en comparación con el valor 0,93 para la VOC cuando $\Delta E_e = 10$ mV. La mayor sensibilidad de la VOC respecto de la de pulso diferencial surge del esquema de medida de la corriente y de la contribución de la corriente inversa a la corriente neta. Como se puede esperar, esta ventaja en la sensibilidad de la VOC respecto de las otras técnicas de pulso se pierde cuando la reversibilidad del sistema disminuye.

La teoría de VOC para otros sistemas redox más complejos, tales como aquellos que involucran una transferencia electrónica más lenta o aquellos que, involucrando transferencias electrónicas rápidas, poseen reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga inicial, tales como los sistemas: QE, EQ, reacciones catalíticas y EQE, donde Q indica la etapa química y E la transferencia electrónica ha sido descrita en la Bibliografía [169].

Otra ventaja que posee la VOC es que el valor de la corriente neta es insensible a [96]:

- a) Geometría de electrodo compleja.
- b) Complicaciones cinéticas homogéneas acopladas a la transferencia de carga.
- c) Transporte de materia convectivo. Debido a esta última característica, la VOC se puede emplear como detector en cromatografía HPLC y en sistemas de flujo.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Instrumental electroquímico

3.1.1. Celdas electroquímicas

La celda para las experiencias de VC y VOC, en medio no agitado, es de vidrio y consta de dos cuerpos (Figura 3.1). Un cuerpo está separado del otro por medio de un fino capilar Luggin, con un área de sección transversal pequeña. En el compartimiento principal se colocan el contra-electrodo y el electrodo de trabajo, el cual se encuentra enfrentado y a la misma altura que el capilar Luggin-Haber, que se encuentra en un compartimiento lateral de la celda. Tanto el electrodo de trabajo como el contra-electrodo están sujetos por una tapa de teflón hermética. Esta tapa posee también un orificio, por donde ingresa un fino tubo de teflón transportando el gas nitrógeno y otro que sirve como salida del mismo. En el compartimiento lateral se coloca el electrodo de referencia a través de un puente salino de agar-KNO₃. Este segundo compartimiento posee un volumen considerable por debajo del Luggin, que conecta ambos cuerpos y que permite retener o impedir la contaminación de la solución de trabajo, debido a los componentes propios del electrodo de referencia. El volumen de la celda es de 10 mL. Las mediciones electroquímicas se realizaron con control de temperatura, con un baño de agua termostatzado, empleando un equipo Cole-Palmer, Polystat® Temperature Controller.

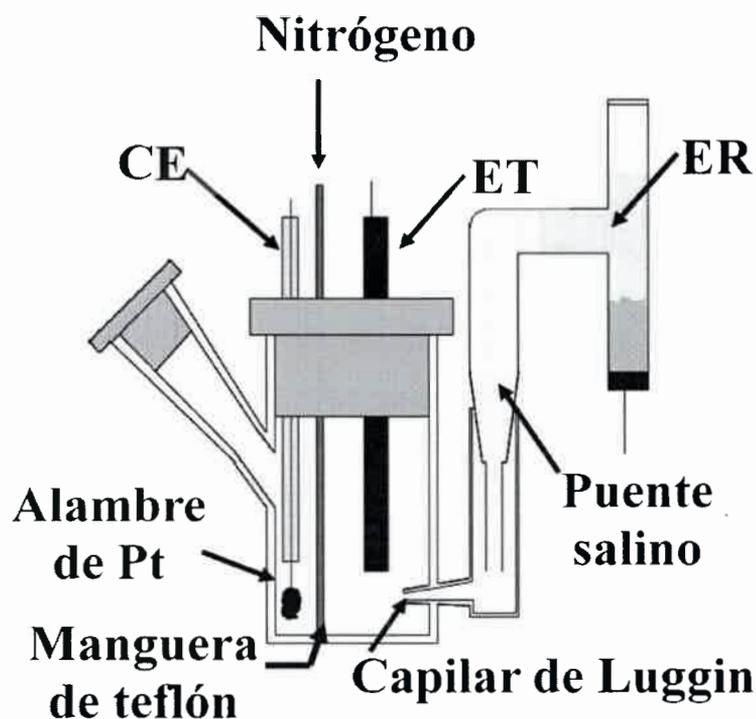


FIGURA 3.1. Esquema de la celda electroquímica utilizada. ET: Electrodo de trabajo. CE: Contra electrodo. ER: Electrodo de referencia., que termina en un capilar de Luggin-Haber.

3.1.2. Electrodo

3.1.2.1. Electrodo convencionales

3.1.2.1.1. Electrodo de trabajo

Para las experiencias de VC y VOC se utilizaron, por un lado, un electrodo de disco de oro poli-cristalino de 1,6 mm de diámetro (Bioanalytical System, BAS), de área geométrica $A = 0,020 \text{ cm}^2$. El área microscópica del electrodo se determinó midiendo el área debajo de la curva del pico de "stripping" de reducción del óxido de oro en una solución acuosa de H_2SO_4 , usando la relación de $0,43 \text{ mC cm}^{-2}$ [172].

Por otro lado, el mismo electrodo de oro se modificó con tioles, tanto alifáticos como aromáticos. Los electrodos de oro modificados con los distintos tioles se prepararon sumergiendo el electrodo de oro (luego de haberlo sometido a un

tratamiento de limpieza mecánica y química, según se describe en el Item 3.2.1.1.) en una solución 5 mM de cada tiol en etanol durante 1 h, salvo la sal del ácido dietil ditiocarbámico, la cual se empleó en una concentración 5 mM, pero disuelta en agua.

3.1.2.1.1.1. Tratamiento previo aplicado al electrodo de trabajo

El electrodo de oro, previo a cada medición, se pulió sucesivamente con polvo de alúmina (Fischer, 0,3 y 0,05 μm) sobre un paño de felpa y luego se sumergió en un baño de ultrasonido durante 5 min. Posteriormente, el electrodo se sumergió en una solución fuertemente oxidante (solución piraña) formada por una mezcla 1:3 (V/V) de H_2O_2 30% y H_2SO_4 concentrado (esta solución reacciona violentamente con los materiales orgánicos, por lo que debe tenerse especial cuidado con su manipulación) durante 10 min [118,119]. Finalmente, se sometió a un pre-tratamiento electroquímico, ciclando el potencial entre $-0,2$ y $1,5$ V en una solución acuosa $0,5$ M H_2SO_4 , hasta que se obtuvo un voltamperograma cíclico característico de un electrodo de oro limpio.

3.1.2.1.2 Electrodo de referencia

El electrodo de referencia fue un electrodo de calomel saturado (ECS) acuoso, el cual se preparó en nuestro laboratorio. Consiste de un tubo de 6 mm de diámetro, el cual posee dos ramas. En una de las ramas se suelda un alambre de Pt, luego se coloca Hg purificado de manera de cubrir toda la superficie del Pt y, por encima del Hg, se agrega la pasta de calomel (Hg_2Cl_2) dispersa en solución de KCl saturado. La otra rama, que realiza el contacto con la solución, está rellena con agar- KNO_3 3%. Este actúa como puente salino. Es importante que no exista flujo de materia hacia el compartimiento del electrodo de trabajo. Una vez preparado el electrodo, se compara su potencial frente a otro ECS estándar, y se verifica que la diferencia de potencial entre ellos no sea mayor que ± 1 mV a temperatura ambiente.

3.1.2.1.3. Contraelectrodo

Para las experiencias de VC y VOC se utilizó como contra-electrodo un alambre de Pt enroscado en forma de espiral, el que tiene un área muy superior a la del electrodo de trabajo ($A \cong 2 \text{ cm}^2$).

3.1.2.2. Sistema de electrodos de láminas impresas (ELI)

Otro sistema de electrodos utilizados para las experiencias de voltamperometría cíclica (VC) y voltamperometría de onda cuadrada (VOC) fueron los electrodos de láminas impresas (ELI) (Screen-Printed Electrode, SPE) de Palm Sens (The Netherlands). Este sistema de electrodos consiste de una celda de forma planar donde se encuentran impresos los tres electrodos (electrodo de trabajo, contra electrodo y un electrodo de pseudo-referencia) sobre un sustrato inerte, generalmente de materiales a base de cerámicas o plásticos [173]. Las tintas de impresión se encuentran compuestas por tres elementos:

- *Grafito de grado sintético*: es el material electroactivo.
- *Polímero ligante*: aumenta la fuerza de adherencia de la tinta con el sustrato.
- *Solventes*: se utilizan para mejorar la viscosidad de la tinta.

Este sistema de electrodos consiste de un contra electrodo y un electrodo de trabajo de carbono y un electrodo de pseudo-referencia de plata. En la Figura 3.2 se muestra una representación esquemática de un sistema de electrodos de lámina impresa.

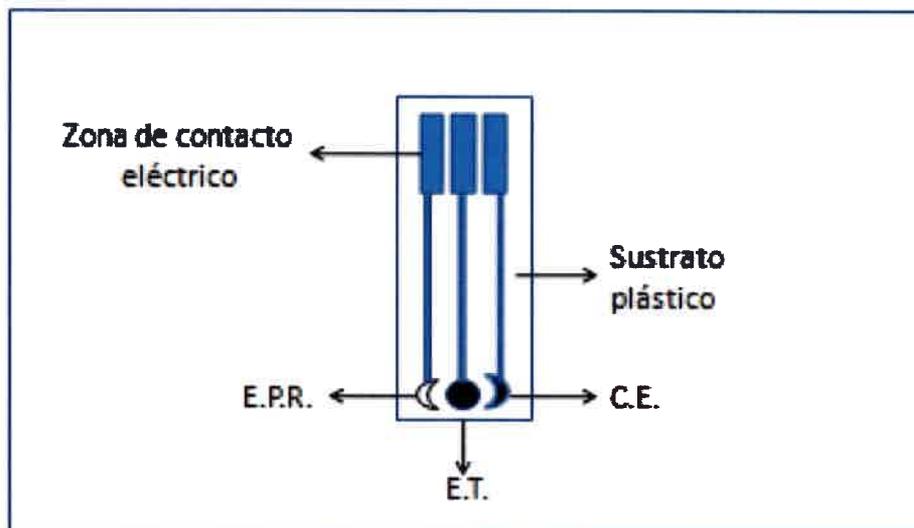


FIGURA 3.2 Representación esquemática de un sistema de electrodos de lámina impresa. Electrodo de trabajo (ET); contra electrodo (CE); electrodo de pseudo-referencia (EPR).

3.1.2.2.1. Tratamiento previo aplicado al sistema de electrodos de láminas impresas

Al electrodo de trabajo, previo a cada medición, se lo activó electroquímicamente con el objetivo de eliminar cualquier tipo de contaminante orgánico, aumentar la rugosidad superficial y funcionalizar la superficie [173,174]. El método de activación se basó en aplicar un salto de potencial de 1,2 V en una solución de KOH 10% P/V, durante 5 min, siguiendo un procedimiento previamente propuesto por Anjo y col. [175].

3.1.3. Equipamiento

Para las medidas electroquímicas se utilizó un Analizador Voltamperométrico, marca AUTOLAB PGSTAT12, acoplado a una PC, con software electroquímico incorporado, GPES 4,9, ambos Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands. Cuando se utilizó el sistema de electrodos de láminas impresas se empleó un conector específico preparado por el Ing. Mario Romero, Dpto. de Física, Facultad de Ciencias Exactas,

Físico-Químicas y Naturales, UNRC) que actúa como interfaz entre el ELI y el potencióstato.

3.2. Técnicas electroquímicas empleadas

Como técnicas electroquímicas se emplearon las voltamperometrías cíclicas (VC) y de onda cuadrada (VOC) y la cronoamperometría. En VC, la velocidad de barrido (v) se varió entre 25 y 200 mV s^{-1} . Los parámetros característicos de los voltamperogramas de OC fueron, en la mayoría de los experimentos los siguientes: amplitud de la onda cuadrada (ΔE_{oc}) = 50 y 25 mV, salto de escalera (ΔE_{es}) = 10 y 5 mV y la frecuencia (f) de 10 y 25 Hz. Sin embargo, en otros experimentos, estos parámetros se variaron, según se indica en la Sección Resultados y Discusión.

3.3. Materiales

3.3.1. Reactivos

OTA se adquirió a Sigma Chemical Company y se usó tal como se recibió. Se mantuvo a una temperatura de 4 °C y protegida de la luz.

Los tioles empleados para la modificación del electrodo de Au fueron: bencenotiol, ácido 3-mercapto propiónico, undecanotiol, la sal del ácido dietil ditiocarbámico, 2-amino etanotiol (cisteamina), 4-amino tiofenol, 2-(dietilamino) etanotiol y 4-mercapto piridina, todos marca SIGMA y se utilizaron sin pre-tratamiento previo.

Los reactivos para el desarrollo del inmunosensor fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal anti OTA (AcmOTA) IgG₁ de ratón adquirido en Santa Cruz Biotechnology; peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (FAL), 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil)carbodiimida (EDAC), ortofenilendiamina (OPD) y 4-nitrofenilfosfato todos de Sigma. *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de Fluka. 1,1-carbonildiimidazol (CDI) y ferricianuro de potasio de Aldrich. La leche descremada en polvo se adquirió en un supermercado local.

3.3.2. Solventes y soluciones

El solvente utilizado fue acetonitrilo (ACN), Sintorgan, calidad HPLC. Previo a su uso, se lo sometió a un proceso de secado por medio de tamices moleculares de 3 Å (Merck p.a.), los que habían sido previamente activados en una mufla a 300 °C por 48 h. Previo a esto, los tamices se enjuagaron con agua destilada y se secaron en la estufa por 72 h a 120 °C.

Se utilizó ácido clorhídrico e hidróxido de sodio (Merck p.a.) para ajustar el pH de las soluciones amortiguadoras al valor deseado. El formaldehído, el metanol y el agua utilizados para preparar las soluciones amortiguadoras fueron Sintorgan (calidad HPLC). El H₂SO₄ y H₂O₂ fueron Merck p. a. Las muestras de vino tinto, Cabernet Sauvignon (2006) Mendoza, Argentina se adquirieron en un supermercado local.

Las soluciones patrones de OTA se prepararon en ACN y metanol. Dichas soluciones se almacenaron a 4 °C en la oscuridad. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente agregando alícuotas de la solución patrón al medio de reacción empleado en cada caso. La concentración de OTA, c_{OTA}^* , se varió en el intervalo 10⁻¹² - 10⁻³ M.

Las soluciones de AcmOTA se prepararon en solución amortiguadora fosfato (SAF) en la concentración deseada. Las soluciones de leche se prepararon diariamente al 3% en SAF.

Se prepararon las siguientes soluciones amortiguadoras a partir de sus sales (Merck, p.a.):

- 1) Solución amortiguadora de fosfato (SAF) 10 mM de pH 7,0 a la cual se le disolvieron sales de KCl en una concentración 2,7 mM y NaCl a una concentración 137 mM.
- 2) Solución amortiguadora citrato-fosfato (SACF) 100 mM de pH 5,0.
- 3) Solución amortiguadora de citrato (SAC) 0,05 M de pH 2.
- 4) Solución amortiguadora TRIS 10 mM de pH 9,5 a la cual se le disolvió sales de MgCl en una concentración de 1 mM y KCl a una concentración de 50 mM.
- 5) Solución amortiguadora acetato (SAA) 0,1 M de pH 4,75.
- 6) Solución amortiguadora carbonato/bicarbonato 2,0 M de pH 9,5.

3.3.3. Esferas magnéticas (EM)

Las esferas magnéticas funcionalizadas con proteína G (Dynabeads® Protein G) que se utilizaron para la inmovilización de los AcmOTA fueron obtenidas de Invitrogen Dynal. El uso de EM con proteína G covalentemente unida a su superficie confiere una alta especificidad de unión y orientación de anticuerpos debido a que ellos tienen receptores específicos para la proteína G [143] (Figura 1.7)

Las EM tienen las siguientes características:

- Un diámetro uniforme de $2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$
- Una concentración de 30 mg mL^{-1} en SAF pH 7
- La proteína G (de aproximadamente 17 KDa) se encuentra unida covalentemente al polímero inerte que rodea al núcleo magnético
- Cuentan con una capacidad de unión de $8 \mu\text{g IgG / mg}$

3.4. Técnicas auxiliares

3.4.1. Espectroscopia UV-Visible

Las medidas espectrofotométricas para la determinación de la relación del conjugado OTA / enzima (OTA-E) se realizaron empleando un espectrofotómetro UV-Visible, marca Hewlett Packard, modelo HP 8453A, equipado con porta celdas termostalizadas. El ancho de banda del monocromador de este instrumento es de 1 nm. El instrumento, totalmente digitalizado, está acoplado a una PC. Se utilizaron celdas de cuarzo, de camino óptico de 1 cm.

Por otro lado, se determinaron, mediante lecturas de placas ELISA, las concentraciones óptimas del anticuerpo monoclonal anti OTA (AcmOTA) y del conjugado OTA-E para luego transferirlo al inmunosensor; para ello se utilizó un lector ELISA Multiskan EX.

3.4.2. Cromatografía líquida de alta presión

Esta técnica se utilizó con el fin de verificar la presencia de OTA en las muestras de vinos antes de analizarlas por los métodos electroquímicos, como así también para realizar su cuantificación ya que se utiliza en el método oficial [75]. Se empleó un equipo de cromatografía Hewlett Packard, Series 1100, con un detector de fluorescencia, Hewlett Packard 1046A. Las etapas de extracción fueron realizadas mediante columnas de inmunofinidad (IAC).

3.5. Otros equipamientos

Las medidas de pH fueron realizadas con un pH-metro, marca HANNA, modelo pH211, Rumania. Las soluciones amortiguadoras fueron termostalizadas a 37 °C usando una estufa NEO LINE, Argentina. El separador magnético utilizado para la manipulación de las esferas magnéticas fue de Serono Diagnostic, Norwell, Mass., U.S.A. Las muestras con EM fueron mezcladas con un vortex Vortemixer Speed Knob (China).

3.6. Procedimiento de ensayo para el inmunosensor electroquímico

El magneto inmunosensor electroquímico fue desarrollado en base a un ensayo competitivo directo. Las EM fueron usadas como soporte sólido para la inmovilización de los AcmOTA. Por otro lado, la superficie del ELI fue utilizada para la reducción de la benzoquinona (Q) producida por la reacción enzimática. Todas las etapas del inmunoensayo se muestran en la Figura 3.3

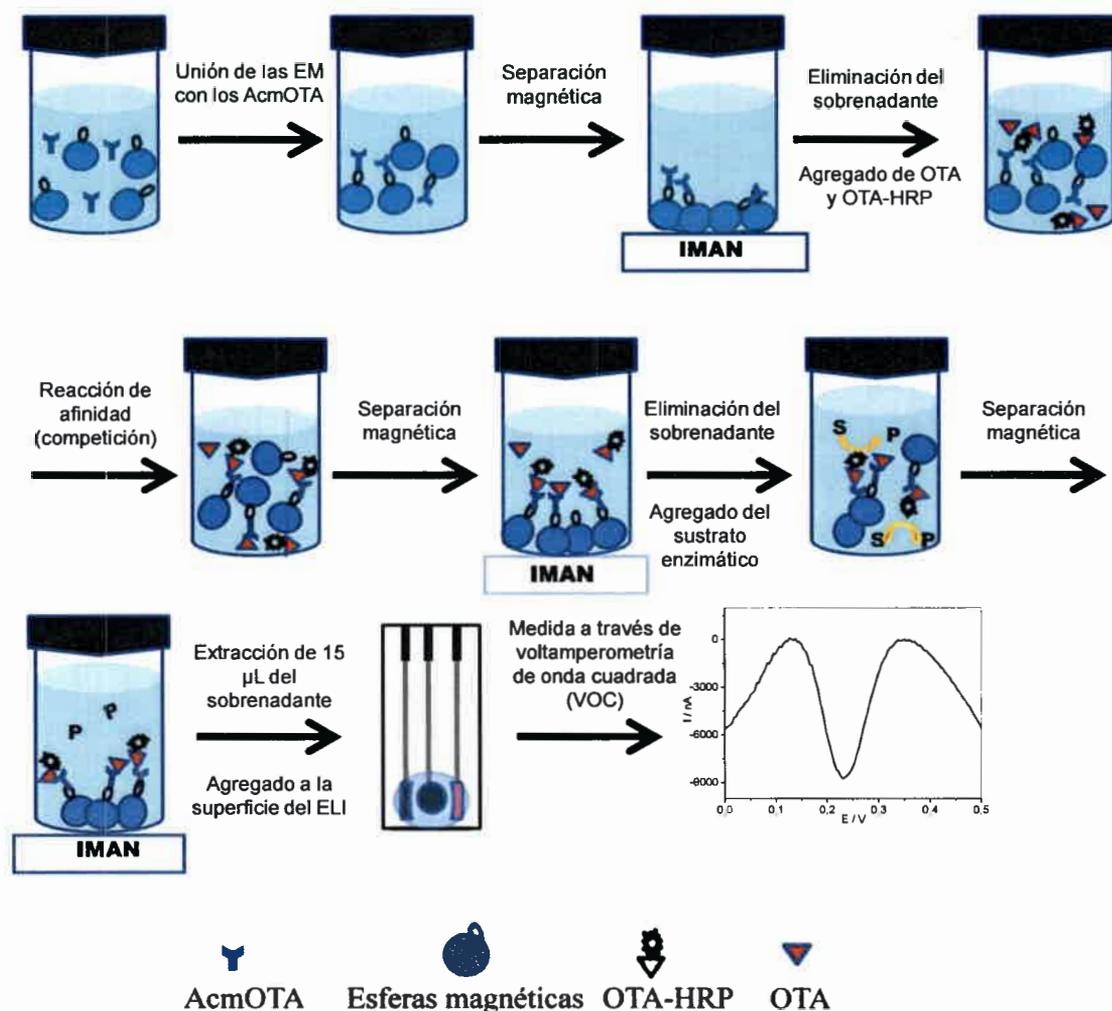


FIGURA 3.3. Representación esquemática del inmunosensor para OTA basado en un ensayo competitivo usando detección electroquímica.

En primer lugar, 1,8 μL de suspensión de EM fueron transferidas a tubos Eppendorf™ y luego fueron lavados con SAF pH 7 tres veces, para remover todo el preservante (NaN_3), según el protocolo del fabricante. Luego, se agregaron a las EM 50 μL de dilución óptima de AcmOTA. La solución fue agitada a 200 rpm a 37° C durante 15 min para obtener el complejo AcmOTA-EM. Después de la incubación, cada tubo fue posicionado en el imán. Una vez que las EM se depositaron en el fondo del tubo, se eliminó el sobrenadante. El complejo AcmOTA-EM fue lavado tres veces con SAF pH 7. Esta etapa de lavado elimina todo el AcmOTA que no se unió a las EM. Las EM fueron re-suspendidas en 50 μL de solución de OTA y OTA-HRP y agitada a 200 rpm a 37°C durante 15 min (etapa de competición). Luego, las EM fueron

separadas magnéticamente y el sobrenadante se eliminó. Las EM fueron lavadas tres veces con SAF pH 7. Las reacciones catalizadas por las enzimas se han usado ampliamente con propósitos analíticos en determinaciones de diferentes sustratos, inhibidores. Gorton ha explicado el mecanismo catalítico de la HRP [176]. Por otro lado, es bien conocido que en presencia de H_2O_2 la enzima cataliza la oxidación de H_2Q a Q [177]. Luego, las EM fueron re suspendidas en 20 μ L de una solución 10 μ M de H_2O_2 / H_2Q en SACF pH 5. Después de 5 min de incubación a 200 rpm a 37°C, las EM fueron separadas magnéticamente y 15 μ L del sobrenadante fueron transferidos a la superficie del ELI. El producto enzimático fue detectado por la medición de la reducción catódica de la Q generada por VOC. Todas las medidas de VOC fueron realizadas en un intervalo de potencial de 0,5 V a 0,0 V, con una amplitud de la onda cuadrada $\Delta E_{oc} = 25$ mV, salto de escalera $\Delta E_{es} = 5$ mV y la frecuencia f de 25 Hz. Estos valores de ΔE_{oc} y de ΔE_{es} son comúnmente usados en transferencias electrónicas heterogéneas de $2 e^-$ [178].

3.7. Extracción de ocratoxina

La extracción de OTA a partir de muestras de vino contaminadas “ex-profeso” se realizó de la siguiente forma: a partir de 10 mL de la muestra de vino, a la que se le había adicionado una cantidad conocida de OTA, se le agregó 0,1 g de poli-vinil-pirrolidona (PVP, marca SP3, peso molecular 150.000), la que es capaz de formar una especie de malla polimérica insoluble con los polifenoles [179]. Luego, esta solución se filtró con papel de fibra de vidrio (MICROCLAR, FFG070 WPH). En el filtro quedaron retenidos los polifenoles con la PVP. Posteriormente, a 5 mL del filtrado se le agregaron 2,5 mL de ácido cítrico 1 M + 5 mL de $CHCl_3$ y se centrifugó durante 5 min a 4600 rpm. Luego, la parte acuosa (parte superior) se descartó y, a la fase orgánica (fase inferior) se le agregaron 5 mL de solución reguladora 0,5 M de $Na_2CO_3/NaCO_3H$ (pH 9,60) con agitación, lo que permitió formar la correspondiente sal de OTA. Se centrifugó durante 5 min a 4600 rpm, con lo cual la micotoxina pasó a la fase acuosa (fase superior). Se tomó 1 mL de dicha fase, a la que se le agrega 1 mL de la SAF de pH 4,0, siendo el pH de la solución resultante de 6,50. Posteriormente, se agregaron pequeñas alícuotas de $HClO_4$ diluido a los efectos de llevar el pH al valor de 4,0 para realizar las medidas experimentales. Esta solución se llevó a la celda electroquímica y se procedió a registrar los correspondiente voltamperograma de OC.

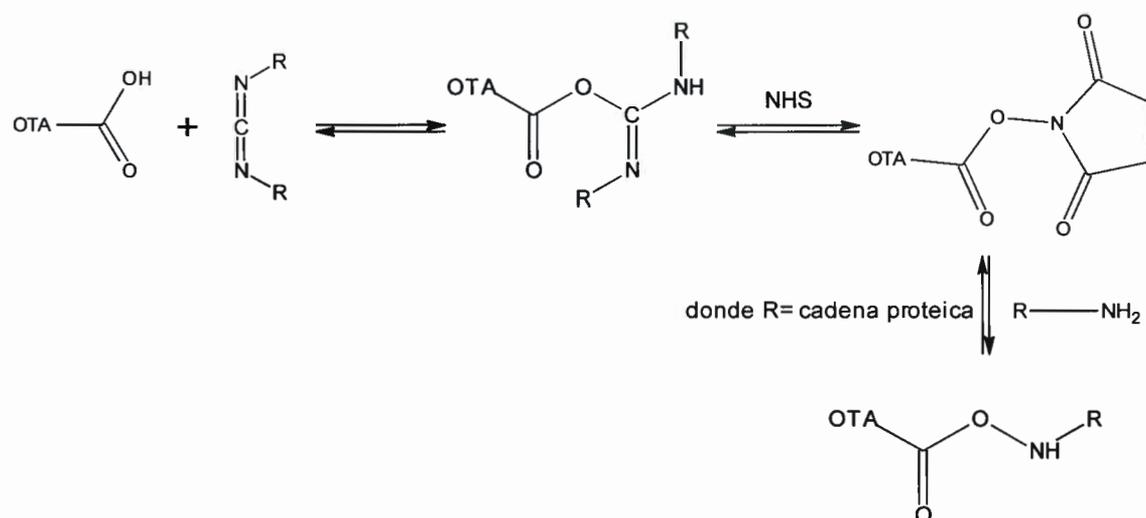
3.8. Conjugación OTA-enzima

Se desarrollaron tres procedimientos de conjugación OTA-FAL y OTA-HRP los cuales se describirán brevemente a continuación.

3.8.1. Conjugación vía carbodiimida

El procedimiento utilizado se basó en el método de Chu y col. [180]. Se disolvieron 0,5 mg de OTA, 1,74 mg de NHS y 6,2 mg de EDAC en 2,0 mL de metanol y se dejó en la oscuridad por 4 h para activar el grupo carbonilo de OTA. Una vez activado el grupo carbonilo de OTA, se mezcló esta solución con una solución de enzima de 1 mg mL⁻¹ de FAL y HRP. Esta nueva solución se dejó agitando durante 24 h a 4 °C y, finalmente, el producto de la solución se purificó mediante dializado con membranas de diálisis de celulosa (10 kDa de corte) frente a agua destilada durante 5 días.

En el siguiente esquema, se muestra como se conjuga OTA con las enzimas utilizadas:

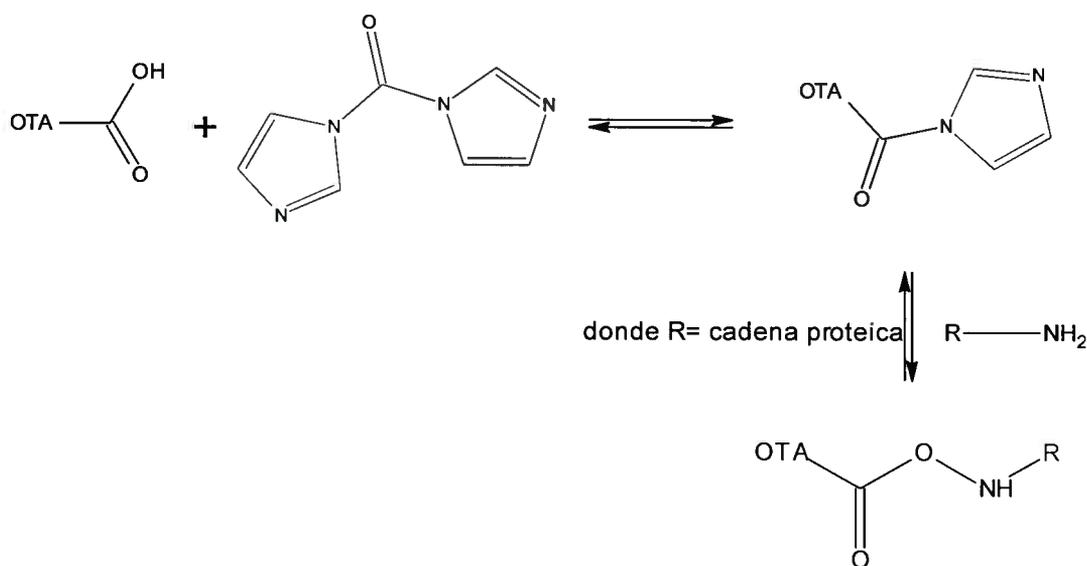


Básicamente, EDAC y NHS activan al grupo carboxilo de OTA con formación de grupos ésteres y amidas. El grupo activado puede formar luego enlaces amidas con aminas primarias (presentes en las enzimas utilizadas).

3.8.2. Conjugación vía carbonildiimidazol

Esta ruta de conjugación se basó en el procedimiento propuesto por Xiao y col. [181]. Se disolvieron 0,5 mg de OTA y 2 mg de CDI en 2,0 mL de metanol y se dejó 1 h bajo agitación a temperatura ambiente para activar el grupo carbonilo de OTA. Una vez activado el grupo carbonilo de OTA, se mezcló esta solución con una solución de enzima de 1 mg mL⁻¹ de FAL y HRP. Esta nueva solución se dejó agitando durante 24 hs a 4° C y finalmente el producto de la solución se purificó mediante dializado con membranas de diálisis de celulosa (10 kDa de corte) frente a agua destilada durante 5 días.

En el siguiente esquema, se muestra como se conjuga OTA con las enzimas utilizadas:



En esta conjugación el grupo carboxilo de OTA es convertido fácilmente por el CDI en un intermediario de acilimidazol carbamato. Estos intermediarios son luego desplazados por nucleófilos, tales como aminas para formar uniones covalentes estables.

3.8.3. Conjugación vía formaldehído

Esta vía de conjugación fue descrita por Abramson y col [182] y se basa en la reacción de Mannich. Así, 0,5 mg de OTA se disolvieron en 0,8 mL de formaldehído y se agregaron 2,5 mL de una solución 1 mg mL⁻¹ de las enzimas disueltas en solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1 mM de pH 4,2 y se lo dejó durante 24 hs a 37° C. Luego de la conjugación, el producto de la solución se purificó mediante dializado con membranas de diálisis de celulosa (10 kDa de corte) frente a agua destilada durante 5 días.

3.9. Estudios colorimétricos mediante ELISA

Mediante los estudios colorimétricos se determinaron las diluciones óptimas del AcmOTA y de los conjugados OTA-FAL y OTA-HRP que se emplearán en el inmunosensor electroquímico.

El procedimiento general utilizado para las determinaciones de las diluciones, fue:

- 1) Incubación de diferentes diluciones de AcmOTA a 37 °C por 2 h (100 µL por pocillo).
- 2) Se enjuaga la cubeta 3 veces con SAF de pH 7.
- 3) Se agrega solución 3 % de leche descremada en SAF de pH 7 hasta completar la cubeta (400 µL). Se incuba 30 min a 37 °C.
- 4) Se enjuaga la cubeta 3 veces con SAF de pH 7.
- 5) Se agrega la solución de los conjugados en la dilución deseada (OTA-FAL y OTA-HRP), 100 µL en SAF de pH 7, se incuba 30 min a 37 °C.
- 6) Se enjuaga la cubeta 3 veces con SAF de pH 7.
- 7) Se agregan 100 µL de reactivo para el desarrollo de color (para la enzima HRP se utilizó OPD conjuntamente con el H₂O₂ 1 mM la concentración de ambos en SAC de pH 5 y para la enzima FAL se utilizó 4-nitrofenilfosfato 2,5 mM a pH 9,5).
- 8) Luego de 10 min, se agregan 100 µL de la solución de H₂SO₄ 2 M para HRP y NaHCO₃/Na₂CO₃ 2 M para FAL con el fin de detener la reacción.

Se lee en el espectrofotómetro a la longitud de onda adecuada ($\lambda = 450 \text{ nm}$ para HRP y $\lambda = 405 \text{ nm}$ para FAL).

Las diluciones de AcmOTA que se utilizaron fueron: 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000. Estas diluciones se prepararon a partir de la solución inicial de AcmOTA que provee el fabricante.

En cuanto a los conjugados, se partió de la solución sintetizada en nuestro laboratorio y se realizaron diluciones seriadas de pocillo en pocillo. En la Figura 3.4 se esquematiza una placa de ELISA de 96 pocillos y como se realizó las diluciones tanto del AcmOTA y de los conjugados para llegar a su optimización.

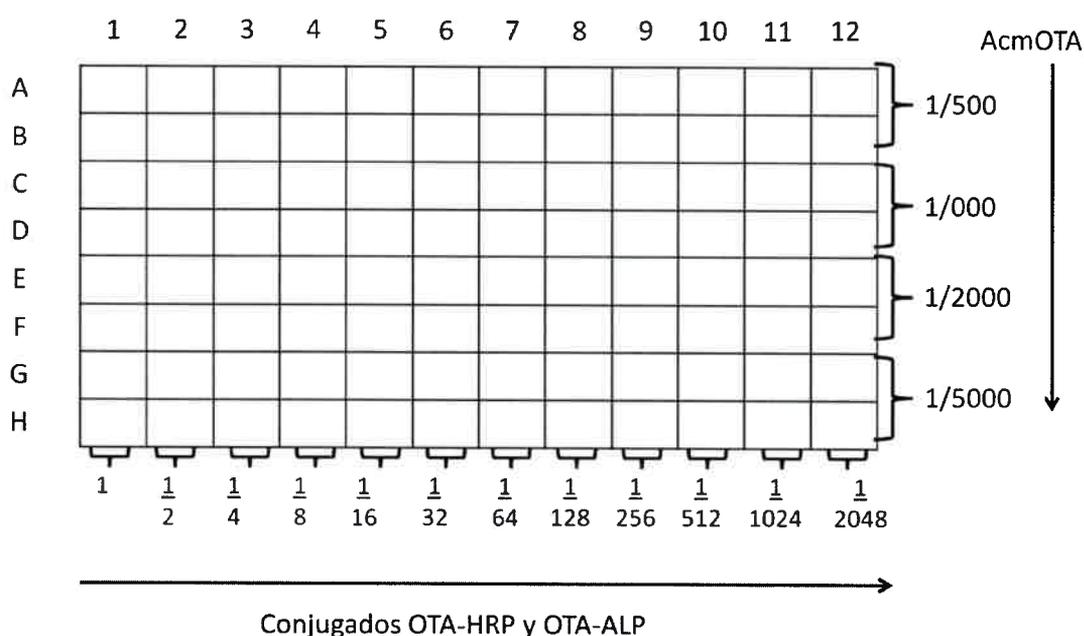


FIGURA 3.4 Desde A hasta H se cargaron las distintas diluciones de AcmOTA y desde 1 hasta 12 los conjugados en dilución seriada.

Todas las diluciones se realizaron por duplicado, y por cada conjugado (OTA-HRP y OTA-FAL) se realizaron tres placas de ELISA, debido a las tres vías de síntesis que se realizaron en cada una de ellas.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comportamiento electroquímico de OTA

4.1.1. Estudios de la oxidación electroquímica de ocratoxina A sobre electrodos de oro desnudo

4.1.1.1. Pre-tratamiento del electrodo de trabajo

En la Figura 4.1 se muestra un voltamperograma cíclico obtenido para el electrodo de oro en H_2SO_4 0,5 M acuoso, después de haber sido sometido al pre-tratamiento de limpieza, según lo indicado en el Item 3.1.2.1.1.1., donde se observa el voltamperograma típico esperado para una superficie de oro limpia.

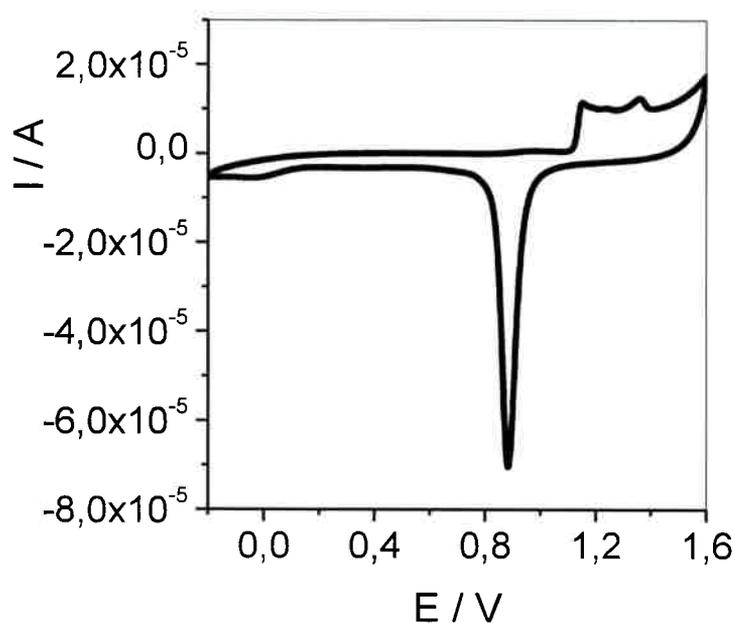


FIGURA 4.1 Voltamperograma cíclico del electrodo de oro en 0,5 M H_2SO_4 acuoso. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.1.1.2. Voltamperometría cíclica

En la Figura 4.2 se muestran los voltamperogramas cíclicos del blanco y de una solución de OTA en 20 % ACN + 80 % solución reguladora de fosfato de pH 7,0 (dos barridos repetitivos). Se observa que, en la solución del blanco, se define durante el barrido anódico el pico de oxidación de oro, tal lo esperado teóricamente [96] y durante el barrido catódico el correspondiente pico de reducción del óxido formado.

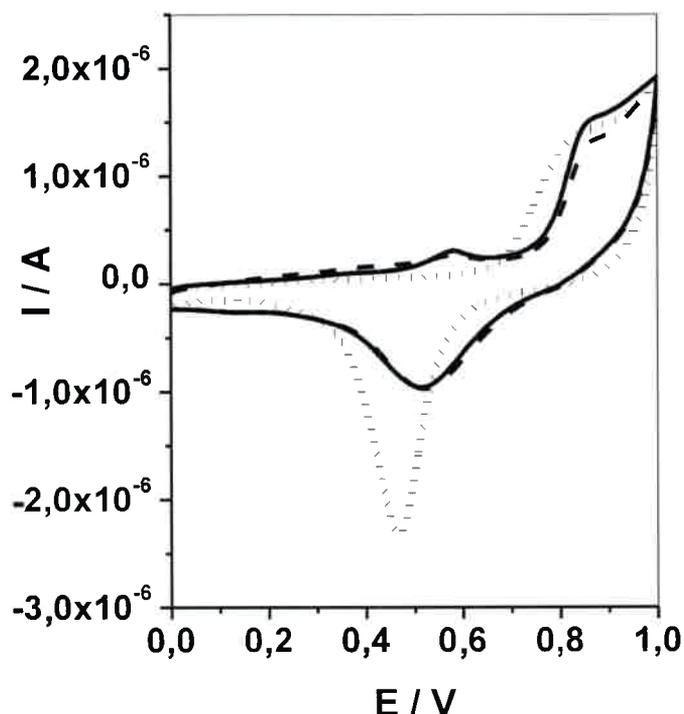


FIGURA 4.2. Voltamperogramas cíclicos del blanco (línea de puntos) y dos repetitivos de OTA (línea continua y discontinua) registrados sobre el electrodo de oro desnudo en 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} M$, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

En la solución de la micotoxina, los voltamperogramas cíclicos muestran un pre-pico centrado en $\approx 600 \text{ mV}$ y que el pico de oxidación principal de OTA se solapa con el pico de formación de los óxidos de oro y se observa una marcada disminución en el pico de reducción de los óxidos. Además, el segundo barrido repetitivo muestra una ligera disminución en el pico de oxidación principal de OTA. Estos hechos estarían poniendo en evidencia que el producto de oxidación de OTA se adsorbe sobre la superficie de electrodos de oro.

Medidas recientes realizadas en nuestro laboratorio han mostrado que, cuando la oxidación de OTA se lleva a cabo sobre electrodos de carbón vítreo en 10% ACN + 90 % 1M HClO_4 acuoso, los voltamperogramas cíclicos consecutivos en el intervalo de potenciales entre 0 y 1400 mV muestran durante el primer barrido anódico un pico de oxidación principal, centrado en $\approx 1300 \text{ mV}$, no mostrando el correspondiente pico

catódico complementario cuando se invierte la dirección del barrido de potencial, mostrando claramente un mecanismo de reacción complejo [155]. Sin embargo, durante el primer barrido catódico se observan dos picos de reducción, centrados a ≈ 600 y 470 mV. Un nuevo pico anódico ancho se encontró durante el segundo barrido de potencial, centrado a ≈ 730 mV, el cual es el pico complementario de los picos catódicos recién descritos. En los barridos sucesivos, el pico de oxidación principal de OTA disminuye, mientras que los sistemas de picos centrados a potenciales menos anódicos aumentan con los barridos sucesivos hasta que después del quinto barrido de potencial alcanzan valores constantes [95].

Si el electrodo se extrae de la celda y, previo lavado con agua, se transfiere a otra celda que contiene sólo solución de blanco se observa la definición de un sistema de picos cuasi-reversibles, que fueron asignados a la descarga electroquímica de un sistema del tipo quinona/hidroquinona, que resulta del producto de oxidación electroquímica de OTA [95].

Estos resultados demuestran que la adsorción del producto de oxidación de OTA es más fuerte sobre electrodos de oro que de carbono vítreo, ya que durante el primer barrido se observa un pre-pico, como se predice teóricamente cuando la adsorción del producto es mayor que la del reactivo en si mismo [155].

En la Figura 4.3 se muestran el voltamperograma cíclico del blanco y dos voltamperogramas de la solución de OTA repetitivos en la región de potencial entre 0 y 700 mV. Como se puede observar, los voltamperogramas cíclicos de OTA son bien reproducibles y muestran durante el barrido catódico un pico complementario medianamente definido.

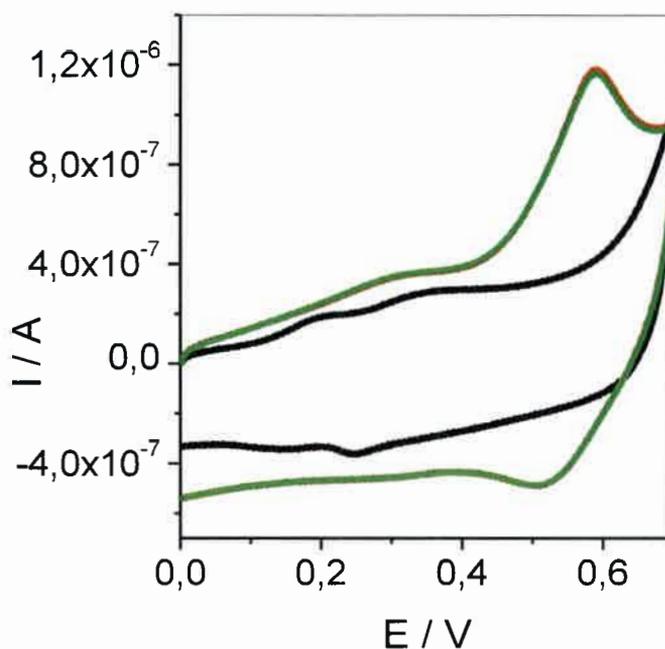


FIGURA 4.3. Voltamperogramas cíclicos del blanco (●) y dos repetitivos de OTA (voltamperogramas cíclico 1 (●) y 2 (●)). Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 4.2.

En la Figura 4.4 se muestran los voltamperogramas cíclicos del pre-pico de adsorción a distintas velocidades de barrido. En la Figura 4.5 se muestra un gráfico de las corrientes de pico anódicas ($I_{p,a}$) en función de v , mostrando un comportamiento lineal, como se predice teóricamente para una cupla redox superficial [155].

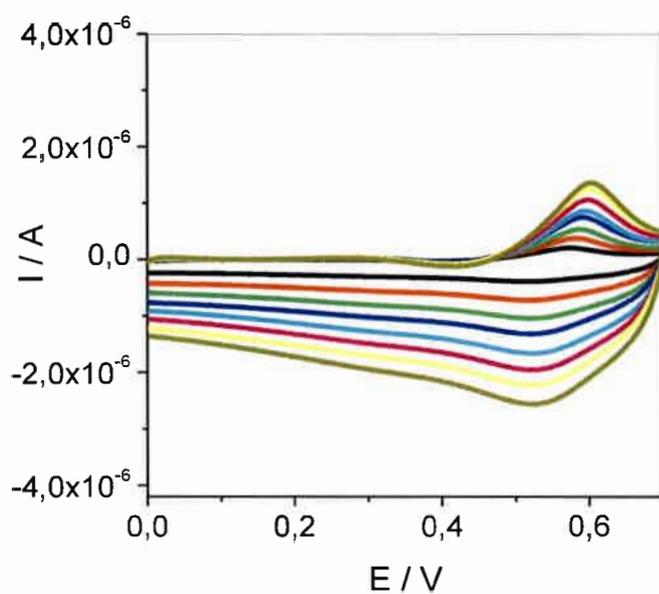


FIGURA 4.4. Voltamperogramas cíclicos del pre-pico de adsorción a distintas v . Las demás condiciones experimentales son idénticas a las de la Figura 4.2. $v = 25$ (●); 50 (●); 75 (●); 100 (●); 125 (●); 150 (●); 175 (●); 200 (●) mV s^{-1}

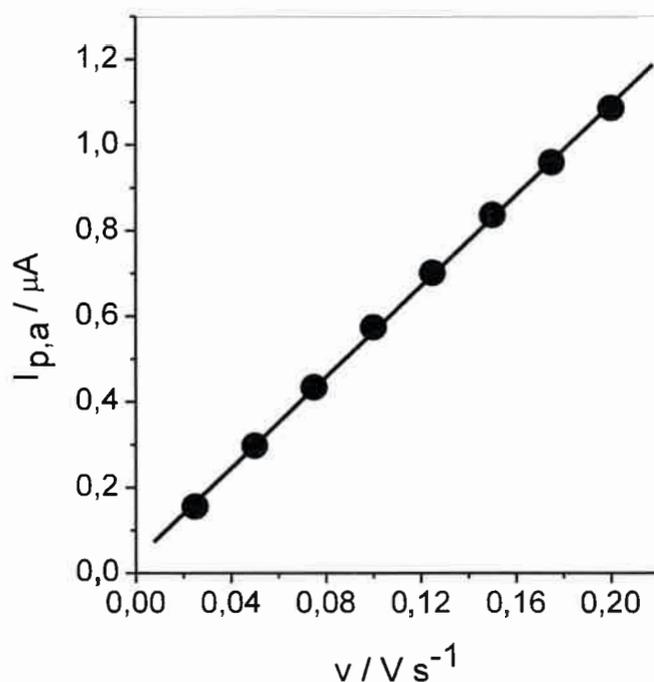


FIGURA 4.5. Dependencia de la corriente de pico anódica con la velocidad de barrido del potencial. Los parámetros de la regresión lineal fueron: ordenada = $(0,033 \pm 0,006)$ μA ; pendiente = $(5,32 \pm 0,05)$ $\mu\text{A V}^{-1} \text{s}$; coeficiente de correlación lineal, $r = 0,9998$. Las demás condiciones experimentales son las mismas que la Figura 4.2.

Los picos anódicos se integraron para determinar, por un lado, la carga (Q) y, por otro lado, el ancho de pico a la altura media ($\Delta E_{p/2}$), obteniendo un valor promedio de ($\Delta E_{p/2} = 93 \pm 4$) mV, valor que concuerda razonablemente bien con el valor teórico predicho, que es de $90,6/n$ mV a 25°C , de donde se podría estar infiriendo un valor de $n = 1$. Por otro lado, de la siguiente ecuación, que corresponde a la descarga de una especie adsorbida sobre la superficie de un electrodo [155]:

$$I_{p,a} = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_{OTA}^* \quad (4.1)$$

donde Γ_{OTA}^* es el recubrimiento superficial de OTA y los otros términos tienen su significado habitual, se predice una variación lineal entre $I_{p,a}$ vs v . A partir de la

pendiente del gráfico de $I_{p,a}$ vs v (Figura 4.5) se determinó un valor de $\Gamma_{OTA}^* = 2,83 \times 10^{-10}$ moles cm^{-2} , considerando $n = 1$ y el área geométrica del electrodo de oro, valor razonable para este tipo de procesos superficiales [155].

En la Figura 4.6 se muestran los voltamperogramas cíclicos de la cupla redox superficial obtenidos a distintos valores de pH a un valor de v constante. Claramente, se observa que el sistema redox cuasi-reversible está mejor definido a un pH ácido (pH 4,0).

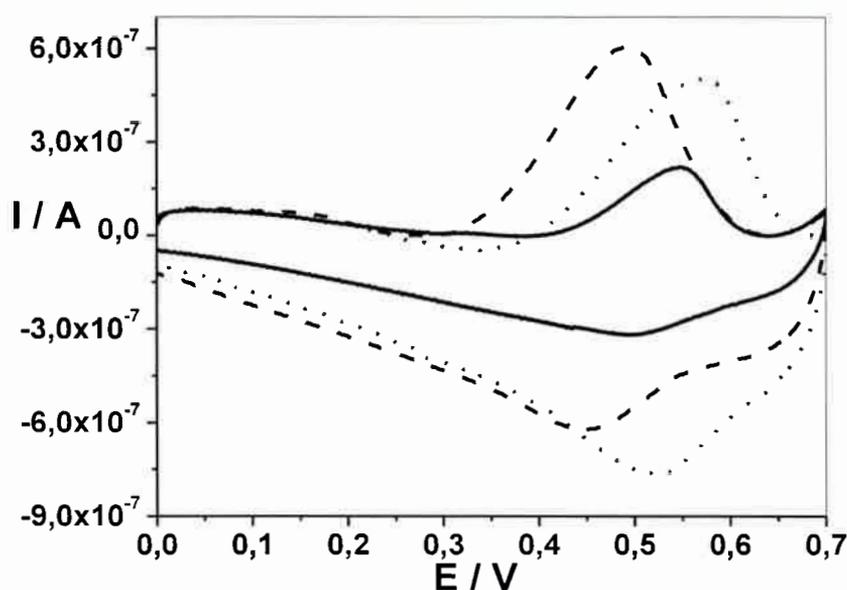


FIGURA 4.6. Voltamperogramas cíclicos del proceso redox superficial obtenidos en 20% ACN + 80% soluciones reguladoras de distintos valores de pH (línea discontinua pH 4, línea de puntos pH 7, línea continua pH 8) sobre el electrodo de oro desnudo. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4}$ M. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

4.1.1.3. Voltamperometría de onda cuadrada

En la Figura 4.7 se muestran los tres registros de corriente obtenidos en un voltamperograma de OC, que son las corrientes directa (I_d), la inversa (I_i) y diferencial o neta (I_n) a pH 7,0.

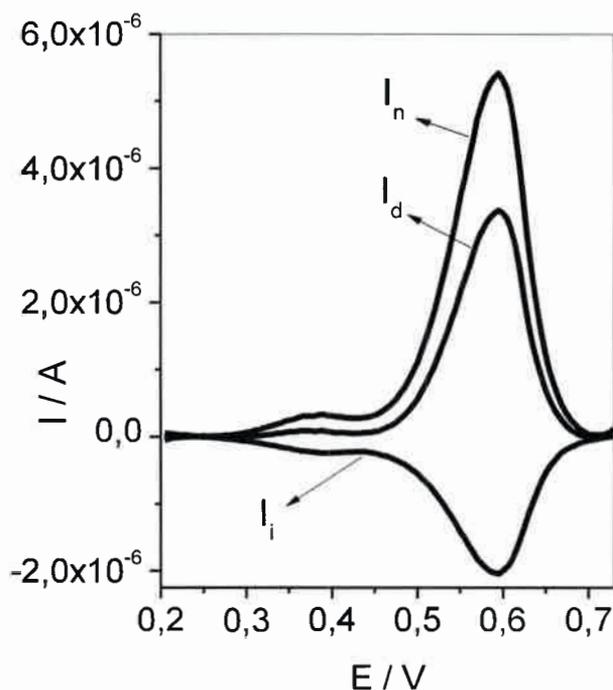


FIGURA 4.7. Los tres registros de corrientes obtenidos para un voltamperograma del sistema redox superficial sobre el electrodo de oro desnudo, pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 50$ mV; $\Delta E_e = 10$ mV y $f = 10$ Hz.

Como se puede observar, la cuasi-reversibilidad del sistema redox superficial está mejor definida en comparación con la respuesta obtenida mediante VC (comparar Figuras 4.6 y 4.7). Este comportamiento se espera en función de la mayor sensibilidad de la técnica de VOC respecto de la VC [169].

En la Figura 4.8 se muestra un gráfico de la corriente de pico neta ($I_{p,n}$) del barrido anódico en función de la frecuencia, donde se observa un comportamiento lineal.

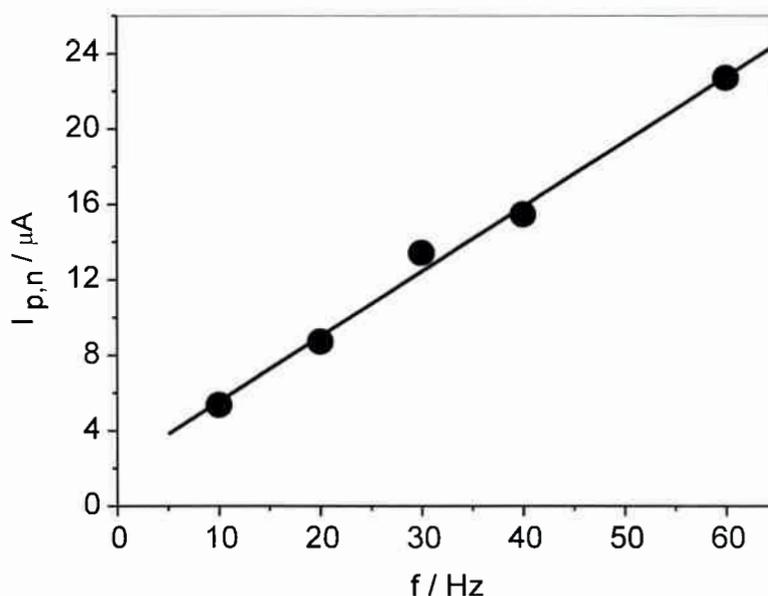


FIGURA 4.8. Dependencia de la corriente de pico anódica neta con la frecuencia. Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 4.7.

El ancho a la altura media del pico diferencial ($W_{1/2}$) promedio calculado para 5 frecuencias distintas fue de ($W_{1/2} = 98 \pm 7$) mV, valor próximo al esperado para una reacción redox que involucra la transferencia de un electrón [169].

4.1.2. Estudios de la oxidación electroquímica de ocratoxina A sobre electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles

4.1.2.1. Electrodo de oro modificados con bencenotiol

En la Figura 4.9 se muestran los voltamperogramas cíclicos de OTA obtenidos sobre el electrodo de oro desnudo y modificado con bencenotiol y los correspondientes blancos. Se observa que el voltamperograma cíclico del blanco sobre el electrodo modificado muestra una menor corriente capacitiva, tal lo esperado teóricamente [120,124]. Sin embargo, la respuesta electroquímica del pico superficial de OTA pierde reversibilidad si se lo compara con el oro desnudo y, además, si bien se analizaron distintos tiempos de acumulación (t_{ac}) variables entre 15 y 150 s a $E = 0$ mV, la

respuesta en corriente fue siempre menor sobre el electrodo modificado respecto del oro desnudo.

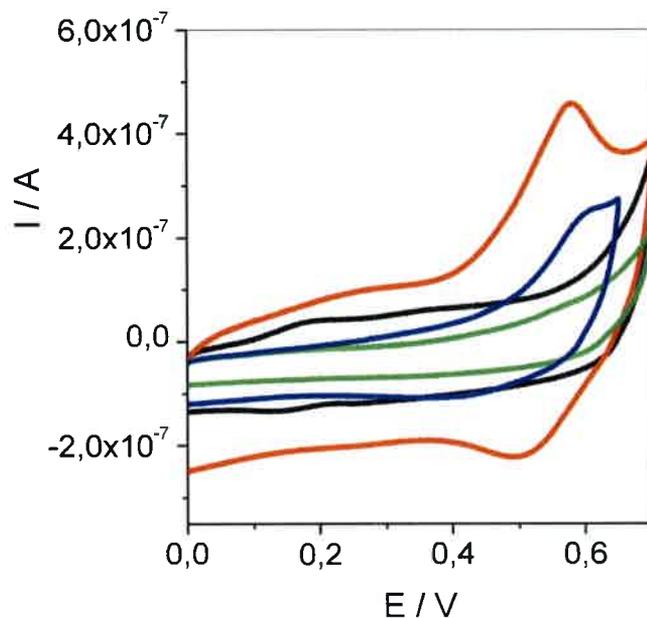


FIGURA 4.9. Voltamperogramas cíclicos de: (—) blanco sobre el oro desnudo; (—) blanco sobre el oro modificado con el bencenotiol; (—) OTA sobre el electrodo modificado, $t_{ac} = 60$ s y (—) OTA sobre el electrodo de oro desnudo. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución amortiguadora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4}$ M. $v = 25$ mV s⁻¹.

4.1.2.2. Electrodo de oro modificado con el ácido 3-mercaptopropiónico

En la Figura 4.10 se muestran los voltamperogramas cíclicos del blanco (20% ACN + 80% solución amortiguadora de fosfato de pH 7,0) obtenidos tanto sobre el electrodo de oro desnudo como modificado por el ácido 3-mercaptopropiónico.

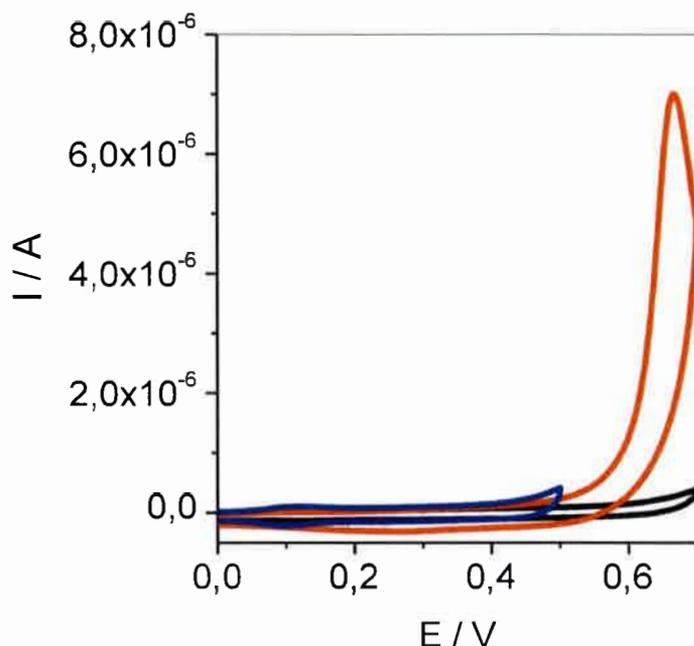


FIGURA 4.10. Voltamperogramas cíclicos del blanco sobre el electrodo de oro desnudo (—) y modificado por el ácido 3-mercaptopropiónico a $E_\lambda = 700 \text{ mV}$ (—) y 500 mV (—), respectivamente. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Como puede verse en la Figura 4.10, un voltamperograma cíclico del blanco registrado sobre el electrodo de oro modificado con el ácido 3-mercaptopropiónico muestra que a partir de un $E \cong 500 \text{ mV}$ comienza a definirse un pico voltamperométrico, indicando que el tiol comienza a desorberse, mostrando así que no sería una alternativa adecuada para el estudio de la cupla redox superficial, la que aparece a potenciales menos positivos.

En la Figura 4.10 se puede observar también que la monocapa de este tiol sería sólo estable en la región de potenciales comprendidos entre 0 y 500 mV.

4.1.2.3. Electrodo de oro modificado con undecanotiol

En la Figura 4.11 se muestran los voltamperogramas cíclicos del blanco y otros registrados en la solución de OTA, uno a continuación del otro, donde claramente se observa que el pre-pico de oxidación de OTA sobre este electrodo modificado está

pobremente definido mostrando una disminución en la corriente en los barridos consecutivos, siendo así mucho mejor la definición de esta pre-onda sobre el electrodo de oro desnudo que sobre este electrodo modificado (comparar Figuras 4.11 con 4.9).

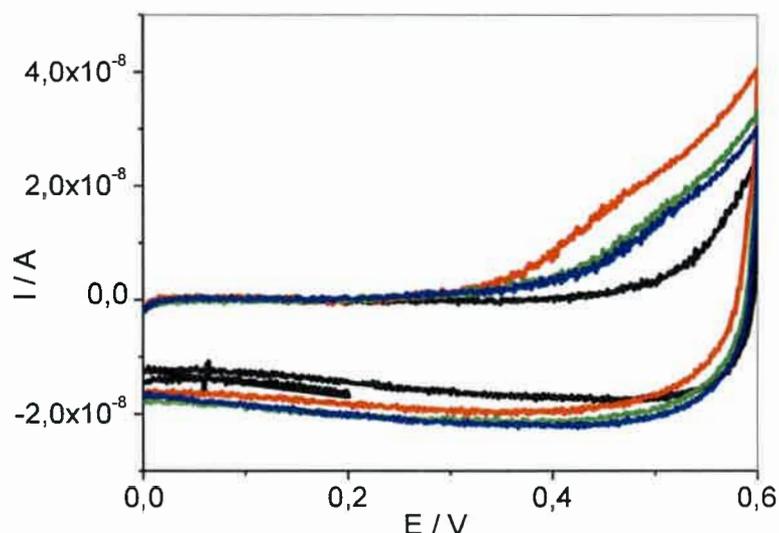


FIGURA 4.11. Voltamperogramas cíclicos del blanco(●) y de soluciones de OTA(primer barrido (●); segundo barrido (●); cuarto barrido (●)) sobre un electrodo de oro modificado con el undecanotiol. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} M$. $v = 50 mV s^{-1}$.

4.1.2.4. Electrodo de oro modificado con la sal del ácido dietil ditiocarbámico y 2-(dietilamino) etanotiol

En la Figura 4.12 se muestran los voltamperogramas cíclicos del blanco y de la descarga de OTA sobre un electrodo de oro modificado con la sal del ácido dietil ditiocarbámico, donde se observa que el pre-pico superficial de OTA está pobrementemente definido. Resultados similares (no mostrados) se encontraron cuando el electrodo de oro se modificó con 2 (dietilamino) etanotiol.

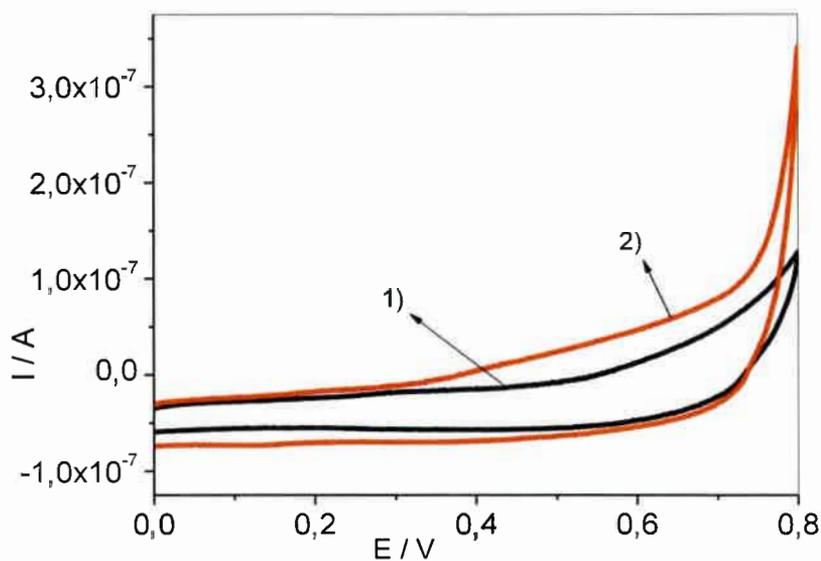


FIGURA 4.12. Voltamperogramas cíclicos del blanco (1) y de la solución de OTA (2) sobre el electrodo de oro modificado con la sal del ácido dietil ditiocarbámico. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4}$ M. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

4.1.2.5. Electrodo de oro modificado con 4-amino-tiofenol

En la Figura 4.13 se muestran los voltamperogramas cíclicos del blanco y de una solución de OTA registrados sobre un electrodo de oro modificado con 4-amino-tiofenol.

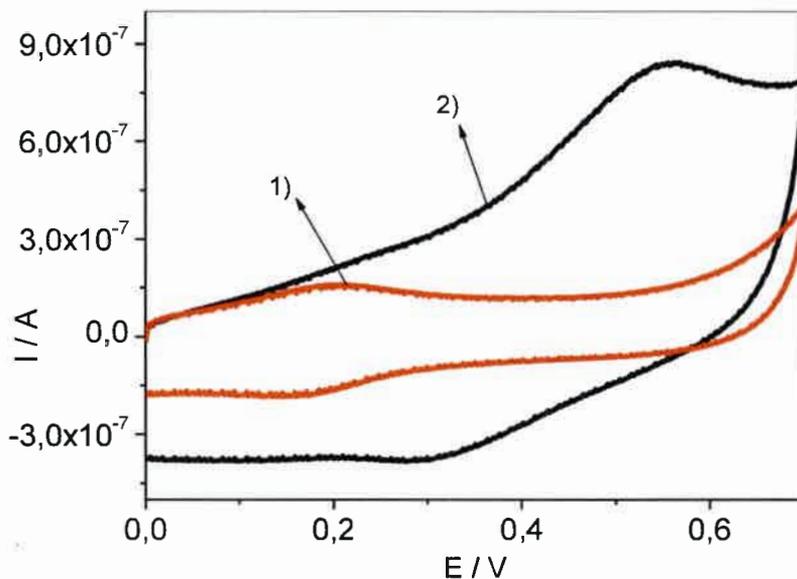


FIGURA 4.13. Voltamperogramas cíclicos del blanco (1) y de la solución de OTA (2) sobre el electrodo de oro modificado con el 4-amino-tiofenol. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Si bien sobre este electrodo modificado la señal de OTA está mejor definida que sobre los electrodos modificados con los tioles anteriores, la cuasi-reversibilidad sigue siendo mayor sobre el electrodo de oro desnudo que sobre aquel modificado con el 4-amino-tiofenol.

4.1.2.6. Electrodos de oro modificados con 2-amino-etanotiol (cisteamina)

4.1.2.6.1. Estudios realizados con voltamperometría cíclica

En la Figura 4.14 se muestran los voltamperogramas cíclicos de OTA sobre el electrodo de oro desnudo y modificado con 2-amino-etanotiol o cisteamina.

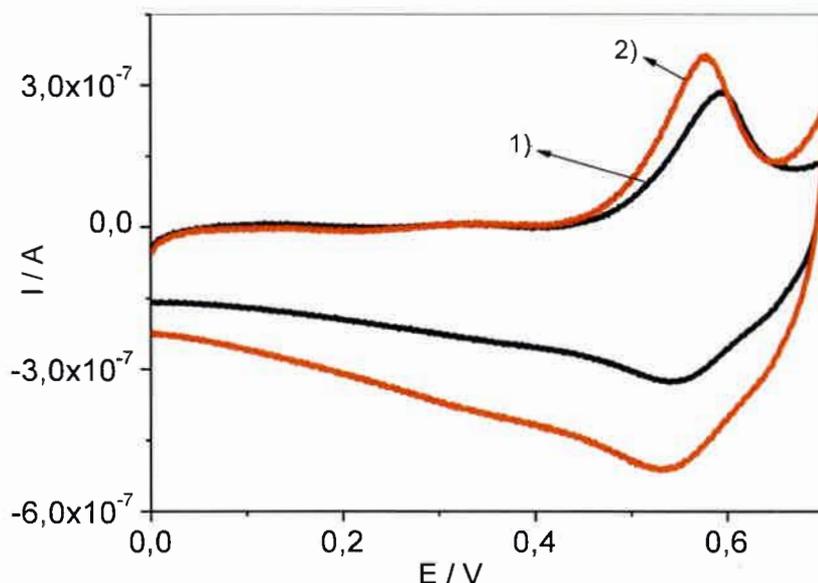


FIGURA 4.14. Voltamperogramas cíclicos de OTA sobre el electrodo de oro desnudo (1) y modificado por la cisteamina (2). Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 7,0. $c_{OTA}^* = 2,48 \times 10^{-4} M$. $v = 25 mV s^{-1}$.

Como se puede observar, la modificación del electrodo de oro con este tiol produce un corrimiento de ≈ 20 mV en la dirección menos anódica del pico de oxidación, como así también una mayor cuasi-reversibilidad en la definición del pre-pico de oxidación de OTA. Los gráficos de $I_{p,a}$ vs v fueron lineales, con una sensibilidad cuatro veces mayor que la obtenida con el electrodo de oro desnudo.

En la Figura 4.15 se muestran los voltamperogramas cíclicos del pre-pico de oxidación de OTA sobre el electrodo de oro modificado con la cisteamina a tres valores de pH. Como se observa en dicha Figura, el pre-pico cuasi reversible presenta a pH 4,0 un corrimiento de ≈ 80 mV en la dirección menos anódica respecto del observado a pH 7,0, como así también un incremento en la corriente de pico anódica de $\approx 1,2$, de modo que el valor de pH 4 fue el que se eligió para realizar los estudios posteriores. Se debe notar también la pobre definición del pre-pico a pH 8, lo que concuerda con lo observado previamente en nuestro laboratorio cuando la oxidación de OTA se estudió sobre electrodos de carbono vítreo [95].

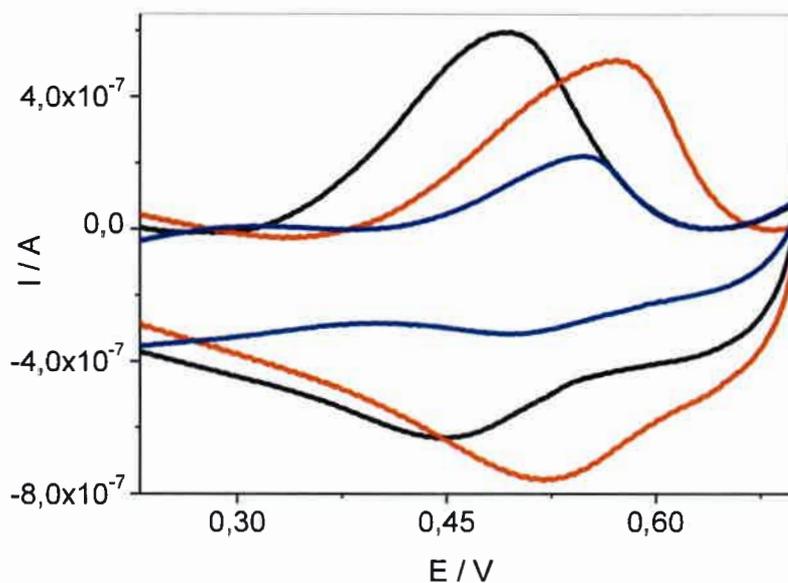


FIGURA 4.15. Voltamperogramas cíclicos del pre-pico de oxidación de OTA a distintos valores de pH sobre el electrodo de oro modificado con la cisteamina. pH 4 (●); pH 7 (●); pH 8 (●). Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 4.14.

En la Figura 4.16 se muestran los voltamperogramas cíclicos a pH 4 del pre-pico de oxidación de OTA sobre el electrodo de oro desnudo y modificado por la cisteamina, donde se puede observar un corrimiento de ≈ 60 mV del potencial de pico en la dirección menos anódica y un incremento en la corriente de $\approx 1,6$ veces sobre el electrodo modificado respecto del oro desnudo.

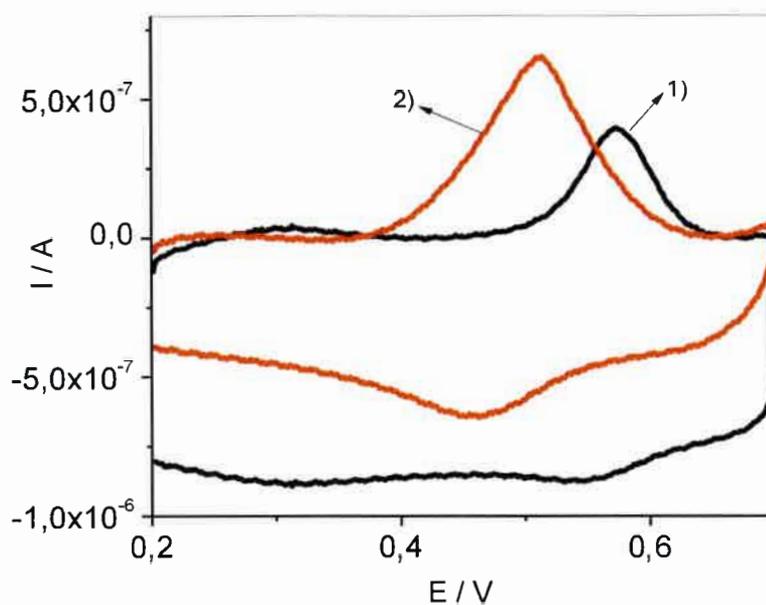


FIGURA 4.16. Voltamperogramas cíclicos del pre-pico de oxidación de OTA sobre 1) electrodo de oro desnudo y 2) modificado con la cisteamina. Solución de blanco: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0. $c_{OTA}^* = 3,10 \times 10^{-5} \text{ M}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

4.1.2.6.2. Estudios realizados con voltamperometría de onda cuadrada

En la Figura 4.17 se muestran los tres registros de corrientes que se obtienen en un experimento de VOC, donde se puede observar la naturaleza cuasi-reversible de la cupla redox superficial [183,184].

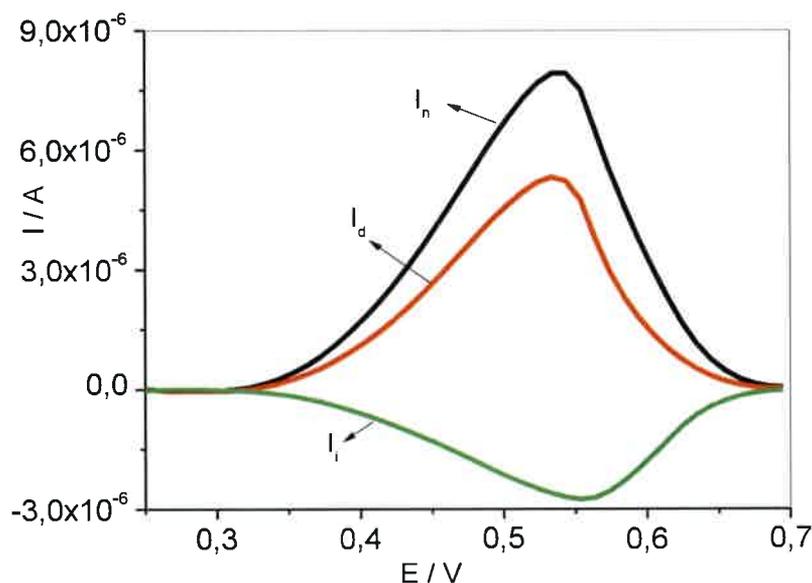


FIGURA 4.17. Registros de las corrientes directa (I_d), inversa (I_i) y neta (I_n) de un voltamperograma de OC del pre-pico de oxidación de OTA sobre el electrodo de oro modificado con la cisteamina. $c_{OTA}^* = 6,20 \times 10^{-6}$ M. $\Delta E_{OC} = 50$ mV; $\Delta E_e = 10$ mV y $f = 10$ Hz.

Los voltamperogramas de OC de las cuplas redox superficiales cuasi-reversibles donde ambos, el reactivo y el producto de la reacción están fuertemente adsorbidos sobre la superficie del electrodo, son altamente sensibles a la cinética de la transferencia de carga [185,186].

Ellos están caracterizados por el así llamado “máximo cuasi-reversible”, donde la relación entre la corriente de pico neta y la frecuencia es una función parabólica del parámetro cinético, $\kappa = k_s/f$ (siendo k_s la constante de velocidad formal), y caracterizado por el fenómeno del “desdoblamiento del pico voltamperométrico neto” con la amplitud de la OC [183,187].

De acuerdo a la teoría, el máximo de esta función parabólica y el desdoblamiento del pico voltamperométrico pueden ser usados para calcular k_s , el coeficiente de transferencia anódico ($1-\alpha$) y el potencial formal de la cupla redox inmovilizada sobre la superficie del electrodo [183-187]. Así, la combinación de los

métodos del “máximo cuasi-reversible” y del “desdoblamiento del pico de OC” pueden ser empleados para realizar una caracterización termodinámica y cinética completa de la cupla redox superficial.

En la Figura 4.18 se muestra un gráfico de $I_{p,n} f^{-1}$ vs f , donde se puede observar la presencia del máximo cuasi-reversible, el cual aparece a una frecuencia vinculada directamente a la k_s de la reacción redox [186,188]. Se ha demostrado que, en la región del máximo, la curva puede ser aproximada por una parábola y ha sido deducido que si $(I_{p,n} f^{-1}) = (I_{p,n} f^{-1})_{max}$, luego $f_{max} = k_s/k_{max}$ [188]. Así:

$$k_s = k_{max} f_{max} \tag{4.2}$$

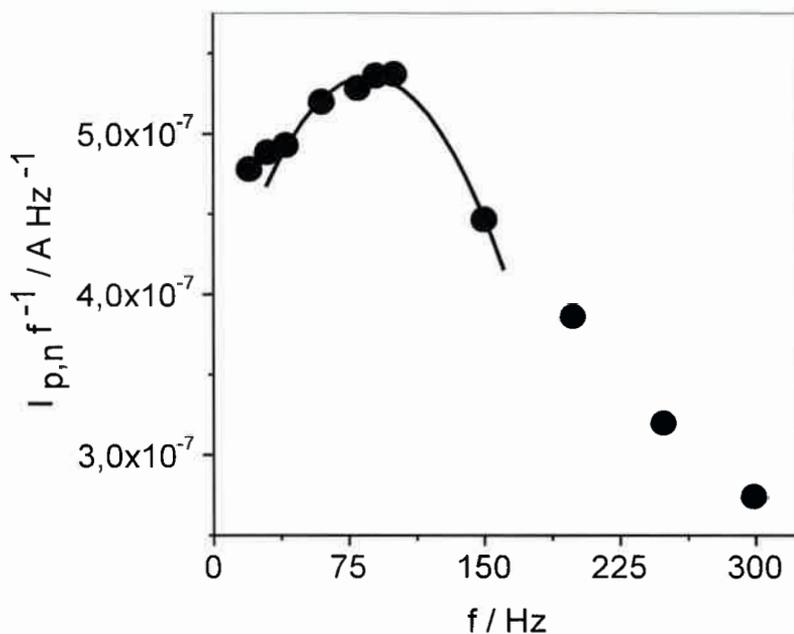


FIGURA 4.18. Gráficos de la relación entre la corriente de pico neta y la frecuencia en función de la frecuencia. Medio de reacción: 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0. $c_{OTA}^* = 6,20 \times 10^{-6} M$. $\Delta E_{OC} = 50 mV$; $\Delta E_e = 10 mV$.

La frecuencia máxima promedio obtenida para dos determinaciones experimentales fue de $f_{max} = (91 \pm 7)$ Hz. Dado que k_{max} depende de $(1-\alpha)$ y de $n\Delta E_{OC}$, pero es independiente de $n\Delta E_e$ y de la cantidad inicial del reactivo adsorbido y,

considerando que todavía no se conoce el valor de $(1-\alpha)$, se puede obtener un valor preliminar de k_s , empleando el valor de κ_{\max} de la Tabla 2 de la Ref.184. En ésta están tabulados los valores de κ_{\max} válidos para valores de $(1-\alpha)$ comprendidos entre 0,1 y 0,9, siendo, para nuestras condiciones experimentales, el valor del parámetro cinético crítico, $\kappa_{\max} = 1,02$, de donde un valor de $k_s = 93 \text{ s}^{-1}$ pudo ser calculado de la ec. (4.2).

Por otro lado, la teoría predice que la corriente del pico neto en VOC tiende a desdoblarse en dos picos y la altura de los mismos se aproxima a cero a medida que la velocidad de la reacción aumenta [187]. Experimentalmente, este comportamiento puede ser observado tanto disminuyendo la f de la OC o aumentando su amplitud [187]. Sin embargo, los cambios en la forma del pico voltamperométrico, el cual lleva información cinética, pueden ser más efectivamente producidos variando la amplitud de la OC más que variando la frecuencia [187].

Así, se realizó un conjunto de experimentos de VOC donde se varió ΔE_{OC} a una dada f y a una dada c_{OTA}^* (Figura 4.19).

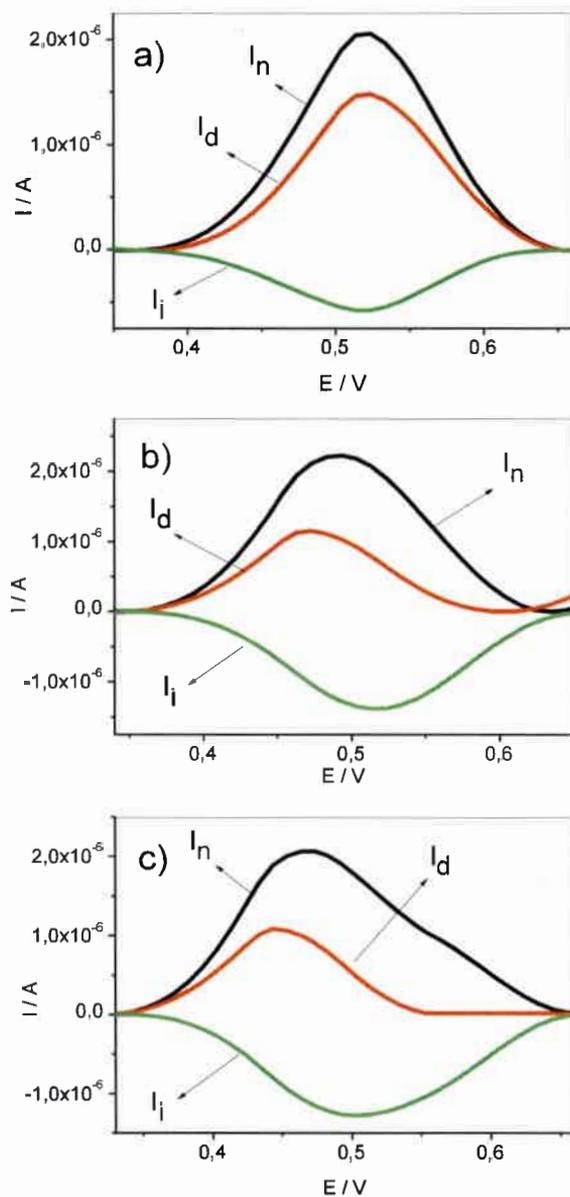


FIGURA 4.19. Registros de las corrientes neta (I_n), directa (I_d) e inversa (I_i) de voltamperogramas de OC de la cupla redox superficial en 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0. $c_{OTA}^* = 6,20 \times 10^{-6} M$. $f = 10 \text{ Hz}$, $\Delta E_e = 10 \text{ mV}$ y $\Delta E_{OC} =$ a) 25 mV; b) 75 mV y c) 100 mV.

Como se predice teóricamente, se observan cambios en las formas de los voltamperogramas de OC a medida que ΔE_{OC} aumenta a una dada f [95,187]. Para pequeños valores de ΔE_{OC} (por ejemplo: 25 mV, Figura 4.19a), se observa un pico

neto simple bien definido. Sin embargo, el pico neto tiende a ensancharse y a desdoblarse a medida que aumenta ΔE_{OC} (comparar Figuras 4.19 b y c con Figura 4.19a).

El potencial formal, E_f^o , de la cupla redox superficial se puede estimar como la semi-suma de los potenciales de pico anódico ($E_{p,a}$) y catódico ($E_{p,c}$) a una dada frecuencia, considerando que los dos picos están simétricamente localizados alrededor del potencial formal de la cupla redox superficial [187]. Por otro lado, se ha informado en la literatura que la influencia de $(1-\alpha)$ sobre la separación de los picos anódicos y catódicos no es significativa [189]. Sin embargo, la forma de la respuesta de OC neta para cuplas redox adsorbidas está influenciada por el coeficiente de transferencia de carga [187,189]. Para valores de $(1-\alpha) > 0,2$, la relación entre las corrientes de pico anódica ($I_{p,a}$) e catódica ($I_{p,c}$) pueden ser aproximadas por una curva exponencial [189]:

$$|I_{p,a}/I_{p,c}| = 5,6414 \exp[-3,4606(1-\alpha)] \quad (4.3)$$

Los valores de $E_{p,a}$, $E_{p,c}$, E_f^o , $I_{p,a}$, $I_{p,c}$, la relación $|I_{p,a}/I_{p,c}|$ y los valores de $(1-\alpha)$ obtenidos a dos f distintas y distintos valores de ΔE_{OC} se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Potenciales de pico anódico ($E_{p,a}$) y catódico ($E_{p,c}$), corrientes de pico anódica ($I_{p,a}$) y catódica ($I_{p,c}$) para los picos desdoblados, la relación entre la $I_{p,a}$ y $I_{p,c}$, los valores $(1-\alpha)$, como así también los valores promedios del potencial formal, \bar{E}_f , de la relación entre las corrientes de pico anódica y catódica, $(\overline{I_{p,a}/I_{p,c}})$ y del coeficiente de transferencia, $(\overline{1-\alpha})$ para la cupla redox superficial obtenida en 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0 sobre el electrodo de oro modificado con cisteamina.
 $c_{OTA}^* = 6,20 \times 10^5 M$

f / Hz	$\Delta E_{OC} / mV$	$E_{p,a} / V$	$I_{p,a} / \mu A$	$E_{p,c} / V$	$-I_{p,c} / \mu A$	$I_{p,a} / I_{p,c}$	$(1-\alpha)$
10	25	0,52	1,47	0,52	0,58	2,55	0,23
	50	0,50	1,35	0,52	1,17	1,15	0,46
	75	0,47	1,15	0,52	1,35	0,85	0,55
	100	0,45	1,10	0,50	1,27	0,87	0,54
	125	0,42	1,07	0,47	1,04	1,03	0,49
	150	0,39	1,09	0,44	0,83	1,51	0,38
20	25	0,53	1,78	0,53	0,82	2,17	0,27
	50	0,51	2,60	0,53	2,10	1,24	0,44
	75	0,49	2,67	0,53	2,70	0,99	0,50
	100	0,46	2,56	0,51	2,42	1,06	0,48
	125	0,43	2,65	0,48	2,10	1,26	0,43
	150	0,41	2,64	0,45	1,70	1,55	0,37

$$(\overline{I_{p,a}/I_{p,c}}) = (1.3 \pm 0.5); \bar{E}_f = (0.48 \pm 0.03) V; (\overline{1-\alpha}) = (0.43 \pm 0.09)$$

Los valores de $(1-\alpha)$ de 0,23 y 0,27 fueron incluidos en el promedio, ya que al aplicar el criterio Q al 90% de confianza [190] se encontró que los mismos no deben ser rechazados.

Como se indica al pie de la Tabla 4.1, los valores promedios del potencial formal de la cupla redox superficial y del coeficiente de transferencia de carga anódico

fueron: $\overline{E}_f^o = (0,48 \pm 0.03) \text{ V}$ y $\overline{(1-\alpha)} = (0,43 \pm 0,09)$, respectivamente.

El valor de k_s se calcula nuevamente combinando los métodos del “máximo cuasi-reversible” y del “desdoblamiento del pico de OC” a través de la ec. (4.2). El valor de $f_{\max} = (91 \pm 7) \text{ Hz}$ fue obtenido del primer método y el valor de κ_{\max} de la Tabla 1 de la Ref.186, que muestra la dependencia del parámetro cinético κ_{\max} con la amplitud normalizada de la onda cuadrada y el coeficiente de transferencia $(1-\alpha)$.

Aceptando $n = 1$ y, considerando que para $n \Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$ y $(1-\alpha) = 0,43$, se obtiene que $\kappa_{\max} = 0,89$. Así, se estimó un valor de $k_s = 81 \text{ s}^{-1}$ para la constante de velocidad formal del proceso redox superficial. Este valor de k_s es algo mayor que el obtenido en nuestro laboratorio cuando la oxidación de OTA se estudió sobre electrodos de carbono vítreo ($k_s = 13 \text{ s}^{-1}$ [95]), aún cuando los valores de $(1-\alpha)$ son prácticamente iguales.

4.2. Determinación de OTA

4.2.1. Determinación indirecta de OTA empleando el reactivo comercial

En la Figura 4.20 se muestran los tres registros de corrientes obtenidos en un experimento de VOC.

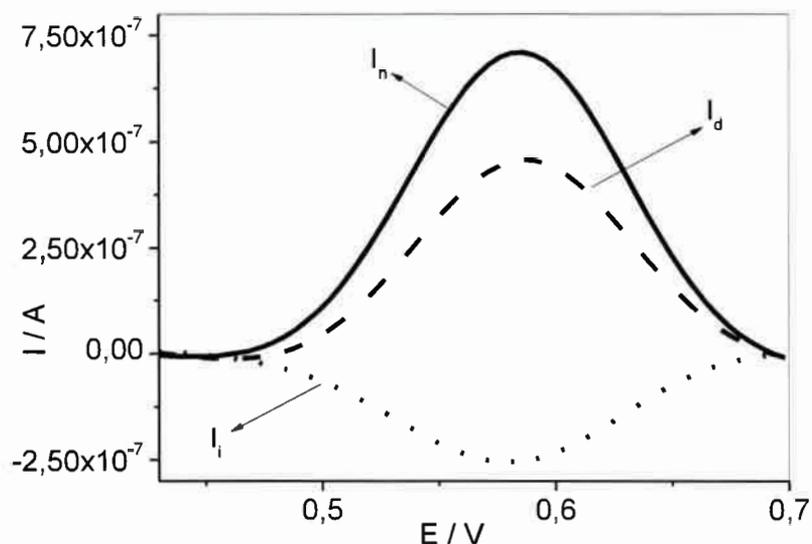


FIGURA 4.20. Registros de las corrientes neta, directa e inversa de un voltamperograma de OC del pre-pico de oxidación de OTA sobre el electrodo de oro modificado con la cisteamina en 20% ACN + 80% solución reguladora de pH 4,0. $c_{OTA}^* = 6,47 \times 10^{-10}$ M. $f = 10$ Hz, $\Delta E_e = 10$ mV y $\Delta E_{OC} = 50$ mV.

La curva corriente neta-potencial en VOC es la señal analítica más útil [169]. La alta sensibilidad de los métodos de acumulación adsorptiva combinada con la VOC es obviamente la mayor ventaja. Así, la combinación de estos métodos es una herramienta electroanalítica muy valiosa para el análisis de compuestos a niveles de trazas, los cuales son a la vez especies adsorbidas y electroactivas.

La determinación indirecta de OTA fue llevada a cabo en soluciones no agitadas compuestas por 20% ACN + 80% solución reguladora de fosfato de pH 4,0. Los valores de las $I_{p,n}$ de los voltamperogramas de OC registrados a diferentes concentraciones de OTA fueron empleados para construir la correspondiente curva de calibración (Figura 4.21), la que fue lineal en el intervalo de c_{OTA}^* entre $4,67 \times 10^{-11}$ y $1,10 \times 10^{-9}$ M. Seis puntos fueron incluidos en la correlación, cada uno de los cuales fue el replicado de tres medidas experimentales.

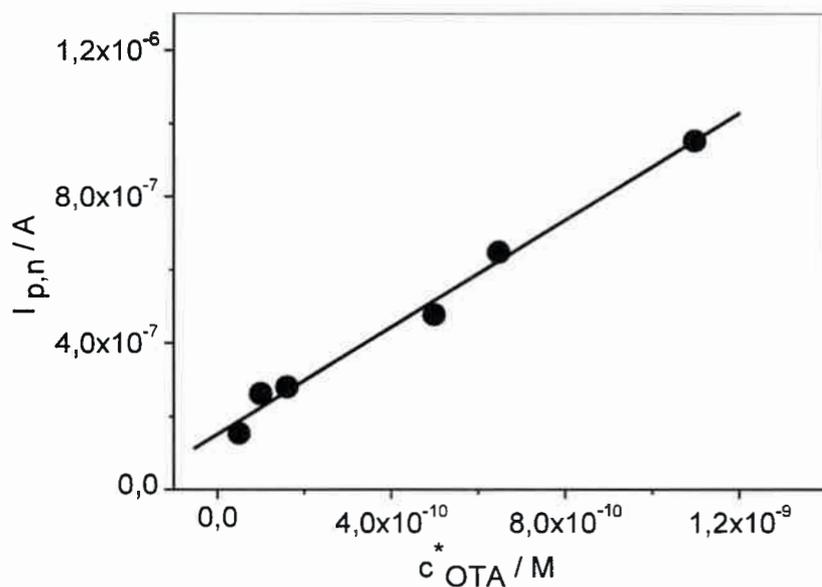


FIGURA 4.21. Curva de calibración. Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la Figura 4.20. Los parámetros de la regresión lineal fueron los siguientes: ordenada = $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-7} A$; pendiente = $(730 \pm 37) A M^{-1}$ y $r = 0,9947$.

La concentración de OTA más baja medida experimentalmente para una relación señal/ruido de 3:1 [191] fue de $5,02 \times 10^{-11} M$, lo que implica un límite de detección (LD) de 0,002 ppb, límite que está muy por debajo de lo permitido por la Comisión Reguladora de la Unión Europea para diferentes productos [17,18].

4.2.2. Comparación del método de extracción

La eficiencia del método de extracción propuesto (L||L), sección 3.7, se comparó con el método oficial [75]. Se prepararon tres muestras por duplicado de vino tinto contaminadas con OTA en diferentes cantidades. Luego se extrajo OTA por la metodología de columnas de inmunoafinidad (IAC) del método oficial y por el método de L||L empleando la polivinilpirrolidona (PVP) como se explicó en la sección 3.7. Se determinó OTA mediante HPLC en los dos grupos de muestras (las extraídas por IAC y por el método propuesto), permitiendo realizar una correlación entre ambos métodos de extracción, representando en el eje de las ordenadas la cantidad de OTA extraída

por el método propuesto y en el eje de las abscisas la cantidad de OTA extraída por el método oficial.

En la Figura 4.22 se muestra la recta de correlación obtenida:

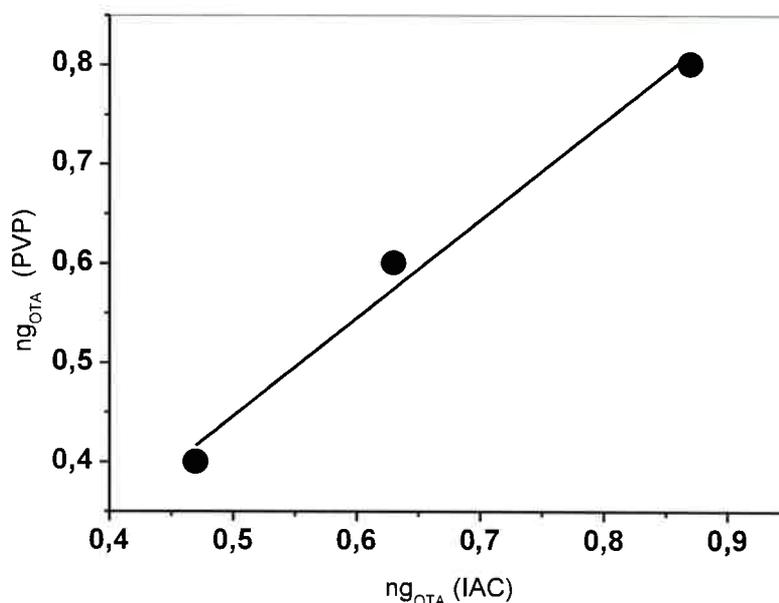


FIGURA 4.22. Los parámetros de la regresión lineal fueron los siguientes: ordenada = $(-0,048 \pm 0,077) \text{ ng mL}^{-1}$; pendiente = $(0,99 \pm 0,11)$ y $r = 0,9934$.

Como $r_{\text{calculada}} > r_{\text{teórica}}$ ($0,9934 > 0,990$), se acepta la hipótesis nula [192] con un riesgo del 1 %, para $\nu = 2$ y $n = 2$ variables, donde ν es el número de grados de libertad y n son las variables de la correlación: $I_{p,n}$ y c_{OTA}^* . Estos resultados demuestran que el método de extracción de OTA en vinos propuesto en esta Tesis es comparable con el método de extracción oficial (IAC).

4.2.3. Determinación indirecta de OTA en matrices reales

La determinación indirecta de OTA en matrices reales se realizó utilizando muestras de vino tinto (Cabernet Sauvignon, Mendoza, año 2008), en las cuales se determinó por el método oficial [75] la ausencia de OTA. Dichas muestras fueron contaminadas “ex profeso” con la micotoxina. Los vinos contienen interferentes,

fundamentalmente los polifenoles que se descargan en la región de potenciales donde lo hace OTA y que, además, pueden pasivar o envenenar las superficies de los electrodos de trabajo [193]. Para eliminar estos efectos de la matriz, se llevó a cabo el procedimiento de extracción comentado en la sección 3.7 y se realizó la curva de calibración (Figura 4.23).

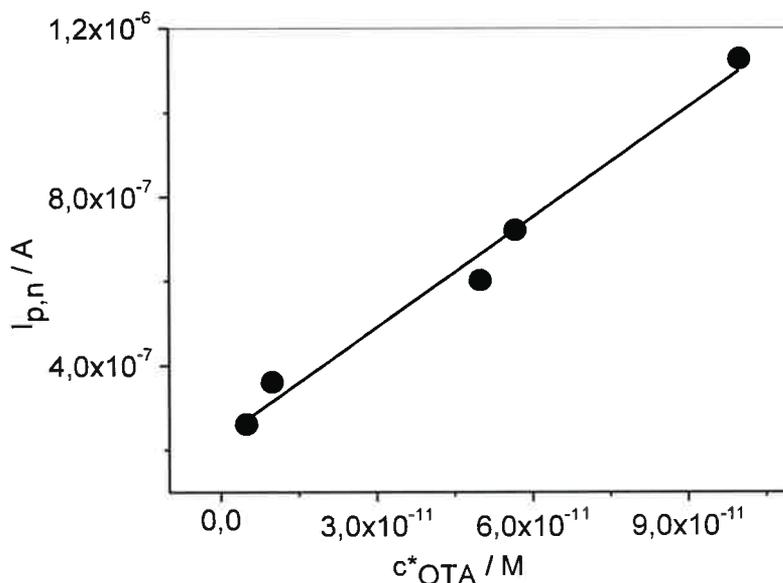


FIGURA 4.23. Curva de calibración correspondiente a los extractos obtenidos a partir de muestras de vino a las que se les había agregado “ex profeso” una determinada concentración de OTA. Los parámetros de la OC fueron los mismos que los indicados en la Figura 4.20.

La curva de calibración fue lineal en un intervalo de 2×10^{-11} M a 1×10^{-9} M (0,008 a 0,4 ppb) con los siguientes parámetros: ordenada = $(2,26 \pm 0,43) \times 10^{-7}$ A; pendiente = (8760 ± 776) A M⁻¹; $r = 0,9923$. La sensibilidad medida de la pendiente de la regresión lineal es notablemente más alta que la obtenida a partir de las muestras del reactivo comercial (sección 4.2.1.), es decir, 8760 ± 776 vs 730 ± 37 , esto se puede deber a una interacción específica de la PVP con la cisteamína que, a su vez, favorecería la interacción de la OTA con la MAE. Este mismo efecto se observó cuando las muestras de reactivo comercial de OTA fueron pre-tratadas por el método de la doble partición

El LD fue de 0,004 ppb y el límite de cuantificación (LQ) de 0,012 ppb. El coeficiente de correlación lineal, $r = 0,9922$, es mayor que el que corresponde teóricamente para $\nu = 2$ y $n = 2$ variables, con un 1% de riesgo, por lo que se acepta la hipótesis nula.

4.2.3.1. Exactitud del método

4.2.3.1.1. Ensayos de recuperación

A fin de evaluar la exactitud del método electroanalítico aquí propuesto, se realizaron ensayos de recuperación a partir de muestras de vinos enriquecidas con OTA por el método de las adiciones estándar. Se emplearon 4 niveles de OTA: 0,02-0,2-2,0-5,0 ppb (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Ensayos de recuperación.

Nivel de OTA agregado / $\mu\text{g L}^{-1}$	^e c_{OTA}^* / $\mu\text{g L}^{-1}$	Adición estándar / $\mu\text{g L}^{-1}$	% Rec	^f % VC
^a 0,020	0,029	0,0982	145	27,2
		0,192		
		0,385		
^b 0,20	0,26	0,444	130	31,4
		0,840		
		1,23		
^c 2,00	1,88	0,982	94	11,5
		2,02		
		4,08		
^d 4,95	4,85	3,31	98	43,5
		6,26		
		13,8		

a) pendiente = $(3776 \pm 83) \text{ A M}^{-1}$ ($r = 0,9995$)

b) pendiente = $(717 \pm 47) \text{ A M}^{-1}$ ($r = 0,9957$)

c) pendiente = $(603 \pm 31) \text{ A M}^{-1}$ ($r = 0,9974$)

d) pendiente = $(183 \pm 29) \text{ A M}^{-1}$ ($r = 0,9764$)

e) c_{OTA}^* la concentración de OTA detectada

f) %CV (coeficiente de variación) calculado como $\%CV = \frac{s_x}{x} \times 100$;

$s_x = \frac{x}{m} \left[\frac{s_{y_r}^2 + s_b^2}{x^2} + (s_m)^2 \right]^{1/2}$ donde s_x es la desviación estándar de los datos, s_{y_r} , s_b y s_m son

las desviaciones estándar del coeficiente de correlación, de la ordenada, y de la pendiente de la curva de calibración, respectivamente.

La columna de las adiciones estándar (columna 3 en Tabla 4.2.) muestra tres niveles de concentración de OTA usadas para realizar el método de las adiciones estándar a cada nivel de concentración de OTA seleccionado (columna 1 en Tabla 4.2.). Los parámetros de la regresión lineal obtenidos para cada concentración de OTA analizada se indican al pie de la Tabla 4.2 (a), b), c), y d), respectivamente para niveles de OTA agregados de 0,020 (a); 0,20 (b); 2,00 (c) y 4,95 (d) $\mu\text{g L}^{-1}$).

De las recuperaciones individuales se determinó la recuperación promedio como:

$$\bar{R} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} R_i = 116,75\% \quad (4.4)$$

con $n = 4$. Si s_R (desviación estándar de la recuperación) se define como:

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (R_i - \bar{R})^2}{(n-1)}} \quad (4.5)$$

se puede calcular la t de distribución como [194]:

$$t = \frac{\bar{R} - 100}{s_R} \sqrt{n} = 1,32 \quad (4.6)$$

mientras que el valor teórico de $t_{2;0,05} = 4,303$, nos permite concluir que se cumple el test de la hipótesis nula (100% de recuperación).

Por otro lado, los coeficientes de variación están dentro de los valores esperados por la "trompeta de Horwitz [194] a niveles de concentraciones del orden de ppb. El valor anómalo de 43,5% al nivel de 4,95 ppb se puede atribuir a la saturación de los sitios de adsorción, lo cual se relaciona a la baja sensibilidad de la cuantificación de OTA a este nivel.

4.2.3.1.2. Línea de identidad

A fin de aplicar otro criterio de exactitud, también se determinó la cantidad de OTA en las mismas muestras de vino tinto (sección 4.2.3.1.1.) por el método oficial.

Las concentraciones determinadas por el método electroanalítico se representaron gráficamente en función de aquellas obtenidas por el método oficial. Los valores determinados siguen una correlación lineal cuya pendiente es $0,89 \pm 0,04$, una ordenada de $(0,04 \pm 0,04) \text{ ng mL}^{-1}$ y un $r = 0,9991$.

Mientras que el test t es frecuentemente usado como criterio de diagnóstico para verificar si se cumple la hipótesis nula de la pendiente y la ordenada al origen, la correlación entre ambas no debe ser ignorada [195]. Por lo tanto, el procedimiento correcto debe considerar el intervalo de confianza conjunta entre la pendiente y la ordenada al origen [196]. Este intervalo es una región en el plano de las dos variables (pendiente y ordenada al origen) que tiene forma elíptica. Por este motivo, la prueba estadística correcta consiste en investigar si los puntos ideales ($m_0 = 1$, $b_0 = 0$) están contenidos en la región elíptica de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada al origen. La prueba se conoce como EJCR (por Elliptical Joint Confidence Region). Específicamente, la región elíptica está descrita por la siguiente ecuación [195]:

$$n(b - b_0)^2 + 2(\sum x_i)(b - b_0)(m - m_0) + (\sum x_i^2)(m - m_0)^2 = 2s_r^2 F_{2,\gamma,0,95} \quad (4.7)$$

donde b y m son las variables que corresponden a las dos dimensiones del plano en que se representa la región elíptica. F es el estadístico de Snedecor-Fischer e γ es el número de grados de libertad.

Por un gráfico bidimensional se observó que los puntos ideales (1,0) están contenidos en la elipse, por lo que el método analizado es exacto desde el punto de vista estadístico.

4.3. Magneto inmunosensor electroquímico para la determinación de OTA

El formato del inmunoensayo que se usó para la determinación de OTA es el de ELISA de modulación (competitivo) directo, basado en dos etapas fundamentales:

- 1) Etapa de inmovilización
- 2) Etapa de transducción

En la primera etapa se utilizó como superficie de inmovilización una suspensión de esferas magnéticas modificadas con proteínas G. A esta suspensión se le agregó cierta cantidad de AcmOTA. Las proteínas G tienen alta capacidad de unión al fragmento C (Fc) de los anticuerpos (ver sección 3.3.3.). Después de esta etapa de unión, se lavaron las esferas para eliminar todo lo que no se unió y se agregó OTA y OTA conjugada a diferentes enzimas (OTA-HRP y OTA-FAL) las cuales compitieron por sitios de unión al anticuerpo (fragmento Fab, Figura 1.7). Después de esta etapa

de competencia, se lavaron las esferas con solución amortiguadora adecuada y se re-suspendieron las esferas magnéticas en un pequeño volumen del sustrato enzimático correspondiente (aproximadamente 20 μL). Una vez re-suspendidas, se transfirió la suspensión al electrodo de trabajo para seguir con la etapa de transducción.

Se empleó como técnica electroanalítica para la determinación de OTA conjugada a la enzima la VOC. La respuesta fué directamente proporcional a la cantidad de OTA marcada con la enzima e inversamente proporcional a la cantidad de OTA de interés, lo que implica que se obtiene una menor señal analítica a medida que mayor sea la concentración de OTA en la muestra.

Diferentes parámetros fueron optimizados con el objetivo de incrementar la performance del inmunosensor. Estos parámetros se relacionan con la obtención del factor de dilución de AcmOTA y de los conjugados OTA-enzima, activación y reproducibilidad de los ELI, cantidad de EM, y volumen y concentración del mediador redox y sustrato enzimático.

4.3.1. Estudio de la determinación del factor de dilución de AcmOTA y de los conjugados OTA-enzima

4.3.1.1. Estudio con el conjugado OTA-FAL

En la Figura 4.24 se muestran las medidas de absorbancia obtenidas cuando se conjugó OTA con FAL mediante la vía de la carbodiimida.

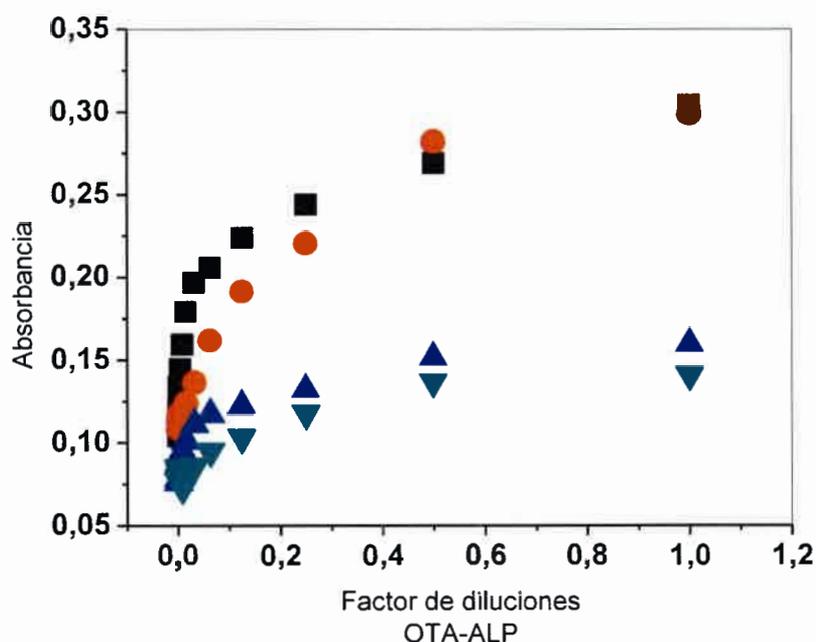


FIGURA 4.24. Variación de la absorbancia con el factor de dilución de OTA-FAL y con diferentes diluciones del AcmOTA: (■) AcmOTA 1/500; (●) AcmOTA 1/1000; (▲) AcmOTA 1/2000 y (▼) AcmOTA 1/5000.

De la Figura 4.24 se puede observar que a medida que disminuye el factor de dilución de los AcmOTA, la absorbancia aumenta. No obstante, la absorbancia no varió cuando se utilizaron diluciones 1/500 y 1/1000. Por otro lado, a partir del factor de dilución 1/2 del conjugado OTA-FAL la absorbancia, que es máxima, no varía. Por lo tanto, se utilizaron diluciones 1/1000 del AcmOTA y diluciones del conjugado OTA-FAL que arroje una señal del 50 % de la señal máxima (dilución 1/16), que es lo establecido para este tipo de ensayo, a fin de lograr una competencia para un amplio intervalo de concentración de antígeno (OTA en este caso) para el desarrollo del inmunosensor electroquímico.

Cuando se intentó conjugar OTA con FAL mediante las vías de la carbonildiimidazol y formaldehído se obtuvieron resultados de absorbancias cercanos a cero, por lo que se dedujo que no se logró la conjugación de la micotoxina con la enzima.

4.3.1.2. Estudio con el conjugado OTA-HRP

En la Figura 4.25 se muestran las medidas de absorbancia obtenidas cuando se conjugó OTA con HRP mediante la vía de la carbodiimida.

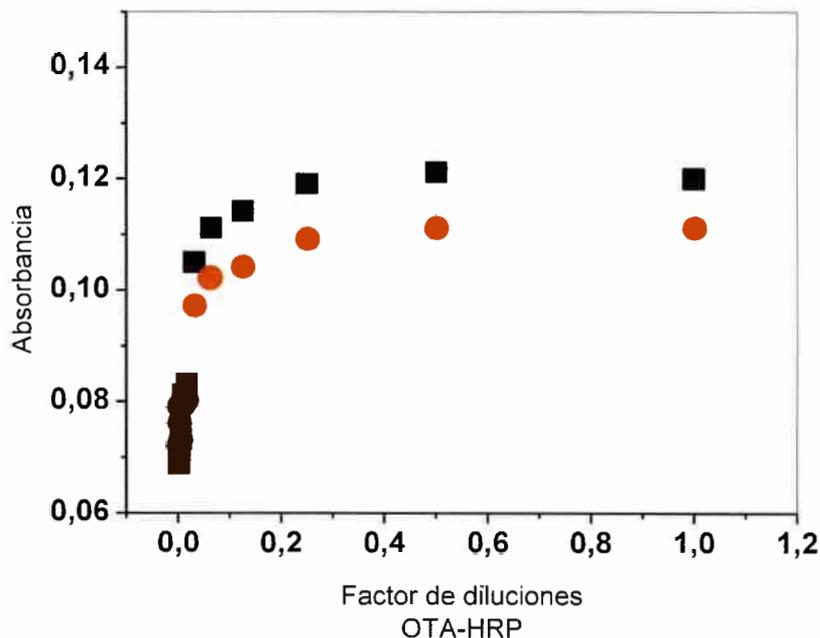


FIGURA 4.25. Variación de la absorbancia con el factor de dilución de OTA-HRP y con diferentes diluciones del AcmOTA: (■) AcmOTA 1/1000; (●) AcmOTA 1/2000.

En la Figura 4.25 se puede observar que, para las dos diluciones del AcmOTA, a partir del factor de dilución del conjugado OTA-HRP de 1/4, la absorbancia que es máxima no varió significativamente. En cuanto a la dilución del AcmOTA, igual que en el caso anterior, se observa que la absorbancia aumenta a medida que disminuye la dilución del AcmOTA. Por lo tanto, las diluciones del conjugado OTA-HRP que arroje una señal del 50 % de la señal máxima (dilución 1/64) y las diluciones de 1/1000 del AcmOTA son las que se utilizaron para el desarrollo del inmunosensor electroquímico. Experiencias con otras diluciones del AcmOTA (1/500, 1/5000) no arrojaron resultados favorables.

Cuando se intentó conjugar OTA con HRP mediante las vías de la carbonildiimidazol y formaldehído se obtuvieron resultados de absorbancias cercanos

a cero, por lo que se dedujo que no se logró la conjugación de la micotoxina con la enzima.

4.3.2. Optimización del ELI

Para remover las tintas orgánicas constituyentes o contaminantes de los ELI y aumentar la rugosidad superficial y activación de grupos funcionales [173,174] se aplicó un pre-tratamiento al ELI. Los voltamperogramas cíclicos obtenidos para el ELI para una solución 1 mM de H_2Q en SACF pH 5, después de la activación electroquímica mediante el método de Anjo, mostró una mejor definición de la cupla redox de H_2Q , comparada con los voltamperogramas cíclicos obtenidos con los ELI sin pre-tratamiento previo (Figura 4.26).

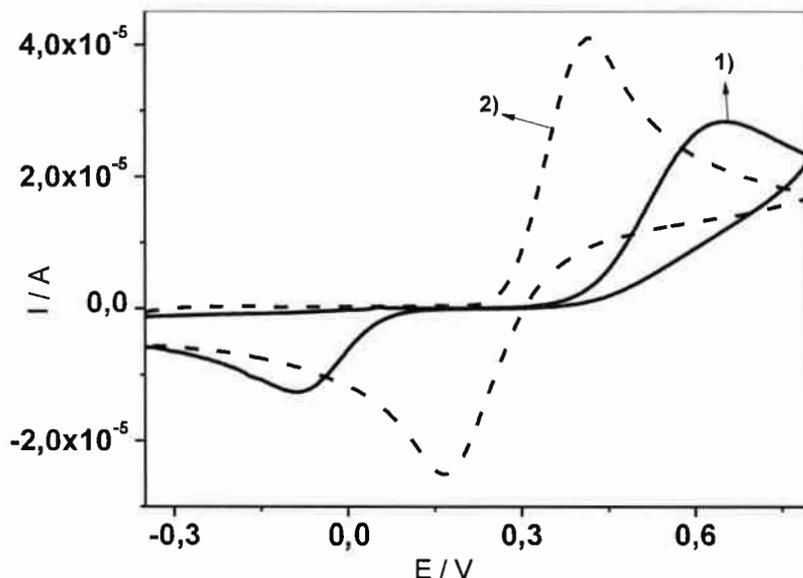


FIGURA 4.26. Voltamperogramas cíclicos del pirocatecol sobre ELI en una solución 1 mM de H_2Q en SACF. 1) (línea continua) antes de la activación y 2) (línea discontinua) después de la activación. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

El voltamperograma cíclico obtenido luego de la activación del ELI, muestra un pico anódico bien definido ($E_{p,a} = 0,364 \text{ V}$) y su correspondiente pico catódico ($E_{p,c} =$

0,165 V). Como es bien conocido, la oxidación de H_2Q a Q y la reducción de Q a H_2Q es un proceso redox cuasi reversible de $2 e^-$ [197].

Por otro lado, después de la activación, se realizó un ensayo de reproducibilidad usando 5 ELI diferentes. Estos ensayos fueron realizados mediante VOC en una solución 1 mM de H_2Q . El coeficiente de variación porcentual (CV) fue determinado mediante la corriente de pico neto ($I_{p,n}$) obtenido para cada uno de los ELI, dando un valor de $CV = 7,62\%$, el cual indica una buena reproducibilidad de los electrodos luego de su activación. En cuanto a la $I_{p,n}$, esta aumentó 1,5 veces después de haber activado los ELI mediante el método de Anjo.

4.3.3. Estudio de la variación de masa de las esferas magnéticas

Un estudio de la masa de EM, las cuales actúan como soporte para la reacción de afinidad, fue realizado utilizando las concentraciones optimizadas mediante los ensayos ELISA (sección 4.3.1.2.) de AcmOTA (1/1000) y OTA-HRP (1/64). La variación de masa de EM fue estudiada en un intervalo de 15 - 120 μg , lo que corresponde a una solución de EM de 0,5 - 4,0 μL (Figura 4.27).

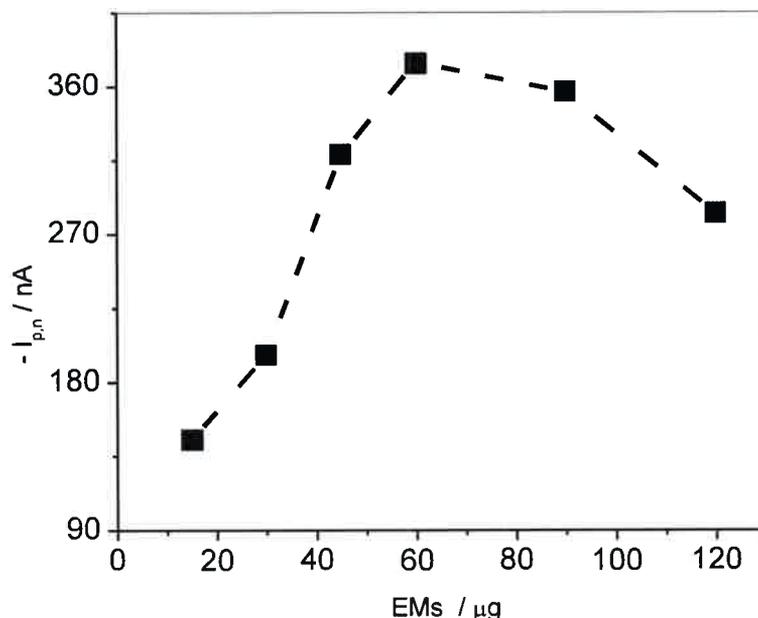


FIGURA 4.27. Efecto de la variación de la masa de las EM sobre la respuesta en corriente. Los factores de dilución de OTA-HRP y AcmOTA fueron 1/64 y 1/1000, respectivamente.

Esta figura muestra que un incremento en la cantidad de EM produce un incremento en la corriente de pico neta ($I_{p,n}$), registrando un máximo a un valor cercano a los 60 μg de EM. Cantidades mayores a los 60 μg produce una disminución continua de la $I_{p,n}$. Esto puede deberse a que a cantidades menores a los 60 μg , las EM forman dispersiones homogéneas, no ocurriendo lo mismo con cantidades mayores a los 60 μg de EM, lo que desfavorecería la interacción entre los AcmOTA y la EM. Por esta razón, se eligió para todos los experimentos una cantidad de 54 μg (1,8 μL) de EM.

4.3.4. Optimización del volumen y concentración del sustrato enzimático y mediador redox

La ventana de potencial usada en VOC fue de 0,500 a 0,000 V debido a que después de la reacción enzimática, la $I_{p,n}$ para la reducción de Q tiene dos contribuciones, una es debida a la reducción de Q generada enzimáticamente y la otra contribución se debe a la reducción de Q generada electroquímicamente en el potencial inicial de los voltamperogramas (0,500 V) (Figura 4.28).

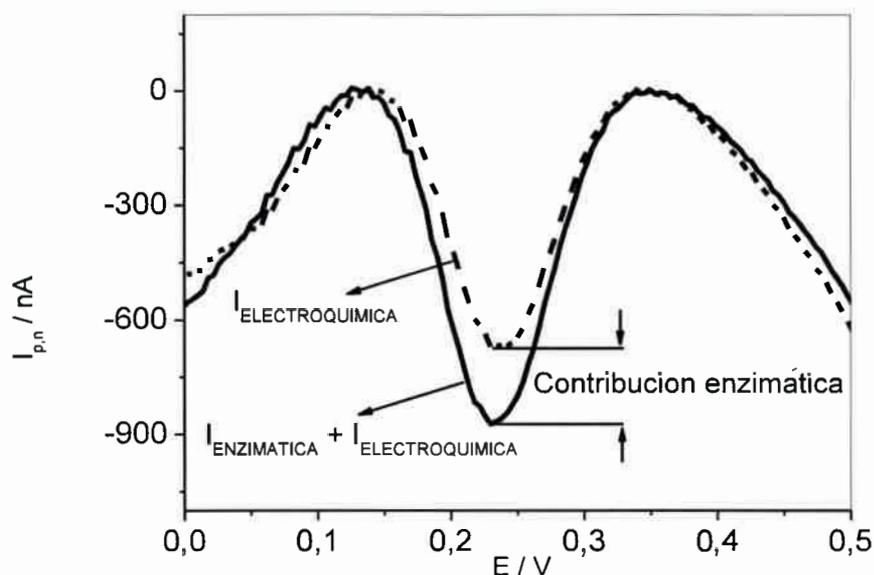


FIGURA 4.28. VOC de una solución $100 \mu M H_2Q$. La línea sólida representa la corriente obtenida para la reducción de la benzoquinona (Q), producida tanto por el producto enzimático como por la oxidación electroquímica del pirocatecol (H_2Q). La línea discontinua representa la corriente de reducción de la benzoquinona (Q) generada electroquímicamente.

4.3.4.1. Concentración del sustrato enzimático

Las concentraciones, tanto de H_2Q y de H_2O_2 , se variaron en un intervalo de 10 a $1000 \mu M$ (Figura 4.29).

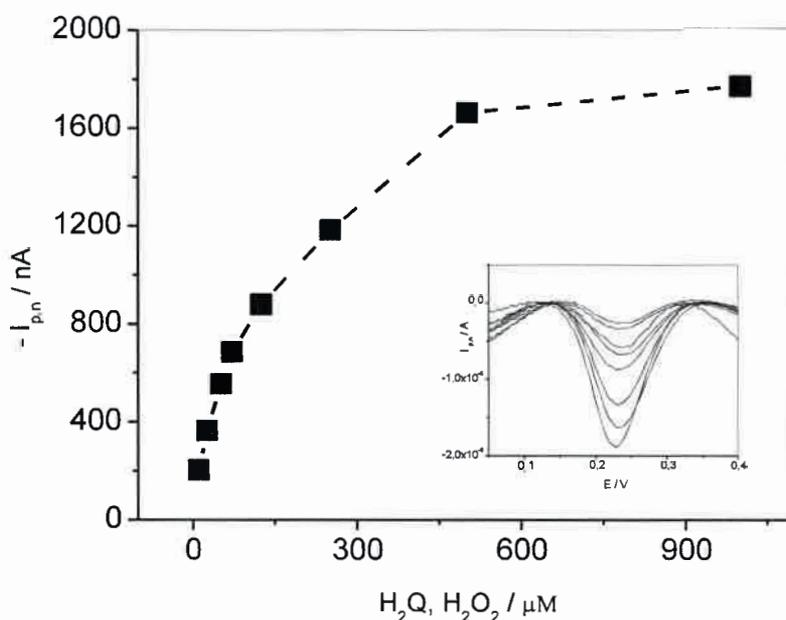


FIGURA 4.29. Variación de la $I_{p,n}$ con la concentración del sustrato enzimático (H_2O_2) y mediador redox (H_2Q). En el inserto se muestran los voltamperogramas de onda cuadrada correspondientes a cada punto de la figura.

A medida que la concentración de H_2Q aumenta, la corriente de reducción aumenta debido a que generó una mayor cantidad de Q electroquímicamente, siendo la contribución enzimática despreciable. Por otro lado, teniendo en cuenta que altas concentraciones de H_2Q_2 pueden desnaturalizar la HRP [198], se eligieron concentraciones de 10 μM tanto de H_2Q como de H_2Q_2 para las experiencias. Estas concentraciones nos permitieron obtener muy buenas respuestas de corriente y altas relaciones de corriente (ver Figura 4.28):

4.3.4.2. Volúmen del sustrato enzimático

Se realizaron estudios de variaciones de los volúmenes de las soluciones de H_2Q y de H_2Q_2 que se agregaron al ELI. El intervalo de volúmenes estudiado fue de 20 a 100 μL . A medida que el volumen se disminuye aumenta la $I_{p,n}$, debido a un incremento en la concentración de Q producido enzimáticamente (Figura 4.30).

El volumen elegido para las siguientes experiencias fue de 20 μL . No se emplearon volúmenes menores a este, ya que se corre el riesgo de no cubrir la superficie de los tres electrodos del ELI.

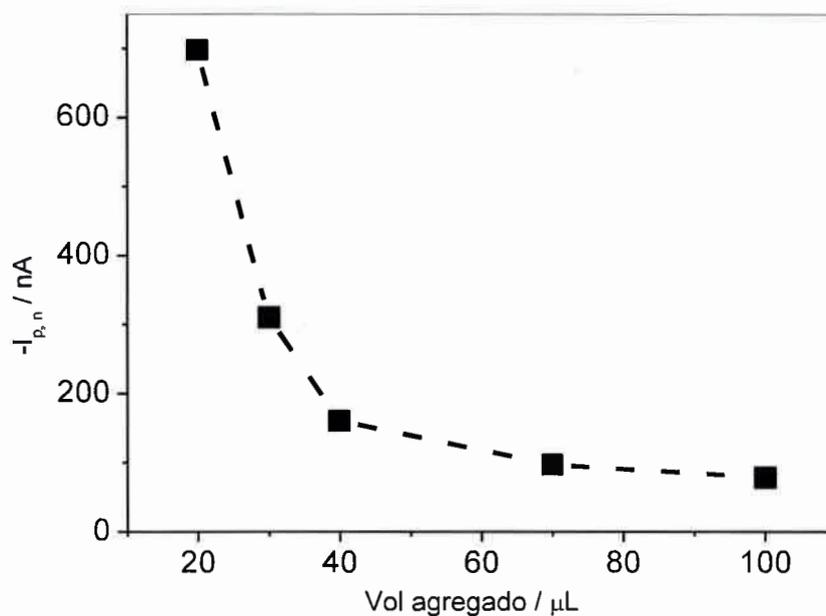


FIGURA 4.30. Estudio de las variaciones del volumen del sustrato enzimático en el inmunosensor desarrollado.

4.3.5. Detección directa de OTA en muestras de vino tinto

Las muestras de vino tinto libres de OTA (comprobado mediante estudios cromatográficos) fueron enriquecidas con OTA para generar la curva de calibración. Por otro lado, se agregaron a las mismas muestras de vino OTA-HRP hasta obtener un factor de dilución de 1/64. Primero, las muestras de vino fueron analizadas con el inmunosensor desarrollado sin la inmovilización de AcmOTA sobre las EM para observar que no existan adsorciones inespecíficas. Después de la etapa de incubación, se agregó la solución de $\text{H}_2\text{Q} + \text{H}_2\text{O}_2$ y ninguna señal apareció, lo que nos indica la ausencia de adsorciones inespecíficas sobre las EM funcionalizadas. Este hecho es una cualidad muy importante del inmunosensor electroquímico, teniendo en

cuenta que el vino es el fluido de composición más compleja después de la sangre [199]

4.3.5.1. Curva de calibración

Se usó muestra de vino libre de OTA como matriz para la generación de una curva de calibración. El vino fue previamente analizado por el método oficial [75], mostrando la ausencia de OTA. Cada solución para la curva de calibración fue preparada, enriqueciéndolas con diferentes cantidades del reactivo comercial de OTA, hasta obtener las concentraciones deseadas. También, el conjugado OTA-HRP se agregó a cada solución en el factor de dilución optimizado (1/64). Usando los parámetros optimizados, se realizó una curva dosis – respuesta para OTA con las soluciones antes mencionadas en un intervalo de concentración de OTA de 0,01 a 20 ppb (Figura 4.31). La curva de calibración fue construida como el porcentaje de unión (B/B_0) vs el logaritmo de la concentración de OTA ($\log c_{OTA}$). B_0 es la $I_{p,n}$ máxima obtenida sin la competición, y B es la $I_{p,n}$ obtenida para la etapa de competición entre el conjugado (OTA-HRP) y las diferentes concentraciones de OTA libre. La curva de calibración fue ajustada por una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando el software Origin 8, el cual arroja los diferentes parámetros de la ecuación 1.3.

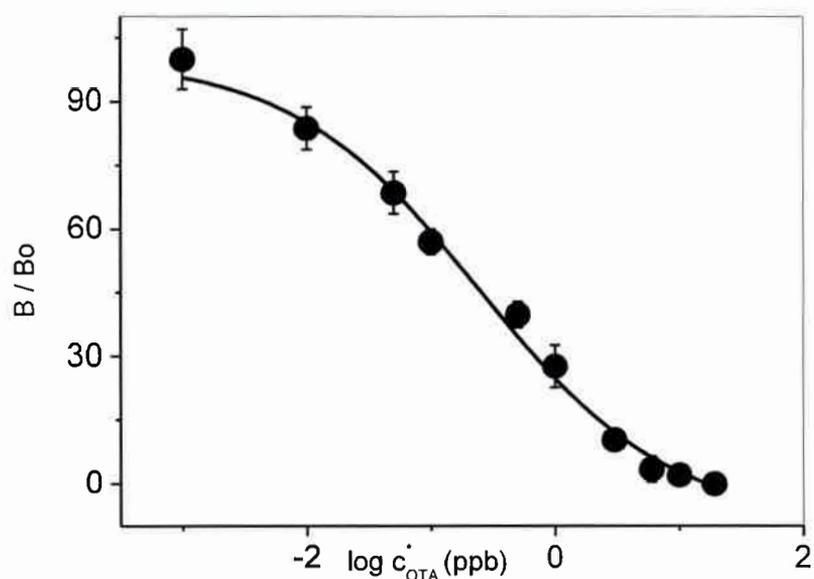


FIGURA 4.31. Curva de calibración de OTA obtenida de los extractos de vino tinto con el inmunosensor electroquímico. B/B_0 es el porcentaje de unión. Los parámetros de la curva fueron los siguientes: $IC_{50} = (0,272 \pm 0,081)$ ppb, "Hill-Slope" = $-(0,45 \pm 0,07)$, con un coeficiente de correlación, $r = 0,9942$. Las medidas amperométricas fueron realizadas a $37^\circ C$ en SACF, conteniendo $10 \mu M$ de H_2O_2 y $10 \mu M$ de H_2Q . Cada punto es un promedio de tres medidas replicadas.

El LD fue de 0,008 ppb y el LQ fue de 0,010 ppb, determinado como la concentración más.baja de la curva de calibración que este sensor puede detectar. El valor del LD es más bajo que el valor fijado por la Comisión Reguladora de la Unión Europea [17,18] lo que nos permite asegurar que este inmunosensor es adecuado para la determinación de OTA en muestras de vino tinto

4.5.5.2. Determinación de OTA por HPLC

A fin de obtener un criterio de la exactitud del inmunosensor electroquímico desarrollado, los resultados de estos estudios fueron comparados con aquellos obtenidos por el método oficial AOAC 2001.01 [75].

Las mismas soluciones estándares usadas para generar la curva de calibración fueron empleadas para llevar a cabo este análisis. La curva obtenida por el método oficial, se puede representar por la siguiente ecuación de regresión lineal:

$$H \text{ (U.A)} = (0,607 \pm 0,156) \text{ [U.A]} + (0,324 \pm 0,024) \text{ [U.A ng}^{-1} \text{ mL]} c_{\text{OTA}}^* \quad (4.8)$$

Donde H es la altura del pico de cromatografía líquida expresada en unidades arbitrarias (U.A), y c_{OTA}^* es la concentración de OTA en ng mL^{-1} (ppb). El coeficiente de regresión lineal fue $r = 0,9892$.

Las concentraciones determinadas por nuestro inmunosensor se representaron vs aquellas obtenidas por el método oficial. Se trazó una línea de identidad con los siguientes parámetros (Figura 4.32): ordenada = $(0,46 \pm 0,22) \text{ ng mL}^{-1}$, pendiente = $(0,95 \pm 0,04)$, coeficiente de regresión lineal, $r = 0,992$.

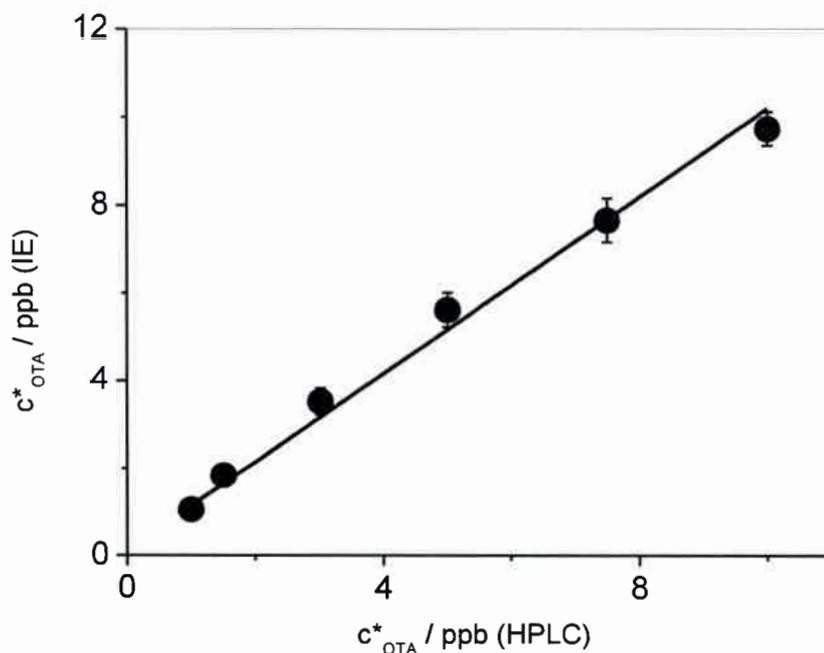


FIGURA 4.32. *Correlación entre los valores de concentración de OTA obtenidos del inmunosensor electroquímico (IE) y aquellos obtenidos por el método oficial.*

4.5.5.3. Test de recuperación

Con el fin de estudiar la performance del inmunosensor desarrollado, se llevó a cabo un test de recuperación. Debido a que no se pudo tener acceso a muestras de vino naturalmente contaminados con OTA, las muestras de vino tinto libres de OTA fueron enriquecidas con diferentes cantidades del reactivo comercial puro.

Las concentraciones elegidas fueron: 0,1, 1,0 y 10 ng mL⁻¹. En la Tabla 4.3 se muestran los resultados obtenidos de las medidas con el inmunosensor electroquímico. Los valores obtenidos son muy buenos, con una recuperación entre el 92 al 110 %, mostrando una alta performance del inmunosensor descrito.

Tabla 4.3. *Análisis estadístico de la respuesta del inmunosensor para tres muestras de vino tinto enriquecidas con diferentes cantidades de OTA. Cada punto es un promedio de tres medidas replicadas.*

^a c _{OTA} (ng mL ⁻¹)	^b c _{OTA} (ng mL ⁻¹)	^c CV(%)	Recuperación (%)
0,10	0,11	7,10	110
1,0	0,92	5,26	92
10	9,68	4,31	97

^a Concentración de OTA en muestra de vino tinto.

^b Valor promedio de la concentración de OTA determinada por nuestro inmunosensor.

^c Coeficiente de variación porcentual.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis doctoral se han desarrollado diferentes estudios acerca de la micotoxina ocratoxina A. Por lo tanto, las conclusiones se presentan en dos secciones, abarcando, por un lado, los estudios electroquímicos de ocratoxina A sobre electrodos de oro desnudo y modificados con monocapas autoensambladas de tioles donde, además, se desarrolló un sensor electroquímico para determinar ocratoxina A en muestras de vino tinto, y, por otro lado, el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para la detección y cuantificación de OTA en las mismas muestras naturales.

5.1. Estudios electroquímicos de ocratoxina A con electrodos de oro desnudo y modificado con monocapas autoensambladas de cisteamina y su cuantificación ultrasensible en muestras de vino tinto

En el estudio de la oxidación de OTA sobre electrodos de oro desnudos, se definió un pre-pico de adsorción, el que podría ser asignado a la fuerte adsorción del producto de la reacción de oxidación sobre la superficie del electrodo de trabajo, comportamiento que es diferente al observado, previamente, en nuestro laboratorio, cuando la oxidación de la misma micotoxina se estudió sobre electrodos de carbón vítreo en un medio de reacción fuertemente ácido, donde dicho pre-pico se observa durante el segundo barrido de potencial consecutivo. Posteriormente, se estudió el proceso de oxidación sobre electrodos de oro modificados con distintos tioles, tales como bencenotiol, ácido 3-mercapto-propiónico, undecanotiol, ácido dietil ditio-carbámico, 2-dietil-amino-etanotiol, 4-amino-tiofenol y 2-amino etanotiol (cisteamina). La mejor respuesta electroquímica se obtuvo cuando el electrodo de oro se modificó

con cisteamina, donde se definió claramente una cupla redox cuasi-reversible durante el primer barrido de potencial. Se estudió también el efecto del pH y se encontró que la cupla redox superficial estaba mejor definida a pH 4,0 sobre el electrodo de oro modificado que sobre el electrodo de oro desnudo, observándose un corrimiento a potenciales menos anódicos y un incremento en la intensidad de la señal voltamperométrica. Dicha cupla redox superficial se caracterizó termodinámica y cinéticamente empleando la combinación de los métodos del "máximo cuasi-reversible" y del "desdoblamiento del pico de OC neto" mediante voltamperometría de onda cuadrada.

Por otro lado, se desarrolló un sensor químico muy sensible para determinar OTA en matrices reales empleando el electrodo de oro modificado con monocapas autoensambladas de cisteamina. Este sensor presentó una muy buena performance, con un límite de detección (LD) de 0,004 ppb, un límite de cuantificación (LQ) de 0,012 ppb y una alta sensibilidad (8760 A M^{-1}). A fin de evaluar la exactitud del método propuesto se realizaron, por un lado, ensayos de recuperación por el método de las adiciones estándar, donde se obtuvo una recuperación promedio de 117 % y, por otro lado, se comparó el método propuesto con el método oficial obteniendo un muy buen acuerdo.

5.2. Magneto inmunosensor electroquímico para la determinación directa de OTA en muestras de vino tinto

Se realizaron también estudios dirigidos al desarrollo de un inmunosensor electroquímico, combinando esferas magnéticas, que actúan como fase sólida para la reacción de inmovilización y electrodos de láminas impresas (ELI), para la etapa de medición electroquímica. El mismo se basó en un ensayo competitivo directo, donde OTA en la muestra compite con OTA marcada con una enzima (OTA-HRP) por los sitios de unión al anticuerpo.

Se optimizaron diferentes parámetros con el objetivo de aumentar la performance del inmunosensor. El sistema de electrodos de láminas impresas se activó mediante el método de Anjo. Luego de la activación del ELI, se observó una mejor definición de la cupla redox de una solución 1 mM de H_2Q en solución amortiguadora citrato-fosfato. Por otro lado, se ensayaron tres formas diferentes de

conjugar OTA con la enzima HRP. La vía de síntesis o conjugación que mejor resultados arrojó fue la vía de la carbodiimida. Luego, se determinaron mediante la técnica de ELISA las concentraciones óptimas (expresadas en diluciones) del conjugado (OTA-HRP) y del anticuerpo monoclonal anti OTA (AcmOTA) por el cual van a competir OTA en su forma libre (a determinar) y el conjugado OTA-HRP. Para ambos casos, la dilución óptima de AcmOTA fue de 1/1000 y de 1/64 para el conjugado OTA-HRP. Con estos valores fueron optimizados la cantidad de EM y la concentración y volumen del sustrato enzimático para realizar la determinación de OTA en muestras de vino tinto

Este sensor fue capaz de detectar OTA a niveles de trazas en muestras de vino tinto. El inmunosensor demostró una alta performance analítica en términos de un excelente límite de detección (0,008 ppb), sensibilidad ($IC_{50} = 0,272 \pm 0,081$ ppb), alta especificidad, un intervalo analítico de interés en muestras de vino (0,01 a 20 ppb), reproducibilidad y una exactitud aceptable. Este dispositivo tiene varias ventajas sobre otros métodos de determinación de OTA en vinos, tales como medición directa sin ningún pre-tratamiento previo, uso de pequeños volúmenes de muestra, y la posibilidad de introducir este tipo de inmunosensor en medidas a campo, debido a su pequeño tamaño y fácil manejo. Todas estas características hacen a este dispositivo una herramienta de importancia para la medición de pequeñas cantidades de OTA en muestras de vino.



CAPÍTULO 6

6. BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] L. A. Goldblatt, Clin. Toxicol., **5**, 1972, 453.
- [2] F. D. Asplin, R. B. A. Carnaghan, Vet. Rec., **73** (1961) 1215.
- [3] W. P. Blount, Turkey, **9** (1961) 52.
- [4] I. M. Campbell, Adv. Microbiol. Physiol., **25** (1984) 198.
- [5] W. B. Turner, D. C. Aldridge, "*Fungal Metabolites II*", Academic Press, London, UK, 1983.
- [6] P. S. Steyn, Revue Méd. Vét., **6** (1998) 469.
- [7] S. Kale, J. W. Bennet, "*Strain instability in filamentous fungi*" en: *Handbook of Applied Mycology, Vol. 5*: D. Bhatnagar, E. B. Lillehoj, D. K. Arora (Eds.) "*Mycotoxins in Ecological Systems*", Marcell Dekker Inc., New York, USA, 1992 págs. 311-331.
- [8] D. B. Prelusky, B. A. Rotter, R. G. Rotter, "*Toxicology of mycotoxins*" en: J. D. Miller, H. L. Trenholm, (Eds.), "*Mycotoxins in grain-compounds other than Aflatoxins*", Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA, 1994, págs. 359-403.
- [9] D. Smith, M. O. Moss, "*Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*", J. Wiley & Sons, Chichester, New York. USA, 1985, págs. 1-143.
- [10] A. Cameán, M. Repetto, "*Estado Actual de la Toxicología Alimentaria*" en: M. Repetto (Ed.), "*Toxicología Avanzada*", Díaz de Santos, Madrid, 1997, págs.205-292.
- [11] E. M. Faustman, G. S. Omenn, "*Evaluación del Riesgo*" en: Casarett y Doull. (Eds.) "*Fundamentos de toxicología*". Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, 2005, págs. 50-61.
- [12] R. M. Martínez-Larrañaga, A. Anadón, A, "*Micotoxinas*" en: A. M. Cameán, M. Repetto (Eds.), *Toxicología Alimentaria*, Díaz de Santos, Madrid, 2006, págs.289-309.

- [13] T. Kuiper-Goodman, "Approaches to the Risk Analysis of Mycotoxins in the Food Supply", FNA/ANA, **23**, 1999, pags. 10-16.
- [14] Internacional Agency for Research on Cancer (IARC), 2006. Disponible en: <http://www.iarc.fr>
- [15] J. Mannon, E. Johnson, New Sci., **105** (1985) 12.
- [16] H.P. Van Egmond, M.A. Jonker en: "Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003", estudio FAO: alimentación y nutrición 81. Roma, 2004.
- [17] Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19th December 2006, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:en:PDF>.
- [18] Commission Regulation (EC) No. 105/2010 of 5th February 2010, Official Journal of the European Union, L 35/7.
- [19] T. B. Whitaker, J. W. Dieckens, R. J. Monroe, J. Am. Oil Chem. Soc., **49** (1974) 590.
- [20] NOM-188-SSA1, 2000.
- [21] W N. W. Turner, S. Subrahmanyam, S. A. Piletsky, Anal. Chim. Acta, **632** (2009) 168.
- [22] N. Horwitz, Anal. Chem., **54** (1982) 67A.
- [23] L. Foley and F. M. Kimmerle, Anal. Chem., **51** (1979) 818.
- [24] C. Mc Crory-Joy and J. M. Rosamillia, Anal. Chim. Acta, **141** (1982) 371.
- [25] O. J. Hayes, M. R. Smyth and I. Mc Murrough, Analyst, **112** (1987) 1197.
- [26] A. E. Clough, J. Am. Oil Chem. Soc., **69** (1992) 456.
- [27] J. J. Nevado, J. Rodríguez and G. Peñalvo, Electroanal., **4** (1999) 11.
- [28] C. Ceballos, Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto. 23 de Diciembre de 1998.
- [29] C. Ceballos and H. Fernández, Food Res. Int., **33** (2000) 357.
- [30] C. Ceballos and H. Fernández, J. Am. Oil Chem. Soc., **77** (2000) 731.
- [31] N. C. Marchiando, M. A. Zón and H. Fernández, Anal. Chim. Acta, **550** (2005) 199.
- [32] E. A. Ramírez, P. G. Molina, M. A. Zón and H. Fernández, Electroanal., **17** (2005) 1635.
- [33] D. Ringot, A. Chango, Y. J. Schneider, Y. Larondelle, Chem. Biol. Interact. **159** (2006) 18.
- [34] T. Kuiper-Goodman, C. Hilts, S. M. Billiard, Y. Kiparissis, I. D. K. Richard and S. Hayward, Food. Addit. Contam., **27** (2010) 212.
- [35] E. Anli and M. Bayram, Food Rev. Int., **25** (2009) 214.

- [36] P. Krogh (Ed.), "Ochratoxins in foods" en "Mycotoxins", Academic Press, London, 1987, págs. 97-121.
- [37] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, J. Chromatogr. A, **864** (1999) 89.
- [38] M. Castellari, S. Febbri, A. Fabián, A. Amati, S. Galassi, J. Chromatogr. A, **888** (2000) 129.
- [39] S. Bräse, A. Encinas, J. Keck, and C. F. Nising, Chem. Rev. **109** (2009) 3903.
- [40] P. Villa, P. Markaki, Food Control, **20** (2009) 455.
- [41] J. M. Soriano del Castillo "Micotoxinas en Alimentos", (Director-Coordinador), Ediciones Díaz de Santos, España, 2007.
- [42] K. J. van der Merwe, P. S. Steyn, L. Fourie, D. B. Scoot, Tetrahedron, **23** (1967) 4449.
- [43] P. S. Steyn, "Ochratoxin and other dihydroisocumarins", en "Microbial toxins, fungal toxins", A. Ciegler, S. Kadis, S. J. Aji (Eds.), Vol VI, Academic Press, New York, 1971, págs. 179-205.
- [44] V. Betina, "Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects", Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 1989.
- [45] A. E. Pohland, P. L. Schuller, P. S. Steyn, H. P. Van Egmond, Pure Appl. Chem., **54** (1982) 2219.
- [46] T. Kuipper-Goodman, P. M. Scott, Biomed. Environ. Sci., **2** (1989) 179.
- [47] F.S. Chu, CRC Crit. Rev. Toxicol., **2** (1974) 499.
- [48] P. Galtier, IARC Sci. Publ., **115** (1991) 187.
- [49] H. Valenta, J. Chromagr. A, **815** (1998) 75.
- [50] A. Esteban, M. L. Abarca, M. R. M. Bragulat, F. J. Cabanes, Res. Microbiol., **155** (2004) 861.
- [51] A. E. Pohland, P.L. Schuller, P.S. Steyn, H.P. Egmond, Pure Appl. Chem., **54** (1982) 2219.
- [52] J. C. Frisvad, F. Lund, "Toxin and secondary metabolite production by *Penicillium* species growing on stored cereals", en: K.A. Scudamore (Ed.), Proceedings of the United Kingdom Workshop on Occurrence and Significance of Mycotoxins, Slough, England: MAFF, 1993, p. 146.
- [53] J. Harwig, T. Kuiper-Goodman, P. M. Scott, en: "Microbial food toxicants: ochratoxins", M. Reichgel (Ed.), "Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin", CRC Press, Boca Raton, FL, 1983, pág. 193.
- [54] H.B. Lee, N. Magan, Int. J. Food Microbiol., **61** (2000) 11.

- [55] A. J. Ramos, N. Labernia, S. Marín, V. Sanchis, N. Magan, *Int. J. Food Microbiol.*, **44** (1988) 133.
- [56] M. L. Abarca, M. R. Bragulat, G. Castellá, F. J. Cabañes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** (1994) 2650.
- [57] C. N. Heenan, K. J. Shaw, J. I. Pitt, *J. Food Microbiol.*, **1** (1998) 67.
- [58] R. A. Samson, P. Noonin, M. Meijer, J. Houbraeken, J. C. Frisvad, J. Varga, *Micol.*, **59** (2007) 129.
- [59] A. E. Pohland, S. Nesheim, L. Friedman, *Pure Appl. Chem.*, **64** (1992) 1029.
- [60] A. M. Bendele, W. W. Carlton, P. Krogh, E. B. Lillehoj, *J. Nat. Cancer*, **75** (1985) 733.
- [61] M. Castegnaro, D. Mc Gregor, *Rev. Med. Vet.*, **149** (1998) 671.
- [62] T. Petkovabocharova, M. Castegnaro, *Eur. J. Cancer Clin. On.*, **23** (1987) 1788.
- [63] M. Castegnaro, H. Bartsch, I. Chernozemsky, *Cancer Res.*, **47** (1987) 3608.
- [64] "International Agency for Research on Cancer, *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*". IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human Lyon, France. Vol. **56** (1993) pág. 489.
- [65] J. C. Gautier, D. Holzhaeuser, J. Markovic, E. Gremaud, B. Schilter, R. J. Turesky, *Free Rad. Biol. Med.*, **30** (2001) 1089.
- [66] G. J. Schaaf, S. M. Nijmeijer, R. F. M. Maas, P. Roostenberg, E. M. de Groene, J. Fink-Gremmels, *Biochim. Biophys. Acta*, **149** (2002) 1588.
- [67] E. E. Creppy, A. Kane, G. Dirheimer, C. Lafarge-Frayssinet, S. Mousset, C. Frayssinet, *Toxicol. Lett.*, **28** (1985) 29.
- [68] S. Lebrun, W. Follmann, *Arch. Toxicol.*, **75** (2002) 734.
- [69] A. Mally, H. Zepnik, P. Waken, E. Eder, K. Dingley, H. Ihmels, W. Volket, W. Dekat, *Chem. Res. Toxicol.*, **17** (2004) 234.
- [70] I. G. Gillman, T. N. Clark, R. A. Manderville, *Chem. Res. Toxicol.*, **12** (1999) 1066.
- [71] N. Ratola, L. Martins y A. Alves, *Anal. Chim. Acta*, **513** (2004) 319.
- [72] R. Serra, C. Mendonca, L. Abrunhosa, A. Pietro, A. Venancio, *Anal. Chim. Acta*, **513** (2004) 41.
- [73] N. Ratola, L. Martins y A. Alves, *Anal. Chim. Acta*, **513** (2004) 319.
- [74] A. Leitner, P. Zollner, A. Paolillo, J. Stroka, A. Papadopoulou, S. Jarobek, E. Anklam, W. Lindler, *Anal. Chim. Acta*, **453** (2002) 33.
- [75] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, *J. AOAC Int.*, **84** (2001) 1818.

- [76] E. González-Peñas, C. Leache, M. Viscarret, A. Pérez de Obanos, C. Araguás, A. López de Cerain, *J. Chromatogr. A*, **1025** (2004) 163.
- [77] Z. Zheng, J. Hanneken, D. Houchins, R. S. King, P. Lee, J. L. Richard, *Mycopathologia*, **159** (2005) 265.
- [78] E. González-Peñas, C. Leache, A. López de Cerain, E. Lizarraga, *Food Chem.*, **97** (2006) 349.
- [79] A. Aresta, R. Vatinno, F. Palmisano, C. G. Zambonin, *J. Chromatogr. A* **1115** (2006) 196.
- [80] M. Solfrizzo, G. Panzarini, A. Visconti, *J. Agric. Food Chem.*, **56** (2008) 11081.
- [81] A. Fabiani, C. Corzani, G. Arfelli, *Talanta*, **83** (2010) 281.
- [82] H. Valenta, *J. Chromatography A*, **815** (1998) 75.
- [83] E. G. Peñas, C. Leache, A. L. de Cerain, E. Lizarraga, *Food Chem.*, **97** (2006) 349.
- [84] S. Obrecht-Pflumio, G. Dirheimer, *Chem. Biol. Interact.*, **127** (2000) 29.
- [85] Z. Zheng, J. Hanneken, D. Houchins, R. S. King, P. Lee, J. L. Richard, *Mycopathologia*, **159** (2005) 265.
- [86] D. Flajs, A. M. Domijan, D. Ivic', B. Cvjetkovic', M. Peraica, *Food Control*, **20** (2009) 590.
- [87] T. Y. Rusanova, N. V. Beloglazova, I. Y. Goryacheva, M. Lobeau, C. Van eteghem, S. De Saeger, *Anal. Chim. Acta*, **653** (2009) 97.
- [88] S. H. Alarcon, L. Micheli, G. Palleschi, D. Compagnone, *Anal. Lett.*, **37** (2004) 1545.
- [89] M. M. Ngundi, L. C. Shiriver-Lake, M. H. Moore, M. E. Lassman, F. S. Ligher, C. R. Taitt, *Anal. Chem.*, **77** (2005) 148.
- [90] B. Prieto-Simón, M. Campás, J. L. Marty, T. Noguier, *Biosens. Bioelectron.*, **23** (2008) 995.
- [91] X. H. Wang, S. Wang, *Sensors*, **8** (2008) 6045.
- [92] J. Yuan, D. Deng, D. R. Lauren, M. I. Aguilar, Y. Wu, *Anal. Chim. Acta*, **656** (2009) 63.
- [93] H. Kuang, W. Chen, D. Xu, L. Xu, Y. Zhu, L. Liu, H. Chu, C. Peng, C. Xu, S. Zhu, *Biosens. Bioelectron.*, **26** (2010) 710.
- [94] S. C. B. Oliveira, V. C. Diculescu, G. Palleschi, D. Compagnone, A. M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta*, **588** (2007) 283.

- [95] E. A. Ramírez, M. A. Zón, P. A. Jara Ulloa, J. A. Squella, L. Nuñez Vergara, H. Fernández, *Electrochim. Acta*, **55** (2010) 771.
- [96] J. Wang, "*Analytical Electrochemistry*", Wiley-VCH, 3rd Ed., USA, 2006.
- [97] M. Mehrvar, M. Abdi, *Anal. Sci.* **20** (2004) 1113.
- [98] M. Velasco-García, T. Mottram, *Biosyst. Eng.* **84** (2003) 1.
- [99] L. D. Mello, L. T. Kubota, *Food Chem.*, **77** (2002) 237.
- [100] M. Mehrvar, M. Abdi, *Anal. Sci.*, **20** (2004) 1113.
- [101] M. Gerad, A. Chaubey, B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.*, **17** (2002) 345.
- [102] J. Tamayo, M. Alvarez, I. M. Lechuga, *Sens. Actuators B: Chemical*, **89** (2003) 33.
- [103] K. Ramanathan, B. Jonsson, B. Danielson, *Anal. Chim. Acta*, **427** (2001) 1.
- [104] D. Ivnitiski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins, *Biosens. Bioelectron.*, **14** (1999) 599.
- [105] A. Chaubey, B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.*, **17** (2002) 441.
- [106] S. Sukeerthi, A. Q. Contractor, *Ind. J. Chem.*, **33 A** (1994) 565.
- [107] J. Janata, M. Josowicz, P. Vanysek, D. M. de Vaney, *Anal. Chem.*, **70** (1998) 179.
- [108] C. J. McNeil, D. Athey, M. Ball, W. O. Ho, S. Krause, R. D. Armstrong, J. D. Wright, K. Rawson, *Anal. Chem.*, **67** (1995) 3928.
- [109] R. S. Papastathopoulos, G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **47** (1975) 1792.
- [110] R. Koncki, *Talanta*, **52** (2000) 13.
- [111] Y. Taniy, Y. Umezawa, *Sensors Lett.*, **3** (2005) 99.
- [112] S. Behera, C. Retna Raj, *Sensors and Actuators B* **128** (2007) 31.
- [113] M. B. Moressi, R. Andreu, J. J. Calvente, H. Fernández, M. A. Zón, *J. Electroanal. Chem.*, **570** (2004) 209.
- [114] D. Mandler & S. Kraus-Ophir, *J Solid State Electrochem*, **15** (2011) 1535.
- [115] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **105** (2005) 1103.
- [116] L. Srisombata, A. C. Jamisonb, T. R. Lee, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **390** (2011) 1.
- [117] H. O. Finklea, en: "*Electrochemistry of organized monolayers of thiols and related molecules on electrodes*", A. J. Bard. I. Rubinstein (Eds.) en: "*Electroanalytical Chemistry*", Marcel Dekker, New York, Vol 19, 1996, págs. 109-335.
- [118] A Ulman, *Chem. Rev.*, **96** (1996) 1533.

- [119] K. D. Schierbaum, T. Weiss, E. U. Thocen van Velzen, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, W. Göpel, *Science*, **265** (1994) 1413.
- [120] A. Ulman, *"Thin films: self-assembled monolayers of thiols"*, Academic Press, New York (1998).
- [121] F. P. Zamborini, R. M. Crooks, *Langmuir*, **14** (1998) 3279.
- [122] D. C. Myles, *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (1994) 7413.
- [123] X. Xiao, J. Hu, D. H. Charych, M. Salmeron, *Langmuir*, **12** (1996) 235.
- [124] A. Ulman, *"Introduction to thin organic films: from Langmuir-Blogett to self-assembly"*, Academic Press, Boston, (1991).
- [125] L. A. Hockett, S. E. Creager, *Langmuir*, **11** (1995) 2318.
- [126] D. Evans, R. Wampler, *J. Phys. Chem. B*, **103** (1999) 4666.
- [127] M. T. Rojas, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 5883.
- [128] M. T. Rojas, R. Koniger, J. F. Stoddart, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 336.
- [129] D. G. Walter, D. J. Campbell, C. A. Mirkin, *J. Phys. Chem. B*, **103** (1999) 402.
- [130] C. T. Yavuz, A. Prakash, J. T. Mayo, V. L. Colvin, *Chem. Eng. Sci.* **64** (2009) 2510.
- [131] M. A. M. Gijs, F. Lacharme, U. Lehmann, *Chem. Rev.*, **110** (2010) 1518.
- [132] K. Aguilar-Arteaga, J. A. Rodríguez, E. Barrado, *Anal. Chim. Acta*, **674** (2010) 57.
- [133] S. Centi, S. Laschi, M. Mascini, *Talanta*, **73** (2007) 394.
- [134] H. Font, J. Adrian, R. Galve, M. C. Estévez, M. Castellari, M. Gratacós-Cubarsí, F. Sánchez-Baeza, M. P. Marco, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 736.
- [135] M. Hervás, M. A. López, A. Escarpa, *Biosens. Bioelectron.* **25** (2010) 1755.
- [136] S. Solé, A. Merkoçi, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.*, **20** (2001) 102.
- [137] A. Lermo, S. Fabiano, S. Hernández, R. Galve, M. P. Marco, S. Alegret, M. I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* **24** (2009) 2057.
- [138] D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, *Anal. Chem.*, **80** (2008) 1582.
- [139] M. Eguílaz, M. M. Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.*, **26** (2010) 517.
- [140] S. Centi, S. Laschi, M. Fránek, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, **538** (2005) 205.
- [141] S. Centi, E. Silva, S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, **594** (2007) 9.
- [142] Y. Y. Lin, G. Liu, C. M. Wai, Y. Lin, *Electrochem. Commun.* **9** (2007) 1547.
- [143] R. A. Margni, en: *"Inmunología e Inmunología. Fundamentos"*, 5ta. Panamericana, Buenos Aires, 1996.

- [144] J. R. Crowther, en: "*ELISA, Theory and Practice*", J. M. Walker (Ed.) en: "*Methods in Molecular Biology*", Humana Press, New Jersey, Vol 42, 1995.
- [145] E. P. Altshuler, D. V. Serebryanaya, and A. G. Katrukha, *Biochemistry-Moscow*, **75** (2010) 1584.
- [146] F. J. Arévalo, G. A. Messina, P. G. Molina, M. A. Zón, J. Raba, H. Fernández, *Talanta*, **80** (2010) 1986.
- [147] A. G. Pertierra, C. V. Gutiérrez, M. D. Blanco Gaitán, J. M. Teijón Rivera, C. Mendoza Oltras, J. Ramírez Rodrigo, "Fundamentos de Bioquímica Estructural", Editorial Tébar, España, 2005.
- [148] H. Curtis, N. S. Barnes, "*Biología*", Editorial Médica Panamericana S. A., Buenos Aires, Argentina, 1993.
- [149] International Union of Biochemistry 2011, disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- [150] M. Hamid, K. Rehman, *Food Chem.*, **115** (2009) 1177.
- [151] J. Everse, K. E. Everse, "*Peroxidases in Chemistry and Biology*", Volúmenes 1 y 2, CRC Press, Boca Raton, 1991.
- [152] L. Banci, *J. Biotech.*, **53** (1997) 253.
- [153] K. G. Welinder, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2** (1992) 388.
- [154] R. Andreu, E. E. Ferapontova, L. Gorton, J. J. Calvente, *J. Phys. Chem. B*, **111** (2007) 469.
- [155] A. J. Bard, L. R. Faulkner, en: "*Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*", 2nd. Ed. J. Wiley, New York, 2001.
- [156] B. H. J. Hofstee, *Nature*, **184** (1959) 1296.
- [157] K. B. Oldham, J. C. Myland, en: "*Fundamentals of Electrochemical Science*", Academic Press, USA, 1994.
- [158] J. E. B. Randles, *Trans. Faraday Soc.*, **44** (1948) 327.
- [159] A. Sevcik, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **13** (1948) 349.
- [160] R. S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.*, **36** (1964) 706.
- [161] R. S. Nicholson, *Anal. Chem.*, **37** (1965) 1351.
- [162] G. C. Barker, I. L. Jenkins, *Analyst*, **77** (1952) 685.
- [163] M. Kalousek, *Czech. Chem. Comm.*, **13** (1948) 105.
- [164] W. Kemula, *Collect. Czech. Chem. Comm.*, **2** (1930) 502.
- [165] a) M. Ishibashi, T. Fujinaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **23** (1950) 261; b) M. Ishibashi, T. Fujinaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **25** (1952) 68; c) M. Ishibashi, T. Fujinaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **25** (1952) 233.

- [166] T. Kambara, Chem. Soc. Jpn., **27** (1954) 527.
- [167] G. C. Barker, en: "*Advances in Polarography*", I. S. Longmuir (Ed.), Pergamon Press, New York, 1960, pág. 144.
- [168] L. Ramaley, M. S. Krause, Jr., Anal. Chem., **41** (1969) 1362.
- [169] J. Osteryoung, J. J. O'Dea, en: "*Square Wave Voltammetry*", en: A. J. Bard (Ed.), "*Electroanalytical Chemistry*", Marcel Dekker, New York. Vol 14, 1987.
- [170] S. C. Rifkin, D. H. Evans, Anal. Chem., **48** (1976) 1616.
- [171] J. H. Christie, J. A. Turner, R. A. Osteryoung, Anal. Chem., **49** (1977) 1899.
- [172] E. Gileadi, E. Kirowa-Eisner, J. Penciner, en: "Interfacial Electrochemistry – An Experimental Approach", Addison-Wesley, Reading, MA, 1975.
- [173] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P. J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García, Electrochim. Acta **53** (2008) 3635.
- [174] H. Wei, J. J. Sun, Y. Xie, C. G. Lin, Y. M. Wang, W. H. Yin, G. N. Chen, Anal. Chim. Acta **588** (2007) 297.
- [175] D. M. Anjo, M. Kahr, M. M. Khodabakhsh, S. Nowinski, M. Wanger, Anal. Chem. **61** (1989) 2603.
- [176] L. Gorton, Electroanal. **7** (1995) 23.
- [177] C. Ruan, Y. Li, Talanta **54** (2001) 1095.
- [178] J. J. O' Dea, J. Osteryoung, R. A. Osteryoung, Anal. Chem. **53** (1981) 695.
- [179] R. Molina Úbeda, "Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas", Editorial Mundi Prensa, Madrid, 2000.
- [180] F. S. Chu, F. C. C. Chang, R. D. Hinsdill, Appl. Envir. Microbiol. **31** (1976) 831.
- [181] H. Xiao, J. R. Clarke, R. R. Marquardt, A. A. Frohlich, J. Agric. Food Chem. **43** (1995) 2092.
- [182] D. Abramson, E. Usleber, E. Märtilbauer, Appl. Envir. Microbiol. **61** (1995) 2007.
- [183] S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, Electrochim. Acta, **40** (1995) 1784.
- [184] S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, Anal. Chim. Acta, **305** (1995) 248.
- [185] M. Lovric, S. Komorsky-Lovric, J. Electroanal. Chem., **248** (1988) 239.
- [186] V. Mirceski, S. Komorsky-Lovric, M. Lovric en: "Square-Wave Voltammetry. Theory and application", Springer, Alemania, 2007.
- [187] J. O'Dea, J. G. Osteryoung, Anal. Chem., **65** (1993) 3090.
- [188] S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, Electrochim. Acta, **384** (1995) 115.
- [189] V. Mirceski, M. Lovric, Electroanal., **9** (1997) 1283.
- [190] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch en: "*Fundamentos de Química Analítica*", Thomson, 8ta. Edición, Madrid, España, 2005.

- [191] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany 2007.
- [192] J. B. Kennedy, A. M. Neville en: "*Basic Statistical Methods for Engineers and Scientists*", 3ra. Edición, Harper and Row, New York, 1986.
- [193] A. M. Granero, H. Fernández, E. Agostini, M. A. Zón, *Electroanal.*, **20** (2008) 858.
- [194] J. N. Miller, J. C. Miller en: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4ta Edición, Pearson: U. K., 2000.
- [195] A. G. González, M. A. Herrador, A. G. Asuero, *Talanta* **48** (1999) 729
- [196] H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri en: "*La calibración en Química Analítica*", Eds. UNL, Santa Fe, 2007.
- [197] E. S. Forzani, G. A. Rivas, V. M. Solís, *J. Electroanal. Chem.* **435** (1997) 77.
- [198] Y. Xiao, H. X. Ju, H. Y. Chen, *Anal. Chim. Acta* **391** (1999) 73.
- [199] A. M. Gurban, B. Prieto-Simón, J. L. Marty, T. Noguier, *Anal. Lett.* **39** (2006) 1543.



U N R C
Biblioteca Central



71198

71108