



FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS

GRADO EN QUÍMICA

Detección de fraudes en alimentos empleando estrategias novedosas de amplificación y magnetobiosensores amperométricos

Daniel Cerna Asencio

Directores:

Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón

Catedrático (U.C.M.)

Dra. Susana Campuzano Ruiz

Profesora Contratada Doctor (U.C.M.)

Departamento de Química Analítica

Madrid, Julio del 2016

ÍNDICE

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. FOOD FRAUDS	1
1.1.1. Horse meat adulteration	3
1.1.2. Conventional methods for detecting food frauds	5
1.2. ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS.....	6
1.2.1. Electrochemical biosensors for food frauds detection	8
1.2.2. Electrochemical biosensors based on the use of magnetic beads.....	8
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	11
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	13
3.1. APARATOS, INSTRUMENTOS Y ELECTRODOS.....	13
3.1.1. Aparatos e instrumentos	13
3.1.2. Electrodos y accesorios necesarios para la realización de las medidas electroquímicas.....	13
3.2. MATERIAL Y REACTIVOS	14
3.2.1. Reactivos	15
3.2.1.1. <i>Analitos empleados</i>	15
3.2.1.2. <i>Reactivos empleados para la preparación del biosensor electroquímico</i> ...	15
3.2.1.3. <i>Reactivos empleados para la preparación de disoluciones</i>	16
3.2.1.4. <i>Muestras analizadas</i>	16
3.2.2. Preparación de disoluciones	17
3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	18
3.3.1. Fabricación de los biosensores	18
3.3.1.1. <i>Formato de hibridación tipo “sándwich”</i>	19
3.3.1.2. <i>Formato de hibridación DNA-RNA y reconocimiento mediante un anticuerpo selectivo a dúplex DNA-RNA</i>	20
3.3.2. Obtención de las medidas amperométricas	21
3.3.3. Análisis de muestras reales	23
3.3.3.1. <i>Extracción de ADN</i>	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24

ÍNDICE

4.1.	OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	24
4.1.1.	Formato de ensayo empleado	25
4.1.2.	Concentración de sonda de captura	27
4.1.3.	Tiempo de incubación con la sonda de captura.....	28
4.1.4.	Tiempo de incubación con target sintético.....	29
4.1.5.	Concentración del anticuerpo de detección.....	30
4.1.6.	Número de etapas	31
4.1.7.	Concentración del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.....	33
4.1.8.	Tiempo de incubación con la mezcla de anticuerpos.....	34
4.2.	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y OPERACIONALES DEL BIOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL TARGET SINTÉTICO	35
4.2.1.	Características analíticas	35
4.2.2.	Características operacionales	37
4.3.	ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES.....	38
5.	CONCLUSIONS.....	40
6.	BIBLIOGRAFÍA	41
7.	GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	45

1. INTRODUCTION

1.1. FOOD FRAUDS

A food fraud is any procedure or set of activities, which affected the quality of food offered, that is to say some quality parameters such foods are altered intentionally in order to gain more profit, reducing costs production and processing [Everstine et al., 2013]. The product offered must conform to consumer demands, final receiver chain that may have established a fraud.

Since ancient times, it is carried by altering the quality of some foods to turn a profit [Charlebois & Haratifar, 2015]. Today, Europe has experienced one of its biggest scandals of meat adulteration, the presence of horse meat in batches of beef [Falkheimer and Heide, 2015], [Le Vallée & Charlebois, 2015]. In the case of meat adulteration in Europe, the product quality was affected by the type of meat for which they wanted to sell; this adulteration affects confidence and customer.

Another of the most important cases was the case of China in 2008, where adulteration of milk consumption aimed at children was discovered. The fraud consisted of adding melamine to increase its nitrogen content and falsify the protein content of the milk. As a result, six children died and 294,000 others were affected [Guan et al., 2009]; [Qiao et al., 2012]; [Xiu & Klein, 2010]. This type of adulteration also represents a public health problem because consumption of these foods poses significant repercussions of human life as well as economic.

Due to the origin of some foods, mistrust comes from consumers and distributors, to the reputation of the countries where it has been found in exported food fraud [Charlebois et al., 2016].

Despite the efforts made to fewer food frauds it is very difficult to find or give real information as to the type of counterfeiting and the country making such forgery. This is because a small amount of exports under review, not a comprehensive analysis of food leaving each country is done. A significant fact is that in the case of the US, examines only

1. INTRODUCTION

less than two percent of imported food, i.e., almost all food coming into this country goes through strict quality controls. According to the global food source monitoring company Food Sentry, any country comes to inspect 50% of all imported food. For this reason, it becomes more difficult to find and determine some kind of food fraud [Food Safety News, 2014].

Even with some difficulties, Food Sentry has been able to obtain data on the main types of food where irregularities were found (see Figure 1.1). This graph corresponds to data for the year 2013.

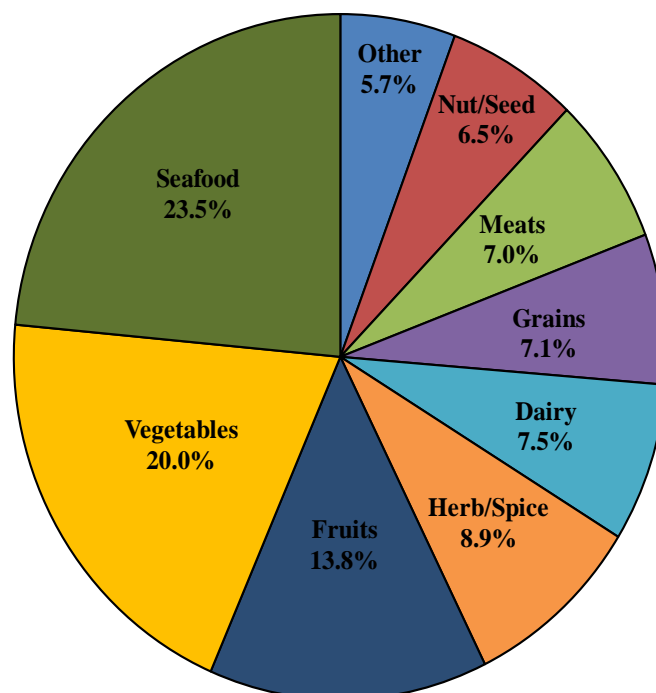


Figura 1.1: Violative food products in the world, 2013. Source: Food Sentry.

Each percentage corresponds to the number of offenses or irregularities found for each food sector. Of these, the one that matters highlight is the 7% for meat, this percentage covers offenses in the quality of all meat sold in the world, such violations are due to some type of fraud present, may be bad meat state or meat adulterated with banned additives, both factors separately or together, affect the quality of the food.

For the same year, 2013, another fact to take into account was the origin of food fraud by country. There is a percentage for each country whose food exports have been analyzed and quantified; of that fact, together with others, a percentage of global is obtained (Figure 1.2). Only the top 10 countries are represented.

1. INTRODUCTION

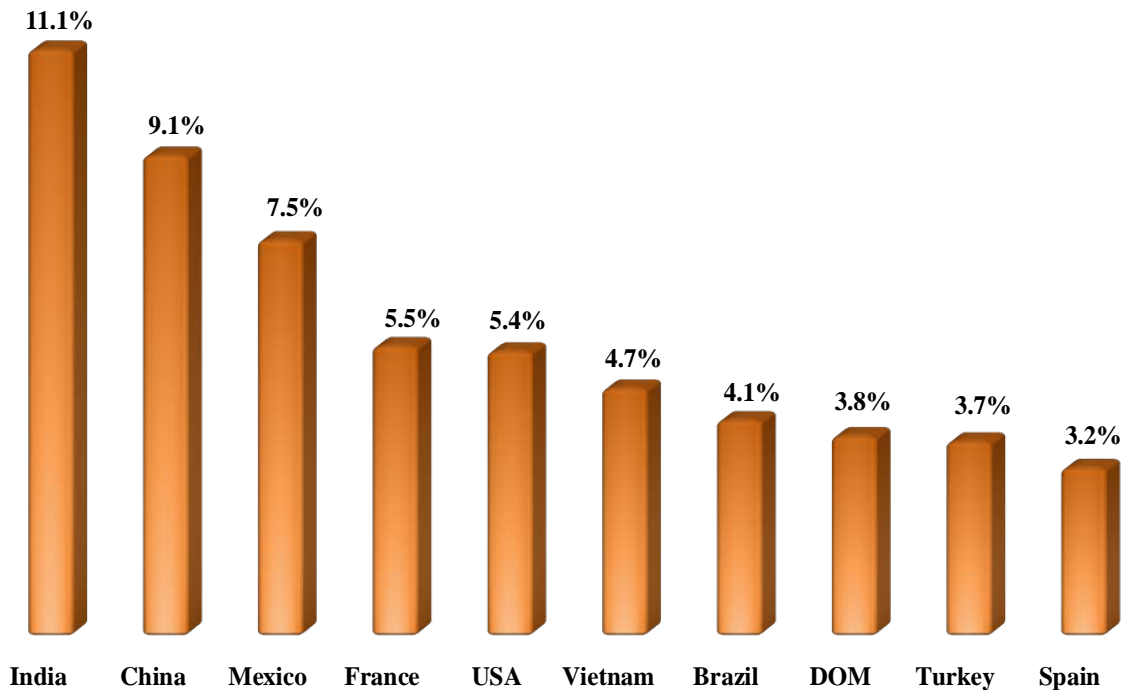


Figura 1.2: Top 10 countries with more irregularities found in the food produced for export, 2013.

Source Food Sentry.

India is first followed by China; the two Asian countries lead the top 10 countries with more irregularities found in the quality of food produced for export. In the last place of the top 10 is Spain with 3.2% of total world share.

1.1.1. Horse meat adulteration

Horse meat is consumed in many places because of its nutritional quality, although few countries produce it for human consumption.

Consumption and production of this type of meat is increasing in Western Europe, because it is an alternative to other types of meat, such as pork or beef; and the presence of n-3 polyunsaturated fatty acids [\[Belaunzaran et al., 2015\]](#).

In 2013, Food and Agriculture Organization of the United Nations estimated production of horse meat was the 0.25% of total meat production worldwide. Table 1 shows the percentage amounts of meat production by species. By continent, Asia produces 46%,

1. INTRODUCTION

America 30%, Europe 18%, Oceania 4% and Africa 2% of the total worldwide meat production [FAO, 2015b].

Table 1: Worldwide meat production (%) by species in 2013 [FAO, 2015b].

Species	Worldwide meat production (%)
Poultry (chicken, turkey, duck, birds, geese and guinea fowl)	34.4
Bovine	21.2
Ovine	2.77
Others (donkey, buffalo, camel, mules, other camelids and other rodents but no sea snails)	1.99
Goat	1.73
Rabbit	0.57
Equine	0.25
Game	0.65
Porcine	36.44

Adulteration with horse meat occurred when this meat is intentionally added to other animals' meat to increase the quantity and value of such meat. It is considered fraud because horse meat found is not present in the specifications of the meat purchased [Falkheimer and Heide, 2015].

These practices make the buyer obtained a different product from that pretended to purchase by paying a much higher cost.

The exact amount of horse meat adulterating other meats is not accurately known because being something illegal, there is no an official method which allows an exact estimation. Europe has found horse meat in beef, thus arousing suspicion and mistrust several meat producers in some large scale and according to La Organización de Consumidores y

1. INTRODUCTION

Usuarios (OCU) the presence of horse meat has been detected in burgers sold in some Spanish supermarkets [Vidales, 2013].

Some controls of the European Union carried out by a committee, highlighted that nearly 5% of the meat called beef contains horse meat.

According to Manuel Gonzalez, general secretary of the Asociación Profesional de Salas de Despiece y Empresas Cárnicas (APROSA), there is way to accurately determine the origin of horse meat present in beef because it is sliced and comminuted before being taken to the butcher shops.

Although it is known to be authorized for abattoirs horse slaughter, the track of the quantities entering and leaving is lost. Legally horse meat has to be marketed as such, but we know that is not always true, because of its low cost, therein lays the problem of adulteration of other meats.

1.1.2. Conventional methods for detecting food frauds

Several methods have emerged as a consequence of the increasing illegal adulteration of meat with horse meat in the market. These methods should be able to determine the presence of horse meat at very low concentrations and in different matrices.

One of the most used methods is identification of meat species in pet foods by using a real-time polymerase chain reaction (PCR)-based assay [Okuma et al., 2014]. This method has been used in USA to detect food fraud in the meat industry and revealed the intended presence of horse meat in minced beef for the production of burgers [Kane et al., 2016]. In particular, TaqMan[®] real-time PCR is commonly used with a detection limit (LOD) of 0.05% (w/w) for horse meat [Di Giuseppe et al., 2015].

Current methods are based on the separation of qualitative and quantitative characteristics that differentiates horse meat from other meats.

In Europe, due to the scandal produced in 2013 [Food Standards Agency, 2013], novel methods to identify horse meat even at trace amounts have emerged. However, the method that is still commonly used is the real-time PCR.

1. INTRODUCTION

Another method is one referred to the use of proteins, ELISA, an immunological technique used to determine the presence of different specific antibodies [Ballin, 2010].

Other interesting method analyzes difference in triglycerides from horse meat and beef by nuclear magnetic resonance spectroscopy of proton (^1H NMR) by using a simple extraction with chloroform. However, this methodology has not been extended to the detection of meats mixtures and the authors affirm that the differences in the overall fat content of the two species represent a considerable challenge [Jakes et al., 2015].

Moreover, a chromatographic method based on the use of a photodiode array detector (PDA) and on the separation of the myoglobins present in the mixture of meat has been used to detect horse meat with a LOD of 0.1% (w/w) [Di Giuseppe et al., 2015].

Horsemeat can also be detected by Raman Spectroscopy. Horse meat has characteristic amino acids which have a unique vibration band different from that of beef amino acids and by measuring the intensity of these bands the presence of horse meat from mixtures of (25-100) % (w/w) of horse meat could be distinguished [Zajac, 2014].

1.2. ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

A chemical sensor is a device capable of transforming analytical information in a measurable and analytically useful signal. Chemical sensors are composed usually by a chemical compound and a chemical-physical transducer [Cammann, 1977].

IUPAC defines a biosensor as a “*device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals*”.

Biosensors are chemical sensors where the recognition system uses a biochemical mechanism which gives their high selectivity and sensitivity [Turner et al., 1987].

A simplified diagram containing the main and essential components for operation of a biosensor is displayed in Figure 1.3. The main components are the bioreceptor, the transducer and the signal processor.

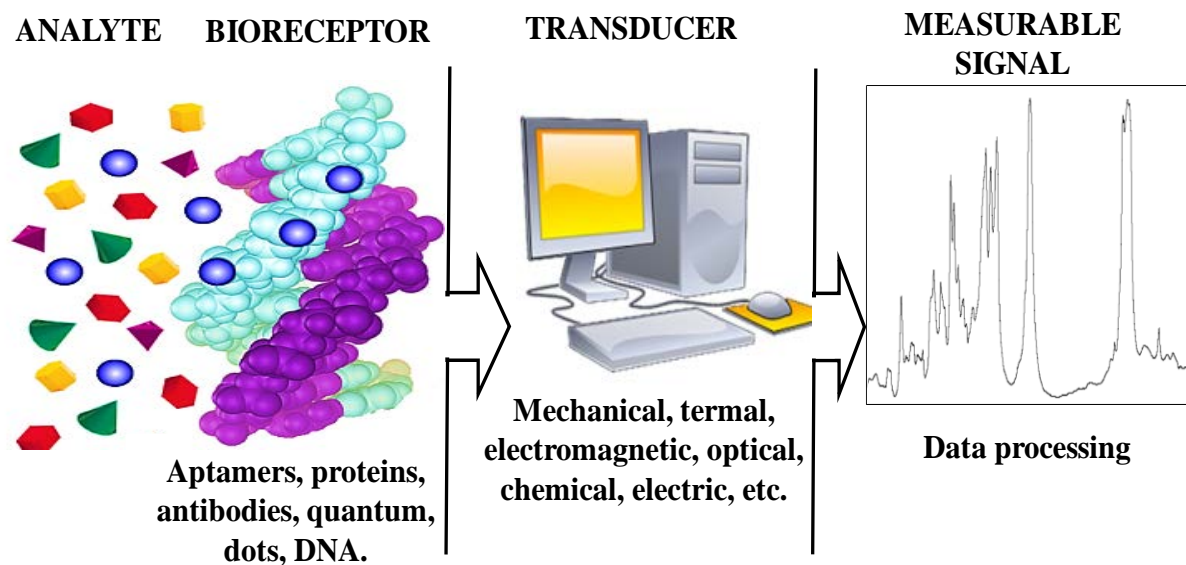


Figura 1.3: General diagram of a biosensor with a bioreceptor, transducer and signal processor.

Electrochemical biosensors are biosensors based on the use of electrochemical transducers which are used to transfer the signal charge obtained through the expression system thereof. Depending on the type of electrochemical transducers they can measure the voltage difference (potentiometric), electric current (amperometric), changes in resistance (conductimetric or impedimetric) and ion charge or field effect. Amperometric are the most common electrochemical biosensors [Bergveld and Thévenot, 1993].

Biosensors are designed to monitor directly the analyte, its biological activity or some inhibitor indirectly [Thevenot et al., 2001]. Fundamental characteristics of biosensors include high sensitivity and selectivity (determined by the affinity of the biological receptor by the target analyte) and short response times [Sharma et al., 2013].

Biosensors are classified in two groups depending on the nature of the biological recognition element: catalytic biosensors based on the use of enzymes, tissues or microorganisms as bioreceptor, and affinity biosensors which include the immunosensors (based on the use of antibodies) genosensors (based on the use of oligonucleotides) and biosensors based on the use of other affinity proteins [López et al., 2013].

1.2.1. Electrochemical biosensors for food frauds detection

One of the main fields for application of biosensors is the food industry. This sector generates great attention owing to the production of food intended for human consumption [Algieri et al., 2014].

Their main use is the determination of pollutants (not explicitly declared unfit or components) that may exist in food. Another widespread use is for the determination of origin of a food or a group of them [Apetrei and Ghasemi-Varnamkhasti, 2013].

Several laboratories are focused on the development and use of biosensors for rapid detection of different pollutants, ranging from bacteria or virus to harmful chemicals for humans [Rotariu et al., 2016].

It is also possible the real-time monitoring of food contaminants [El Ichi et al., 2009].

The origin or the determination of the species present in a sample of meat, is one of the major sectors where electrochemical biosensors are being applied for. The determination of various types of meats is possible using biosensors, able to discriminate between DNA fragments characteristics of different animal species in a meat mixture [Murugaiah et al., 2009]. Working times and costs have been reduced dramatically in these fields with the use of biosensors. For this reason, today there are many projects where the main goal is to manufacture biosensors for this purpose with greater reproducibility [Ahmed et al., 2010].

1.2.2. Electrochemical biosensors based on the use of magnetic beads

In the field of biosensors, in recent years there has been a big boost in the use of magnetic beads (MBs) as bioimmobilization platforms, biomolecular conveyors, separators and concentrators of various analytes, as well as to control electrochemical processes that occur at the electrode surfaces [Stanciu et al., 2009].

MBs are made of different materials and sizes (microspheres, nanospheres and ferrofluids), in which each magnetic field of atomic origin is produced by a dipole or a magnetic moment, staying all of them perfectly positioned and joined by a cohesive force.

1. INTRODUCTION

The magnetic materials are then covered with a thin shell of polymer that also serves to define a surface area for the adsorption or coupling of a large variety of molecules [Stanciu et al., 2009].

MBs are modified with the appropriate bioreceptors to capture in a selective and an efficient the target analyte is collected from the sample matrix.

These highly reactive materials of relatively low volume constitute a versatile tool in the development of biosensors, as they provide a large surface area for binding of recognition elements and specific analytes, which can then be easily separated from the liquid phase with a small magnet, and can be redispersed immediately after the magnet is removed. Therefore, the reagents that are not specifically link can be removed easily and efficiently by magnetically controlled washing, thus giving them utility for purification and preconcentration purposes [Erdem et al., 2005]. The use of magnetic microcarriers as attractive solid support to carry out the recognition events avoids also the need for delicate electrode preparation required to enable control of density and orientation of bioreceptors at the electrodic surface, minimizes non-specific adsorptions occurring in complex samples and allow faster kinetics, improving the performance of electrochemical biosensors in terms of sensitivity, reduced assay time and minimization of matrix effects [Zacco et al., 2006], [Ma et al., 2016]. Additional advantages of the use of MBs are the small sample volume of solution required for their modification and that the immobilization of the recognition element can be performed in large quantities in a single step and the coated MBs can be stored for several weeks without significant loss of activity. This is crucial when large number of samples have to be analyzed, and could lead to an important reduction of the analysis time.

Currently there are commercial available different types of MBs, modified with various ligands such as oligonucleotides, streptavidin and other proteins, as well as groups of high specificity of recognition, such as antibodies, for specific applications in bioaffinity reactions [Paleček and Fojta, 2007]. For example, there are magnetic microparticles modified with streptavidin (Strep) to interact with biotinylated molecules (Figure 1.4). Thanks to the possibilities MBs offered, they have been seamlessly integrated into the design of genosensors, immunosensors, enzymatic sensors and other affinity sensors.

1. INTRODUCTION

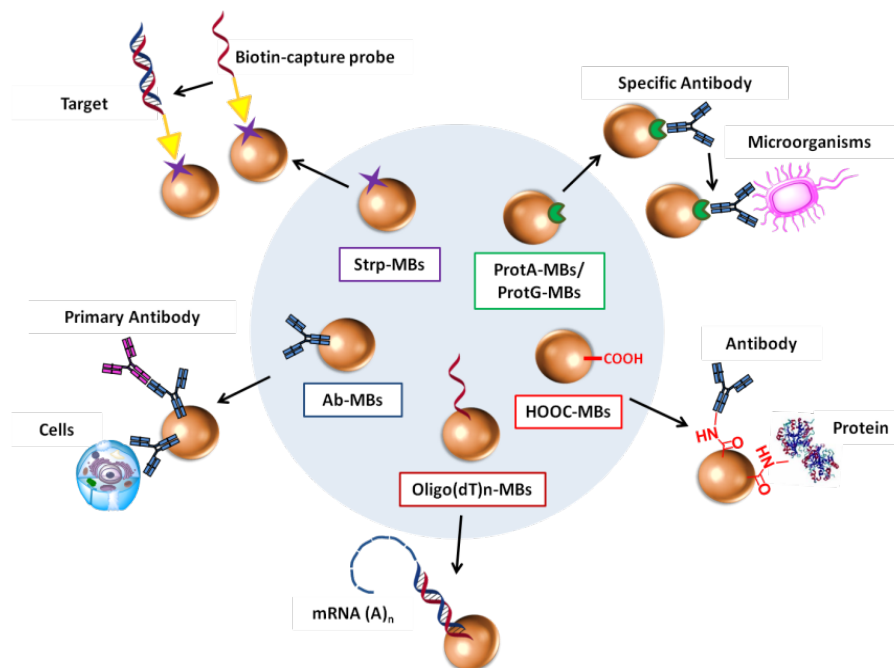


Figura 1.4: Examples of MBs modified with different recognition elements for various applications.

The coupling of MBs with electrochemical sensors has enabled to develop very sensitive and selective sensors with interesting applications in the food field. Particularly, biosensors, based on the coupling of MBs and disposable SPCEs, have demonstrated also to be promising approaches for the detection of specific protein and genetic biomarkers [Ruiz-Valdepeñas Montiel et al., 2015_a], [Ruiz-Valdepeñas Montiel et al., 2015_b], [Amaya-González et al., 2013].

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), en el grupo de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos y en colaboración con el grupo de Biotecnología de Plantas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM. Este Trabajo Fin de Grado, titulado: **“Detección de fraudes en alimentos empleando estrategias novedosas de amplificación y magnetobiosensores amperométricos”**, tiene como objetivo la implementación de nuevas plataformas biosensoras electroanalíticas para la detección de un fragmento de ADN específico de la región D-loop mitocondrial de caballo (*Equus ferus*), para su aplicación en la detección de adulteraciones con carne de caballo.

Uno de los mayores escándalos ocurridos recientemente en Europa por adulteración fue la presencia de carne de caballo en alimentos, lo que pone de manifiesto la necesidad de disponer de nuevas metodologías que permitan la detección sensible, selectiva, sencilla y rápida de este tipo de infracciones que afectan directamente a la confianza o salud de los consumidores.

La estrategia desarrollada se basa en el empleo de electrodos desechables y partículas micromagnéticas convenientemente modificadas con sondas de ADN o RNA específicas del fragmento a detectar y el marcaje del híbrido resultante con otra sonda de ADN y un conjugado enzimático comercial o un anticuerpo específico de híbridos de RNA/DNA acoplado a un secundario marcado enzimáticamente.

El plan de trabajo seguido para cumplir con los objetivos propuestos, consta de 3 etapas, que se describen brevemente a continuación:

1. Estudio sistemático y optimización de las diferentes variables que afectan a la preparación y al funcionamiento del biosensor desarrollado, así como a la respuesta amperométrica obtenida con el mismo.
2. Establecimiento de las características analíticas y operacionales del biosensor desarrollado en las condiciones experimentales optimizadas:

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

- Evaluación de la reproducibilidad y estabilidad.
- Determinación de las características analíticas, evaluando parámetros como la sensibilidad, precisión y límites de detección y cuantificación.

3. Estudios de selectividad

4. Aplicación a la determinación en muestras reales.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. APARATOS, INSTRUMENTOS Y ELECTRODOS

Los diferentes aparatos, instrumentos y electrodos empleados en este trabajo se describen a continuación.

3.1.1. Aparatos e instrumentos

- Incubador termostatzado con agitación, Optic Ivymen[®] System (Comecta S.A, Scharlab).
- Agitador tipo vórtex AGT-9 (Bunsen).
- pH-metro Basic 20+ (Crison).
- Termociclador, SensoQuest LabCycler (Progen Scientific Ltd).
- Concentrador magnético DynaMag[™]-2 (123.21D, Invitrogen Dynal AS).
- Potenciostato CHI812B (CH Instruments, Inc.), controlado mediante el software CHI812B.
- Agitador magnético MS01 (ELMI, Ltd.).
- NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies).
- Sistema de electroforesis horizontal: cubeta, portageles, peines y cables de corriente (Ecogen).
- Mortero de porcelana.
- Agitador térmico Universal Labortechnic.
- Autoclave Trade Raypa[®].
- Cabina de seguridad microbiológica Telstar BioSTAR (mod. AH-100).
- NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies).

3.1.2. Electrodoos y accesorios necesarios para la realización de las medidas electroquímicas

3. PARTE EXPERIMENTAL

- Electrodo serigrafiado de carbono (SPCEs) (DRP-110, DropSens) constituidos por un electrodo de trabajo de carbono ($\varnothing = 4$ mm), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de pseudo-referencia de Ag (Figura 3.1).
- Electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 M (Bioanalytical Systems, Inc.).
- Cable conector para electrodos serigrafiados (DRP-CAC 70499, DropSens).
- Soporte con imán de neodimio embutido para electrodos serigrafiados de fabricación propia.
- Célula de vidrio de 10 mL (Pobel).

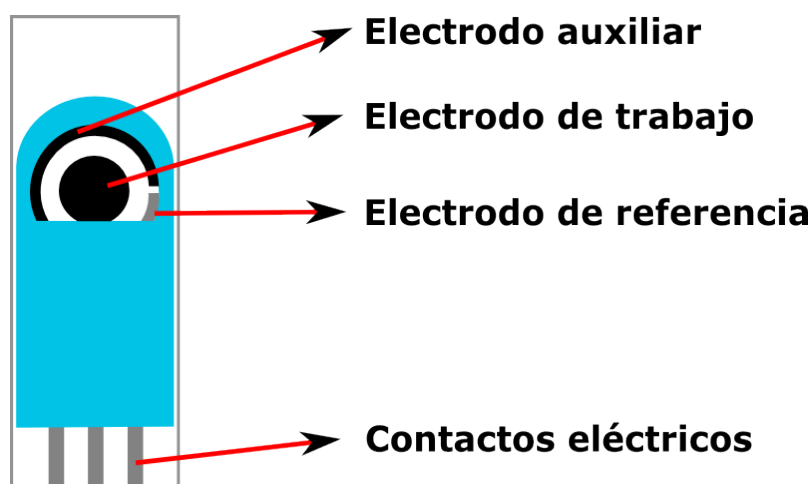


Figura 3.1: Diagrama esquemático de un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE, DRP-110, DropSens), indicándose sus diferentes componentes.

3.2. MATERIAL Y REACTIVOS

Todos los reactivos y disolventes empleados en este trabajo de investigación son de calidad para el análisis. Todas las disoluciones se han preparado con agua desionizada obtenida a partir de un sistema de purificación Millipore Milli-Q y, algunas que se indican, posteriormente esterilizadas a elevada presión y temperatura (1 atmósfera, 121 ° C) en un autoclave. Teniendo en cuenta el empleo de una sonda de captura sintética de RNA (b-RNACp) todos los reactivos y disoluciones necesarios para el desarrollo de los magnetobiosensores se han manipulado en una cabina de seguridad microbiológica para evitar su posible contaminación y degradación por ribonucleasas (RNasas).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. Reactivos

3.2.1.1. Analitos empleados

Los analitos empleados en este trabajo fueron suministrados por el grupo de Biotecnología de Plantas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Siendo adquiridos en un supermercado local y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación.

- Carne de caballo (*Equus ferus*).
- Carne de ternera (*Bos primigenius*).

3.2.1.2. Reactivos empleados para la preparación del biosensor electroquímico

- Partículas magnéticas comerciales modificadas con estreptavidina (**Strep-MBs**, 10 mg mL^{-1}), (Dynabeads M-280 Streptavidina, Invitrogen Dynal AS).
- Oligonucleótidos (Sigma). Todos los oligonucleótidos empleados se reconstituyeron tras su recepción en el volumen correspondiente de H_2O esterilizada para obtener una concentración final de $100\text{ }\mu\text{M}$ y se almacenaron en alícuotas de pequeño volumen ($5\text{ }\mu\text{L}$) a -20 (ADN) o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ARN), respectivamente.

Tabla 3.1: Oligonucleótidos empleados.

Oligonucleótidos	Nombre	Secuencia (5' → 3')
Sonda diana	Target _{horse}	ATAACACCATACCCACCTGACATGCAATA TCTTATGAATGGCCTATGT
Sonda de ADN de captura biotinilada	b-DNACp	Biotin-ACATAGGCCATTCATAAGATATTG
Sonda de ADN de detección biotinilada	b-DNADp	CATGTCAGGTGGGTATGGTGTTAT-Biotin
Sonda de ARN de captura biotinilada de 40 bp	b-RNACp-40	Biotin-ACAUAGGCCAUUCAUAAGAUUU GCAUGUCAGGUGGGUUAU
Sonda de ARN de captura biotinilada de 24 bp	b-RNACp-24	Biotin-ACAUAGGCCAUUCAUAAGAUUUUG

3. PARTE EXPERIMENTAL

- Conjugado de estreptavidina-peroxidasa (**Strep-HRP**, Roche, ref. 11 089 153 001, 500 U) reconstituido en 1.0 mL de agua estéril ($0.5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$).
- Anticuerpo selectivo de híbridos ADN-ARN (**anti-DNA-RNA**, Covalab, ref. mab0105/00015043).
- Anticuerpo secundario de detección conjugado con peroxidasa (**IgG-HRP**, Goat Anti-Mouse IgG Fc (HRP) ab97265, Abcam).

3.2.1.3. *Reactivos empleados para la preparación de disoluciones*

- Fosfato monosódico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99 %, Scharlab).
- Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4 , 99 %, Scharlab).
- Hidroquinona (HQ) (≥ 99.5 %, Sigma–Aldrich).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30 % v/v, Sigma–Aldrich).
- NaCl (99.8 %, Scharlab).
- KCl (Scharlab).
- Tween 20 (Sigma–Aldrich).
- Tris(hidroximetil)aminometano-HCl (Tris–HCl, 99%, Scharlab).
- NaOH (Scharlab).
- Ácido etilendiaminotetraacético (AEDT, Merck).
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, Sigma–Aldrich).
- Solución bloqueante comercial de caseína (PBS con caseína 1% (p/v)) (BB, Thermo Scientific, ref: 37528).

3.2.1.4. *Muestras analizadas*

Se analizaron los extractos de ADN mitocondrial o amplicones, obtenidos mediante PCR, de los diversos analitos estudiados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.2. Preparación de disoluciones

- **Disolución reguladora de PBS 10 mM (pH 7.5):** se prepara una disolución reguladora de fosfato 10 mM suplementada con NaCl 137 mM y KCl 2.7 mM. Para ello se disuelven 0.946 g de Na₂HPO₄, 0.399 g de NaH₂PO₄, H₂O, 8.006 g de NaCl y 0.201 g de KCl en 1 L de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora de PBST 10 mM (pH 7.5):** se prepara una disolución de PBS 10 mM suplementada con Tween 20 0.05 % (v/v).
- **Disolución reguladora de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2):** se disuelven 0.788 g de Tris-HCl en 50 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora Binding and Washing (B&W, pH 7.5):** se prepara una disolución reguladora Tris-HCl 10 mM suplementada con EDTA 1 mM y NaCl 2 M. Para ello se disuelven 0.39 g de Tris-HCl, 0.09 g de AEDT y 29.22 g de NaCl en 250 mL de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora de fosfato 1.0 M (pH 6.0):** se prepara disolviendo 8.44 g de Na₂HPO₄ y 129.79 g de NaH₂PO₄. H₂O en 1 L de agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0):** se prepara por dilución de la disolución reguladora de fosfato 1.0 M en agua desionizada, ajustándose el pH con NaOH 2.0 M.
- **Disolución de HQ 100 mM:** se disuelven 22 mg de HQ en 2.0 mL de disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0). Esta disolución se prepara diariamente momentos antes de llevar a cabo la medida electroquímica y se almacena en un frasco topacio para asegurar su estabilidad.
- **Disolución de H₂O₂ 0.1 M:** se diluyen 51 µL de la disolución comercial al 30% (p/v) en 5 mL de disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6.0). Esta disolución se prepara diariamente e inmediatamente antes de su utilización.
- **Disoluciones de b-DNACp, b-DNADp, b-RNACp-40, b-RNACp-24 y Target_{horse} sintético:** se preparan por dilución adecuada de cada disolución reconstituida de 100 µM, en H₂O esterilizada.
- **Disolución de conjugado Strep-HRP 0.5 mU µL⁻¹:** se prepara por dilución adecuada (1/1,000) de la disolución reconstituida del conjugado de Strep-HRP comercial (0.5 U µL⁻¹) en BB.

3. PARTE EXPERIMENTAL

- **Disolución de los anticuerpos de detección anti-DNA-RNA ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) e IgG-HRP ($0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$):** se prepara por dilución adecuada (1/500) y (1/2,500), respectivamente de la disolución reconstituida de anti-DNA-RNA (1 mg mL^{-1}) y disolución comercial IgG-HRP (1 mg mL^{-1}) en BB.
- **Solución I:** se prepara una disolución reguladora de Tris-HCl 25 mM suplementada con glucosa y EDTA 50 mM 10 mM respectivamente en H₂O ajustándose a pH 8.0 con NaOH 2 M.
- **Solución MLB:** se prepara una disolución reguladora de Tris-HCl 10 mM suplementada con NaCl y Na₂EDTA 150 mM y 50 mM respectivamente en H₂O ajustándose a pH 8.0 con NaOH 2 M.
- **Solución SDS:** se prepara una disolución 2 % (p/v) SDS y 0.4 M NaOH.
- **Solución III:** se prepara diluyendo 29.5 mL ácido acético glacial y añadiendo KOH hasta pH de 4.8 en 100 mL de H₂O.

3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.3.1. Fabricación de los biosensores

En este Trabajo Fin de Grado se ha realizado la implementación de un biosensor para la determinación de un fragmento específico de ADN mitocondrial de caballo.

Esta metodología está basada en el empleo de un formato de hibridación de la secuencia de interés con una sonda biotinilada de ARN complementaria inmovilizada previamente sobre MBs, el posterior reconocimiento del dúplex de ADN-ARN formado por un anticuerpo selectivo a este tipo de dúplex y el marcaje de éste con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La metodología desarrollada ha sido comparada con un biosensor basado en un formato de hibridación tipo “sándwich” de la secuencia de interés con sondas biotiniladas de ADN de captura y detección complementarias, realizándose el marcaje de estas con un conjugado comercial de Strep-HRP.

A continuación, se describe en detalle la preparación de ambos formatos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1.1. Formato de hibridación tipo “sándwich”

Las MBs comerciales empleadas en este trabajo están funcionalizadas con estreptavidina (Strep-MBs). La estreptavidina es una proteína tetramérica que presenta una elevada afinidad por la biotina, permitiendo la unión específica y eficiente de la b-DNACp biotinilada a la superficie de las partículas magnéticas.

Para la modificación de las Strep-MBs se depositan 5 μL de la suspensión comercial de Strep-MBs en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se realizan 2 lavados con 100 μL de la disolución reguladora B&W (pH 7.5). En cada etapa de lavado se requiere la agitación manual de las partículas para asegurar su resuspensión y su posterior imantación durante 3 min en un concentrador magnético, para la eliminación del sobrenadante sin pérdida de las mismas.

A continuación, las MBs se resuspenden en 100 μL de disolución b-DNACp 0.1 μM preparada en B&W (pH 7.5 filtrado) incubándose durante 30 minutos (37° C y 950 rpm). Transcurrido este tiempo se retira el sobrenadante y las partículas magnéticas modificadas (b-DNACp-MBs) se lavan 3 veces con 100 μL de BB, siguiendo el procedimiento comentado anteriormente.

Las partículas magnéticas modificadas (b-DNACp-MBs) se resuspenden en 25 μL del target sintético o muestra suplementados con la b-DNADp (0.25 μM) preparadas en BB y se incuban durante 30 minutos (37 °C, 950 rpm), produciéndose la hibridación de la secuencia de interés con la sonda de captura, inmovilizada sobre las partículas magnéticas, y con la sonda de detección en disolución (b-DNADp/Target/b-DNACp-MBs). A continuación, se retira el sobrenadante y se realizan 3 lavados con 100 μL de BB.

Posteriormente, se realiza el marcaje enzimático del híbrido formado realizándose la incubación de las b-DNADp/Target/b-DNACp-MBs en 50 μL de Strep-HRP (0.5 mU μL^{-1} , preparada en BB), durante 30 minutos (37 °C, 950 rpm).

Para finalizar, se retira el sobrenadante y se realizan 3 lavados con 500 μL de PBST, incubándose 5 min en agitación constante (37 °C, 950 rpm). Por último, las Strep-HRP/b-DNADp/Target/b-DNACp-MBs se resuspenden en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0) para llevar a cabo la medida amperométrica.

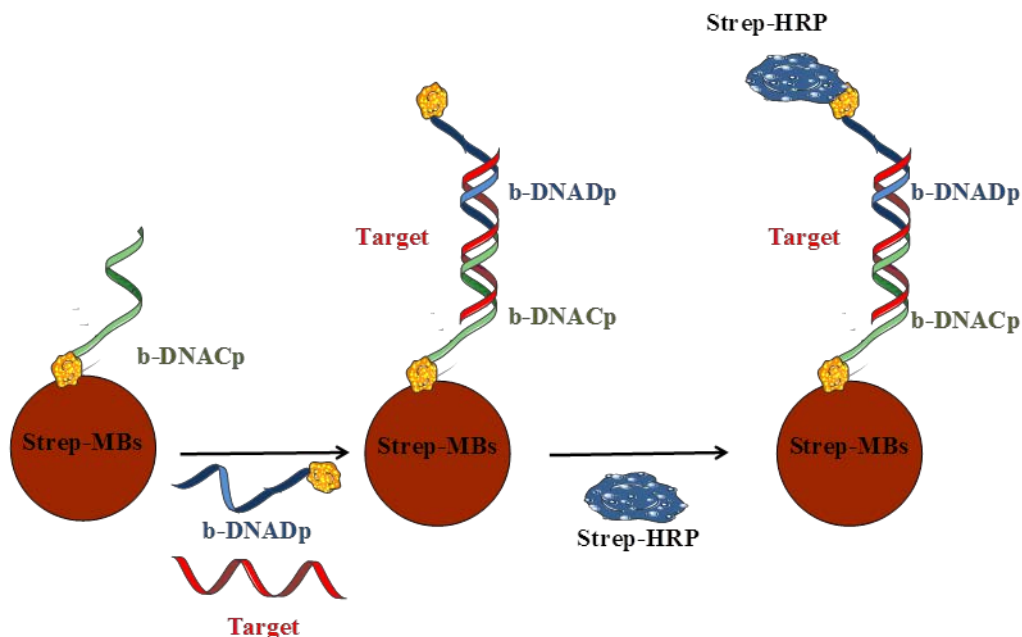


Figura 3.2: Etapas de modificación de las b-DNACp-MBs para la fabricación del biosensor: hibridación tipo “sándwich” del target con la b-DNACp inmovilizada sobre las MBs y la b-DNADp y marcaje enzimático del híbrido formado con la Strep-HRP.

3.3.1.2. Formato de hibridación DNA-RNA y reconocimiento mediante un anticuerpo selectivo a dúplex DNA-RNA

El protocolo de fabricación de este biosensor, al igual que el descrito en el apartado 3.3.1.1, está basado en el empleo de MBs funcionalizadas con estreptavidina como microsoporte magnético para su elaboración.

Para la modificación de las MBs, se depositan 5 μL de Strep-MBs en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, realizándose 2 lavados con 50 μL de B&W. A continuación, se incuban con 25 μL de disolución b-RNACp40 0.1 μM (preparada en B&W filtrado) durante 60 min (37 $^{\circ}\text{C}$, 950 rpm).

Tras la modificación de las MBs con la sonda de captura biotilada (b-RNACp40-MBs), se retira el sobrenadante y se realizan 2 lavados con 50 μL de BB cada lavado.

Las b-RNACp-40-MBs resultantes se resuspenden en 25 μL de la disolución que contiene la concentración de target sintético o cantidad de muestra deseada (preparadas en

3. PARTE EXPERIMENTAL

BB) y se incuba durante 30 min (37 °C, 950 rpm). Posteriormente se retira el sobrenadante y se realizan 2 lavados con 50 μ L de BB. A continuación, se marcan los dúplex DNA-RNA formados sobre la superficie de las MBs (Target/b-RNACp-40-MBs) con un anticuerpo selectivo a estos dúplex DNA-RNA que es reconocido a su vez por un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Para ello las MBs modificadas se incuban con 25 μ L de la mezcla de anticuerpos anti-DNA-RNA e IgG-HRP (2.0 y 0.4 μ g mL⁻¹, respectivamente, preparada en BB) durante 30 minutos (37 °C, 950 rpm). Tras finalizar el tiempo de incubación, se retira el sobrenadante y se realizan 2 lavados con 50 μ L de BB. Por último, las MBs modificadas se resuspenden en 50 μ L de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0) para llevar a cabo la medida amperométrica.

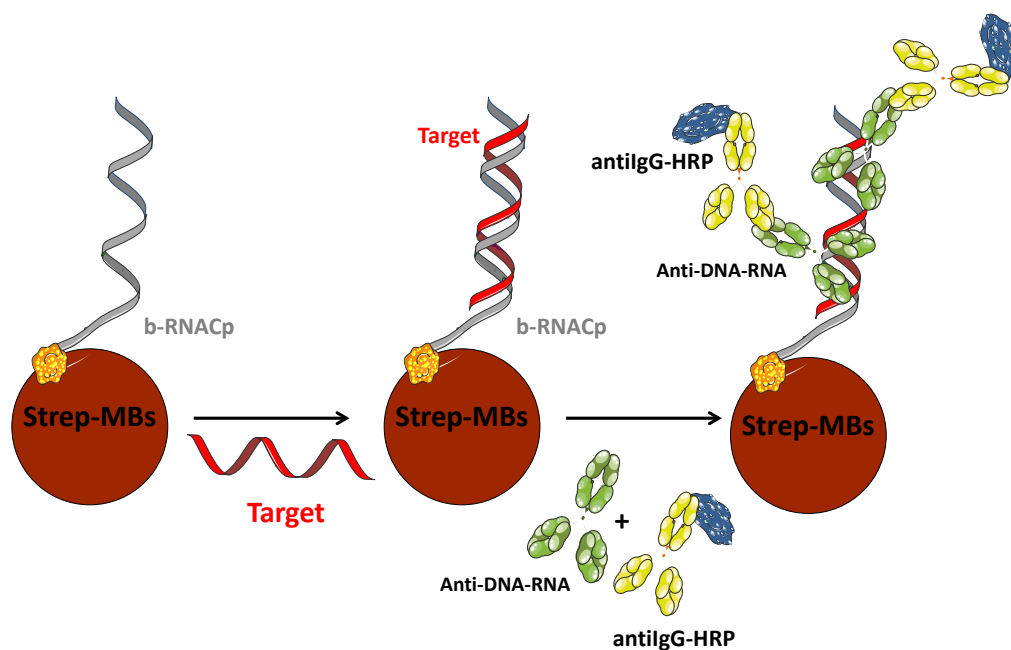


Figura 3.3: Etapas de modificación de las b-RNACp-40-MBs para la fabricación del biosensor basado en el empleo de un anticuerpo selectivo a dúplex RNA-DNA, describiéndose las etapas de hibridación RNA-DNA y reconocimiento y marcaje enzimático del dúplex formado sobre la superficie de las MBs por parte de anticuerpos específicos.

3.3.2. Obtención de las medidas amperométricas

Para la obtención de las medidas amperométricas se emplea el mismo procedimiento independientemente del formato de ensayo empleado.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Las MBs modificadas y resuspendidas en 50 μL de disolución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.0) se depositan sobre la superficie del electrodo de trabajo de un SPCE, con ayuda de un imán de neodimio embutido en un soporte que asegura la captura magnética de las mismas de forma estable y reproducible (Figura 3.4). El conjunto carcasa-electrodo se conecta al cable conector y se sumerge en una célula de medida que contiene una barra agitadora y 10.0 mL de la disolución reguladora de fosfato 50 mM e HQ 1 mM (preparada justo antes de la medida electroquímica). La disolución se mantiene bajo agitación mecánica constante, se aplica una diferencia de potencial de -0.20 V (frente a un electrodo de referencia de Ag/AgCl) y se espera hasta alcanzar la estabilización de la corriente de fondo. A continuación, se adicionan 50 μL de una disolución de H_2O_2 0.1 M y se registra la variación de corriente hasta que se alcanza el estado estacionario ($\sim 100\text{ s}$ tras la adición) [Conzuelo, 2012], [Gamella, 2013].

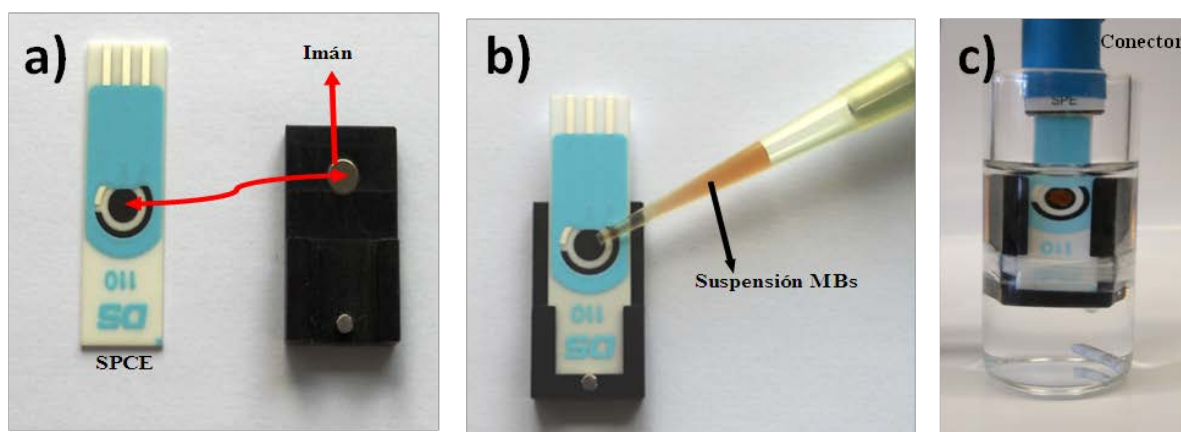


Figura 3.4: Carcasa con imán de neodimio, electrodo serigrafiado de carbono empleado para la obtención de las señales amperométricas a) y captura magnética de las MBs modificadas sobre el electrodo de trabajo de un SPCE b). SPCE sumergido en la célula electroquímica c).

3.3.3. Análisis de muestras reales

3.3.3.1. Extracción de ADN

Con el fin de demostrar la aplicabilidad del biosensor desarrollado en este trabajo y teniendo en cuenta que el fragmento específico de ADN elegido como diana para la detección de carne de caballo, forma parte del ADN presente en las mitocondrias, se eligió un protocolo de extracción de ADN mitocondrial, basado en un aislamiento previo de la masa mitocondrial presente en la muestra y su posterior extracción, aislamiento y elución del ADN presente en éstas. Los procesos de extracción se realizaron en colaboración con el grupo de Biotecnología de Plantas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

La extracción se realiza a partir de 3.0 g de matriz alimentaria, que se macera y tritura con 15 mL de Solución I y se centrifuga a 1,000 g (5 min, 4 °C) para la eliminación de restos sólidos en la muestra. El sobrenadante se centrifuga nuevamente a 12,000 g (10 min, 4 °C) y el pellet resultante (masa mitocondrial presente en la muestra) se resuspende en 800 µL de Solución MLB, adicionándose 400 µL de solución SDS para la ruptura de las membranas mitocondriales. A continuación, se adicionan 800 µL de Solución III centrifugándose la mezcla resultante a 13,000 rpm (5 min, 25 °C) para la precipitación y eliminación del ADN no mitocondrial. A partir del sobrenadante resultante se obtiene el ADN mitocondrial empleando el kit comercial *Speedtools plasmid DNA purification kit* (Biotools) siguiendo las especificaciones recomendadas en el kit.

Se valoró la cantidad y calidad del ADN mitocondrial obtenido midiendo los valores de absorbancia a 260; 230 y 280 nm. En todos los casos se obtuvieron valores indicativos de muestras puras y libres de proteínas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que uno de los mayores escándalos ocurridos recientemente en Europa por adulteración fue la presencia de carne de caballo en alimentos, poniendo de manifiesto la necesidad de disponer de nuevas metodologías sensibles, selectivas, sencillas y rápidas para la detección de este tipo de adulteraciones, en este trabajo se ha desarrollado un biosensor electroquímico para este propósito. La plataforma biosensora desarrollada está basada en el empleo de electrodos desechables y partículas micromagnéticas como soporte para la inmovilización de una sonda de RNA específica del fragmento a detectar y el marcaje del híbrido resultante mediante el empleo de un anticuerpo específico de heterohíbridos de RNA/DNA acoplado a un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente.

Tras su modificación, las MBs se capturan magnéticamente en la superficie del electrodo de trabajo mediante la colocación del SPCE en la carcasa magnética de fabricación casera, y el proceso de biorreconocimiento se monitoriza a través de la medida amperométrica de la corriente de reducción generada en presencia de HRP con el sistema HQ/H₂O₂. Cabe destacar que, en esta metodología, el SPCE actúa sólo como transductor electroquímico mientras que todas las reacciones de reconocimiento se producen en la superficie de las MBs.

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

En este apartado se detallarán las diferentes variables experimentales involucradas en el proceso de fabricación del biosensor que fueron optimizadas con el fin de asegurar el comportamiento óptimo del biosensor desarrollado para la detección de adulteraciones por carne de caballo.

Todas las variables evaluadas se optimizaron teniendo en cuenta los valores de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (N) o en presencia de 0.5 nM de target sintético (S) y la relación entre ellas (relación S/N).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1. Formato de ensayo empleado

En primer lugar, se evaluaron diferentes formatos de fabricación del biosensor, descritos en los apartados 3.3.1.1 y 3.3.1.2 como formato de hibridación tipo “sándwich” y formato de hibridación DNA-RNA y reconocimiento mediante un anticuerpo selectivo a híbridos de DNA-RNA, con el fin de seleccionar aquel formato que permitiera alcanzar una mayor sensibilidad en la determinación del target sintético de interés, asociado a la presencia de carne de caballo.

La siguiente tabla resume las principales características de los diferentes formatos evaluados. Dichos formatos están basados en un formato de hibridación tipo “sándwich” de híbridos de ADN biotinilados y su posterior marcaje enzimático con Strep-HRP del híbrido formado sobre la superficie de las MBs (formato A), o en la formación de heterohíbridos de DNA-RNA biotinilados de 24 (formato B) o 40 pares de bases (formato C) y su reconocimiento con un anticuerpo selectivo a estos heterohíbridos. Asimismo, se evaluaron distintas disoluciones reguladoras para la etapa de hibridación y marcaje enzimático. En la Figura 4.1 se muestra un diagrama esquemático de cada uno de los formatos ensayados.

Tabla 4.1: Características y tipo de formato evaluados.

Formato	Tipo	Híbrido formado	Medio de hibridación y marcaje enzimático
A-1	Hibridación tipo “sándwich”	DNA-DNA (48 pares de bases)	PBS
A-2			BB
B-1	Hibridación DNA-RNA y reconocimiento con un anticuerpo selectivo a dúplex DNA-RNA	DNA-RNA (24 pares de bases)	PBS
B-2			BB
C-1		DNA-RNA (40 pares de bases)	PBS
C-2			BB

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

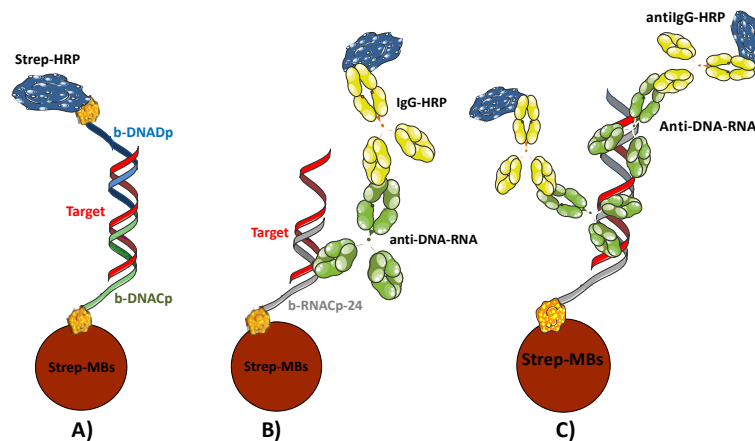


Figura 4.1: Diagrama esquemático de los diversos formatos de ensayo evaluados.

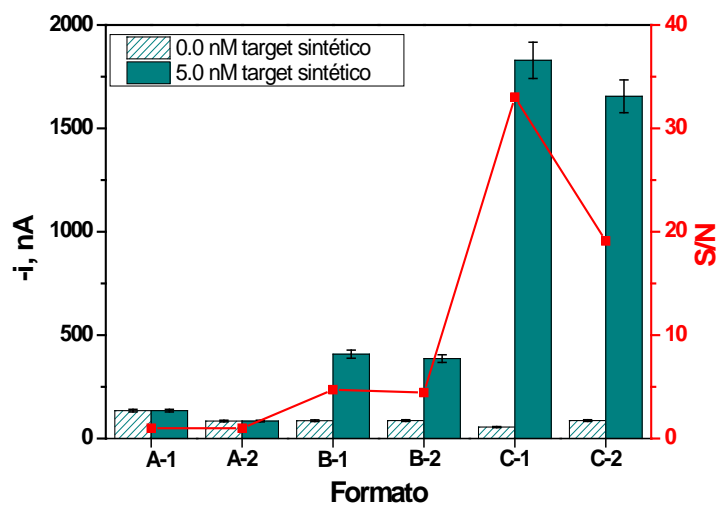


Figura 4.2: Dependencia de los valores de intensidad de corriente obtenidos en estado estacionario dependiendo del tipo de formato de ensayo empleado, para estándares preparados en ausencia (N), o en presencia de 0.5 (S) nM de target sintético preparados en el medio indicado y relación de señales resultante (S/N). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.20$ V (vs. electrodo de pseudoreferencia de Ag).

Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

De los resultados mostrados en la Figura 4.2, se eligió el formato C-1 como óptimo, ya que es el que permite alcanzar una mayor relación entre las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de 0.5 nM de target sintético, y por tanto una mayor sensibilidad en la detección del analito de interés. Los resultados obtenidos demuestran que la formación de heterohíbridos de DNA-RNA de mayor longitud mejora la eficiencia de la hibridación y permite la captura selectiva de un mayor número de anticuerpos (anti-DNA-RNA) por cada heterohíbrido formado. De acuerdo con resultados descritos por otros autores

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el epítipo de estos anticuerpos tiene un tamaño aproximado de 6 pares de bases [Qavi et al., 2011].

4.1.2. Concentración de sonda de captura

Tras seleccionar el formato de ensayo óptimo se evaluó la dependencia de las señales amperométricas obtenidas en ausencia o presencia de 0.5 nM de target sintético a partir de biosensores fabricados variando la concentración de la sonda de captura en el intervalo comprendido entre 0.0 y 1.0 μM .

Como se observa en la Figura 4.3 las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de target sintético aumentan con la concentración de bRNACp-40 inmovilizada hasta 0.1 μM , valor a partir del cual las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de target sintético y la relación resultante (S/N) decaen debido a la menor eficiencia de hibridación en presencia de elevadas concentraciones de sonda de captura. A la vista de estos resultados se seleccionó una concentración de 0.1 μM de bRNACp-40 como óptima para la fabricación del biosensor.

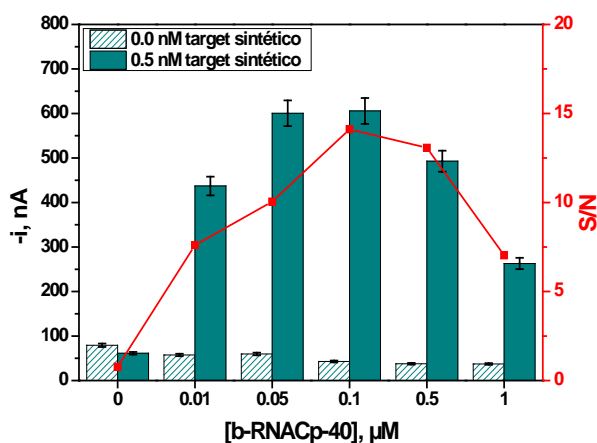


Figura 4.3: Dependencia de los valores de intensidad de corriente medidos en estado estacionario con la concentración de [b-RNACp-40] para estándares preparados en ausencia (N) y en presencia de 0.5 nM (S) de target sintético y relación de señales resultante (S/N). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.20\text{ V}$ (vs. electrodo pseudoreferencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.3. Tiempo de incubación con la sonda de captura

También se optimizó el tiempo de incubación necesario para la inmovilización eficiente de la sonda de captura sobre las MBs. Para ello se evaluaron las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de target sintético empleando tiempos de incubación de las MBs con la b-RNACp-40 comprendidos entre 15 y 90 min. Los resultados mostrados en la Figura 4.4 muestran un ligero aumento de la relación S/N resultante con el tiempo de incubación hasta un valor de 60 min, tiempo a partir del cual, dicha relación se estabiliza, por lo que se seleccionó este tiempo de incubación para estudios posteriores.

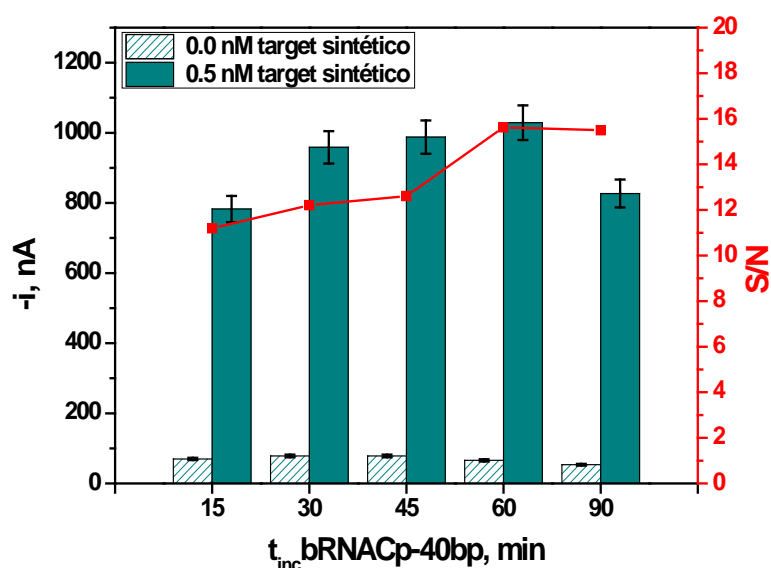


Figura 4.4: Dependencia de los valores de intensidad de corriente medidos en estado estacionario con el tiempo de incubación de la sonda de captura (bRNACp-40) para estándares preparados en ausencia (N) y en presencia de 0.5 nM (S) de target sintético y relación de señales resultante (S/N). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.20$ V (vs. electrodo de pseudoreferencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.4. Tiempo de incubación con target sintético

Igualmente se estudió la influencia del tiempo de incubación de las bRNACp-40-MBs con el target sintético sobre la eficiencia de la hibridación en el intervalo comprendido entre 15 y 90 min. Los resultados de la Figura 4.5 demuestran que la relación S/N aumenta con el tiempo de incubación hasta valores de 30 min y permanece constante para tiempos superiores lo que demuestra que este tiempo es suficiente para asegurar una eficiencia óptima del proceso de hibridación en las condiciones experimentales seleccionadas. Como compromiso entre sensibilidad y tiempo de ensayo se eligió un tiempo de hibridación con el target de 30 min como óptimo para la formación del heterohíbrido de DNA-RNA sobre la superficie de las MBs (T-bRNACp-40-MBs).

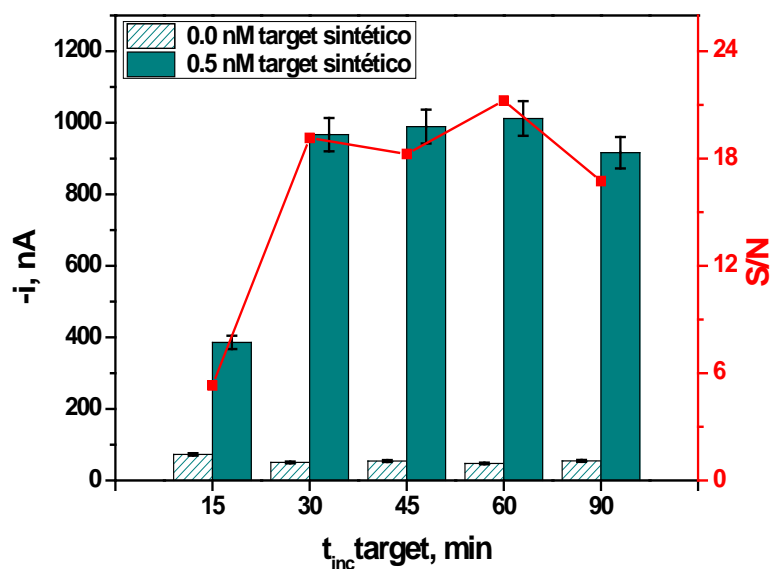


Figura 4.5: Dependencia de los valores de intensidad de corriente medidos en estado estacionario con el tiempo de incubación de las bRNACp-40-MBs con el target sintético para estándares preparados en ausencia (N) y en presencia de 0.5 nM (S) de target sintético y relación de señales resultante (S/N). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.20$ V (vs. electrodo de pseudoreferencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.5. Concentración del anticuerpo de detección

Para optimizar la concentración del anticuerpo de detección [anti-DNA-RNA] se evaluó la respuesta que proporcionaban biosensores preparados a partir de distintas diluciones comprendidas entre (1/2,500-1/250).

Como puede observarse (Figura 4.6) la relación S/N aumenta con la concentración de anticuerpo hasta una dilución 1/500, valor a partir del cual las señales inespecíficas aumentan en mayor proporción que las específicas y la relación S/N disminuye ligeramente. A la vista de estos resultados se seleccionó una dilución de anti-DNA-RNA 1/500 como óptima para la fabricación del biosensor.

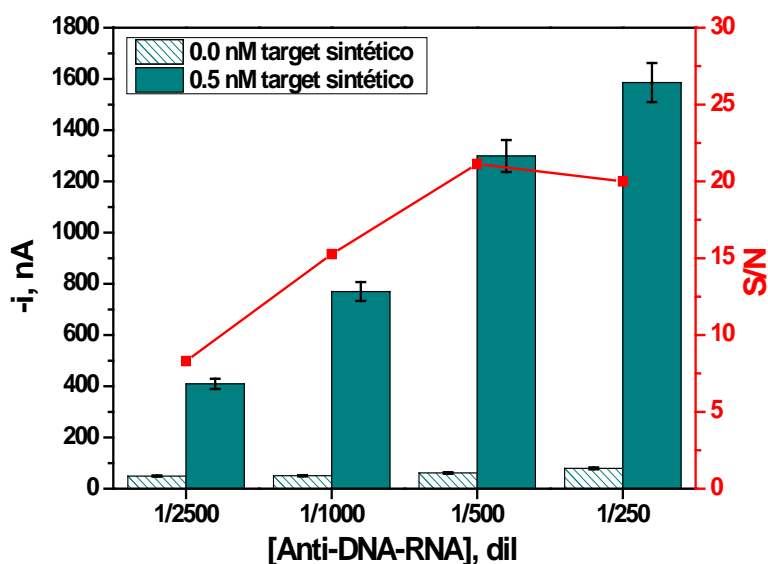


Figura 4.6: Dependencia de los valores de intensidad de corriente medidos en estado estacionario con la dilución de anticuerpo de detección [anti-DNA-RNA], para estándares preparados en ausencia (N) y en presencia de 0.5 nM (S) de target sintético y relación de señales resultante (S/N). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.20$ V (vs. electrodo de pseudoreferencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.6. Número de etapas

Con el fin de minimizar el tiempo de ensayo y mejorar la eficiencia de éste también se evaluó la influencia del número de etapas involucradas en la fabricación del biosensor, siguiendo los protocolos descritos en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Número de etapas y medio en el que se realizan.

Formato	Nº de etapas	Descripción
A	3	1) Incubación del target con las bRNACp-40-MBs en PBS (30 min). 2) Marcaje selectivo del T-bRNACp-40-MBs con el anti-DNA-RNA en BB (60 min). 3) Marcaje selectivo del anti-DNA-RNA-T-bRNACp-40-MBs con el antiIgG-HRP en BB (60 min).
B	3	1) Incubación del target con las bRNACp-40-MBs en BB (30 min). 2) Marcaje selectivo del T-bRNACp-40-MBs con el anti-DNA-RNA en BB (60 min). 3) Marcaje selectivo del anti-DNA-RNA-T-bRNACp-40-MBs con el antiIgG-HRP en BB (60 min).
C	2	1) Incubación del target con las bRNACp-40-MBs en PBS (30 min). 2) Marcaje selectivo del T-bRNACp-40-MBs con los anticuerpos anti-DNA-RNA y antiIgG-HRP en BB (60 min).
D	2	1) Incubación del target con las bRNACp-40-MBs en BB (30 min). 2) Marcaje selectivo del T-bRNACp-40-MBs con los anticuerpos anti-DNA-RNA y antiIgG-HRP en BB (60 min).
E	1	1) Hibridación del target, marcaje selectivo del dúplex formado con los anticuerpos anti-DNA-RNA y antiIgG-HRP en PBS y captura sobre las bRNACp-40-MBs (60 min).
F	1	1) Hibridación del target y marcaje selectivo del dúplex formado con los anticuerpos anti-DNA-RNA y antiIgG-HRP en BB y captura sobre las bRNACp-40-MBs (60 min).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en la Figura 4.7 muestran un aumento significativo de las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de target sintético y de la relación resultante (S/N) cuando se trabaja con la mezcla de anti-DNA-RNA y antiIgG-HRP en disolución, lo que puede atribuirse a una mejor eficiencia en los procesos de inmunoreconocimiento por parte de estos anticuerpos cuando se encuentran libres en disolución.

En vista de estos resultados se decidió continuar realizando el ensayo en dos etapas (Formato D): una primera etapa de hibridación del target sintético con las bRNACp-40-MBs y otra posterior de reconocimiento y marcaje selectivo del dúplex de DNA-RNA capturado sobre la superficie de las MBs con la mezcla de anticuerpos (anti-DNA-RNA y antiIgG-HRP).

Cabe destacar además que la eficiencia de la hibridación del target sintético con las bRNACp-MBs es superior en BB que en PBS, por lo que se seleccionó como medio óptimo de trabajo.

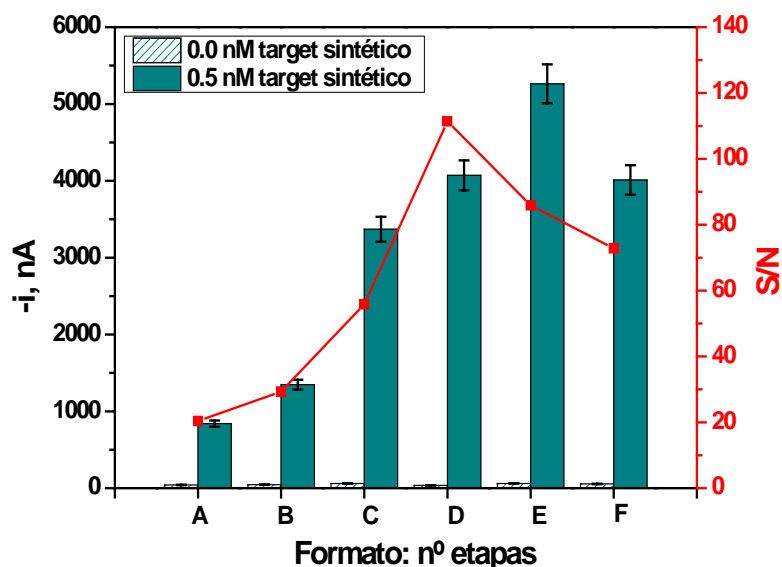


Figura 4.7: Dependencia de los valores de intensidad de corriente medidos en estado estacionario con el número de etapas y el medio en el que se realizan, para estándares preparados en ausencia (N) y en presencia de 0.5 nM (S) de target sintético y relación de señales resultante (S/N). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.20$ V (vs. electrodo de pseudoreferencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.7. Concentración del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa

También se estudió la influencia de la concentración del anticuerpo secundario (antiIgG-HRP) en la mezcla de anticuerpos preparada en BB empleando diluciones comprendidas entre 1/5,000 y 1/500).

Como puede observarse en la Figura 4.9, la relación S/N aumenta con la concentración de antiIgG-HRP hasta la dilución 1/2,500 y disminuye para concentraciones superiores, lo que puede atribuirse a que las señales inespecíficas aumentan en mayor proporción que las específicas, por lo que se seleccionó como óptima una dilución 1/2,500 del antiIgG-HRP.

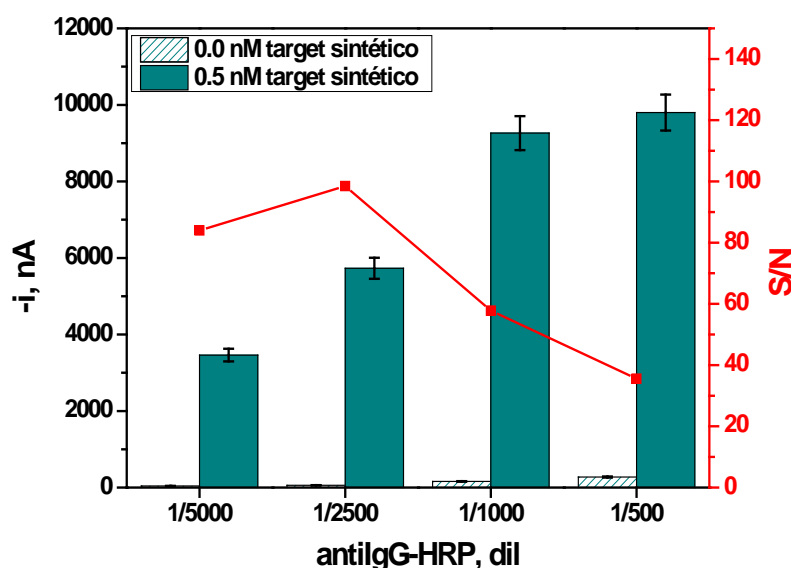


Figura 4.9: Dependencia de los valores de intensidad de corriente medidos en estado estacionario con la concentración de antiIgG-HRP, para estándares preparados en ausencia (N) y en presencia de 0.5 nM (S) de target sintético y relación de señales resultante (S/N). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.20$ V (vs. electrodo de pseudoreferencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.8. Tiempo de incubación con la mezcla de anticuerpos

Por último, también se optimizó el tiempo de incubación de las MBs con el dúplex de DNA-RNA capturado con la mezcla de anticuerpos (anti-DNA-RNA (1/500) y antiIgG-HRP (1/2,500) preparados en BB).

Aunque se obtuvieron valores elevados de la relación resultante (S/N) para todos los tiempos estudiados (comprendidos entre 15 y 90 min, Figura 4.10), se seleccionó un tiempo de incubación de 30 min como compromiso entre sensibilidad y tiempo de ensayo.

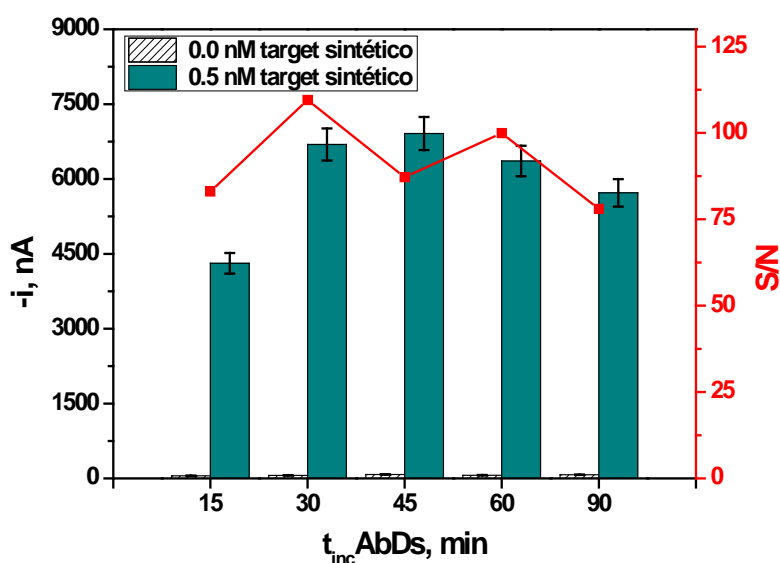


Figura 4.10: Dependencia de los valores de intensidad de corriente medidos en estado estacionario con el tiempo de incubación de las MBs con el dúplex de DNA-RNA capturado con la mezcla de anticuerpos, para estándares preparados en ausencia (N) y en presencia de 0.5 nM (S) de target sintético y relación de señales resultante (S/N). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; $E_{ap} = -0.20$ V (vs. electrodo de pseudoreferencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar (n = 3).

En la Tabla 4.3 se resumen los rangos evaluados y los valores seleccionados para cada una de las variables estudiadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.3: Variables optimizadas, rangos evaluado y valores seleccionados para el desarrollo del biosensor.

Variable	Rango evaluado	Valor seleccionado
[b-RNACp-40bp], μM	0 - 1	0.1
Tiempo de incubación b-RNACp-40, min	15 - 90	60
Tiempo de incubación target sintético, min	15 - 90	60
Dilución anti-DNA/RNA	(1/2,500-1/250)	1/500
Número de etapas	3-1	1
Dilución antiIgG-HRP	(1/5,000-1/500)	1/2,500
Tiempo de incubación con mezcla de anticuerpos (anti-DNA-RNA y antiIgG-HRP), min	15 - 90	30

4.2. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS Y OPERACIONALES DEL BIOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL TARGET SINTÉTICO

4.2.1. Características analíticas

Después de realizar las optimizaciones mencionadas anteriormente, se determinaron las características analíticas del biosensor desarrollado para la determinación de una secuencia sintética de ADN que se corresponde con el fragmento específico seleccionado de ADN mitocondrial de caballo. Para ello se evaluaron las respuestas amperométricas proporcionadas por el biosensor desarrollado para disoluciones (preparadas en BB) que contienen diferente concentración de target sintético, obteniéndose la recta de calibrado que se muestra en la Figura 4.11.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

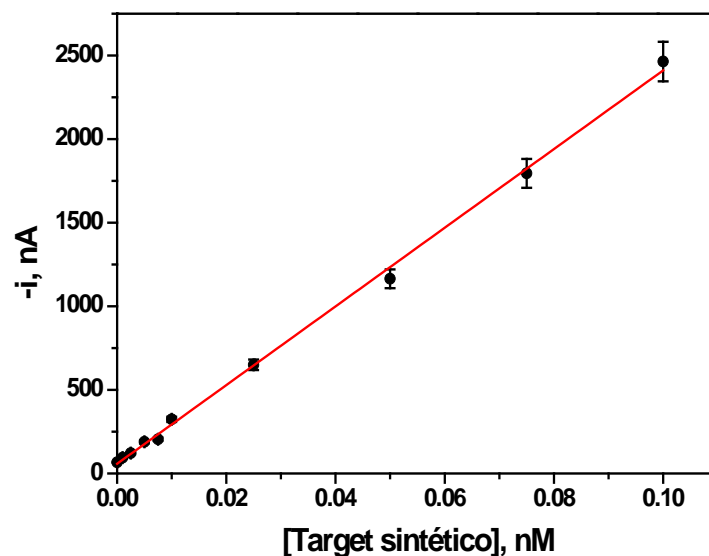


Figura 4.11: Curva de calibrado obtenida con el biosensor desarrollado para la determinación de disoluciones de target sintético de diferente concentración (preparadas en BB, pH 7.5). Disolución de medida: tampón fosfato 0.05 M pH 6.0 que contiene 1 mM de HQ; $E_{app} = -0.20$ V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag). Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$)

Los resultados mostrados demuestran una dependencia lineal de las respuestas amperométricas obtenidas con la concentración del target sintético en el intervalo comprendido entre 1.2 y 100 pM ($r = 0.998$), con una pendiente de $(23,529 \pm 344)$ nA nM⁻¹ y una ordenada en origen de (58 ± 15) nA.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), estimados empleando el criterio de $3 \times s_b/m$ y $10 \times s_b/m$, respectivamente, donde m es la pendiente de la recta de calibrado y s_b la desviación estándar de diez señales amperométricas medidas en ausencia de target sintético, resultaron de 0.0037 nM (0.37 pM) y 0.0012 nM (1.2 pM), respectivamente.

Para verificar que el biosensor desarrollado permite alcanzar mayor sensibilidad en la determinación del target sintético de interés que el formato de hibridación tipo sándwich convencional se compararon las características analíticas obtenidas empleando el formato de hibridación tipo “sándwich” (formato A, Figura 4.1) y el formato de hibridación DNA-RNA y reconocimiento mediante un anticuerpo selectivo a híbridos de DNA-RNA (formato C, Figura

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1) seleccionado para el desarrollo del biosensor. Las características analíticas y operacionales de ambos formatos se resumen y comparan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4: Comparación de las características analíticas y operacionales de los formatos de ensayo A y C de la Figura 4.1.

Parámetros	Formato A	Formato B
r^2	0.9992	0.9983
Pendiente, nA nM ⁻¹	119.0 ± 1.33	(235 ± 3) × 10 ²
Ordenada en el origen, nA	86 ± 27	58 ± 15
LOD, pM	157	0.4
LOQ, pM	812	1.2
RSD _(n=8) , %	4.7	4.8
Tiempo de ensayo, min	60	60

A partir de los resultados expuestos en la Tabla 4.4 se puede concluir que el biosensor desarrollado para la identificación de fraudes alimentarios asociados a la presencia de carne de caballo permitió alcanzar límites de detección ~400 veces inferiores a los obtenidos empleando la metodología convencional, basada en formatos de hibridación DNA-DNA-DNA sin el empleo de anticuerpos específicos, y en el mismo tiempo de ensayo. La elevada sensibilidad alcanzada pone de manifiesto el potencial de la metodología para desarrollar estrategias de detección sin necesidad de amplificar previamente el fragmento genético a detectar.

4.2.2. Características operacionales

Con el fin de demostrar la fiabilidad del proceso de fabricación del biosensor y la reproducibilidad de las señales proporcionadas por biosensores diferentes preparados de la misma manera se compararon las respuestas amperométricas proporcionadas por 8

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

biosensores diferentes fabricados el mismo día para una disolución de target sintético de concentración 0.01 nM. El valor de RSD obtenido, del 4.8 %, confirma la reproducibilidad de los protocolos de modificación de MBs, de su captura magnética sobre la superficie de los SPCEs y de medida amperométrica.

4.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Con el fin de demostrar la aplicabilidad de la metodología desarrollada a la detección de fraudes alimentarios asociados a la presencia de carne de caballo, se determinaron diferentes porcentajes de diversos extractos de ADN mitocondrial extraídos de muestras de músculo de caballo y ternera. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.11.

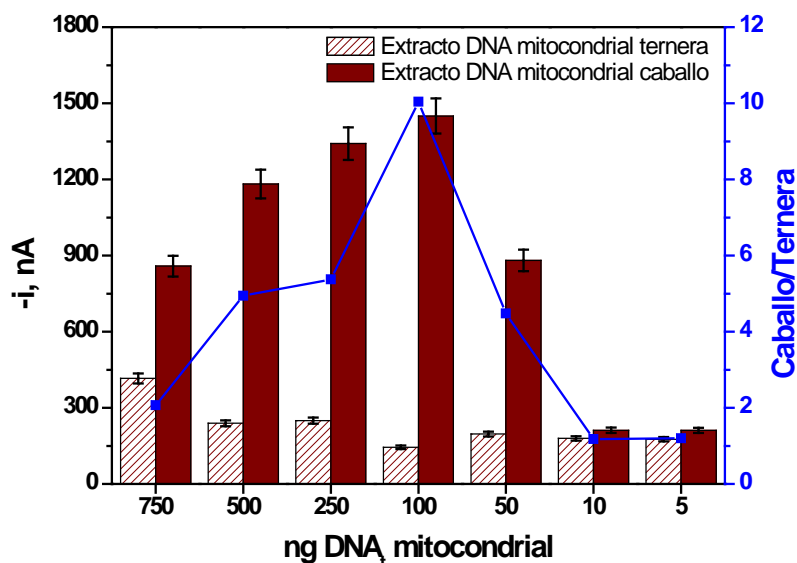


Figura 4.11: Respuestas amperométricas proporcionadas por el biosensor para diferentes concentraciones de extractos de ADN, mitocondrial extraído de carne de ternera (como control negativo) y de caballo y relaciones resultantes (caballo/ternera). Medio de medida: tampón fosfato de pH 6.0 conteniendo HQ 1 mM; Eap = -0.20 V (vs. electrodo de pseudo-referencia de Ag).

Como puede observarse en la Figura el biosensor discrimina claramente la presencia de caballo o ternera siempre que se use una cantidad de ADN_t mitocondrial superior a 50 ng sin necesidad de aplicar protocolos de amplificación previa del material genético por PCR.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados demuestran además que la mejor discriminación se obtiene realizando el ensayo con 100 ng de extracto de ADN_i mitocondrial.

Cabe destacar que, además del nuevo protocolo de bioensayo, la naturaleza del fragmento de ADN seleccionado para la identificación de carne de caballo, así como el protocolo de extracción empleado son los responsables de la buena sensibilidad alcanzada. El ADN mitocondrial está constituido por un considerable menor número de genes que el ADN genómico, por lo que existe un ratio mayor en el número de copias de cada gen mitocondrial. Además, el protocolo de extracción de ADN mitocondrial empleado, permite la extracción de una mayor cantidad inicial de muestra que los métodos convencionales empleados para la extracción de ADN genómico, debido a que se realiza el aislamiento previo de la masa mitocondrial del total de la muestra antes de iniciar la extracción del ADN.

Estos resultados preliminares obtenidos ponen de manifiesto la aplicabilidad de la metodología desarrollada en este Trabajo Fin de Grado para la identificación inequívoca de carne de caballo empleando pequeñas cantidades de extractos de ADN mitocondriales, sin necesidad de recurrir a etapas previas de amplificación del ADN extraído.

En la actualidad se está trabajando en la preparación de extractos sintéticos de carnes contaminadas con diferentes porcentajes de carne de caballo con el fin de establecer el límite de detección del biosensor desarrollado y su campo de aplicabilidad real.

5. CONCLUSIONS

In this work, an amperometric biosensor for the specific detection of horse meat using extracted mitochondrial, functionalized magnetic beads and a specific RNA capture probe and a commercial antibody with affinity for DNA-RNA heteroduplexes has been developed for the first time.

In order to achieve the best sensitivity for the determination, two protocols were compared and, according to the obtained results, the one based on DNA-RNA hybridization and recognition of the previously captured duplexes on the surface of MBs by a specific antiDNA-RNA antibody showed the best sensitivity for the detection of the target DNA fragment. The developed DNA sensor allowed detecting 0.4 pM (10 attomoles/0.15 pg in 25 μ L of sample) of the synthetic target fragment in only 60 min without any preconcentration/amplification technique. Preliminary results demonstrated also its applicability to detect unequivocally the presence of horse meat using only 50 ng of mitochondrial DNA extracted from raw meat. These promising results together with the simplicity, low cost, reduced assay time and feasibility of automation and miniaturization of the required methodology make the developed tool a very interesting alternative to replace other methodologies used currently worldwide.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [Ahmed et al., 2010] M.U. Ahmed, Q. Hasan, M.M. Hossain, M. Saito, E. Tamiya. Meat species identification based on the loop mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor. *Food Control* 21 (2010) 599–605.
- [Algieri et al., 2014] C. Algieri, E. Drioli, L. Guzzo, L. Donato. Bio-mimetic sensors based on molecularly imprinted membranes. *Sensors (Basel)* 14 (2014) 13863–13912.
- [Amaya-González et al., 2013] S. Amaya-González, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M. J. Lobo-Castañón. Aptamer-Based Analysis: A Promising Alternative for Food Safety Control. *Sensors* 13 (2013) 16292–16311.
- [Apetrei and Ghasemi-Varnamkhasti, 2013] C. Apetrei, M. Ghasemi-Varnamkhasti. Biosensors in food PDO authentication. (2013) *Comprehensive Analytical Chemistry* 60 (2013) 279–297.
- [Ballin, 2010] N.Z. Ballin. Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 86 (3) (2010) 577–587.
- [Belaunzaran et al., 2015] Xabier Belaunzaran, Rui J.B. Bessa, Paz Lavín, Angel R. Mantecón, John K.G. Kramer, Noelia Aldai. Horse-meat for human consumption. Current research and future opportunities. *Meat Science* 108 (2015) 74–81.
- [Bergveld and Thévenot, 1993] P. Bergveld, D.R. Thévenot, A.P.F. Turner (Ed.), *Advances in biosensors*, Supplement 1, JAI Press (1993), 31.
- [Cammann, 1977] K. Cammann. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 287 (1977) 1–9.
- [Charlebois & Haratifar, 2015] S. Charlebois, S. Haratifar. The perceived value of dairy product traceability in modern society: an exploratory study. *Journal of Dairy Science* 98 (2015) 3514–3525.
- [Charlebois et al., 2016] Sylvain Charlebois, Anita Schwab, Raphael Henn, Christian W. Huck. Food fraud: An exploratory study for measuring consumer perception towards mislabeled food products and influence on self-authentication intentions. *Trends in Food Science & Technology* Volume 50 (2016) 211–218.
- [Conzuelo et al., 2012] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, D.G. Pinacho, A. J. Reviejo, M. P. Marco, J. M. Pingarrón. Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosensors and*

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bioelectronics 36 (2012) 81–88.
- [Di Giuseppe et al., 2015] Antonella M.A. Di Giuseppe, Nicola Giarretta, Martina Lippert, Valeria Severino, Antimo Di Maro. An improved UPLC method for the detection of undeclared horse meat addition by using myoglobin as molecular marker. *Food Chemistry*, 169 (2015) 241–245.
 - [El Ichi et al., 2009] Sarra El Ichi, Mohamed Nejib Marzouki, Hafsa Korri-Yousoufi. Direct monitoring of pollutants based on an electrochemical biosensor with novel peroxidase (POX1B). *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 3084–3090.
 - [Erdem et al., 2005] A. Erdem, D.O. Ariksoysal, H. Karadeniz, P. Kara, A. Sengonul, A. A. Sayiner, M. Ozsoz. Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology. *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 815–820.
 - [Everstine et al 2013] K. Everstine, J. Spink, S. Kennedy (2013). Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *Journal of Food Protection* 76:723-35. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-399.
 - [Falkheimer and Heide, 2015] J. Falkheimer, M. Heide. Trust and brand recovery campaigns in crisis: findus nordic and the horsemeat scandal. *International Journal of Strategic Communication* 9 (2015) 134–147.
 - [FAO, 2015b] Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). FAOSTAT. [online] Available at: <http://faostat3.fao.org/home/E> [Acceso 18 abril, 2016].
 - [Food Safety News, 2014] U.S. Makes Top 10 List of Worst Food Safety Violators | Food Safety News. [online] Available at: <http://www.foodsafetynews.com/2014/08/u-s-in-top-ten-worst-food-safety-violators/#.VxTo3DCLTIV> [Acceso 18 abril, 2016].
 - [Food Standards Agency, 2013] Food Standards Agency. (2013). Report of the investigation by the Food Standards Agency into incidents of adulteration of comminuted beef products with horse meat and DNA.
 - [Gamella et al., 2013]: M. Gamella, S. Campuzano, F. Conzuelo, M. Esteban-Torres, B. de las Rivas, A. J. Reviejo, R. Muñoz and J. M. Pingarrón. An amperometric affinity penicillin-binding protein magnetosensor for the detection of β -lactam antibiotics in milk. *Analyst* 138 (2013) 2013–2022.
 - [Green, 1990] N.M. Green. Avidin and streptavidin. *Meth. Enzymol.* 184 (1990) 51–67.
 - [Guan et al., 2009] N. Guan, Q. Fan, J. Ding, Y. Zhao, J. Lu, Y. Ai, G. Xu, S. Zhu, C. Yao, L. Jiang, J. Miao, H. Zhang, D. Zhao, X. Liu, Y. Yao. Melamine-contaminated powered

6. BIBLIOGRAFÍA

- formula and urolithiasis in young children. *The New England Journal of Medicine* 360 (11) (2009) 1067–1074.
- [Jakes et al., 2015] W. Jakes, A. Gerdova, M. Defernez, A.D. Watson, C. McCallum, E. Limer, I.J. Colquhoun, D.C. Williamson, E.K. Kemsley. Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz ¹H NMR spectroscopy. *Food Chemistry* 175 (2015) 1–9.
 - [Kane et al., 2016] Dawn E. Kane, Rosalee S. Hellberg. Identification of species in ground meat products sold on the U.S. commercial market using DNA-based methods. *Food Control* 63 (2016) 158–163.
 - [Le Vallée & Charlebois, 2015] J. Le Vallée, S. Charlebois. Benchmarking global food safety performances: the era of risk intelligence. *Journal of Food Protection* 78 (2015) 1896–1913.
 - [López et al., 2013] P. López “Aplicación de biosensores electroquímicos de DNA basados en el empleo de partículas magnéticas modificadas”. Trabajo fin de Grado del Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid (Spain).
 - [Ma, 2016] W. Ma, B. Situ, W. Lv, B. Li, X. Yin, P. Vadgama, W. Wang, L. Zheng. Electrochemical determination of microRNAs based on isothermal strand-displacement polymerase reaction coupled with multienzyme functionalized magnetic micro-carriers. *Biosens. Bioelectron.* 80 (2016) 344–351.
 - [Murugaiah et al., 2009] Chandrika Murugaiah, Zainon Mohd Noor, Maimunah Mastakim, Lesley Maurice Bilung, Jinap Selamat, Son Radu. Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. *Meat Science* 83 (2009) 57–61.
 - [Okuma et al., 2014] T.A. Okuma, R.S. Hellberg. Identification of meat species in pet foods using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. *Food Control* 50 (2014) 9–17.
 - [Paleček and Fojta, 2007] E. Paleček, M. Fojta. Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta* 74 (2007) 276–290.
 - [Qavi et al., 2011] A.J. Qavi, J.T. Kindt, M.A. Gleeson, R.C. Bailey. Anti-DNA:RNA Antibodies and Silicon Photonic Microring Resonator Arrays Enable the Ultrasensitive, Multiplexed Detection of micro-RNAs. *Anal. Chem.* 2011, 83, 5949–5956.
 - [Qiao, et al., 2012] G. Qiao, T. Guo, K.K. Klein. Melamine and other food safety and health scares in China: Comparing households with and without young children. *Food Control* 26 (2012) 378–386.

7. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

- [Rösli et al., 2008] C. Rösli, J.N. Rybak, D. Neri, G. Elia. Quantitative recovery of biotinylated proteins from streptavidin-based affinity chromatography resins. *Methods Mol. Biol.* 418 (2008) 89–100.
- [Rotariu et al., 2016] Lucian Rotariu, Florence Lagarde, Nicole Jaffrezic-Renault, Camelia Bala. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 79 (2016) 80–87.
- [Ruiz-Valdepeñas Montiel et al., 2015a] V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, F. Conzuelo, R.M. Torrente-Rodríguez, M. Gamella, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón. Electrochemical magnetoimmunosensing platform for determination of the milk allergen β -lactoglobulin. *Talanta* 131 (2015) 156–162.
- [Ruiz-Valdepeñas Montiel et al., 2015b] V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, A. Pellicanò, R.M. Torrente-Rodríguez, A.J. Reviejo, M.S. Cosio, J.M. Pingarrón. Sensitive and selective magnetoimmunosensing platform for determination of the food allergen Ara h 1. *Anal. Chim. Acta* 880 (2015) 52–59.
- [Sharma et al., 2013] H. Sharma, M. Agarwal, M. Goswami, A. Sharma, S.K. Roy, R. Rai, M.S. Murugan. "Biosensors: tool for food borne pathogen detection. *Veterinary World* 6 (2013), 968–973.
- [Thevenot et al., 2001] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121–131.
- [Turner et al., 1987] A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, (Eds.), 1987. *Biosensors, fundamentals and applications*. Oxford University Press, Oxford.
- [Vidales, 2013] R. Vidales (2013). ¿Por dónde cuele el caballo? [online] EL PAÍS. Available at:
http://sociedad.elpais.com/sociedad/2013/02/23/actualidad/1361650507_537284.html
[Acceso 8 mayo, 2016].
- [Xiu & Klein, 2010] C. Xiu, K.K. Klein. Melamine in milk products in China: examining the factors that let to deliberate use of the contaminant. *Food Policy* 35 (2010) 463–470.
- [Zacco et al., 2006] E. Zacco, MI Pividori, S. Alegret. *Anal. Chem.* 78 (2006) 1780–1788.
- [Zajac, 2014] A. Zajac, J. Hanuza, L. Dymińska. Raman spectroscopy in determination of horse meat content in the mixture with other meats. *Food Chemistry* 156 (2014) 333–338.

7. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

- **¹H NMR:** Resonancia magnética nuclear de ¹H
- **AEDT:** Ácido etildiaminotetracético
- **APROSA:** Asociación Profesional de Salas de Despiece y Empresas Cárnicas
- **B&W:** Disolución reguladora Binding and Washing
- **BB:** Blocking Buffer
- **b-DNACp:** Sonda de captura biotinilada de DNA
- **b-DNADp:** Sonda de detección biotinilada de DNA
- **b-RNACp:** Sonda de captura biotinilada de RNA
- **CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **DOM:** República Dominicana
- **ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- **FAO:** Organización de Las Naciones Unidas para La alimentación y La Agricultura
- **HQ:** Hidroquinona
- **HRP:** Peroxidasa
- **IgG:** Inmunoglobulina G
- **IUPAC:** Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
- **LOD:** Límite de detección
- **MBs:** Partículas magnéticas
- **mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero
- **OCU:** Organización de Consumidores y Usuarios
- **PBS:** Disolución reguladora fosfato salino
- **PBST:** Disolución reguladora fosfato salino suplementada con Tween
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PDA:** Detector de fotodiodos en serie
- **RNA:** Ácido ribonucleico

7. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

- **RNasas:** Ribonucleasas
- **Rpm:** Revoluciones por minuto
- **RSD:** Desviación estándar relativa
- **S/N:** Relación señal/ruido
- **SPCE:** Electrodo serigrafiado de carbono
- **Strep:** Estreptavidina
- **Strep-MBs:** Partículas magnéticas modificadas con estreptavidina
- **Tris-HCl:** Hidroximetil aminometano-HCl
- **US, USA:** Estados Unidos.