

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

*Trabajo Fin de Máster*

**HACIA UN APTAENSAYO ELECTROQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN  
DE GLUTEN**

**ROMINA FERNÁNDEZ SIERRA**

**Julio 2013, Oviedo**

**NOEMÍ DE LOS SANTOS ÁLVAREZ**, Investigadora Ramón y Cajal del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo,

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo, titulado **“Hacia un aptaensayo electroquímico para la detección de gluten”** ha sido realizado en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo por la licenciada **Romina Fernández Sierra** bajo su dirección, constituyendo el Trabajo Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizo.

En Oviedo, a 14 Julio de 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Noemi', with a large, stylized flourish above it.

Fdo. Noemí de los Santos Álvarez

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. El gluten	2
1.2. Enfermedad celíaca	3
1.3. Legislación	6
1.4. Métodos analíticos de detección de gluten	7
1.5. Aptámeros como elemento de reconocimiento molecular.	13
1.6. Partículas magnéticas	15
1.7. Electrodo serigrafiado	16
1.8. Cronoamperometría	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	19
<b>3. EXPERIMENTAL</b>	21
3.1. Reactivos	22
3.2. Material de laboratorio	22
3.3. Instrumentación	24
3.4. Procedimientos experimentales	25
<b>4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	32
4.1. Selección del soporte de ensayo	33
4.2. Efecto del medio de interacción	36
4.3. Selección del aptámero de captura	38
4.4. Efecto de la cantidad de aptámero inmovilizado sobre las partículas magnéticas.	40
4.5. Características analíticas del aptaensayo	41
<b>5. CONCLUSIONES</b>	43
<b>6. REFERENCIAS</b>	45
<b>ANEXO I: Tablas de datos</b>	48

## **1.-INTRODUCCIÓN**

### 1.1. El gluten

El gluten constituye las proteínas de reserva, insolubles en agua o sales, del trigo y otros cereales, denominadas en el caso del trigo, gliadina y glutenina, como se indica en la tabla 1, ambas involucradas en la enfermedad celíaca. Actualmente, el Codex Alimentarius define el gluten como una fracción proteica del trigo, centeno, cebada, avena, de sus variedades híbridas y sus derivados, al que algunas personas son intolerantes, y que es insoluble en agua y en NaCl 0.5 M [1].

Fracción		Trigo	Centeno	Cebada	Avena
Globulina		Edestina			
Albumina		Leucosina			
Gluten	Prolamina	Gliadina	Secalina	Hordeína	Avenina
	Glutelina	Glutelina	Secalinina	Hordenina	Avenalina

**Tabla 1.** Fracciones proteicas de los granos de cereales que contienen gluten (fracciones de Osborne)

Las gliadinas son la fracción soluble en alcohol del gluten de trigo y contienen la mayor parte de los componentes tóxicos para los celíacos. Son ricas en glutamina y prolina, cuya digestión en el tracto gastrointestinal es más difícil que la de otros péptidos. La gliadina puede ser separada, al menos en cuatro fracciones:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadina.

La identificación inequívoca de la secuencia peptídica responsable de la enfermedad es difícil. Se ha demostrado que tras la ingesta de gliadina existen regiones sin digerir, que son resistentes a la proteólisis enzimática gástrica, pancreática e intestinal. Entre los péptidos identificados como tóxicos, se encuentra un fragmento de la  $\alpha$ -gliadina compuesto por 33 aminoácidos (33-mer).

Este péptido contiene seis epítomos de las células T<sup>1</sup> y parece ser el más inmunógeno [3, 4].

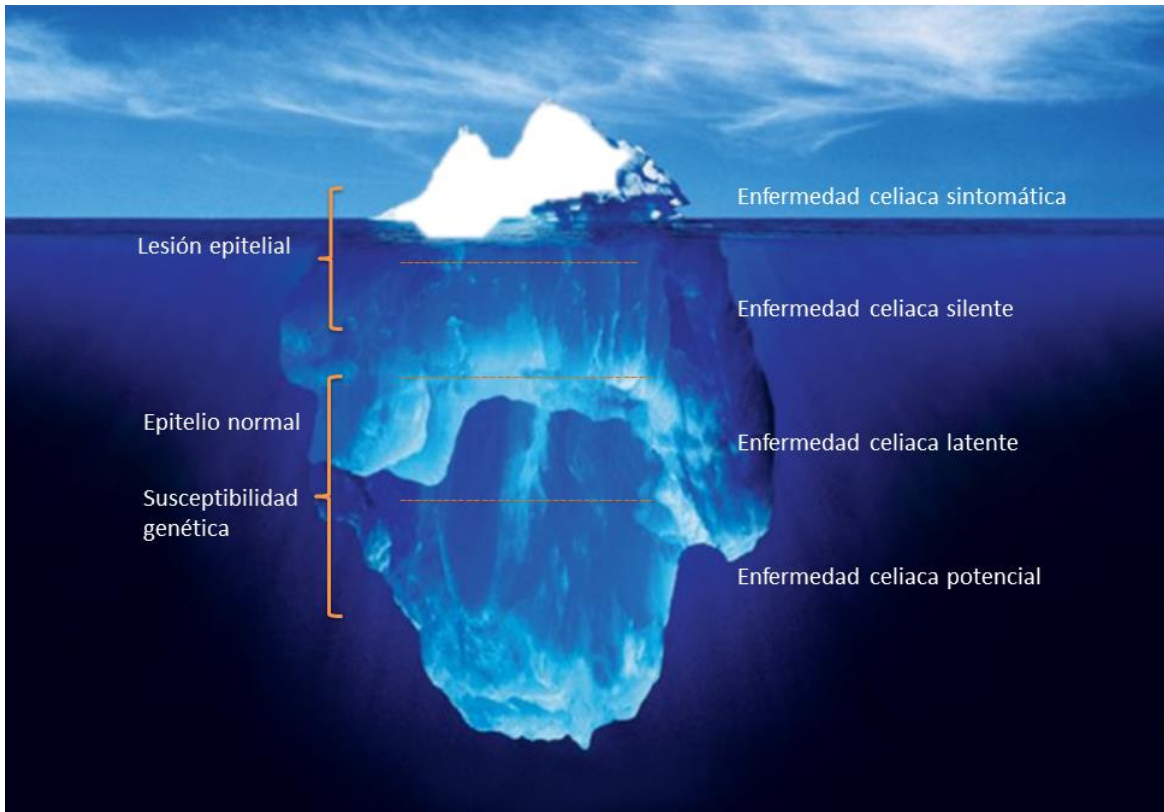
### **1.2. Enfermedad celiaca**

La enfermedad asociada a la intolerancia al gluten es la celiacía. Es la enfermedad inflamatoria crónica intestinal más frecuente. En España, 1/70 niños padecen la enfermedad [4] y en adultos el número es de 1/100 [5]. Estas cifras pueden ser más elevadas ya que hay muchos pacientes no diagnosticados. La celiacía es un desorden autoinmune intestinal crónico con un fuerte componente genético, cuya sintomatología está asociada a la ingestión de gluten. Las proteínas que constituyen el gluten inducen un proceso inflamatorio crónico en el intestino delgado, que conduce al acortamiento progresivo de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas e infiltración del epitelio por linfocitos, que eventualmente pueden experimentar una transformación maligna [6].

Existen distintas formas de presentación de la celiacía que se detallan a continuación. Hoy en día se emplea el símil del iceberg, ya que se cree que existe un porcentaje significativo de celíacos sin diagnosticar (figura1) [7].

---

<sup>1</sup> Las células T son parte del sistema inmunitario y se forman a partir de células madre en la médula ósea. Ayudan a proteger el cuerpo de las infecciones.



**Figura 1.** El iceberg celiaco.

- Enfermedad celiaca activa: Incluye sujetos con sintomatología clínica evidente, marcadores serológicos de actividad positivos, afectación de la mucosa intestinal y susceptibilidad genética. Es la más fácil de detectar, constituyendo la punta del iceberg celiaco.
- Celiaquía potencial: Se presenta en individuos con susceptibilidad genética a padecer la enfermedad celiaca, pero sin datos serológicos ni histológicos en el momento de realizar el estudio que confirmen la sospecha. Además, pueden darse otras alteraciones, principalmente inmunológicas, como un aumento de los linfocitos intraepiteliales.
- Celiaquía silente: Bajo este término se incluyen cuadros clínicos asintomáticos, o con manifestaciones clínicas mínimas. Sin embargo, presentan

una atrofia vellositaria característica de la enfermedad celiaca con presencia de uno o varios marcadores serológicos positivos y HLA- DQ2/DQ8<sup>2</sup>.

- Celiaquía latente: Los enfermos con este tipo de presentación no tienen síntomas, aunque si una susceptibilidad genética (HLA DQ2/DQ8). Sin embargo, pueden tener una biopsia intestinal normal consumiendo gluten. Pueden desarrollar la enfermedad de manera súbita. Esta tipología es la más difícil de diagnosticar.

- Celiaquía refractaria: Se refiere a cuadros clínicos que no responden a la dieta sin gluten que, en la mayoría de los casos (95%), se acompaña de la recuperación clínica e histológica. Este tipo de celiacía es relativamente infrecuente, aparece en la forma adulta de la enfermedad celiaca y tiene una elevada morbi-mortalidad<sup>3</sup> [7, 8, 9].

Mediante un examen clínico cuidadoso y una analítica de sangre, que incluya los marcadores serológicos de enfermedad celíaca (anticuerpos antitransglutaminasa tisular), se establece el diagnóstico de sospecha de la enfermedad. El conocimiento reciente de diferentes formas clínicas de enfermedad celiaca, ha venido a demostrar que no siempre se puede establecer un diagnóstico clínico o funcional de la enfermedad celiaca. Por ello, para la confirmación del diagnóstico de la enfermedad celiaca, es imprescindible realizar una biopsia intestinal. Para realizar esta prueba, es necesario que no se haya retirado el gluten de la dieta.

Una vez diagnosticada la enfermedad, el tratamiento consiste en seguir una dieta estricta sin gluten de manera permanente. Con este tratamiento se repara la mucosa intestinal y los síntomas desaparecen. En la actualidad, se investiga sobre otros tratamientos muy prometedores, pero el único existente hoy día es el seguimiento de la dieta exenta de gluten. Por este motivo, los métodos de

---

<sup>2</sup> Antígenos leucocitarios humanos, cuya presencia predispone al desarrollo de la enfermedad celiaca. ,

<sup>3</sup> En Medicina, mortalidad por causa de una enfermedad.



detección de gluten en los alimentos constituyen una herramienta básica para el control de la enfermedad [10].

### **1.3. Legislación**

Debido a que el único tratamiento efectivo es la dieta libre de gluten durante toda la vida, la legislación sobre etiquetado de alimentos en España (Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios) y en la Unión Europea, obliga al fabricante a indicar en la etiqueta de los alimentos envasados si contienen como ingredientes cereales con gluten (trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas).

Además, el Reglamento (UE) nº 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten, aplicable a partir del 1 de enero de 2012, regula el empleo de las indicaciones “sin gluten” cuando el alimento o producto dietético contenga menos de 20 mg de gluten por Kg de producto o lo que es lo mismo 20 partes por millón (ppm). En el caso de ciertos alimentos dietéticos, en los que se ha usado almidón de trigo especialmente procesado para reducir el contenido de gluten, el fabricante podrá utilizar el término “muy bajo en gluten” si el producto contiene menos de 100 ppm de gluten.

Aunque los niveles de 20 ppm sean considerados aparentemente no dañinos, el umbral de inocuidad para los pacientes celíacos es incierto, existiendo individuos que se ven afectados con menores concentraciones. Por esta razón, en España, la FACE (federación de asociaciones de celíacos de España) establece como límite crítico un nivel de 10 ppm de gluten (figura 2). Este valor puede disminuir según las técnicas de análisis vayan avanzando y disminuyendo el límite de detección [11, 12].



**Figura 2.** Distintivo usado por la FACE para reconocer los alimentos con un nivel máximo de 10 ppm

En la elaboración de alimentos existen diversos puntos críticos susceptibles de provocar la contaminación con gluten de los alimentos cuando en la misma fábrica o cadena de producción se elaboran productos con y sin gluten.

El consumo de productos manufacturados conlleva asumir riesgos potenciales a los pacientes celíacos, ya que el gluten puede ser añadido a un producto como ingrediente, aditivo, o bien este puede contenerlo por razones tecnológicamente inevitables del proceso de fabricación. Por lo tanto, el gluten puede estar presente no sólo en los productos elaborados a partir de las harinas de trigo, cebada, centeno y avena, como pan, pastas, pasteles y galletas, sino también en embutidos y derivados cárnicos, salsas, aperitivos, golosinas, comidas preparadas e, incluso, en ciertos medicamentos como excipiente [13].

#### **1.4. Métodos analíticos de detección de gluten**

La detección de gluten es una tarea complicada, ya que no está constituido por un solo analito, sino que existen varias regiones inmunotóxicas, que además afectan de manera distinta a las personas susceptibles.

Una de las etapas críticas en la cuantificación del gluten es su extracción del alimento. Durante el proceso de elaboración, los alimentos se someten a tratamientos térmicos y a otros procesos que pueden modificar la estructura del gluten. Esta modificación y la heterogeneidad de la matriz de los alimentos suponen una dificultad añadida para la correcta extracción del gluten de los

alimentos. El método tradicional de extracción consiste en la utilización de una mezcla etanol-agua al 60%. La eficiencia del proceso es baja, especialmente para la extracción del gluten en alimentos procesados con calor. Puede mejorarse añadiendo a la muestra, antes de la extracción definitiva en etanol, compuestos reductores y desnaturalizantes para solubilizar los agregados de gluten producidos por el calor y posterior enfriamiento. La disolución más utilizada con este fin se ha patentado en España con el nombre de cocktail de extracción de gluten (patente ES2182698).

Otra de las dificultades que nos encontramos a la hora de desarrollar métodos de análisis de gluten es la carencia de material de referencia de valor certificado de contenido en gluten o gliadina. Esto es debido a la variabilidad genética de los diferentes cultivos de cereales. Actualmente, se dispone de un material de referencia no certificado denominado PWG-gliadin, las siglas PWG provienen de Prolamin Working Group, que consiste en gliadina liofilizada aislada de una mezcla de trigos procedentes de distintos cultivos para tener en cuenta los diferentes contenidos en gluten y variedades de epítomos inmunotóxicos de cultivos individuales. Este material ha sido preparado por el Prolamin Working Group y tiene un alto contenido en proteína, es soluble en etanol, es homogéneo y tiene una buena reactividad en distintos inmunoensayos enzimáticos. Sin embargo no ha sido aprobado como material de referencia certificado [15, 16].

A continuación se detallan los métodos más habitualmente empleados para la detección de gluten.

### **1.4.1. Ensayo inmunoenzimático ELISA**

La técnica ELISA (del inglés Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) consiste en un ensayo basado en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos a las moléculas que reconocen como extrañas (antígenos). Es una técnica inmunológica clásica, adecuada para realizar análisis ya que se realizan con rapidez y proporcionan una alta sensibilidad. En el caso de

la detección de gluten se utilizan anticuerpos que reconocen fragmentos inmunotóxicos presentes en las proteínas del gluten (antígeno).

Existen distintos formatos de ensayos ELISA, siendo los más utilizados en la detección de gluten los ensayos tipo sándwich y los ensayos competitivos. En el ELISA tipo sándwich se utilizan dos anticuerpos, el anticuerpo primario o de captura y el anticuerpo secundario o de detección, unido a la enzima. En este ensayo se establece la unión directa del gluten a los dos anticuerpos, quedando el antígeno entre ambos. Por tanto, requiere dos sitios de unión distintos (anticuerpos primario y secundario distintos) o más de un sitio de unión idéntico (anticuerpos primario y secundario iguales).

El ensayo ELISA tipo sándwich diseñado mediante un sistema de doble anticuerpo idéntico denominado R5, es el considerado por el Codex Alimentarius como un método de análisis tipo I, para la determinación de gluten en alimentos. Este método propuesto por el grupo del Dr. Méndez (CNB-CSIC, Madrid) utiliza el anticuerpo monoclonal R5, que reconoce el epítipo QQFPF considerado como tóxico [17]. Este método permite la detección de gluten de trigo, centeno y cebada, incluso después del tratamiento de los alimentos con calor, previa extracción con la disolución cocktail. Este método no es válido para detectar gluten de avena. Este mismo grupo ha desarrollado un ensayo ELISA específico para avena. La sensibilidad de este método es de 3 ppm de gluten, y su límite de cuantificación de 5 ppm, siendo por ello particularmente apropiado para el análisis de gluten en el intervalo de baja concentración (20-200 ppm) [18].

Este método tiene como ventajas que es un ensayo simple, rápido, económico, con alta sensibilidad y que no produce reacciones cruzadas frente a otras proteínas no tóxicas de maíz o arroz. El principal inconveniente de esta metodología es producir falsos negativos cuando los alimentos están hidrolizados y/o altamente procesados, debido a que el gluten se encuentra fragmentado en fracciones incapaces de ser reconocidas por dos anticuerpos, ya que tienen un solo epítipo inmunotóxico.

Este problema se ha intentado solucionar mediante el desarrollo de ensayos ELISA competitivos, que sólo requieren un único epítopo activo para reaccionar con el anticuerpo.

En el ELISA competitivo se incuba la muestra con el anticuerpo para después añadir esta preparación sobre una superficie recubierta de antígeno (por ejemplo, gliadina de trigo) de tal forma que se une a la superficie el anticuerpo libre no unido al gluten de la muestra. Finalmente se detecta la cantidad de anticuerpo libre; cuanto más anticuerpo libre es detectado, menor cantidad de gluten contiene la muestra [14].

Se han desarrollado varios anticuerpos que reconocen diferentes fracciones inmunotóxicas del gluten. Sin embargo, los resultados obtenidos en ensayos ELISA difieren dependiendo del anticuerpo usado [18].

### **1.4.2. Western Blot**

La técnica Western Blot es, al igual que los ELISA, un inmunoensayo diseñado para detectar proteínas en muestras complejas. La detección final de gluten se realiza mediante la unión de anticuerpos específicos anti-gluten y la utilización de enzimas unidas a estos mismos anticuerpos gracias a las cuales puede detectarse su unión al gluten.

El procedimiento consta de varias etapas. En una primera etapa se separan las proteínas, en función de su tamaño, mediante electroforesis en gel, que utiliza una corriente eléctrica para la separación de las proteínas. A continuación, con el objetivo de hacer accesibles las proteínas para su detección por el anticuerpo, se transfieren a membranas sintéticas. Por último, se produce la unión específica de los anticuerpos a la proteína y éstos son detectados gracias a la enzima unida a ellos.

La técnica Western Blot se utiliza como una prueba confirmatoria de los resultados de un ELISA cuando se detecta presencia de gluten.

Con este método tenemos una alta selectividad y sensibilidad tanto para alimentos crudos como procesados. En cambio, es un método lento para el cual se requiere formación y una especialización adecuada para poder realizar los análisis. Además es un método cualitativo, sólo nos indica la presencia o ausencia de gluten, no su concentración [12, 19].

### **1.4.3. Métodos basados en la amplificación de ADN (PCR)**

Una alternativa a los métodos inmunológicos son los basados en la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y actualmente PCR en tiempo real, capaces de determinar secuencias específicas de ADN. Sin embargo, a pesar de su selectividad y extremada sensibilidad, en el análisis de alérgenos no son siempre útiles, ya que el contenido de ADN puede no estar relacionado con la concentración de gluten en alimentos. La relación de proteína-ADN varía dependiendo del grado de expresión genética de distintos cultivos de cereales y del tipo de procesamiento sufrido por el alimento. Por tanto, los métodos de análisis de ADN son siempre indirectos.

Mediante PCR se amplifica un fragmento de ADN que se pretende detectar. La elección de una adecuada secuencia diana hacia la que se dirige la amplificación, así como el diseño de cebadores y el tamaño del fragmento amplificado son de vital importancia para conseguir un resultado adecuado.

Los puntos fuertes de esta técnica son su alta sensibilidad, la identificación inequívoca de la especie de la que proviene el gluten, lo cual es muy importante en los casos en los que la presencia de gluten se debe a contaminación cruzada.

Los inconvenientes son la necesidad de personal cualificado e instrumentación sofisticada y que es una determinación indirecta, por lo tanto no cuantifica la presencia de gluten [19].

### **1.4.4. Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas permite detectar proteínas y péptidos con alta sensibilidad. Esta técnica es muy usada para identificar y caracterizar numerosas proteínas. Aunque la detección de alérgenos puede hacerse con la proteína intacta, es más sensible cuando las proteínas son transformadas en pequeños péptidos, los cuales pueden ser separados por cromatografía antes de entrar en el espectrómetro donde serán ionizados, mediante MALDI (matrix assisted desorption ionization) o electrospray, y detectados con TOF (time of flight) o cuadrupolo.

El fundamento del método de análisis de gluten se basa en la comparación de los perfiles de las proteínas extraídas del alimento frente a los perfiles característicos de las diferentes prolaminas extraídas de estándares de cereales.

Esta técnica tiene como ventajas su rapidez, facilidad en la manipulación de la muestra, reproducibilidad, precisión y que la interpretación rutinaria de los espectros es relativamente sencilla. Como desventajas se pueden citar el laborioso trabajo de crear bibliotecas de perfiles de espectros, la costosa instrumentación, compleja calibración del equipo, y que se requieren instalaciones amplias y personal cualificado para la manipulación del mismo [12, 19].

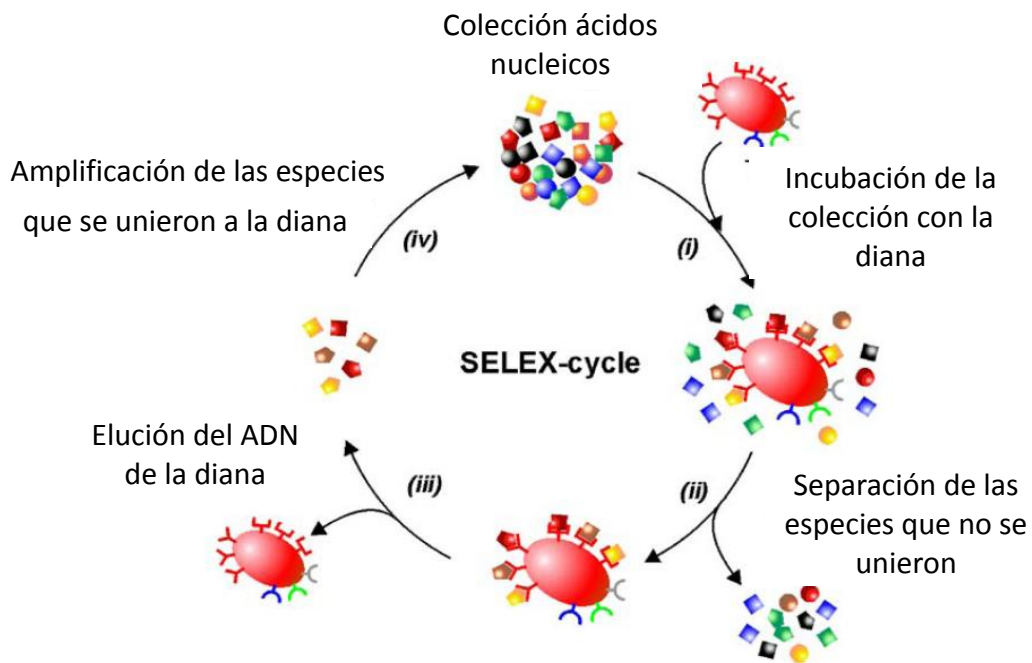
### **1.4.5. Tendencias actuales**

Hoy en día, empiezan a ser aplicadas nuevas metodologías en la detección del gluten en alimentos, basadas en biosensores, ya que estos dispositivos tienen como ventajas la posibilidad de automatizar la detección de gluten de una forma sencilla y rápida [12]. El presente trabajo se va a centrar en esta metodología.

**1.5. Aptámeros como elemento de reconocimiento molecular.**

Como alternativa a los tradicionales anticuerpos, en este trabajo se propone el uso de aptámeros como receptor molecular. Un aptámero es una secuencia corta de ADN o ARN, que adopta una estructura tridimensional característica y es capaz de enlazar con elevada selectividad y afinidad a una molécula determinada (proteínas, carbohidratos, moléculas pequeñas...).

Los aptámeros se obtienen a través de un proceso denominado SELEX por sus siglas en inglés, Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial. Este proceso comienza con la generación de una colección de ADN que contiene hasta  $10^{14}$ - $10^{15}$  oligonucleótidos de cadena sencilla de ADN o ARN diferentes.



**Figura 3.** Procedimiento general del método SELEX



La colección de oligonucleótidos de ADN se sintetiza de forma que los oligonucleótidos contengan N-nucleótidos al azar en el centro de sus secuencias, flanqueados por dos regiones constantes en cada extremo, denominadas cebadores, que servirán para su posterior amplificación. Durante la selección de los aptámeros, las moléculas diana se incuban con la colección de ADN para permitir el reconocimiento molecular entre las moléculas diana y los oligonucleótidos (etapa i en figura 3). En teoría, los aptámeros se unen con gran afinidad a las moléculas objetivo y los otros oligonucleótidos libres permanecen en la disolución. Debido a que el complejo aptamérico y los oligonucleótidos tienen distintas propiedades físicas, se pueden separar mediante métodos de partición (etapa ii en figura 3). Después de la separación de las hebras de ADN enlazadas de las no enlazadas, las secuencias unidas a las moléculas diana se eluyen del complejo (etapa iii en figura 3) y se amplifican mediante PCR (etapa iv en figura 3) para generar una colección de ADN, la cual tendrá una mayor afinidad por la diana aunque menor variedad de secuencias. Este proceso se suele repetir de 8 a 12 veces.

Los aptámeros identificados por el procedimiento de selección suelen tener de 80 a 100 nucleótidos incluyendo los cebadores. Sin embargo, no todos los oligonucleótidos de un aptámero juegan un papel crítico en la unión a su diana. Por ello, los nucleótidos no esenciales son eliminados posteriormente en estudios de truncado [20, 21].

En este trabajo se ha trabajado con aptámeros debido a sus numerosas ventajas frente a los anticuerpos. La primera de estas ventajas es que los aptámeros se obtienen por síntesis química, de una forma fácil y reproducible. Además, como se acaba de comentar, se obtienen tras una gran selección, en la cual sólo se mantienen los que mayor afinidad presentan hacia la molécula diana. En consecuencia, en el último ciclo, se consigue un reactivo con una alta afinidad y selectividad. Por otra parte, la conformación tridimensional que adquieren los convierte en moléculas de captura casi ideales, ya que pueden discriminar

moléculas con diferencias mínimas como los enantiómeros. Por último, los aptámeros tienen una estabilidad excelente en condiciones extremas de pH y temperatura [21].

Por todas estas razones, en los últimos años, los aptámeros han sido utilizados en numerosas aplicaciones analíticas y biomédicas [22].

### **1.6. Partículas magnéticas**

Las partículas magnéticas (MBs) se han convertido en una de las herramientas más versátiles como soporte sólido de bioensayos. Se trata de partículas de poliestireno con un núcleo de hierro que le proporciona su condición superparamagnética. Son partículas esféricas de tamaño micrométrico (diámetros 1 - 2,8  $\mu\text{m}$ ).

Comercialmente existen MBs modificadas con diversos grupos funcionales que pueden utilizarse para la captura de moléculas específicas y, actualmente, constituyen una herramienta muy potente en una gran variedad de aplicaciones analíticas y biotecnológicas relacionadas con la determinación de contaminantes en alimentos [23, 24].

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

En el tema de estudio que estamos abordando, las partículas magnéticas se van a utilizar como superficie sólida sobre la que inmovilizar el elemento de biorreconocimiento, con las ventajas que esto conlleva: mejoran notablemente el rendimiento de la reacción de afinidad debido a un aumento de la superficie de biorreconocimiento, y favorecen una cinética más rápida de interacción, ya que las partículas están en suspensión y el analito no tiene que migrar muy lejos durante

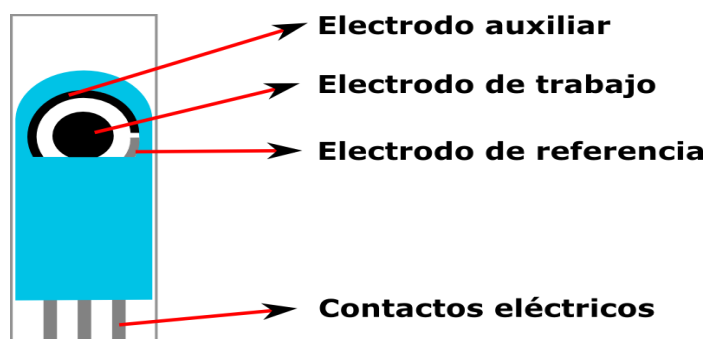
la interacción. Además, proporcionan una baja adsorción inespecífica y se minimiza el efecto matriz, debido a la alta eficiencia en la separación durante las etapas de lavado por acción de un campo magnético [25].

### 1.7. Electrodo serigrafiados

Desde principio de los años 90, la tecnología de serigrafado (screen-printing technology) ha sido muy utilizada en la industria microelectrónica para aplicaciones electroquímicas.

Los electrodos serigrafiados (SPEs), son el equivalente miniaturizado de una célula electroquímica tradicional que incluye tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y electrodo auxiliar. El uso de SPEs permite la producción de electrodos en masa de forma reproducible y más económica. Además, debido a su pequeño tamaño, las determinaciones electroanalíticas requieren volúmenes muy pequeños de muestra y reactivos para cubrir completamente la superficie de los 3 electrodos, lo que reduce el coste y consumo de reactivos, del orden de diez veces comparado con los métodos ELISA.

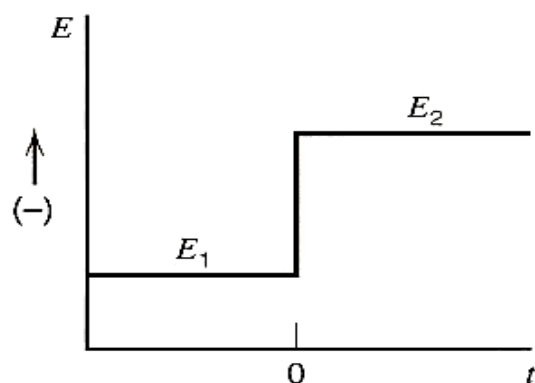
En este trabajo se emplearon dos tipos de electrodos (figura 4), uno con el electrodo de trabajo de oro y otro con el electrodo de trabajo de carbono.



**Figura 4.** Electrodo serigrafiado de carbono.

### 1.8. Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica electroanalítica sencilla muy empleada en el campo de los biosensores. En esta técnica la función de excitación es un salto de potencial, desde un valor inicial  $E_1$ , al cual no hay corriente debida a un proceso redox, hasta un segundo potencial  $E_2$ , al que tiene lugar la reacción de reducción u oxidación de la especie electroactiva (figura 5). Este proceso provoca un gradiente de concentración y por tanto un transporte de materia de la especie medida desde el seno de la disolución al electrodo. Tan rápidamente como la especie medida alcanza el electrodo es transformada, con lo que la velocidad de transformación de una especie a otra está controlada por la velocidad de difusión de la especie en disolución bajo la influencia del mencionado gradiente de concentración [26].



**Figura 5.** Señal de excitación empleada en cronoamperometría cuando la especie que se encuentra en disolución es oxidada.

Para un electrodo plano la dependencia corriente-tiempo viene definida por la ecuación de Cottrell:

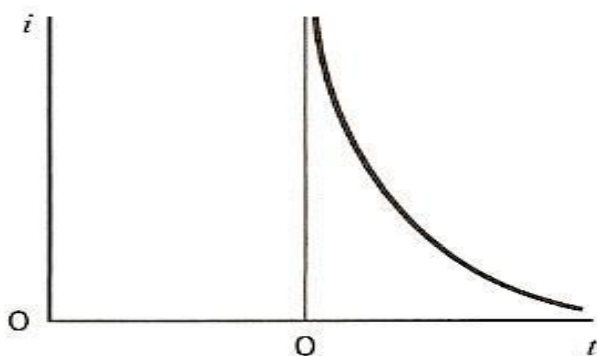
$$i_f(t) = \frac{nFAD^{1/2}C_o}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

Donde  $i(t)$  es la corriente faradaica y viene expresada en A,  $n$  es el número de electrones que intervienen en la reacción electroquímica,  $F$  la constante de Faraday ( $C \cdot mol^{-1}$ ),  $A$  es el área del electrodo en  $cm^2$ ,  $D$  es el coeficiente de difusión en  $cm^2 \cdot s^{-1}$ ,  $C_0$  es la concentración de analito en la disolución en  $mol \cdot cm^{-3}$ ,  $t$  es el tiempo transcurrido desde la aplicación del pulso de potencial.

La corriente que se registra contiene también una componente capacitiva, la cual disminuye de manera exponencial con el tiempo. En consecuencia, sólo es significativa a tiempos muy cortos. En la siguiente ecuación se expresa la variación de esta corriente en función del tiempo:

$$i_c(t) = \frac{\Delta E}{R} e^{-t/RC}$$

Donde  $R$  es la resistencia en ohmios y  $C$  la capacidad en faradios.



**Figura 6.** Respuesta corriente-tiempo (cronoamperograma)

En la figura 6 se representa un cronoamperograma para un proceso de oxidación, donde se observa el decaimiento exponencial de la corriente con el tiempo. Como se indicará más adelante, en el trabajo que nos ocupa, la oxidación del sustrato enzimático se lleva a cabo enzimáticamente y se mide la intensidad de corriente de reducción del producto oxidado previamente por la enzima.

## **2.-OBJETIVOS**

El objetivo fundamental de este trabajo de investigación se centra en el estudio de la interacción entre el aptámero Gli-1 y el péptido 33-mer que forma parte de la  $\alpha$ -gliadina, como base para el desarrollo de un aptaensayo electroquímico que permita llevar a cabo la determinación de la fracción inmunotóxica del gluten.

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

1. Preparación de una fase sensora, basada en el uso de partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, capaz de reconocer gluten empleando el aptámero Gli1 como receptor molecular y peroxidasa como marca enzimática para la detección cronoamperométrica del mismo.
2. Optimización de los parámetros más relevantes que afectan a la señal analítica.
3. Evaluación de las características analíticas del ensayo.

### **3.-EXPERIMENTAL**



### **3.1. Reactivos**

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por IDT (integrated DNA technologies).

Como soporte del ensayo se usaron partículas magnéticas de 1µm de diámetro funcionalizadas con estreptavidina, Dynabeads MyOne Streptavidin C1, adquiridas a Life Technologies.

Las disoluciones que se han empleado a lo largo del trabajo son:

- Disolución de afinidad: Tris HCl 50 mM, NaCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM.
- Disolución lavado partículas: 1x PBS, 0.01% Tween-20
- Disolución B: Tris HCl 50 mM, NaCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 0.01% Tween-20
- Disolución B&W: Tris HCl 10 mM, NaCl 2 M, EDTA 1 mM

Otros reactivos que se han usado junto con los necesarios para preparar estas disoluciones aparecen en la Tabla 2.

### **3.2. Material de laboratorio**

- Micropipetas automáticas de distinto rango de utilización.
- Pipetas de vidrio de distintos rangos de utilización.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Placas Petri

<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Ácido sulfúrico</b>	Merck
<b>Etanol</b>	Prolabo
<b>EZ-Biotin</b>	Thermo scientific
<b>Tween-20</b>	Sigma Aldrich
<b>10x PBS<sup>4</sup></b>	Sigma Aldrich
<b>Tris HCl</b>	Sigma Aldrich
<b>NaCl</b>	Sigma Aldrich
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Sigma Aldrich
<b>EDTA</b>	Sigma Aldrich
<b>Biotina</b>	Sigma Aldrich
<b>STR-HRP<sup>5</sup></b>	Sigma Aldrich
<b>Anticuerpo G12</b>	Biomedal
<b>3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)</b>	Sigma Aldrich

**Tabla 2.** Reactivos empleados durante el trabajo.

<sup>4</sup> La disolución 10x PBS está compuesta por una reguladora de fosfato 0.1 M de pH=7.4, NaCl 1.54M y está libre de ARNasas

<sup>5</sup> Las iniciales STR-HRP, corresponden al conjugado enzimático estreptavidina- peroxidasa de rábano silvestre

### **3.3. Instrumentación**

Los instrumentos utilizados durante el desarrollo del presente trabajo han sido:

-Potenciostato AutoLab PGSTAT 10, con software incorporado GPES versión 4.9.

-Electrodos serigrafiados de carbono DRP-110 de Dropsens.

-Electrodos serigrafiados de oro de Dropsens.

-Conector específico de Dropsens como interfase entre la celda serigrafiada y el potenciostato.

-Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10s UV-VIS. Se emplea para medir la concentración de aptámero tras la reconstitución del liofilizado comercial.

-Vortex. (Figura 7)



**Figura 7. Vortex**

- Agitador orbital, Dynal MX1. (Figura 8)



**Figura 8.** Agitador orbital para viales de 1.5 mL

-Imán para llevar a cabo la separación de las partículas en la disolución, DynaMag-2, con capacidad para 16 viales de 1.5 mL. (Figura 9)



**Figura 9.** Imán

### **3.4. Procedimientos experimentales**

En este trabajo se llevaron a cabo distintos procedimientos experimentales en función del aptaensayo que se quisiera generar.

#### **3.4.2. Modificación de las partículas magnéticas**

En primer lugar, se debe eliminar la disolución comercial de almacenamiento. Para ello las partículas magnéticas se someten a dos lavados, en los cuales se eliminan compuestos que podrían interferir a la hora de realizar la modificación.

Para lavar las partículas, se toman 25  $\mu\text{L}$  de la suspensión comercial de partículas magnéticas. Para que la cantidad de partículas sea lo más homogénea posible, se coge el volumen inmediatamente después de haber agitado la suspensión en un vortex. Los 25  $\mu\text{L}$  de partículas se transfieren a un vial de 1.5 mL, al que se le añaden 500  $\mu\text{L}$  de disolución de lavado y se incuban durante 2 minutos bajo rotación.

A continuación el vial se lleva al imán durante 2 minutos, con lo cual las partículas magnéticas quedan atrapadas sobre la pared del mismo. De esta forma se puede eliminar el sobrenadante sin problemas. Esta operación se realiza dos veces.

Seguidamente se procede a la modificación de las partículas, añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de aptámero biotinilado 2  $\mu\text{M}$  preparado en PBS 1x (dilución 1:10 de la comercial). Esta disolución se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo rotación. Transcurrido este tiempo se separa el sobrenadante con ayuda del imán.

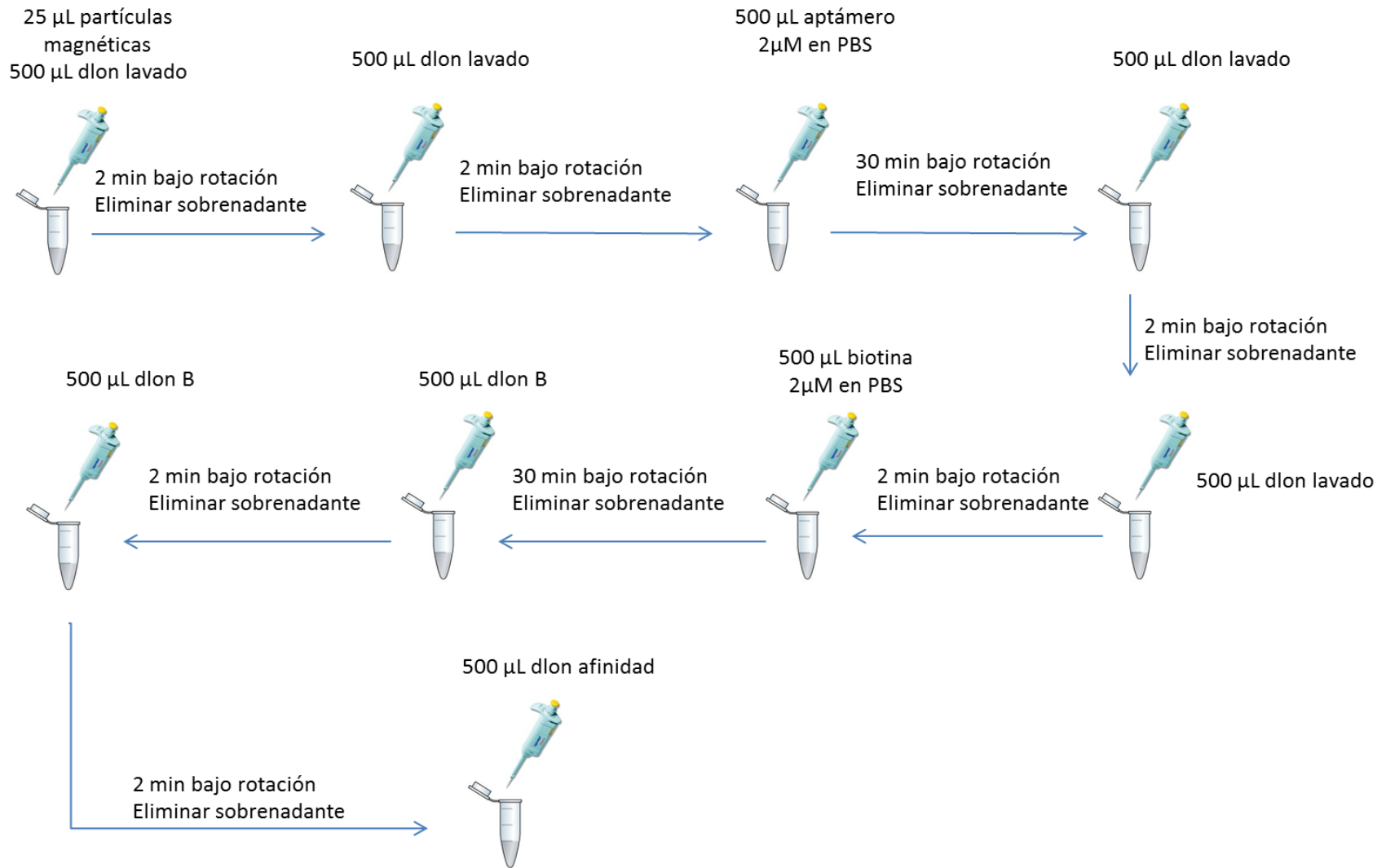
A continuación se lavan de nuevo las partículas magnéticas, se añaden 500  $\mu\text{L}$  de la disolución de lavado, se mantiene durante 2 minutos bajo rotación e inmediatamente después se llevan al imán para eliminar el sobrenadante. Esta etapa de lavado se realiza dos veces.

A continuación se bloquean los sitios de unión que hayan podido quedar libres en la estreptavidina que recubre las partículas magnéticas. Para realizar este bloqueo se usa una disolución con cantidades saturantes de biotina, 500  $\mu\text{M}$ , preparada en PBS 1x. Se añaden 500  $\mu\text{L}$  de esta disolución a las partículas magnéticas y se dejan 30 minutos bajo rotación en la rueda a temperatura ambiente.

Una vez ha pasado este tiempo se lleva el vial al imán, se elimina el sobrenadante. A continuación se lava dos veces, con la disolución B. El tween se añade para facilitar la separación de las partículas.

Después de los lavados se reconstituyen las partículas magnéticas en 500  $\mu\text{L}$  de disolución de afinidad. Esta suspensión se almacena a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

En la página siguiente aparece la figura 10, donde se esquematizan las etapas seguidas en la modificación de las partículas.



**Figura 10.** Etapas seguidas en la modificación de las partículas magnéticas.

### **3.4.3. Protocolo de ensayo**

El ensayo consiste en el reconocimiento entre el aptámero unido a las partículas magnéticas y el péptido 33-mer biotinilado, que contiene la fracción inmunotóxica del gluten. Para ello se cogen 30  $\mu\text{L}$  de partículas modificadas con aptámero y se le añaden 470  $\mu\text{L}$  de péptido biotinilado 2  $\mu\text{M}$ , esta mezcla se incuba durante 30 minutos bajo rotación a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la unión entre péptido y aptámero habrá tenido lugar. Por lo tanto se elimina el sobrenadante con la ayuda del imán. Este paso se corresponde con la segunda etapa de la figura 11. La primera etapa representa la modificación de las partículas con el aptámero biotinilado (sección 3.4.2.).

Seguidamente se lavan las partículas, añadiendo a las mismas 500  $\mu\text{L}$  de disolución B, incubando bajo rotación dos minutos y eliminando el sobrenadante. Este lavado se realiza dos veces.

### **3.4.4. Marcaje enzimático**

Una vez eliminado el sobrenadante tras las etapas de lavado, se procede al marcaje enzimático. Esta etapa, la tercera de la figura 11, se realiza con el conjugado STR-HRP. La estreptavidina se une a la biotina del péptido enlazado a las partículas. Para llevar a cabo esta etapa se añaden 470  $\mu\text{L}$  de STR-HRP, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  preparado en disolución de afinidad, a las partículas magnéticas que se encuentran en el vial tras la eliminación del sobrenadante. Se dejan 30 minutos bajo rotación a temperatura ambiente y, transcurrido este tiempo, se elimina el sobrenadante.

A continuación se procede al lavado de las partículas. En el primer lavado se añade a las mismas 500  $\mu\text{L}$  de disolución B, se incuba dos minutos bajo rotación y se elimina el sobrenadante. El siguiente lavado se lleva a cabo con disolución de afinidad, de manera idéntica. Las partículas que quedan una vez se elimina el sobrenadante se reconstituyen en 30  $\mu\text{L}$  de disolución de afinidad.



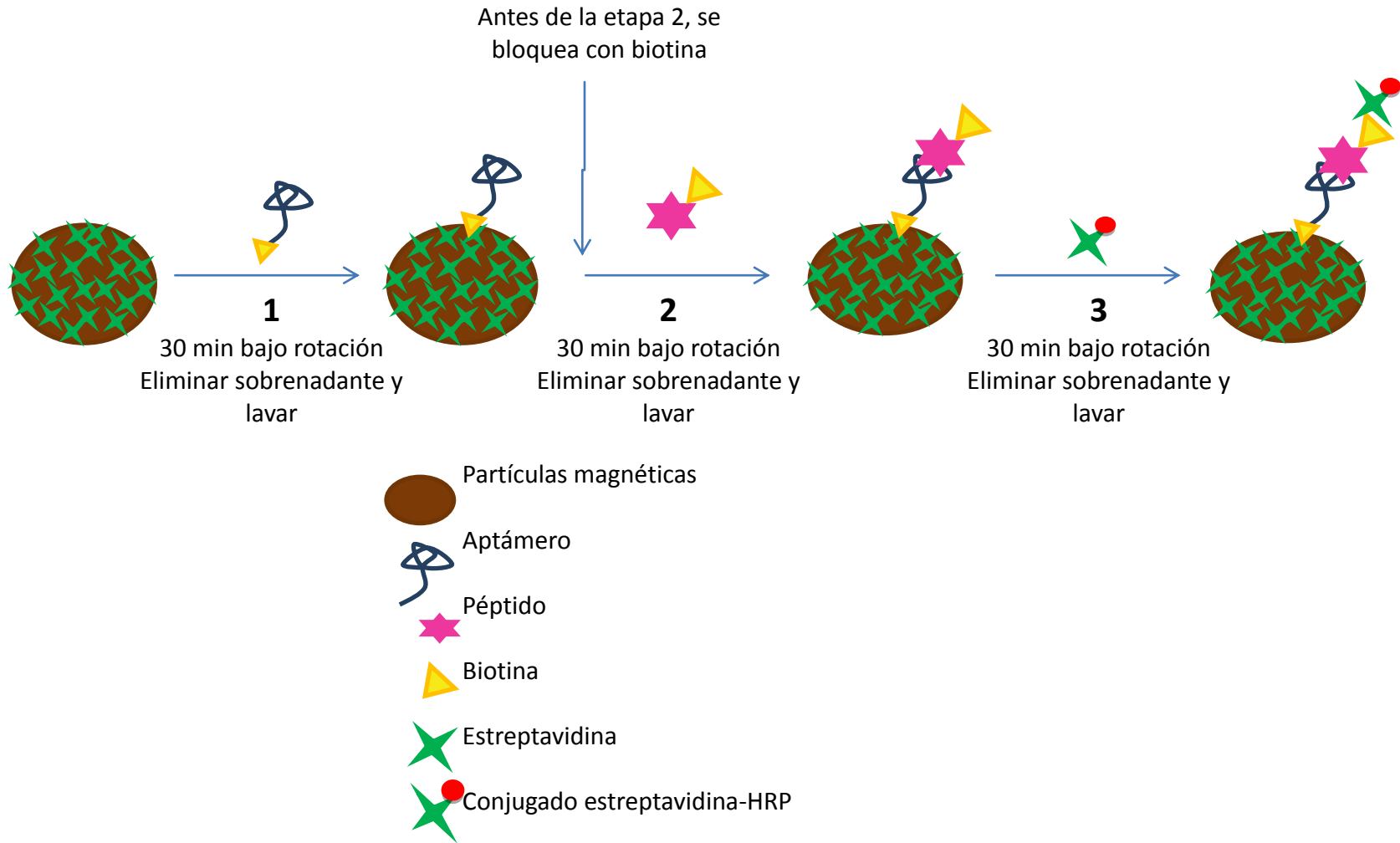


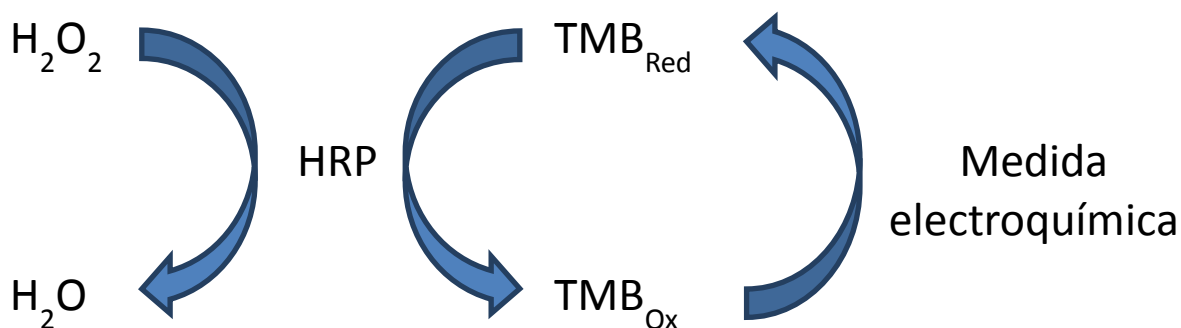
Figura 11. Esquema que muestra las distintas etapas del ensayo.

### 3.4.5. Detección

Para llevar a cabo la detección es necesario que todas las partículas magnéticas se encuentren sobre el electrodo de trabajo. Para ello se adhiere un imán de 4 mm de diámetro a la base del electrodo serigrafiado, justamente debajo del electrodo de trabajo. De esta forma se evita que las partículas se dispersen por el resto de la celda electroquímica.

Seguidamente se toman 10  $\mu\text{L}$  de las partículas magnéticas que están reconstituidas en la disolución de afinidad, se colocan en el centro del electrodo de trabajo, bajo el que se encuentra el imán, con lo cual las partículas quedan atraídas por acción del campo magnético. Se esperan dos minutos para asegurarnos que todas las partículas se encuentran bajo la acción del imán y se añaden 40  $\mu\text{L}$  del sustrato enzimático, TMB. Tras un minuto de reacción enzimática se mide cronoamperométricamente a 0 V el producto electroactivo generado enzimáticamente durante 60 segundos.

En esta medida el sustrato sufre un proceso de oxidación enzimática en presencia de peróxido, como puede verse en la figura 12. El producto generado es TMB oxidado, que es electroactivo y se reduce sobre la superficie del electrodo a TMB.

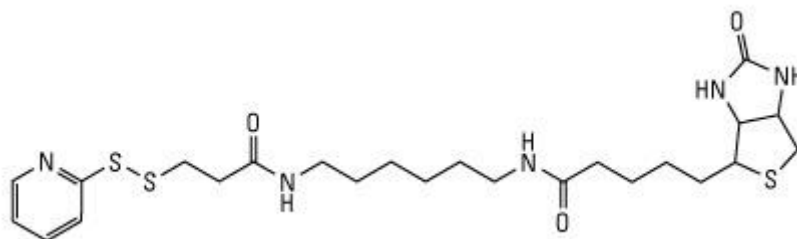


**Figura 12.** Reacciones que tienen lugar durante la detección.

## **4.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### 4.1. Selección del soporte de ensayo

Para este trabajo se estudiaron distintos soportes para la inmovilización del aptámero. El primer soporte que se probó fue un electrodo serigrafiado de oro sobre el cual se inmovilizó EZ-Biotin, cuya estructura se representa en la figura 13. Una vez que la EZ-Biotin se encuentra inmovilizada se añade estreptavidina, quedando los electrodos revestidos con esta molécula que a continuación se unirá al receptor de captura, el aptámero biotinilado. De esta forma, el electrodo ya está listo para inmovilizar el analito, el péptido con la fracción inmunotóxica, que se unirá al aptámero.



**Figura 13**, estructura correspondiente a la molécula EZ-Biotin.

Lo primero que hay que hacer en este tipo de ensayo es acondicionar el electrodo. Para ello hay que realizar 10 barridos cíclicos entre 0 y +1.25 V a 100 mV/s en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M hasta la obtención de un voltamperograma típico de una superficie de Au policristalino limpia.

El procedimiento de inmovilización del aptámero en el electrodo de oro se detalla a continuación:

1. Añadir 12  $\mu\text{L}$  de Ez-biotin 1  $\mu\text{M}$  al electrodo de trabajo y deja toda la noche en nevera, para que tenga lugar la modificación del electrodo.
2. Lavar el electrodo con  $\text{H}_2\text{O}$  y secar con  $\text{N}_2$
3. Añadir 12  $\mu\text{L}$  de estreptavidina 1  $\mu\text{M}$ , dejar durante 15 minutos
4. Lavar el electrodo con  $\text{H}_2\text{O}$  y secar con  $\text{N}_2$

5. Añadir 12  $\mu\text{L}$  de aptámero biotinilado 1  $\mu\text{M}$ , dejar durante 30 minutos
6. Lavar el electrodo con  $\text{H}_2\text{O}$  y secar con  $\text{N}_2$

A continuación se lleva a cabo el bloqueo de los sitios libres de la estreptavidina con lo que quedaría finalizada la preparación de la fase sensora.

7. Añadir 12  $\mu\text{L}$  de biotina 500  $\mu\text{M}$ , dejar durante 15 minutos
8. Lavar el electrodo con  $\text{H}_2\text{O}$  y secar con  $\text{N}_2$

El protocolo del ensayo es el siguiente:

9. Añadir 12  $\mu\text{L}$  de péptido 500 nM, dejar durante 30 minutos
10. Lavar el electrodo con  $\text{H}_2\text{O}$  y secar con  $\text{N}_2$
11. Añadir 12  $\mu\text{L}$  del conjugado enzimático Str-HRP, dejar durante 30 minutos
12. Lavar el electrodo con  $\text{H}_2\text{O}$  y secar con  $\text{N}_2$

Por último se realiza la medida electroquímica. En este caso, el potencial que se usa para la medida cronoamperométrica es de -0.2 V ya que se está trabajando con electrodos de oro, y el proceso redox del TMB en este tipo de electrodo está desplazado a potenciales negativos respecto a los de carbono. El tiempo de medida es de 60 segundos, después de haber esperado 1 minuto a que tenga lugar la reacción enzimática tras la adición de 40  $\mu\text{L}$  de TMB.

Las intensidades de corriente obtenidas en este ensayo son extremadamente bajas, tanto en el análisis del blanco como de la muestra, en torno a los 50 nA. Incluso por simple adsorción inespecífica del conjugado enzimático se esperarían corrientes más elevadas. Tras analizar estos resultados se pensó que podría deberse a degradación del conjugado enzimático, ya que estudios previos realizados en el laboratorio indican inequívocamente que el aptámero es capaz de reconocer al péptido. Para comprobar esta hipótesis se probó a realizar el mismo ensayo pero empleando el anticuerpo G12 comercial,

específicamente obtenido para reconocer al péptido 33-mer, el cual viene directamente marcado con la enzima peroxidasa.

Las intensidades de corriente obtenidas al llevar a cabo el ensayo con el anticuerpo son mayores que las obtenidas en el caso anterior (200-300 nA), pero siguen siendo muy bajas para poder considerarlas señales producidas por la detección de analito. La diferencia en intensidad de corriente se atribuye a la diferente actividad de la enzima. Además tampoco se observa diferencia entre la señal del blanco y del analito.

Como al cambiar el conjugado enzimático por el anticuerpo no se detecta diferencia en los resultados, se pensó que el problema del ensayo podría estar en los reactivos empleados para la inmovilización del receptor y no en el conjugado enzimático. Para poder determinar donde se encuentra el problema, se tendría que ir modificando uno a uno los reactivos empleados para esta inmovilización. Esto llevaría mucho tiempo por lo tanto se pasó a trabajar con partículas magnéticas, ya que se disponía de ellas en el laboratorio.

El procedimiento seguido para la detección del péptido con las partículas magnéticas es el que se explica en la parte experimental.

Al realizar este ensayo se obtienen señales más altas que las obtenidas hasta ahora y además son distintas para el blanco y para la muestra, como se puede ver en la tabla 2, con lo cual se decidió optar por este soporte de ensayo para seguir trabajando en la detección del péptido.

	Blanco	Péptido (2 $\mu$ M)
Intensidad ( $\mu$ A)	0.71	1.25

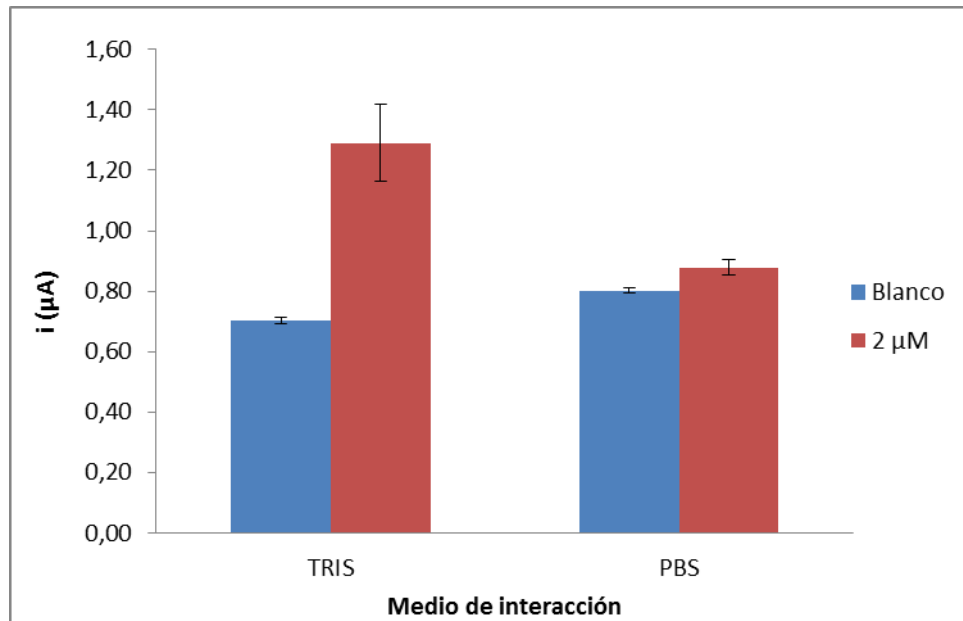
**Tabla 2.** Intensidades de corriente obtenidas sobre partículas magnéticas.

### **4.2. Efecto del medio de interacción**

En el ensayo realizado con partículas magnéticas se emplean distintas disoluciones, según se esté llevando a cabo la modificación de las partículas o la reacción de afinidad entre aptámero y péptido. Para la modificación de las partículas se usa PBS 1x, y una vez que concluye la modificación de las mismas se pasa a usar la denominada disolución de afinidad.

Se compararon los resultados que se obtienen al realizar el ensayo tal y como está explicado hasta ahora, con los resultados que se obtienen al usar durante todo el procedimiento la disolución de PBS 1x, sin modificar las concentraciones de tween que había en las disoluciones de TRIS.

En la figura 14 se comparan las corrientes medidas para el blanco y para una concentración de 2  $\mu\text{M}$  de péptido en ambos medios de reacción. Como puede verse en la gráfica, para la disolución de PBS, la diferencia entre la señal del blanco y de la disolución 2  $\mu\text{M}$  es muy pequeña. Por tanto, no es útil emplear esta disolución en el desarrollo del ensayo, ya que en dichas condiciones el aptámero no es capaz de reconocer al péptido o su unión no es lo suficientemente estable. En cambio usando la disolución de afinidad se observa una diferencia significativa entre blanco y la disolución 2  $\mu\text{M}$  de péptido.



**Figura 14.** Resultados obtenidos para las disoluciones de TRIS y PBS.

Estos resultados no están muy alejados de lo que se esperaba obtener, ya que la disolución de afinidad es la disolución que se usó en el proceso SELEX para el desarrollo del aptámero que ahora se está usando. En esta disolución es donde el aptámero adquiere una estructura tridimensional característica que permite el reconocimiento específico del péptido y por tanto, la reacción de afinidad se ve favorecida. Hay que destacar que la principal diferencia entre ambas disoluciones es un mayor contenido en NaCl así como la presencia de  $MgCl_2$  en la disolución de afinidad. Esto parece indicar que la presencia de estas sales es imprescindible para el reconocimiento molecular.

Una vez analizados los resultados obtenidos para las dos disoluciones, será la disolución de afinidad con la que se seguirá trabajando, ya que aporta mejores resultados.



### 4.3. Selección del aptámero de captura

Una vez seleccionadas las partículas magnéticas como soporte de ensayo y la disolución de interacción durante el ensayo, pasamos a evaluar el funcionamiento del aptámero, la sonda de captura. Para ello se comparó el comportamiento del el aptámero Gli1 directamente unido a biotina y del mismo aptámero Gli1 con separador entre éste y la biotina. Como separador se empleó una secuencia de 20 nucleótidos, que corresponde al cebador empleado durante la selección del aptámero mediante SELEX.

Se pensó que el aptámero con separadores podría dar mejores resultados ya que es inmovilizado a más distancia de las partículas magnéticas que el aptámero que no tiene separador. En consecuencia la interacción entre aptámero y péptido está más favorecida ya que se evita que haya impedimentos estéricos, provocados por la partícula magnética que dificulten la reacción de afinidad.

En la figura 15 se muestra una imagen en la que se intenta mostrar cómo sería la diferencia entre la disposición de las sondas de captura.

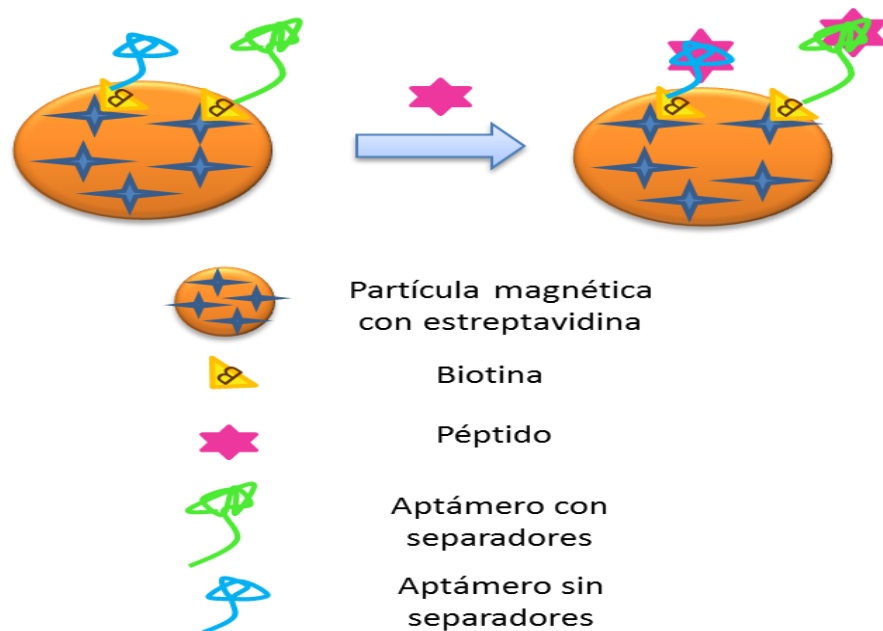
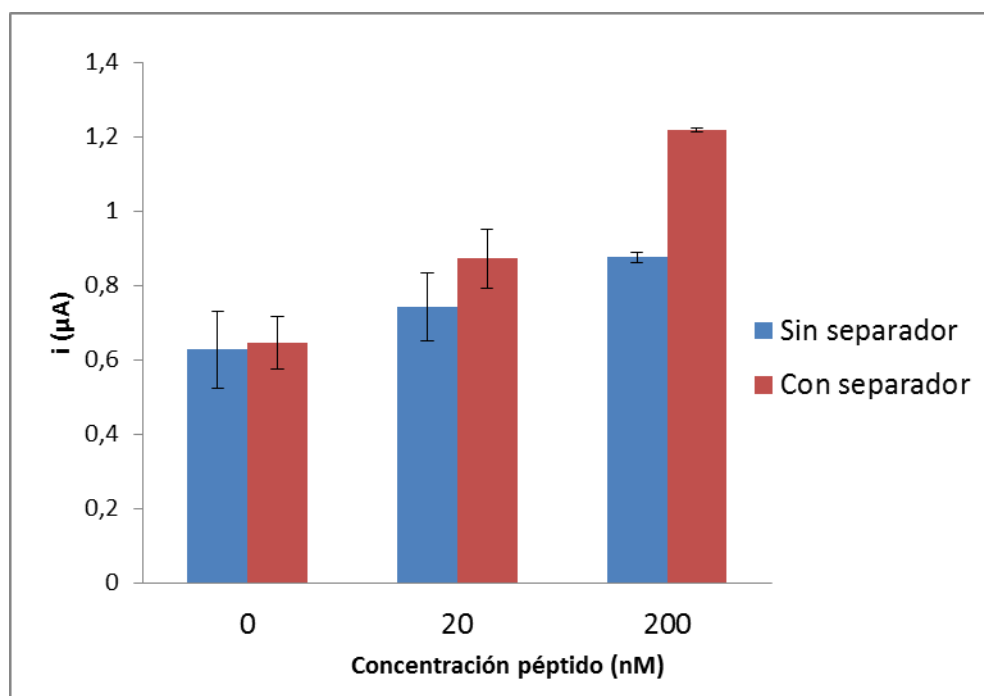


Figura 15. Comparación entre aptámeros de captura

Los resultados obtenidos al trabajar con una y otra sonda pueden verse en la figura 16 para diferentes concentraciones de péptido. En ella puede observarse que la intensidad de corriente al trabajar con el aptámero que tiene separadores aumenta respecto a trabajar con la sonda de captura que no los tiene. En el blanco, sin péptido, la intensidad de corriente es independiente del tipo de aptámero empleado. En cambio, la intensidad de corriente crece más rápidamente con la concentración de péptido en el caso del aptámero con separador.



**Figura 16.** Efecto del uso de separador entre el aptámero y la biotina sobre la señal analítica.

En consecuencia se podría decir que se observan impedimentos estéricos al usar el aptámero sin separador, que impiden una buena interacción entre la sonda de captura y el péptido.

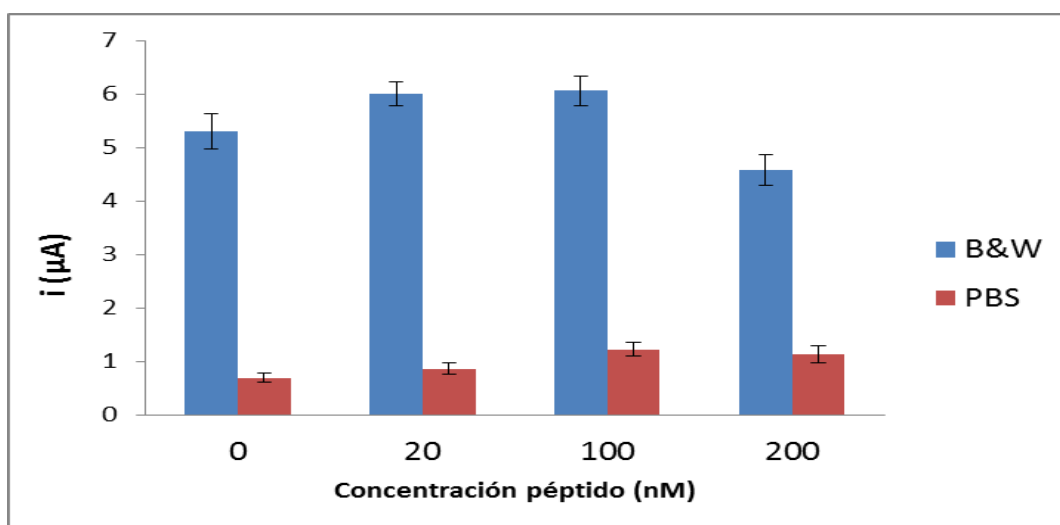
Para realizar el calibrado y seguir con el estudio del aptaensayo nos quedaremos con el aptámero que tiene separador, ya que es el que mejores resultados ha proporcionado.

### 4.4. Efecto de la cantidad de aptámero inmovilizado sobre las partículas magnéticas.

Tras haber seleccionado el soporte de ensayo, la disolución de interacción y la sonda de captura, se probó a modificar la cantidad de aptámero que constituye la fase sensora. Para conseguirlo se empleó una nueva disolución para llevar a cabo la modificación de las partículas magnéticas, que se denominará B&W, y que tiene una alta fuerza salina. Con este alto contenido en sales lo que se pretende es apantallar las cargas del ADN, de manera que se favorezca la unión de mayor cantidad de aptámero sobre las partículas magnéticas.

Para ver cómo se comportan las partículas magnéticas modificadas de esta forma, se compararon los resultados obtenidos usando la disolución B&W con los resultados que se obtienen con la disolución de PBS, que se usó hasta ese momento. El procedimiento a seguir en la modificación de las partículas es el mismo, sólo cambia la disolución de PBS por la de B&W, añadiéndole a esta última tween al 0.01% cuando sea necesario.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17.



**Figura 17.** Efecto de la cantidad de aptámero inmovilizado en las partículas magnéticas sobre la señal analítica.

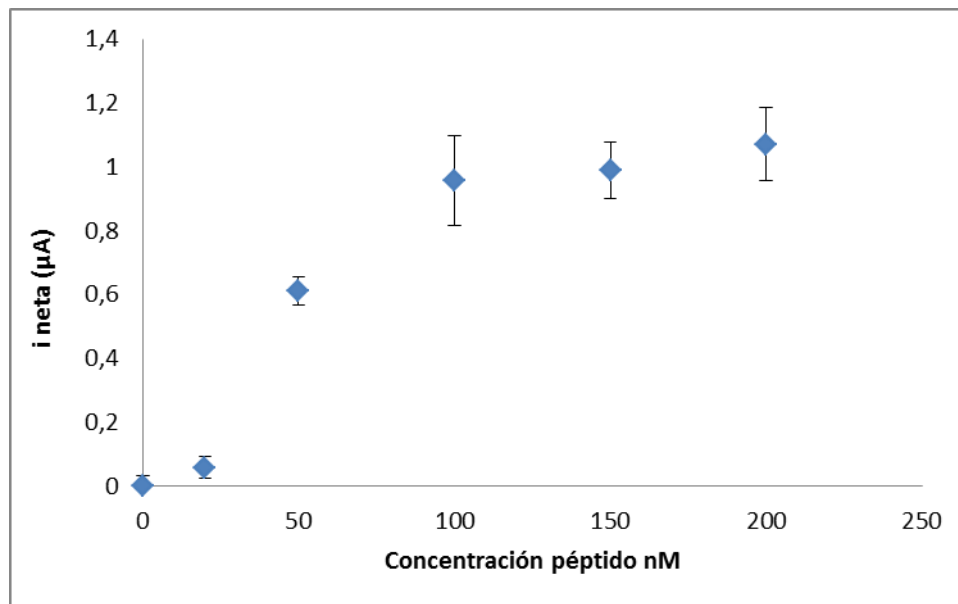
Las intensidades de corriente que se obtienen para la nueva disolución son muy altas en todos los casos, incluso para el blanco, y no hay diferencias de señal con la concentración. En cambio para la disolución de PBS, aunque las intensidades de corriente son más bajas, sí que se ve un aumento progresivo de la señal con la concentración. En estos momentos se desconoce la razón por la que las señales correspondientes al blanco crecen tan exageradamente por la simple presencia de mayor cantidad de ADN sobre las partículas. Por otra parte esta disolución es la indicada por la casa comercial que suministra las partículas magnéticas para inmovilizar ADN sobre ellas.

En consecuencia, en vista de los resultados, se utilizarán las partículas modificadas en PBS.

### **4.5. Características analíticas del aptaensayo**

Una vez que se han probado distintos tipos de disoluciones, sondas de captura y soportes, se lleva a cabo la evaluación de las características analíticas del aptaensayo, en las condiciones encontradas como óptimas.

Con el fin de evaluar dichas características de calibración (límite de detección, intervalo de linealidad y reproducibilidad) se realizaron medidas para cantidades crecientes de péptido en un intervalo de concentraciones comprendido entre 20 nM y 200 nM, manteniendo constante la cantidad de aptámero empleado, 2  $\mu$ M, en la modificación de las partículas magnéticas.



**Figura 18.** Curva de respuesta que representa la Intensidad de corriente medida a 0 V frente a la concentración de péptido.

En la figura 18 puede verse la respuesta del aptaensayo. La intensidad de corriente crece hasta 100 nM donde se alcanza la saturación de la capacidad de enlace de las partículas magnéticas.

Se intentó linealizar la curva de respuesta representando la intensidad de corriente frente al logaritmo de la concentración obteniéndose un pequeño intervalo lineal entre 20 y 100 nM cuyo ajuste de regresión es:

$$I (\mu A) = 1.29 \log[\text{péptido (nM)}] - 1.61$$

$$r^2 = 0.998$$

Con estos resultados el límite de detección es de 20 nM. La reproducibilidad obtenida, expresada como coeficiente de variación, es de un 4.3% para una concentración de 50 nM.

## ***5.-CONCLUSIONES***

Las conclusiones obtenidas al término del presente Trabajo Fin de Máster y de acuerdo con los objetivos propuestos han sido las siguientes:

Se ha diseñado una fase sensora para la detección de la fracción inmunodominante del gluten (péptido 33-mer) empleando un aptámero biotinilado como receptor molecular inmovilizado sobre partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina.

Se ha determinado que la interacción entre el aptámero y su diana, el péptido 33-mer, sobre partículas magnéticas requiere:

- que la interacción tenga lugar en la disolución empleada durante la selección del aptámero mediante SELEX, que contiene la composición y concentración de sales más adecuada para garantizar el mantenimiento de la estructura secundaria del aptámero que permite el reconocimiento entre éste y el péptido.
- que la secuencia aptámerica esté expuesta completamente a la disolución mediante el empleo de un espaciador entre ésta y la molécula que le sirve de anclaje al soporte, en este caso, biotina.

Este ensayo, que permite detectar 20 nM de péptido, constituye el primer paso hacia el desarrollo de un ensayo competitivo para la detección de gluten en muestras alimentarias.

## ***6.-REFERENCIAS***



1. <http://www.codexalimentarius.org/>
2. [http://www7.uc.cl/sw\\_educ/prodanim/digestiv/fii4c.htm](http://www7.uc.cl/sw_educ/prodanim/digestiv/fii4c.htm)
3. A. Parada, M. Araya. El gluten. Su historia y efectos en la enfermedad celiaca. Rev Med Chile 2010, 138, p: 1319-1325
4. Polanco, A. Libro blanco de la enfermedad celíaca. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. 2008
5. F. Casellas, Enfermedad celiaca. Medicina Clínica. 2006, 126, p: 137-142.
6. M. Martín, J.F. Cacho, A. Cepeda, F. Martín, I. Prieto, AESAN. 2010, 3.
7. <http://calgaryceliac.com/CCA/>
8. Kate E. Evans, David S. Sanders. Celiac disease. Gastroenterology Clinics of North America. 2012, 41, p: 639-650
9. D. R. Counts, V. S. Sierpina. Celiac disease/gluten intolerance. Explore. 2006, 2, p: 43-46.
10. E. Mendez, A. Hernando, M. Lombardía, M. C. Mena, J. R. Mújico. Últimos avances en la detección del gluten en los alimentos. Centro nacional de biotecnología CSIC. 2007.
11. Federación de asociaciones de celiacos de España. [www.celiacos.org](http://www.celiacos.org)
12. González, J. M, García, E. Fernández, J. L. Gago, L. Benito. Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos. Informe de vigilancia tecnológica. CEIM. Dirección General de Universidades e Investigación. 2007, p: 3-81.
13. Reglamento CE 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de los productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (D.O.U.E. 21.1.2009). Corrección de errores (D.O.U.E. 1.7.2009).
14. T. Thomson, E. Méndez. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. J Am Diet Assoc. 2008, 108, p: 1682-1687
15. R. van Eckert, E. Berghofer, P.J. Ciclitira, F. Chirido, S. Denery-Papini, H.J. Ellis, P. Ferranti, P. Goodwin, U. Immer, G. Mamone, E. Mendez, T. Mothes, S. Novalin, A. Osman, M. Rumbo, M. Stern, L. Thorell, A. Whim, H. Wieser. Towards a new gliadin reference material— isolation and characterization. Journal of cereal science. 2006, 43, p: 331-341

16. R. van Eckert, J. Bond, P. Rawson, C.L. Klein, M. Stern, T.W. Jordan. Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. *Journal of Cereal Science*. 2010, 51, p: 198–204.
17. A. A. Osman, H. Uhlig, I. Valdes, M. Amin. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2001, 13, p: 1189-1193
18. L. Sorell, J. A. López, I. Valdés, P. Alfonso, E. Camafeita, B. Acevedo, F. Chirido, J. Gavilondo, E. Mendez. An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Letters*. 1998, 439, p: 46-50.
19. C. Diaz-Amigo, B. Popping. Gluten and Gluten-Free: Issues and considerations of Labeling Regulations, Detection Methods, and Assay Validation. *Journal of AOAC International*. 2012, 95, p: 337-349
20. J. Zhou, M. R. Batting, Y. Wang. Aptamer-based molecular recognition for biosensor development. *Anal Bioanal Chem*. 2010, 398, p: 2471-2480.
21. N. de los Santos Alvarez, M. J. Lobo Castañon, A. J. Miranda- Ordieres, P. Tuñón Blanco. Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008, 27, p: 437-446
22. C. Daniel, F. Melaine, Y. Roupioz, T. Livache, A. Buhot. Real time monitoring of thrombin interactions with its aptamers: Insights into the sandwich complex formation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, 40 p: 186–192
23. S. Solé, A. Merkoçi, S. Alegret. New materials for electrochemical sensing III. Beads. *Trends in Analytical Chemistry*. 2001, 20, p: 102-109
24. E. Zacco, M.I. Pividori, S. Alegret. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Analytical Chemistry*. 2006, 78, p: 1780-1788.
25. M. Hervas, M. Angel Lopez, A. Escarpa, Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food: An anticipated analytical tool for food safety. *Analytica Chimica Acta*. 2009, 635, p: 167-172.
26. Química electroanalítica: Fundamentos y aplicaciones. J.M Pingarrón Carrazón; P. Sánchez Batanero. Editorial Síntesis S.A. Madrid, 1999.

## ***ANEXO I: Tablas de datos***

**Tabla 1.** Datos experimentales correspondientes a la figura 14.

Concentración (nM)	TRIS		PBS	
	i ( $\mu\text{A}$ )	Desv est. ( $\mu\text{A}$ )	i ( $\mu\text{A}$ )	Desv est. ( $\mu\text{A}$ )
0	0,70	0,01	0,80	0,01
2000	1,29	0,13	0,88	0,02

**Tabla 2.** Datos experimentales correspondientes a la figura 16.

Concentración (nM)	Sin separador		Con separador	
	i ( $\mu\text{A}$ )	Desv. est. ( $\mu\text{A}$ )	i ( $\mu\text{A}$ )	Desv. Est. ( $\mu\text{A}$ )
0	0,63	0,10	0,65	0,07
20	0,74	0,09	0,87	0,08
200	0,88	0,01	1,22	0,00

**Tabla 3.** Datos experimentales correspondientes a la figura 17.

Concentración (nM)	PBS		B&W	
	i ( $\mu\text{A}$ )	Desv. est. ( $\mu\text{A}$ )	i ( $\mu\text{A}$ )	Desv. est. ( $\mu\text{A}$ )
0	0,69	0,09	5,31	0,33
20	0,86	0,11	6,00	0,22
100	1,22	0,14	6,06	0,28
200	1,12	0,16	4,57	0,29

**Tabla 4.** Datos experimentales correspondientes a la figura 18.

Concentración (nM)	I neta ( $\mu\text{A}$ )	Desv. est. ( $\mu\text{A}$ )
0	0,00	0,03
20	0,06	0,03
50	0,61	0,05
100	0,96	0,14
150	0,99	0,09
200	1,07	0,11