



Universitatea "Babeș-Bolyai" Cluj Napoca
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



UPVD
Université de Perpignan Via Domitia



Universitatea Via Domitia din Perpignan
Laboratorul IMAGES, EA 4218

TEZĂ în cotutelă
pentru obținerea gradului de
DOCTOR AL UNIVERSITĂȚII VIA DOMITIA DIN PERPIGNAN
DOCTOR AL UNIVERSITĂȚII BABEȘ BOLYAI DIN CLUJ-NAPOCA

Susținută în 24 iunie 2011 de către

Vasilica Adriana LATEȘ

**Sisteme bioanalitice pentru determinarea capacității
antioxidante și a ocratoxinei A în alimente**

-rezumat-

Cuprins

<i>Partea 1. Sisteme bioanalitice pentru determinarea capacității antioxidante a alimentelor</i>	4
1 Studiu bibliografic	5
2 Scop	7
3 Rezultate originale	8
3.1 Partea experimentală	8
3.1.1 Măsurători electrochimice și spectrofotometrice	8
3.1.2 Elaborarea biosenzorului pe bază de peroxidază din hrean (HRP)	9
3.1.3 Elaborarea bioreactorului pe bază de xantin-oxidază (XOD)	9
3.1.4 Metode de referință pentru măsurarea capacității antioxidante	10
3.1.4.1 Metoda radicalului DPPH	10
3.1.4.2 Metoda Folin-Ciocalteu	11
3.2 Rezultate și discuții	13
3.2.1 Caracterizarea biosenzorului pe bază de peroxidaza din hrean (G/HRP-Os)	13
3.2.2 Determinarea capacității antioxidante folosind cuplajul bioreactor-biosenzor	15
3.2.2.1 Modul "staționar"	17
3.2.2.2 Modul "tranzitoriu"	18
4 Concluzii	20
<i>Partea 2. Sisteme bioanalitice pentru detecția ocratoxinei A în alimente</i>	21
1 Studiu bibliografic	22
1.1 Produsele alimentare contaminate cu ciupercile producătoare de OTA	22
1.2 Efectele toxice ale ocratoxinei A	23
1.3 Reglementările și metodele de referință pentru detecția OTA	23
1.3.1 Extracția și purificarea	23
1.3.2 Separarea și detecția OTA	24
1.4 Teste imunologice pentru depistarea OTA	25
2 Scop	26
3 Rezultate originale	27

3.1	Partea experimentală	27
3.1.1	Măsurători electrochimice, spectrofotometrice și cromatografice	27
3.1.2	Obținerea materialului bio-sensibil	28
3.1.2.1	Modificarea microbilelor de sticlă cu grupări amino.....	28
3.1.2.2	Imobilizarea ocratoxinei B pe microbilele de sticlă	29
3.1.2.3	Legarea anticorpilor anti-OTA și etichetarea acestora cu al doilea anticorp	29
3.1.3	Detecția OTA cu testul imunologic de deplasare pe materialul bio-sensibil	29
3.1.3.1	Detecția spectrofotometrică	29
3.1.3.2	Detecția amperometrică cu analiza prin injecție în flux.....	30
3.1.4	Metode de extracție și purificare a vinurilor și validarea lor prin HPLC-FD	30
3.1.4.1	Metoda standard de extracție și purificare a vinurilor dopate cu OTA	30
3.1.4.2	Extracția și purificarea în fază solidă pentru obținerea OTA din vinuri.....	31
3.2	Rezultate și discuții	31
3.2.1	Caracterizarea materialului bio-sensibil	31
3.2.1.1	Imobilizarea ocratoxinei B pe microbilele de sticlă	31
3.2.1.2	Optimizarea testului imunologic prin deplasare pentru detecția OTA	34
3.2.2	Procedee de purificare a probelor de vin	36
3.2.3	Detecția OTA <i>in situ</i> în probe de vin	37
3.2.4	Posibilități de utilizare a materialului bio-sensibil	39
4	Concluzii	41
	Referințe.....	42

Cuvinte cheie:

capacitatea antioxidantă, xantin-oxidază, peroxidază din hrean, biosenzor, bioreactor, detecție amperometrică în flux, ocratoxina A, test imunologic, ocratoxina B, anticorpi, microbile de sticlă, material bio-sensibil, probe reale de vinuri și sucuri de fructe.

*Partea 1. Sisteme
bioanalitice pentru
determinarea capacității
antioxidante a
alimentelor*

1 Studiu bibliografic

Metabolismul oxidativ este esențial pentru viața celulară. Cu toate acestea unul dintre efectele secundare este producerea de radicali liberi foarte reactivi. Printre aceștia se numără radicalul superoxid ($O_2^{\bullet-}$), radicalul hidroxil ($HO^{\bullet}$), radicalul peroxil ($ROO^{\bullet}$), oxidul nitric ($NO^{\bullet}$) și derivații acestora, cum ar fi apa oxigenată (H_2O_2), acidul hipocloros ($HOCl$) și peroxinitritul ($ONOO^-$) [1]. Toți acești compuși sunt denumiți specii reactive ale oxigenului (SRO). Impactul major al acestor compuși asupra organismelor este deteriorarea căilor biochimice conducând, în cele din urmă, la îmbătrânirea prematură a țesuturilor.

Stresul oxidativ este descris ca dezechilibrul dintre cantitatea de radicali liberi și puterea de apărare a sistemului antioxidant compus din enzime de protecție, cum ar fi catalaza, peroxidaza și superoxid dismutaza [2]. Aportul zilnic de antioxidanți (compuși chimici găsiți în mod natural în unele alimente) ajută la restabilirea acestui echilibru. În acest context, evaluarea capacității antioxidante a sistemelor biologice și a alimentelor ar putea contribui la prevenirea bolilor neurodegenerative și a îmbătrânirii.

O metodă rapidă de cuantificare a capacității antioxidante a nutrienților ar putea fi folosită pentru a testa calitatea produselor alimentare. Astfel, capacitatea antioxidantă poate fi utilizată ca un criteriu de selecție a soiurilor, speciilor, a gradului de maturare și a condițiilor de cultură în vederea obținerii alimentelor cu conținut ridicat de antioxidanți.

Variatatea metodologiilor folosite pentru evaluarea capacității antioxidante (CAO) este justificată prin diversitatea de substraturi și compozițiile lor. Dintre aceste metode, se disting două tipuri în funcție de abordarea analitică utilizată. Primul tip include metodele bazate pe gradul de inhibare de către antioxidant a oxidării lipidelor sau a unei lipoproteine. Al doilea tip se referă la metodele bazate pe capacitatea antioxidantilor de a captura radicalii liberi.

În acest caz, metodele se diversifică în funcție de natura radicalilor liberi, care pot fi produși în mod natural (SRO), în metabolismul celular, sau sintetizați (cum ar fi 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, DPPH sau 2,2-azinobis(3-ethylbenzotiazolin), ABTS) și în funcție de mijloacele analitice utilizate pentru a monitoriza reacțiile implicate.

În ultimul deceniu, cercetătorii sunt tot mai interesați de utilizarea biosenzorilor ca instrumente de evaluare a capacității antioxidante. Printre aceștia, numeroși sunt biosenzorii bazați pe capacitatea antioxidantilor de a captura radicalul superoxid ($O_2^{\bullet-}$), (SO). Acesta este produs *in situ* prin reacții chimice [3] sau prin oxidarea biochimică a xantinei (XA) în acid uric (AU) catalizată de xantin-oxidază (XOD) [4]. Acești biosenzori utilizează fie citocromul C (Cyt C) [5-7] sau superoxid dismutaza (SOD) [3, 8]. Ambele

enzime acceptă radicalul SO ca substrat, permițând fie cuantificarea sa directă [3, 5-8] sau indirectă, prin cuantificarea H_2O_2 produse în această reacție [9, 10]. Acești biosenzori exploatează ineficient sistemul XA / XOD deoarece XOD nu este imobilizată, ci utilizată liberă în tamponul folosit pentru măsurătorile electrochimice.

Recent, s-au obținut biosenzori prin co-imobilizarea covalentă a Cyt C și a XOD pe suprafața unor electrozi de grafit serigrafiați [11, 12]. Acești biosenzori au fost utilizați pentru determinarea CAO a unor probe de usturoi și suc de portocale, dar numai în ceea ce privește acivitatea anti-radicalică, deoarece catalaza a fost adăugată în soluție pentru a elimina interferențele provocate de H_2O_2 .

Alte încercări de imobilizare a XOD au fost descrise pentru includerea enzimei în bioreactoare [13-17]. Dintre aceștia, niciunul nu a fost folosit pentru a estima CAO în probe reale. De exemplu, bioreactorul dezvoltat prin imobilizarea XOD într-un gel de sefaroză activată cu bromură de cian a fost utilizat pentru a evalua CAO a SOD (figura 1A) [17]. Acesta se bazează pe concurența între enzimă și un antioxidant sintetic, sarea de tetrazoliu, pentru radicalul SO. Produsul format este urmărit spectrofotometric la 438 nm.

Într-un alt bioreactor, XOD a fost imobilizată pe un suport de microbile de sticlă, cu dimensiunea controlată a porilor (CPG). Reactorul a fost inclus într-un sistem de flux cu două canale (figura 1B) [15]. Acest sistem a fost folosit pentru determinarea individuală a CAO a SOD și a acidului ascorbic către radicalul SO și a catalazei către H_2O_2 . Detecția radicalului SO și a H_2O_2 a fost efectuată cu doi biosenzori pe bază de Cyt C.

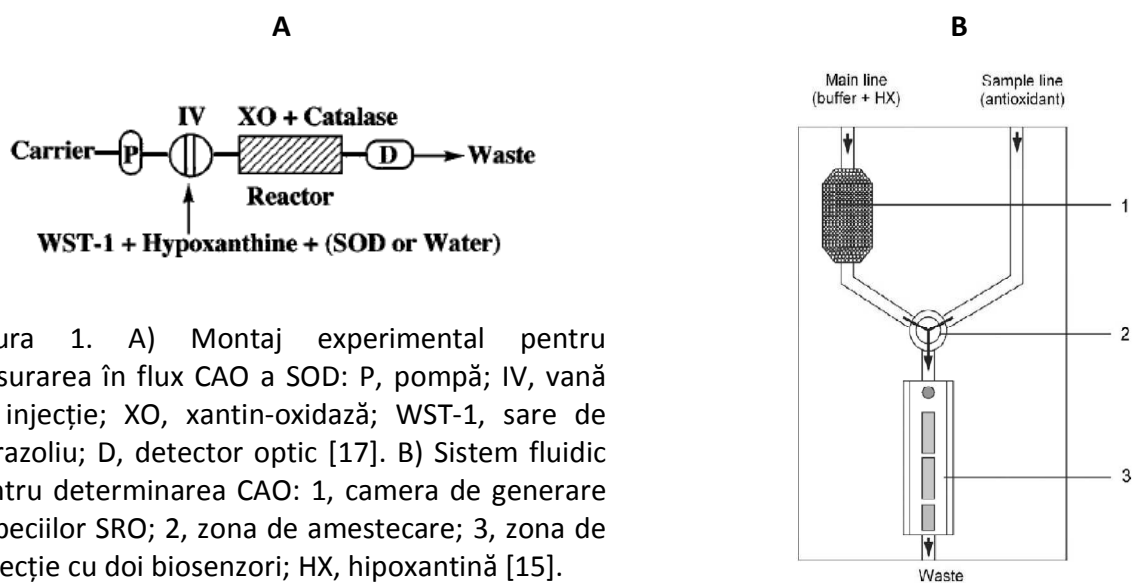


Figura 1. A) Montaj experimental pentru măsurarea în flux CAO a SOD: P, pompă; IV, vană de injecție; XO, xantin-oxidază; WST-1, sare de tetrazoliu; D, detector optic [17]. B) Sistem fluidic pentru determinarea CAO: 1, camera de generare a speciilor SRO; 2, zona de amestecare; 3, zona de detecție cu doi biosenzori; HX, hipoxantină [15].

2 Scop

Din studiul bibliografic reiese că nu există nici o lucrare publicată despre un biosenzor sau un bioreactor care ar putea măsura o CAO a aceleiași probe reale față de două specii diferite, cum ar fi radicalul SO și H_2O_2 , care sunt strâns legate prin reacția spontană de disproporționare. În acest scop, s-a dezvoltat un sistem bioanalitic bazat pe cuplarea în flux a unui bioreactor, umplut cu XOD imobilizată pe CPG, cu un biosenzor amperometric bazat pe peroxidaza din hrean (HRP) (figura 2).

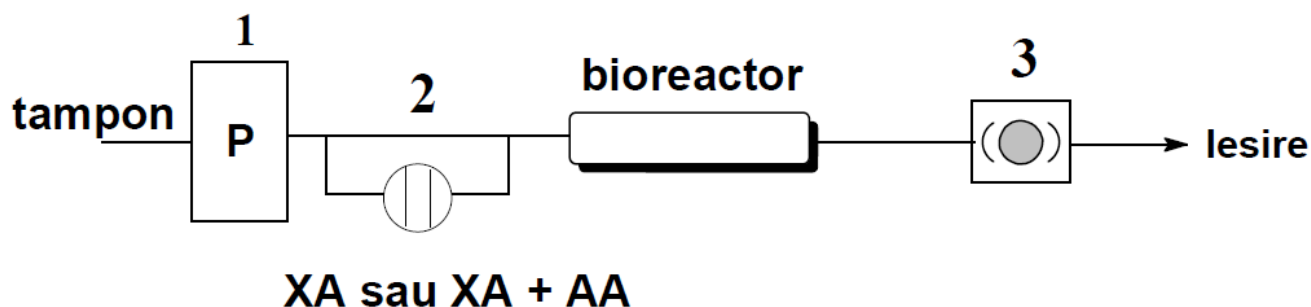


Figura 2. Montajul sistemului în flux cu o singură linie utilizat pentru determinarea CAO: (1) pompă peristaltică, (2) vană de injecție, bioreactor (cu XOD), (3) celula electrochimică conținând biosenzorul cu HRP.

Principiul de funcționare al acestui sistem este următorul:

1. În timpul trecerii xantinei prin bioreactor, reacția enzimatică descrisă în schema 1 este responsabilă pentru producerea radicalului SO și a H_2O_2 . Radicalii SO dismută repede, astfel încât la ieșirea din bioreactor, tamponul conține numai H_2O_2 . Aceasta este măsurată cu biosenzorul bazat pe HRP prin înregistrarea curentului de reducere.

2. În timpul trecerii prin bioreactor a unui amestec de XA și antioxidant (AOX), acesta din urmă reacționează atât cu radicalul SO cât și cu H_2O_2 , astfel încât, la ieșirea din reactor, cantitatea totală de H_2O_2 este mai mică decât în cazul precedent. Astfel, curentul de reducere înregistrat de biosenzor este și el diminuat, iar CAO a eșantionului testat este direct proporțională cu diferența dintre cele două curenți de reducere înregistrate.

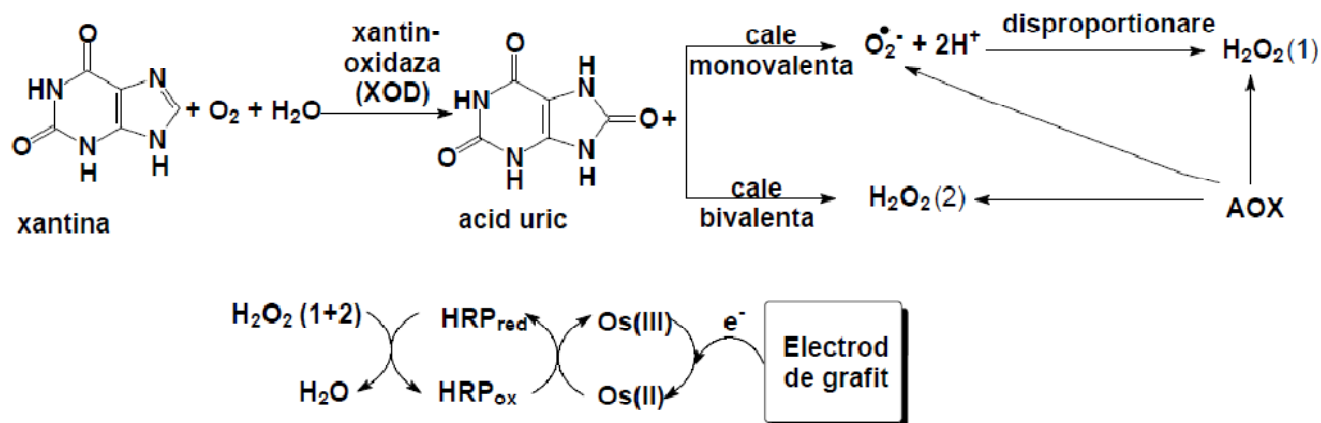
Pentru a utiliza acest sistem s-au propus două moduri lucru:

1. Modul "staționar" în care antioxidanții sunt injectați într-un flux de XA.
2. Modul "tranzitoriu" în care un amestec de antioxidanți și XA este injectat într-un flux de tampon.

Pentru alegerea condițiilor experimentale, s-au urmărit:

1. Parametrii bioreactorului: procedura de imobilizare a XOD, dimensiunile bioreactorului, concentrația și pH-ul soluției de XA, debitul.

2. Parametrii biosenzorului: metoda de imobilizare a HRP. Astfel, s-au obținut doi biosenzori: i) un biosenzor de generația a treia prin imobilizarea covalentă a HRP pe electrozi modificați cu un strat de 4-carboxifenil; ii) un biosenzor de a doua generație prin adsorbția la suprafața unor electrozi de grafit a HRP încorporate într-un polimer redox de osmiu. Acest mediator permite detecția H_2O_2 la un potențial redus. Performanțele în termeni de sensibilitate și limita de detecție au fost mai bune pentru cel de-al doilea biosenzor, astfel încât rezultatele referitoare la evaluarea CAO au fost obținute cu acest biosenzor, notat G/HRP-Os.



Schema 1. Principul de funcționare al cuplajului bioreactor - biosenzor: producerea speciilor SRO cu sistemul XA - XOD, reacția dintre AOX și SRO și detecția H_2O_2 cu biosenzorul G/HRP-Os.

3 Rezultate originale

3.1 Partea experimentală

3.1.1 Măsurători electrochimice și spectrofotometrice

Măsurătorile electrochimice au fost efectuate la temperatura camerei, cu un potențostat SP-150, Biologic Science Instruments, Grenoble, Franța și cu un potențostat AUTOLAB PGSTAT10, Eco Chemie, Utrecht, Olanda. Celula electrochimică este alcătuită dintr-un electrod de lucru de grafit serigrafat (DropSens DRP-110, Spania, diametrul suprafeței electrodului de lucru este de 4 mm), un electrod de referință $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$ (BAS, West Lafayette, SUA) și un fir de platină ca electrod auxiliar.

Pentru măsurătorile electrochimice în flux, s-a folosit-o celulă de tip "wall-jet" (DRP-FLWCL, DropSens), adaptată la electrozii serigrafiați (DropSens DRP-110, Spania). Fluxul a fost asigurat cu o pompă persaltică (FIALab-2500, FIALab®, WA, SUA) iar injecțiile cu o vană de injecție cu 6 canale.

Măsurătorile spectrofotometrice au fost efectuate cu un spectrofotometru UV-Vis (V-530 Jasco International Co, Tokyo, Japonia; UV-1800 Shimadzu Co, Japonia; HP 8452A) iar spectrele IR au fost înregistrate cu un spectrofotometru FT/IR (FT/IR-600, Jasco International Co, Tokyo, Japonia), folosind tehnica pastilei de KBr.

3.1.2 Elaborarea biosenzorului pe bază de peroxidază din hrean (HRP)

Suprafața electrozilor serigrafiați de grafit a fost activată prin măsurători de voltametrie ciclică într-o soluție de 0,5 M H_2SO_4 prin baleierea potențialului între -0,4 și 1,5 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$ cu o viteză de baleiaj de 0,1 V/s (3 cicluri). După spălare, 10 μL din soluția de HRP au fost depuși pe suprafața electrodului de lucru. După 2 ore la temperatura camerei, solventul se evaporă iar enzima este imobilizată prin adsorbție. În acest mod s-a obținut biosenzorul bazat pe HRP (G/Os-HRP). Acesta a fost stocat la 4 °C într-un tampon fosfat (PBS) până în momentul utilizării.

3.1.3 Elaborarea bioreactorului pe bază de xantin-oxidază (XOD)

Construirea bioreactorului pentru determinarea capacității antioxidante a inclus două etape. În primul rând, materialul bioreactorului (microbile de sticlă cu o dimensiune controlată a porilor, CPG) a fost funcționalizat cu grupări amino ($-\text{NH}_2$) cu un protocol adaptat după publicația grupului Richter et al. [16]. Astfel, 0,3 g de CPG au fost adăugate la o soluție de 1 M NaOH (35 mL) și agitate într-un pahar de plastic pentru 1 h la 90 °C. Apoi, microbilele au fost spălate cu 25 mL de 50 mM tampon borat (pH 9). Pe parcursul a două zile, silanizarea s-a realizat prin agitarea ușoară a microbilelor cu 5 mL de 10 % (v/v) de 3-aminopropiltietoxysilan (APTES) în același tampon borat. În cele din urmă, microbilele au fost spălate de 3 ori cu tampon borat și uscate timp de 3 zile într-o etuvă la 60 °C. Succesul silanizării a fost evaluat prin diferența dintre cele două spectre IR înregistrate pe materialul nemodificat (figura 3A) și materialul modificat (NH_2 -CPG) (figura 3C). Pentru acesta din urmă, a fost înregistrată aceeași deplasare a benzilor de absorbție în IR ca cea deja raportată de alți autori pentru silanizarea unor bile de siliciu cu un alt agent de silanizare (3-cloropropiltietoxysilan) [18].

În al doilea rând, xantin-oxidaza (XOD) a fost imobilizată pe microbille NH_2 -CPG prin reticulare cu glutaraldehidă (Glu). Microbillele au fost activate cu o soluție de Glu (2,5 % în PBS, pH 7,4) timp de 30 min la temperatura camerei, spălate și agitate ușor cu soluție de XOD (0,25 U/mL). Pentru a verifica succesul imobilizării, activitatea enzimatică a soluției înainte și după imobilizare a fost măsurată cu protocolul recomandat de furnizorul enzimei [19]. Astfel, s-a observat că soluția după imobilizare nu conține XOD, ceea ce arată o imobilizare completă a enzimei pe materialul bioreactorului.

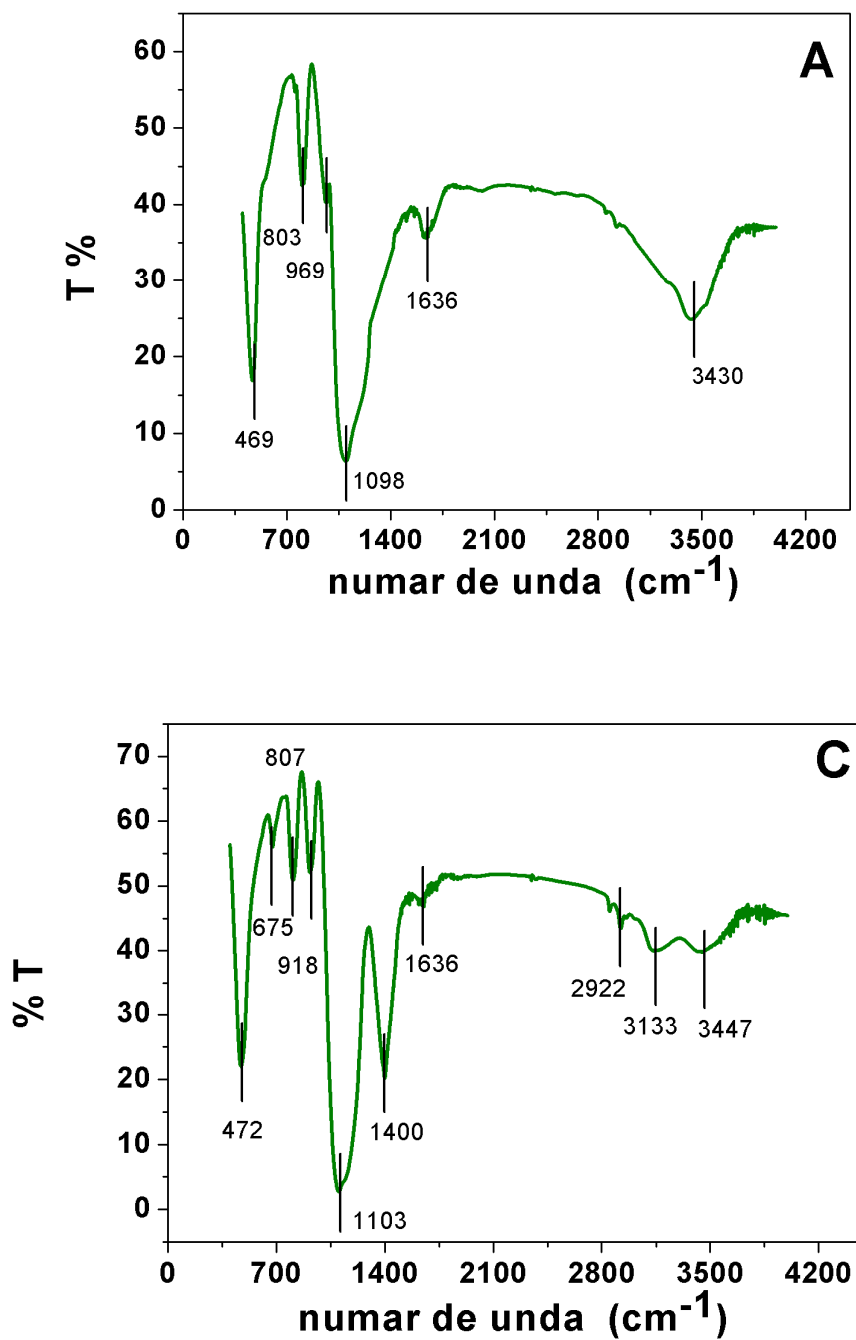


Figura 3. Spectre IR pentru A) siliciu nemodificat și C) microbulele CPG modificate cu APTES.

3.1.4 Metode de referință pentru măsurarea capacității antioxidante

3.1.4.1 Metoda radicalului DPPH

O serie de soluții de DPPH cu concentrații între $5 \cdot 10^{-6}$ și $1 \cdot 10^{-3}$ M a fost preparată cu un amestec 2:3 (v/v) de apă:etanol și o curbă de calibrare a fost trasată prin înregistrarea densității optice (D.O.) a

radicalului la 540 nm. Câteva teste preliminare au fost realizate pentru a alege diluțiile antioxidantilor testați precum și timpul de reacție între aceștia și radicalul DPPH. În cele din urmă, 100 μ L de probă au fost amestecați cu 1,9 mL de $4 \cdot 10^{-4}$ M DPPH iar amestecul de reacție a fost lăsat timp de 1 h la temperatura camerei. După acest timp, D.O. corespunzătoare cantității de DPPH nereacționat servește la calcularea capacității antioxidante cu următoarea formulă:

$$CAO (\%) = \frac{A(DPPH)_{AOX=0} - A(DPPH)_{AOX \neq 0}}{A(DPPH)_{AOX=0}} \times 100$$

3.1.4.2 Metoda Folin-Ciocalteu

500 μ L de reactiv Folin-Ciocalteu (FC) (dilat 1:9 (v/v) cu apă) au fost amestecați cu 100 μ L de probă și cu 400 μ L de Na_2CO_3 (75 g/L). Reacția este lăsată 5 minute la temperatura camerei, iar apoi, formarea unui compus colorat este înregistrată la 735 nm. Această lungime de undă a fost selectată din spectrul UV-Vis pentru o soluție de reactiv FC cu 15 mg/mL de acid galic (AG), după verificarea că probele colorante testate nu absorb la această lungime de undă. O curbă de etalonare a fost trasată cu o gamă de concentrații de AG între 1 și 100 mg/mL (figura 4). Probele reale (vinuri, sucuri și ceaiuri) au fost diluate 1:3 cu tampon PBS, cu excepția vinului roșu, care a fost diluat 1:6. Această diluție a fost necesară pentru a menține valorile D.O. în intervalul liniar al curbei de calibrare. Timpul de reacție a fost ales de 5 minute după ce s-a observat că, în acest interval, valorile D.O. ajung la 80 % din platoul obținut după 30 de minute de reacție (figura 5). Acest timp scurt de reacție este de preferat pentru a compara aceste rezultate cu cele obținute cu sistemul în flux, pentru care timpul de reacție este de aproximativ un minut.

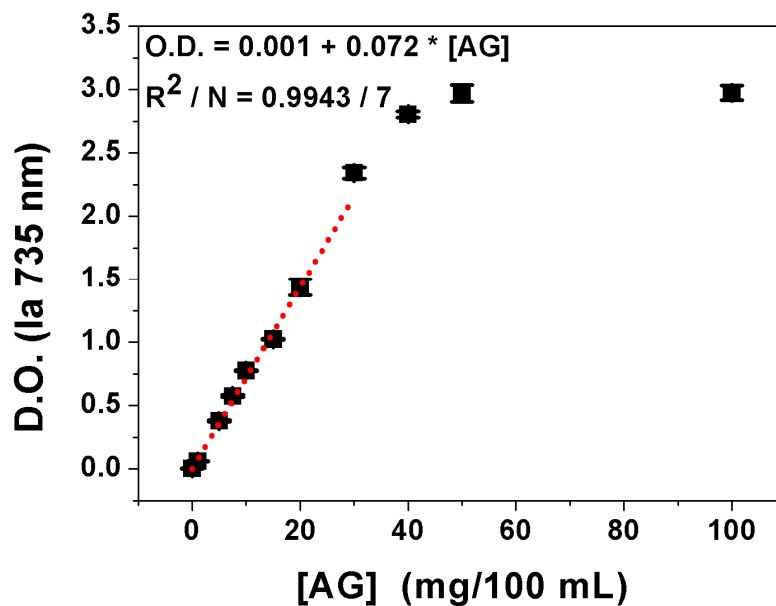


Figura 4. Curba de calibrare pentru variația D.O. a compusului format în urma reacției reactivului FC cu diferite concentrații de acid galic.

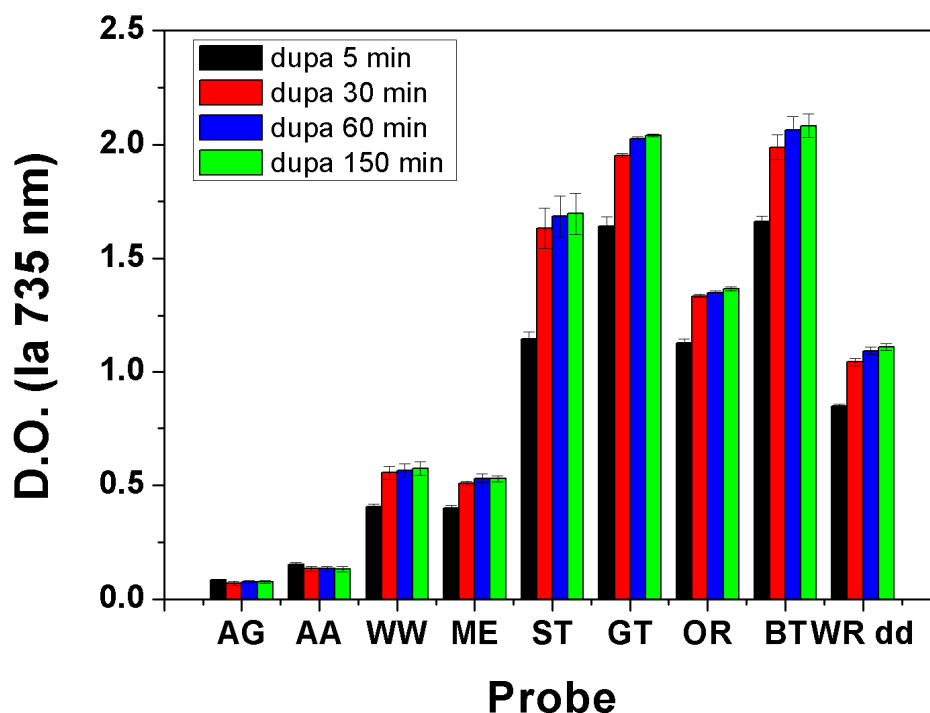


Figura 5. Influența timpului de reacție asupra D.O. a produsului obținut în reacția reactivului FC cu diverse probe reale. Prescurtările semnifică: AG, acid galic; AA, acid ascorbic; WW, vin alb; ME; suc de mere; ST, suc de struguri; GT, ceai verde; OR, suc de portocale; BT, ceai negru; WRdd, vin roșu diluat 2x.

3.2 Rezultate și discuții

3.2.1 Caracterizarea biosenzorului pe bază de peroxidaza din hrean (G/HRP-Os)

Parametrii bioanalitici au fost obținuți prin metoda adaosului standard de H_2O_2 într-o celulă electrochimică standard cu trei electrozi:

- Parametrii cinetici ai reacției enzimatice au fost obținuți cu modelul Michaelis-Menten:
 $I_{\max} = (4,20 \pm 0,08) \mu\text{A}$, $K_M = (16,3 \pm 0,9) \mu\text{M}$ ($R^2 / N = 0.994 / 16$, N fiind numărul de concentrații de H_2O_2).
- Sensibilitatea (definită ca $I_{\max} / K_M$): $0,26 \mu\text{A}/\mu\text{M}$;
- Limita de măsurare (LOM) (definită ca de 10 ori deviația standard a curentului de reducere în lipsa de H_2O_2 împărțită la sensibilitate): $0,46 \mu\text{M}$, ceea ce corespunde, de asemenea la cea mai scăzută concentrație măsurată experimental;
- Limita de detecție (LOD) (definită ca de 3 ori deviația standard a curentului de reducere în lipsa de H_2O_2 împărțită la sensibilitate): $0,13 \mu\text{M}$;
- Domeniu liniar: $0,5 - 12 \mu\text{M}$;
- Timpul de răspuns t_{95} (definit ca timpul necesar pentru a obține 95 % din curentul de reducere la adăugarea oricărei concentrații de H_2O_2): $5,2 \text{ s}$;
- Repetabilitatea (definită ca deviația standard a mediei a 4 măsurători individuale a curentului de reducere înregistrat cu același biosenzor la adăugarea de $6 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$): $1,9 \%$;
- Reproducibilitatea (deviația standard a mediei a 3 măsurători individuale a curentului de reducere înregistrat cu 3 biosenzori diferiți la adăugarea de $6 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$): $13,2 \%$.

Pentru a verifica dacă speciile implicate în funcționarea cuplajului bioreactor-biosenzor prezintă interferențe electrochimice, s-au comparat voltamogramele ciclice obținute cu biosenzorul G/HRP-Os în absența și prezența XA, AU, a acidului ascorbic (AA) și a acidului galic (AG) (figura 6 A, B, C, D). La potențialul de lucru ($-0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$), aceste specii nu sunt active din punct de vedere electrochimic. În plus, s-au înregistrat și curbele de calibrare pentru H_2O_2 cu biosenzorul G/HRP-Os, în absența și în prezența acestor specii (figura 6 E, F, G, H). Parametrii electro-cinetici ai acestor curbe sunt prezentați în tabelul 1. Nu se observă nici o interferență din partea XA și a AU în detecția H_2O_2 . În prezența AA și a AG, scăderea acestor parametri este o dovadă a capacității antioxidante a acestor compuși față de H_2O_2 .

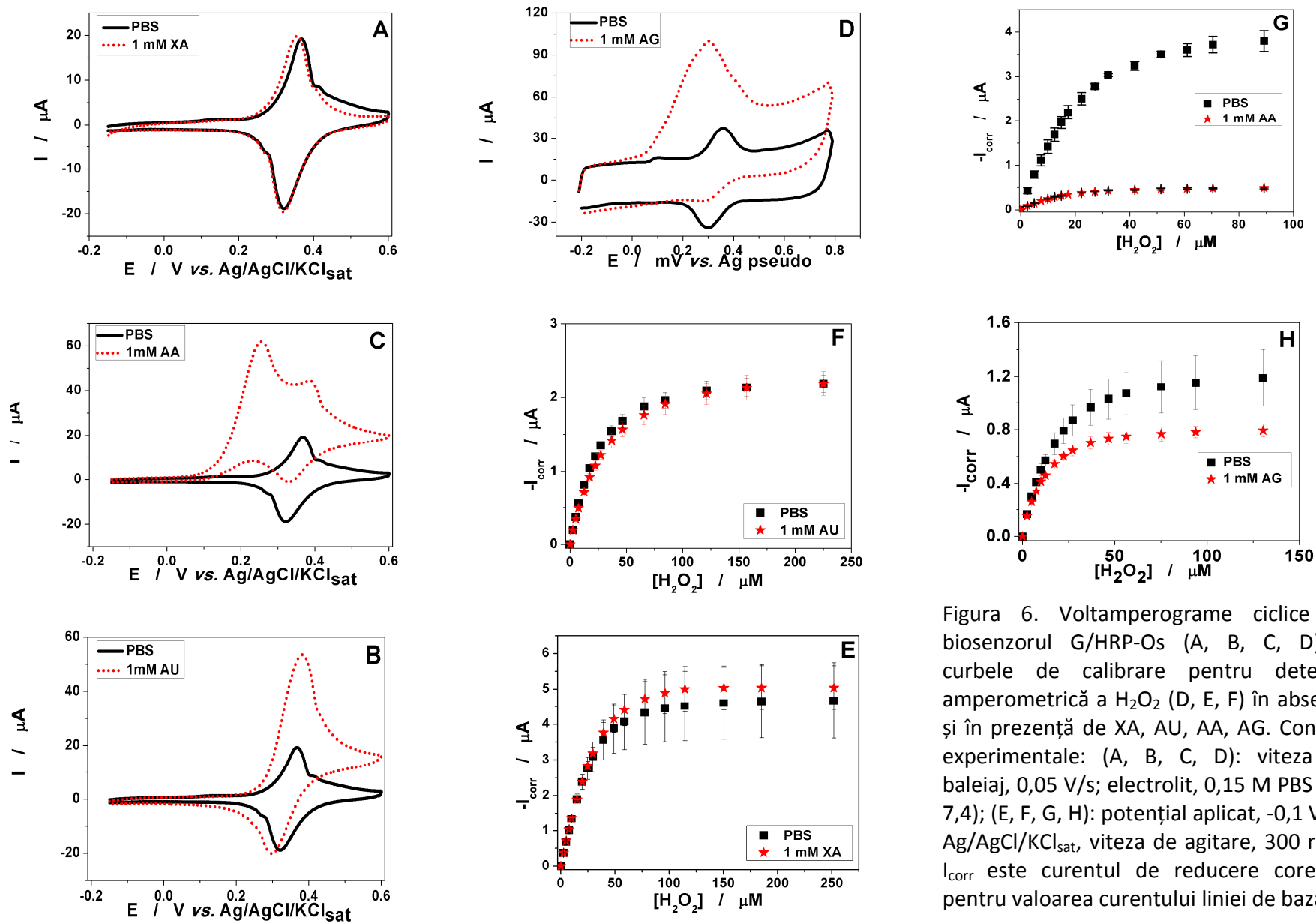


Figura 6. Voltamperograme ciclice cu biosenzorul G/HRP-Os (A, B, C, D) și curbele de calibrare pentru detecția amperometrică a H_2O_2 (D, E, F) în absență și în prezență de XA, AU, AA, AG. Condiții experimentale: (A, B, C, D): viteza de baleiaj, 0,05 V/s; electrolit, 0,15 M PBS (pH 7,4); (E, F, G, H): potențial aplicat, -0,1 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}, viteza de agitare, 300 rpm. I_{corr} este curentul de reducere corectat pentru valoarea curentului liniei de bază.

Tabelul 1. Parametrii modelului Michaelis-Menten pentru detecția H_2O_2 cu biosenzorul G/HRP-Os în absența și în prezența a diverși compuși.

Perametrii modelului Michaelis-Menten		K_M (μM)	I_{max} (μA)	$R^2 / 15$
Figura 6 E	H_2O_2	25 ± 2	5.5 ± 0.1	0.98688
	$H_2O_2 + XA$	28 ± 3	6.0 ± 0.2	0.98421
Figura 6 F	H_2O_2	24 ± 1	2.5 ± 0.0	0.99749
	$H_2O_2 + AU$	29 ± 1	2.5 ± 0.0	0.99914
Figura 6 G	H_2O_2	23 ± 1	4.9 ± 0.1	0.99531
	$H_2O_2 + AA$	13 ± 1	0.6 ± 0.0	0.99444
Figura 6 H	H_2O_2	17 ± 3	1.4 ± 0.0	0.99814
	$H_2O_2 + AG$	11 ± 2	0.9 ± 0.1	0.99653

Pentru a caracteriza și utiliza biosenzorul G/HRP-Os într-un sistem de flux, este necesară calcularea coeficientul de dispersie al unui eșantion în acest sistem. Acesta se calculează din raportul curentului de reducere înregistrat de biosenzor pentru câteva injecții de 10 μL 0,5 mM H_2O_2 și curentul de reducere înregistrat pentru un flux continuu conținând 0,5 mM H_2O_2 . Pentru caracteristici bine definite ale întregului sistem de flux (viteza de curgere, lungimea circuitului, diametrul tuburilor), s-a găsit un coeficient de dispresie de 1,8, carcaterisitic unei bune hidrodinamici a sistemului proiectat.

Cu această valoare, s-au ajustat parametrii electro-cinetici obținuți pentru funcționarea biosenzorului în flux:

- LOD: 2,2 μM H_2O_2 ;
- LOM: 7,5 μM H_2O_2 ;
- Sensibilitatea 5 mA / M;
- Domeniul liniar: 7,5 ÷ 50 μM H_2O_2 .

Stabilitatea operațională pentru o perioadă scurtă de timp (repetabilitatea în flux) a fost testată prin efectuarea a 30 de injecții consecutive de 50 μM H_2O_2 timp de 1700 secunde. Abaterea standard a mediei curentului de reducere a fost de 1,2 %, ceea ce arată stabilitatea excelentă a acestui biosenzor pentru funcționarea în flux.

3.2.2 Determinarea capacității antioxidante folosind cuplajul bioreactor-biosenzor

Noul sistem de determinare CAO se bazează pe cuplajul dintre biosenzorul G/HRP-Os și bioreactorul bazat pe XOD imobilizată pe materialul NH_2 -CPG. Cuplajul este realizat după cum arată figura 2. Alegerea condițiilor de lucru a însemnat:

- Găsirea parametrilor de funcționare caracteristici unui sistem în flux (volumul de injecție, debitul tamponului);

- Alegerea parametrilor funcționali ai biosenzorului G/HRP-Os (stabilitatea, domeniul liniar);
- Alegerea parametrilor bioreactorului (concentrația de XA, cantitatea de XOD imobilizată).

Toți acești parametri sunt conectați: debitul fluxului de tampon care conține XA influențează timpul reacției enzimatică din bioreactor și, astfel, concentrația de H_2O_2 produsă. De asemenea, aceasta depinde și de concentrația folosită pentru XA iar valoarea obținută trebuie să rămână în domeniul liniar de răspuns al biosenzorului. În cele din urmă, debitul stabilește timpul de analiză și, în consecință, viteza de analiză a eșantioanelor.

Pentru alegerea acestor parametri s-a recurs la un plan experimental factorial în care cele două variabile independente, concentrația de XA și debitul, sunt juxtapuse în scopul de a studia efectele lor specifice și interactive asupra curentului de reducere. Pentru fiecare variabilă, s-au folosit cinci nivele de variație iar fiecare nivel al unei variabile a fost asociat cu toate nivelurile celeilalte variabile. Astfel s-au realizat 5^2 măsurători experimentale. Rezultatele sunt prezentate sub forma unui grafic 3D (figura 7), din care se observă că:

- Răspunsul biosenzor variază liniar cu concentrația de XA, pentru toate valorile de debit;
- Creșterea debitului implică scăderea curentului de reducere pentru toate valorile concentrației de XA;

Acest comportament al sistemului este cel caracteristic unei bune funcționări în flux. Astfel, s-a ales cea mai mică concentrație de XA (0,5 mM), care dă un răspuns ridicat al biosenzorului și un debit destul de ridicat (1,5 mL/min), care asigură un timp de contact suficient de mare pentru a menține eficiența bioreactorului. În aceste condiții, timpul necesar pentru analiza unui eșantion a fost 60 secunde, adică o viteză relativ mare de analiză (20 de probe, în triplicat pe oră).

În aceste condiții, stabilitatea operațională a sistemului în flux a fost evaluată prin 50 de injecții succesive de XA (0,5 mM). În plus față de buna stabilitate a semnalului de bază, s-a obținut și o abatere standard foarte scăzută (0,96 %) a mediei curentului de reducere. Pentru stabilitatea pe termen lung (depozitarea bioreactorului la 4 °C timp de 14 de zile) s-a înregistrat o scădere de 35 % în activitatea enzimatică a XOD.

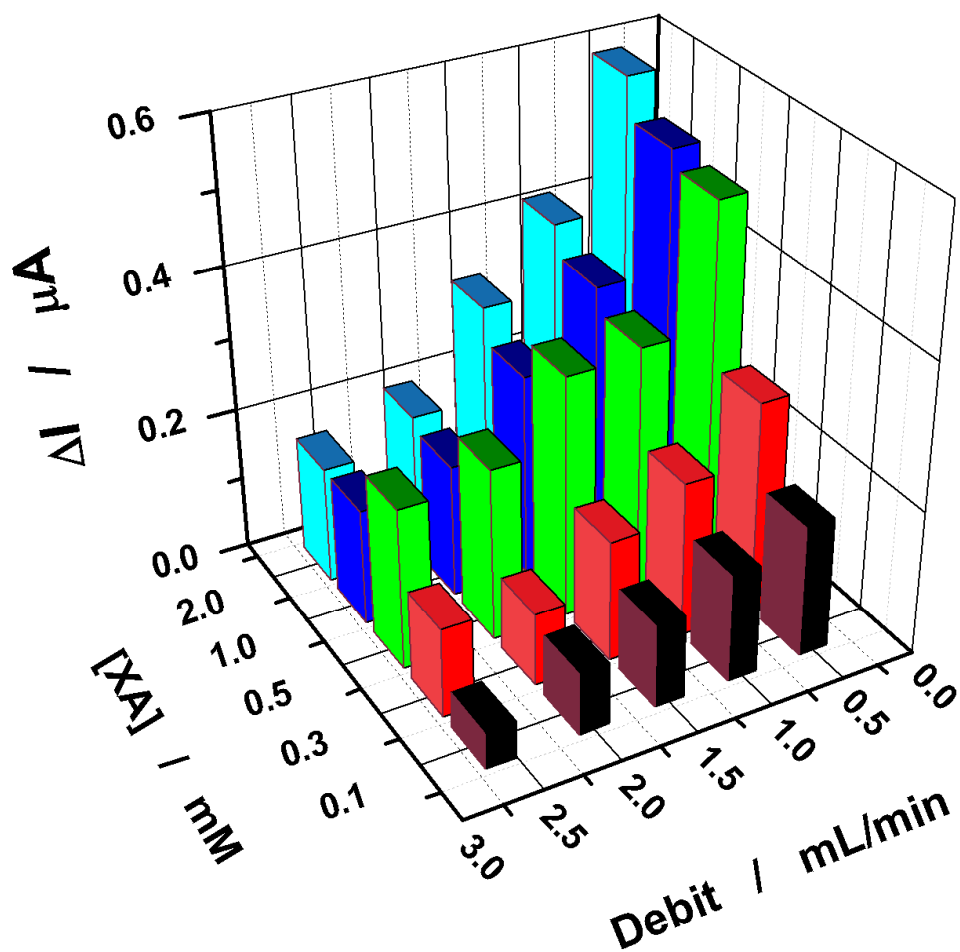


Figura 7. Influența concentrației de XA și a debitului asupra detecției amperometrice a H_2O_2 cu biosenzorul G/HRP-Os. Condiții experimentale: electrolit, 0,15 M PBS (pH 7,4); potențial aplicat, -0,1 V vs. Ag pseudo (DROPSSENS-110); volum injectat, 10 μ L.

3.2.2.1 Modul "staționar"

Cuplajul bioreactor - biosenzor a fost folosit în modul "staționar", pentru a evalua CAO a acidului ascorbic, acesta fiind considerat un antioxidant de referință. Astfel, răspunsul biosenzorului a fost înregistrat pentru o serie de concentrații de AA injectate într-un flux continuu de XA. Abaterea standard pentru 4 injecții succesive de aceeași concentrație de AA nu a depășit 3,2 %. Pentru a calcula CAO, o curbă de calibrare a fost trasată cu curenții de pic relativ $\Delta I_{p, AA} / I_{Xa}$ (unde $\Delta I_{p, AA}$ este curenții de pic și I_{Xa} este curenții liniei de bază în fluxul de XA). Concentrația de AA responsabilă de scăderea curenților de reducere cu 50 % față de valoarea inițială este notată IC_{50} și este considerată ca o modalitate de a evalua CAO. Valoarea obținută (188 μ M) a fost semnificativ mai mare decât cea obținută cu un alt sistem

în flux (2 μ M). Această diferență este justificată prin timpul de contact între antioxidant și speciile reactive din bioreactor, mai scurt în sistemul nostru. Cu toate acestea, acest mod de a exprima CAO în termen de IC_{50} implică trasarea unei curbe de calibrare pentru care este necesar un timp relativ lung (1 oră). Pentru reducerea acestuia s-a propus determinarea capacității antioxidante în modul "tranzitoriu".

3.2.2.2 Modul "tranzitoriu"

Determinarea CAO în modul "tranzitoriu" implică injecția în fluxul de tampon a unui amestec de XA cu antioxidantul testat. Denumirea acestui mod de lucru este prin analogie cu modul "staționar", ambii termeni referindu-se la compoziția fluxului, constantă în XA pentru modul "staționar" și variabilă în XA pentru modul "tranzitoriu". Evaluarea CAO se bazează pe scăderea relativă a curentului de pic, în prezența AOX în comparație cu curentul de pic în absența acestuia (ecuația 1).

Cu această ecuație, s-a obținut CAO pentru AA de 45 %. Prin înlocuirea soluției de XA cu o soluție de H_2O_2 care oferă același răspuns al biosenzorului în aceleași condiții de utilizare a cuplajului, a fost găsită o valoare a CAO pentru AA de 28 %. Acest rezultat justifică construirea sistemului în flux cu o singură linie, crescând șansele AA de a reacționa cu radicalul SO și măsurând astfel o capacitate antioxidantă bivalentă.

Ecuția 1: Evaluarea CAO în modul "tranzitoriu".

$$CAO (\%) = \frac{I_{p,XA} - I_{p,XA+AOX}}{I_{p,XA}} * 100$$

unde: $I_{p,XA}$ este curentul de reducere de pic pentru o soluție de XA și

$I_{p,XA+AOX}$ este curentul de reducere de pic pentru o soluție de XA+AOX

S-a măsurat CAO cu noua ecuație propusă în modul "tranzitoriu" pentru o serie de băuturi comerciale. Curentul de reducere înregistrat la injecția XA și a amestecului de XA cu probele reale este caracterizat printr-o abatere medie standard foarte bună (~4 %) (figura 8). Probele au fost alese deoarece conțin AA ca un constituent natural (pentru probele de sucuri) sau ca aditiv alimentar (pentru probele de ceai). Din păcate, cantitatea exactă de AA nu a fost specificată pe ambalajul produsului și prin urmare o corelație liniară cu CAO măsurată nu a putut fi stabilită. Cu toate acestea, sucul de portocale și mandarine, fructe cunoscute pentru conținutul lor ridicat de acid ascorbic, a arătat cea mai mare CAO din seria testată. În plus, ceaiul notat cu numărul 1 a fost selectat pentru verificarea mențiunii de pe ambalajul

acestuia potrivit căreia el prezintă o bună capacitate antioxidantă. Într-adevăr, CAO a acestuia a fost a doua în seria testată.

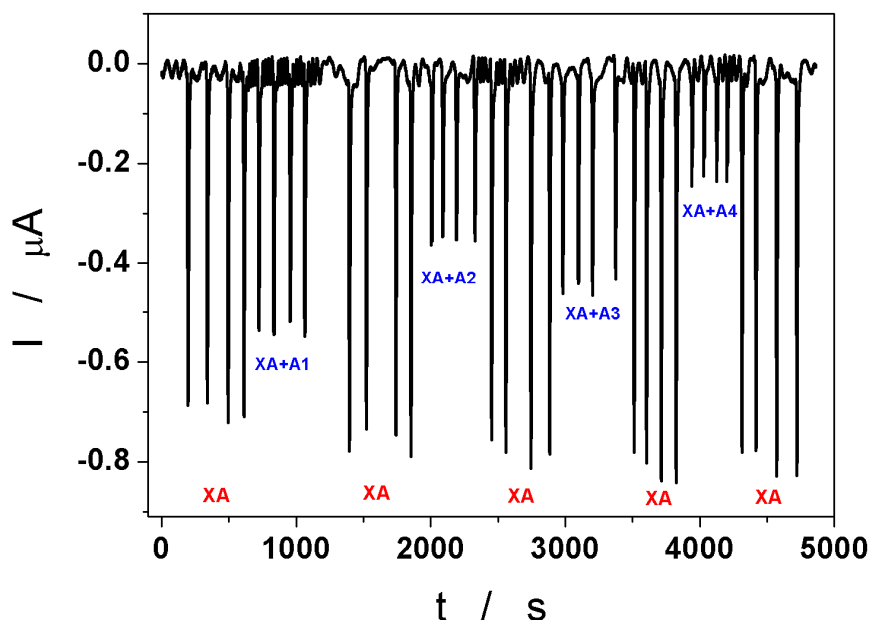


Figura 8. Determinarea CAO pentru diferite probe reale cu modul "tranzitoriu". Condiții experimentale: electrolit, 0,15 M PBS (pH 7,4); potențial aplicat, -0,1 V vs. Ag pseudo (DROPSSENS-110); volum injectat, 10 μ L; debit, 1,5 mL/min; soluția injectată, 0,5 mM XA sau 0,5 mM XA conținând probele reale (A1 = suc de piersici și biscuiți, A2 = suc de portocale, A3 = suc de lămâie galbenă și verde, A4 = suc de lămâie galbenă).

S-au folosit două metode de referință pentru a compara valorile CAO obținute cu sistemul bioanalitic în flux. Coeficientul de corelație cu metoda radicalului DPPH a fost de 0,238 pentru cele 8 probe din seria testată. Această corelație scăzută se explică prin diferența de reactivitate între cei doi radicali implicați: DPPH și radicalul SO. Primul este un radical organic stabil iar reacția sa cu AOX se bazează pe un transfer de electroni [20]. Al doilea este un radical mult mai reactiv iar mecanismului său de reacție cu AOX se bazează pe un transfer mixt de electroni și protoni [21]. Această diferență de reactivitate se regăsește și în timpul necesar până la sfârșitul reacției și anume o oră pentru DPPH și un minut pentru radicalul SO. Aceeași corelație slabă a fost găsită între metoda radicalului DPPH și un alt sistem în care reacția dintre H_2O_2 și AOX a fost urmărită prin măsurători de bioluminescență.

Pentru a caracteriza mai bine sistemul propus, a fost testat un set mai variat de probe. Acesta include probe de vinuri și sucuri cu un conținut redus de AA (vin roșu și alb, suc de mere, suc de struguri) și eșantioane cu un conținut ridicat de AA (suc de portocale și o soluție standard de AA de 20 mg/100

mL). Coeficientul de corelație dintre CAO obținută cu sistemul propus și metoda Folin-Ciocalteu a fost de 0,972 pentru 6 probe. Acest lucru arată că, în afară de AA, și alți constituenți ai acestor probe (polifenolii) contribuie la valorile de CAO obținute iar ambele metode țin cont de această contribuție.

4 Concluzii

În această primă parte, s-a elaborat un sistem în flux pentru evaluarea capacității antioxidante. Sistemul este alcătuit dintr-un bioreactor, responsabil pentru producerea de specii reactive ale oxigenului ($O_2^{\bullet-}$ și H_2O_2), și un biosenzor pentru detecția apei oxigenate.

În evaluarea capacității antioxidante, acest sistem prezintă următoarele avantaje, în comparație cu alte sisteme [15, 17]:

- i. Introducerea antioxidantului amestecat cu o soluție de XA în bioreactor, facilitează un contact mai intim între acesta și speciile reactive ale oxigenului. Știind că reacția de disproporționare a radicalilor SO este foarte rapidă, acest mod de lucru crește probabilitatea de reacție între această specie reactivă și AOX.
- ii. O singură măsurătoare cu biosenzorul G/HRP-Os exprimă capacitatea antioxidantă față de două specii reactive ($O_2^{\bullet-}$ și H_2O_2).
- iii. Selectivitatea celor două reacții enzimaticе (oxidarea XA și reducerea H_2O_2) asigură lipsa interferențelor.

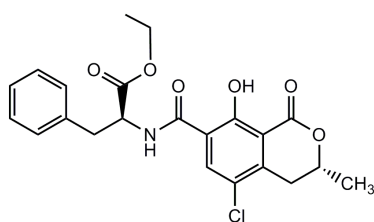
În cele din urmă, parametrii bio-electroanalitici precum și simplitatea și viteza bună de analiză a sistemului au permis utilizarea acestuia pentru evaluarea CAO a unor probe reale de vinuri, sucuri și ceaiuri, cu o bună corelație cu metoda Folin - Ciocalteu.

*Partea 2. Sisteme
bioanalitice pentru
detectia ocratoxinei A în
alimente*

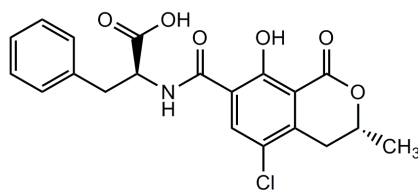
1 Studiu bibliografic

1.1 Produsele alimentare contaminate cu ciupercile producătoare de OTA

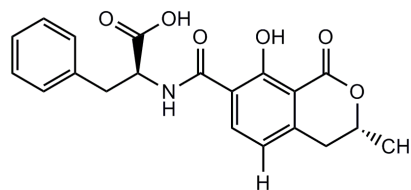
Ocratoxina A (OTA) a fost descrisă pentru prima dată în 1965 de către van der Merwe ca metabolit al *Ochraceus Aspergillus Wilh* [22]. Găsită pe suprafața mai multor legume din Africa de Sud, OTA este N-[5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1H-1oxo-2-benzopiran-7-il)carbonil]-L-fenilalanină. Au fost identificate și derivatul declorinat, ocratoxina B și esterul etilic, ocratoxina C. În 1969, OTA este identificată drept un contaminant al porumbului în Statele Unite, produsă de *Wrestling Viridicatum Penicillium*. Apoi, OTA a fost găsită în întreaga lume, în regiunile cu climă rece și temperată, fiind produsă de *P. verrucosum* și de *A. carbonarius* iar în regiunile calde și tropicale de către *A. ochraceus*. *P. verrucosum* este specifică cerealelor depozitate, *A. ochraceus* este ciuperca cel mai frecvent întâlnită în cafeaua verde, condimente, boabe de cacao, soia, alune, orez și porumb iar *A. carbonarius* este susceptibilă de a contamina între altele strugurii și astfel vinurile.



Ocratoxina A



Ocratoxina B



Ocratoxina C

Deși infecțiile fungice pot apărea și înainte și după recoltare, sinteza OTA apare, în special în timpul depozitării. Mecanismul de biosinteză nu este bine cunoscut iar organizarea genelor care codează sinteza acestei micotoxine este încă în curs de studiu. Formarea OTA depinde de puterea tulpinii toxigene dar și de practicile utilizate în procesul tehnologic de obținere al produselor alimentare. De exemplu, una dintre soluțiile pentru a evita prezența OTA în cereale constă în controlul nivelului de umiditate în momentul umplerii silozului și în timpul depozitării, știind că dezvoltarea *P. verrucosum* este favorizată de o activitate de apă mai mare de 0,8 (Aw). În vițele de vie, numai daunele cauzate fructelor de către utilaje sau insecte sunt cauza contaminării și evoluției ulterioare a tulpinii de *Aspergillus*, care, dealtfel nu ar fi patogenă pentru vița de vie.

1.2 Efectele toxice ale ocratoxinei A

Absorbția OTA la nivelul stomacului și a intestinului subțire este favorizată de caracterul acid al toxinei. După absorbție, afinitatea ridicată a toxinei pentru proteinele plasmatică duce la formarea unui complex stabil cu acestea, ceea ce favorizează reținerea OTA în organism pentru timp îndelungat (timpul de înjumătățire este de 840 de ore în caz de ingestie orală). Produșii de biotransformare a ocratoxinei sunt ocratoxina α (OT α), două forme izomerice 4R și 4S-hidroxi-OTA și 10-hidroxiocratoxina, aceștia având toxicitate redusă.

La animale, toxicologia generală a OTA implică genotoxicitate, carcinogenitate și efecte teratogene iar toxicologia organelor cuprinde nefrotoxicitate, hepatotoxicitate și imunotoxicitate. La om, o corelație pozitivă între expunerea la OTA și Nefropatia endemică din Balcani (BEN) a fost găsită în 1987 în țările din Europa de Est (România, Bulgaria). OTA a fost clasificată ca potențial agent cancerigen (Grupa 2B) de către Agenția Internațională pentru Cercetarea Cancerului.

1.3 Reglementările și metodele de referință pentru detecția OTA

Metodele analitice pentru determinarea cantitativă a OTA urmează aceiași pași ca cele de cuantificare a micotoxinelor: prelevarea probei, extracția, purificarea, separarea și detecția.

1.3.1 Extracția și purificarea

Extracția OTA din probele reale se realizează cu un amestec de solvenți organici și apoși, a cărui compoziție depinde foarte mult de tipul de probă. De exemplu, pentru determinarea OTA în vinuri, o metodă veche (1990) a "Asociației chimiștilor analiști oficiali" (AOAC) propune utilizarea cloroformului. Dar, pentru motive de protecția mediului, se recomandă scoaterea din uz a solvenților clorurați. Astfel, noul standard al Comitetului European de Standardizare din 2009 (CEN EN 14133:2009), bazat pe metoda AOAC nr. 2001.01 "Determinarea ocratoxinei A în vinuri prin purificare cu IAC și detecție prin cromatografie lichidă", prevede diluarea probei de vin cu un volum egal de soluție de 5 % NaHCO₃ și 1 % PEG (polietilen glicol) cu pH 8,5. La pH-ul acid al vinului, OTA este solubilă în solvenți organici polari și foarte puțin solubilă în apă. Acest lucru justifică utilizarea unui pH alcalin la care OTA devine solubilă în soluția apoasă de carbonat de sodiu. Utilizarea de PEG este esențială pentru îmbunătățirea procentului de recuperare și pentru a reduce efectul de matrice în etapa de separare și detecție. Acești parametri au fost optimizați de Visconti et al. [23] și validați prin studii între laboratoare, publicate în "Journal of AOAC International" [24].

Pentru purificarea extractului se folosesc coloanele de imuno-afinitate. Acestea utilizează anticorpii anti-OTA pentru a realiza o purificare foarte specifică. După etapa de extracție, probele de vin și bere pot fi aplicate direct pe coloană, în timp ce pentru probe mai complexe, cum ar fi cafeaua, o coloană de silice grefată cu diferite grupări (amino [25], fenil [25]) este prevăzută în amonte, pentru eliminarea cofeinei. Capacitatea de adsorbție a siliciului modificat este justificată prin caracterul anionic al grupărilor $-NH_2$ la care contribuie caracterul ionic al soluției de carbonat de sodiu. Procentul de recuperare a OTA în coloanele de extracție în fază solidă variază în funcție de concentrația de OTA cu care proba a fost dopată, dar, de asemenea, și în funcție de grupările funcționale ale fazei solide și de solventul utilizat pentru eluție.

Pentru purificarea probelor de vin, Rusanova et al. [26] au utilizat coloane de siliciu modificat cu aminopropil ($Si-NH_2$) sau cu aminopropil trimetilamoniu (SAX) cu care au obținut probe aproape incolore, dar pentru care procentul de recuperare al OTA nu a fost măsurat. Cele două valori de pK_a ale OTA, corespunzătoare grupărilor hidroxil și carboxil sunt 4,4 și 7.1, astfel încât la pH-ul soluției de extracție (pH 8), toxina este încărcată negativ. La acest pH, faza solidă este încărcată pozitiv și implicit, interacțiunile electrostatice sunt responsabile pentru reținerea OTA pe suport. Dar, în același timp, interacțiunile electrostatice sunt de asemenea responsabile pentru reținerea unui număr ridicat de compuși din matricea vinului.

1.3.2 Separarea și detecția OTA

Cromatografia pe strat subțire este prima tehnică de analiză pentru detecția OTA, propusă în 1975. Separarea a fost efectuată în fază normală pe o fază staționară de siliciu cu o fază mobilă constând din solvenți organici clorurați și metanol. La iradierea cu UV, OTA are o culoare albastră-verde care devine violetă prin tratarea cu o soluție alcalină. Astfel, un rezultat pozitiv implică re-extracția, conversia în esterul metilic prin tratarea cu BF_3/CH_3OH sau HCl/CH_3OH și în cele din urmă, detecția prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu detecție prin fluorescență (HPLC-FD). Acest procedeu este metoda oficială pentru detecția OTA în porumb [27].

HPLC-FD este tehnica cea mai des folosită pentru detecția OTA, deoarece toxina prezintă fluorescență naturală. Faza staționară este de tip C18 și faza mobilă este un amestec de acetonitril sau metanol cu acid acetic sau acid fosforic. Această acidificare este necesară pentru a reduce retenția nespecifică, deoarece OTA este un acid slab. Limitele de detecție sunt suficient de scăzute pentru detecția ocratoxinei A în orz, grâu și secară (10 mg/kg). Studiile între laboratoare au validat această

tehnică pentru detecția OTA în vin, deoarece valorile procentului de recuperare au fost între 93 și 84 % pentru concentrații de OTA între 0,2 și 3 ng/mL [28].

1.4 Teste imunologice pentru depistarea OTA

Testele imunologice sunt tehnici biochimice care utilizează reacția dintre antigeni (AG) și anticorpii (Ac). Având în vedere această interacțiune specifică, aceste teste sunt presupuse a fi sensibile și capabile să detecteze antigenului sau anticorpii într-o matrice complexă. Etapa de extracție și purificare a probelor ar trebui să devină mai simplă, sau chiar să fie eliminată. Acest lucru înseamnă o reducere semnificativă a timpului total de analiză. Un minim de pretratare a probei este totuși necesar în cazul unei detecții colorimetrice. Imunosenzorii sunt un caz aparte al testelor imunologice deoarece biomoleculele (anticorpii sau antigenii) sunt imobilizate la suprafața unui electrod. Testele imunologice și imunosenzorii dezvoltați pentru detecția OTA se încadrează în formatul general al acestor tehnici.

Testele imunologice competitive implică concurența între antigenul existent în probă și antigenul marcat cu o enzimă, adăugat probei, pentru epitopii liberi ai anticorpilor, imobilizați pe diferite suporturi. Acest tip de test este cunoscut cu numele de test ELISA direct (din limba engleză "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"). Semnalului analitic este obținut cu ajutorul enzimei și este proportional cu concentrația de antigen. În cazul testelor pentru OTA, antigenul etichetat utilizat frecvent este conjugatul OTA-HRP, a cărui sinteză a fost publicată de Radoi et al [29]. Această tehnică a fost folosită pentru detecția OTA în mostre de vin iar rezultatele au fost validate prin HPLC-FD. Un alt exemplu este conjugatul OTA-alcalin fosfataza (ALP), utilizat, de asemenea, într-un test ELISA direct și transferat pe suprafața unor electrozi serigrafiați pentru obținere de imunosenzori [30]. Un caz aparte al testului ELISA direct este publicat de Rusanova et al. [26] în care concurența se desfășoară în două etape: anticorpii imobilizați sunt incubați pentru un anumit timp cu proba ce conține OTA, iar după o etapă de spălare, aceștia sunt incubați cu OTA-HRP (figura 9).

Testele imunologice competitive indirecte (testele ELISA indirecte) implică concurența între un antigen conjugat cu o proteină, imobilizat pe un suport și antigenul din probă pentru epitopii liberi ai anticorpului adăugat în probă. Cel mai des folosiți sunt conjugatul OTA cu albumina serică bovină (BSA) și cu biotina. Aceștia au fost imobilizați prin adsorbție pe un suport nemodificat și respectiv printr-o legătură de afinitate pe un suport modificat cu avidină [31, 32]. Semnalului analitic este obținut cu ajutorul unei enzime sau a unui compus fluorescent cu care anticorpii au fost modificați înaintea efectuării testului. În cazul anticorpilor pentru OTA, acest gen de etichetare nu a fost folosit încă. În

schimb, se utilizează un al doilea anticorp, denumit anticorp anti-IgG, conjugat cu HRP sau ALP. Aceste enzime permit obținerea semnalului analitic prin teste colorimetrice și electrochimice, acesta fiind indirect proporțional cu concentrația toxinei [31].

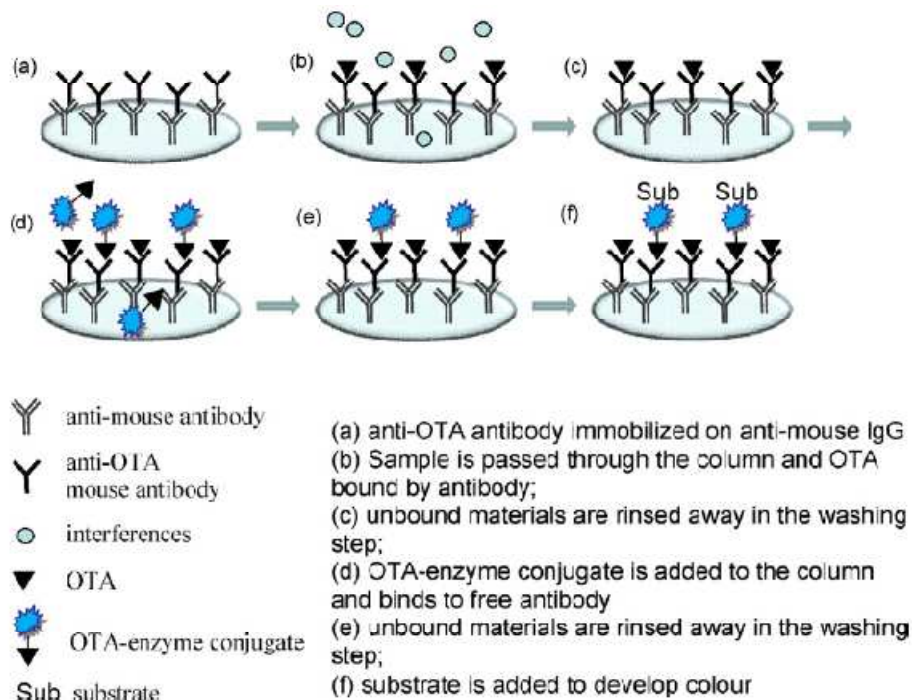


Figura 9. Testul ELISA direct cu reacția de competiție realizată în două etape [26].

Toți acești conjugați ai ocratoxinei A nu sunt disponibili în afara kiturilor ELISA comerciale. De aceea, ei trebuie sintetizați în laborator ori de câte ori este necesar. Pentru evitarea expunerii la potențialele pericole cauzate de toxicitatea acestor conjugați, o soluție este folosirea unui compus peptidic, netoxic, care imită epitopul ocratoxinei A. Acesta a fost selectat prin expunerea anticorpilor anti-OTA la o bancă de bacteriofagi [33].

2 Scop

Pentru a detecta ocratoxina A, abordarea noastră se bazează pe utilizarea ocratoxinei B (OTB), o micotoxină cu structură asemănătoare dar mult mai puțin toxică decât OTA. Cele două micotoxine sunt produse de aceleași tulpini într-un raport de 1:5 (OTB:OTA) [34]. Toxicitatea redusă a OTB este justificată prin lipsa atomului de clor din structura sa [35]. În structura OTA, atomul de clor contribuie la stabilizarea radicalului fenolic, produs în reacțiile de bioactivare a toxinei, și la creșterea capacității de chelare a ionilor ferici (Fe^{3+}). Radicalul fenolic poate reacționa cu glutaniona (GSH) dând naștere la radicalul superoxid. Complexul OTA-Fe^{3+} poate servi ca substrat pentru ansamblul citocrom P450 - NADH

cu formarea de OTA-Fe^{2+} , care apoi produce radicali hidroxili ($\text{HO}^\bullet$). Aceste SRO astfel generate sunt responsabile pentru peroxidarea lipidelor și deteriorarea ADN-ului, justificând, în parte, toxicitatea OTA [35].

OTB a fost utilizată într-un test imunologic bazat pe reacția de deplasare. Acest test folosește reactivitatea încrucișată a anticorpilor față de un antigen cu o structură similară cu cea a antigenul țintă. Pentru a diferenția între cei doi antigeni, cel care reprezintă molecula țintă este antigenul pentru care anticorpii au o afinitate ridicată (AG) iar cel responsabil pentru reactivitate încrucișată este antigenul cu afinitate scăzută (AG*). Acest tip de test imunologic implică, pe lângă reacțiile de asociere dintre antigen și anticorpi întâlnite în testele competitive directe și indirecte, și reacțiile de disociere ale aceluiași complex și de reasociere a anticorpilor într-un nou complex. Această abordare a fost încercată de Prieto-Simon et al. [31] fără succes deoarece antigenul OTA-BSA, despre care se presupunea fiind antigenul AG* s-a dovedit a arăta o afinitate mai mare pentru anticorpi decât antigenul țintă (AG), OTA.

Cu scopul de a aplica acest tip de test în detecția OTA, s-a obținut un material bio-sensibil prin imobilizarea OTB pe microbule de sticlă cu dimensiunea controlată a porilor (CPG). Următoarele paragrafe arată etapele de optimizare ale acestui test și posibilitatea de utilizare a acestui material pentru detecția OTA în probe de vin.

3 Rezultate originale

3.1 Partea experimentală

3.1.1 Măsurători electrochimice, spectrofotometrice și cromatografice

Măsurătorile electrochimice au fost efectuate la temperatura camerei, cu un potențostat PalmSens V 1.6.1.0, Olanda. Pentru măsurătorile electrochimice în flux, s-a folosit-o celulă de tip "wall-jet" (DRP-FLWCL, DropSens), adaptată la electrozi serigrafiați (DropSens DRP-110, Spania). Fluxul a fost asigurat cu o pompă peristaltică iar injecțiile cu o vană de injecție cu 6 canale. Măsurătorile spectrofotometrice au fost efectuate cu un cititor de microplăci Multiscan Ex, Thermo Life Sciences, Franța.

Măsurătorile de cromatografie lichidă de înaltă performanță au fost efectuate pe o coloană cu fază inversă C18 (Kinetex, 2,6 μm , 100 Å, 100 × 4,6 mm, Phenomenex, Statele Unite ale Americii). Faza mobilă a fost un amestec de acetonitril:apă:acid acetic (51:47:2 v/v/v) iar volumul injectat a fost de 20 μL . Fluxul a fost asigurat de o pompă Lazchrom, Hitachi, L-7110 (Merck, Germania) cu un debit de 1

mL/min. Detecția s-a realizat cu un senzor de fluorescență LaChrom, Hitachi L-2485 (VWR, Franța). Lungimile de undă de excitație și de emisie au fost 330 și respectiv 460 nm.

3.1.2 Obținerea materialului bio-sensibil

3.1.2.1 Modificarea microbilelor de sticlă cu grupări amino

Introducerea grupărilor amino ($-NH_2$) la suprafața microbilelor de sticlă cu dimensiunea controlată a porilor (GPC) a fost efectuată în conformitate cu protocolul prezentat în prima parte a acestei teze, paragraful 3.1.3. Testul Kaiser a fost utilizat pentru a măsura gradul de acoperire a CPG cu grupările $-NH_2$. Acest test se bazează pe formarea unui complex albastru între ninhidrină și grupările amino. Spectrul de absorbantă al acestui complex prezintă un maxim la 570 nm. O curbă de etalonare a fost trasată cu soluții de APTES (3-aminopropiltriethoxisilan) de concentrații cunoscute (figura 10) și utilizată pentru calcularea gradului de acoperire a CPG. Valoarea obținută ($0,66 \text{ mmol } -NH_2/g$) se află în intervalul de valori găsite pentru această reacție de silanizare ($0,3 \div 2 \text{ mmol/g}$) [36].

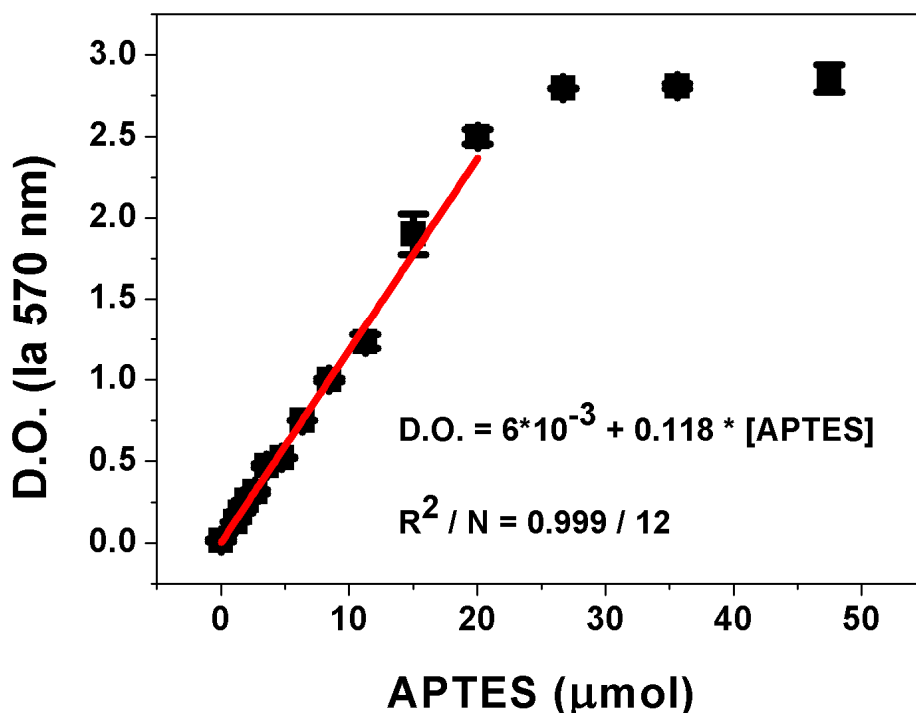


Figura 10. Curba de calibrare pentru soluții de APTES de concentrații cunoscute. Apariția culorii se realizează cu testul Kaiser.

3.1.2.2 Imobilizarea ocratoxinei B pe microbulele de sticlă

Microbulele CPG-NH₂ (200 mg) au fost suspendate în 400 µL de tampon fosfat de potasiu (KPB, 10 mM, pH 7,4) conținând 80 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidă și 100 mM N-hidroxisuccinimidă. La această suspensie s-au adăugat 400 µL de soluție de 35,2 µM OTB. După 30 de minute de reacție la temperatura camerei, supernatantul a fost colectat prin centrifugare la 6000 rpm timp de 30 de secunde. Acest protocol a fost folosit pentru separarea microbulilor de soluție în toate etapele necesare obținerii materialului bio-sensibil. Microbulele OTB-CPG astfel obținute au fost spălate o dată cu tampon KPB - 0,05 % Tween 20 și de două ori cu tampon KPB.

3.1.2.3 Legarea anticorpilor anti-OTA și etichetarea acestora cu al doilea anticorp

Pentru a evita adsorbția nespecifică, microbulele OTB-CPG au fost imersate într-un tampon de blocare (KPB - 0,5 %, cazeină grad Hammerstein) pentru 30 de minute. Apoi, s-a adăugat anticorpul anti-OTA la o concentrație finală de 10 µg/mL și s-a lăsat 30 de minute la temperatura camerei sub agitare magnetică la 150 rpm. După separarea și spălarea microbulilor, la acestea s-a adăugat cel de-al doilea anticorp (denumit anticorp anti-IgG), marcat cu enzima HRP și s-a lăsat 30 de minute la temperatura camerei sub agitare magnetică la 150 rpm. La final, microbulele au fost separate și spălate, obținându-se astfel materialul bio-sensibil (figura 11).

3.1.3 Detecția OTA cu testul imunologic de deplasare pe materialul bio-sensibil

Materialul bio-sensibil a fost dispersat într-o soluție de KPB (1:8 m/v) din care s-au prelevat, sub agitare constantă, 5, 25 și 50 de µL. La aceștia s-au adăugat 150 µL de soluții de diferite concentrații de OTA și s-au lăsat să reacționeze 10 minute la temperatura camerei sub o agitare orbitală de 300 rpm. Supernatantul a fost recuperat cu ajutorul protocolului de separare (vezi paragraf 3.1.2.2) iar activitatea enzimatică a HRP a fost urmărită spectrofotometric și amperometric.

3.1.3.1 Detecția spectrofotometrică

La 100 µL din fiecare supernatant colectat s-au adăugat 50 µL de substrat colorimetric (TMB și H₂O₂) și s-a înregistrat variația absorbanței la 620 nm timp de 20 de minute cu cititorul de plăci ELISA. Reacția a fost oprită cu 50 µL 0,5 M H₂SO₄ și s-a citit valoarea absorbanței la 450 nm. Aceasta este corelată cu concentrația OTA.

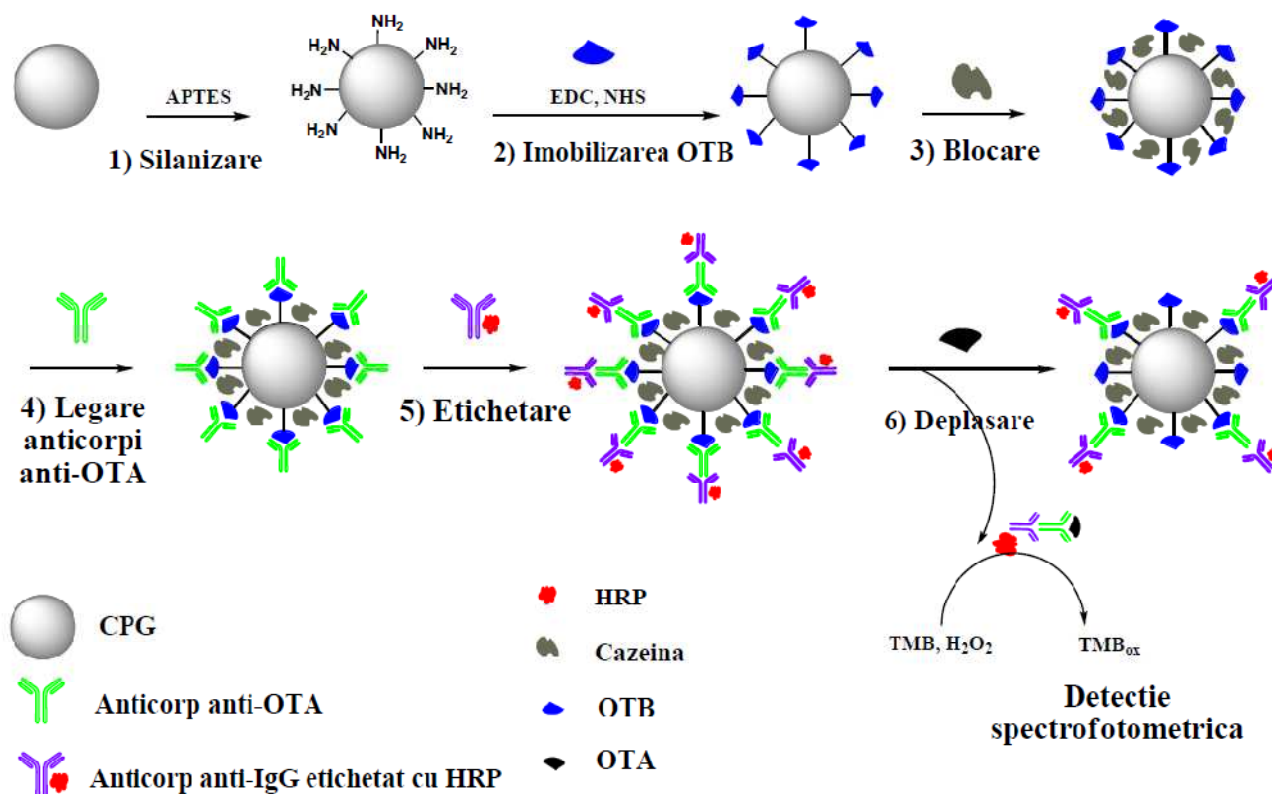


Figura 11. Etapele de obținere a materialului bio-sensibil (1-5) și reacția de deplasare (6) în prezența OTA.

3.1.3.2 Detectia amperometrică cu analiza prin injecție în flux

Produsul reacției enzimatică (TMB_{ox}), obținut în etapa precedentă, a fost diluat 1:4 v/v cu 0,5 M H₂SO₄ și 50 μ L au fost injectați într-un flux de 0,5 M H₂SO₄ (1 mL/min). Curentul de reducere al TMB_{ox} este înregistrat la 0,1 V vs. electrodul de referință pseudo Ag. Acesta este corelat cu concentrația de OTA.

3.1.4 Metode de extracție și purificare a vinurilor și validarea lor prin HPLC-FD

3.1.4.1 Metoda standard de extracție și purificare a vinurilor dopate cu OTA

Extracția OTA din probe de vin a fost efectuată în conformitate cu norma Comitetului European de Standardizare din 2009 (CEN EN 14133:2009). Astfel, 10 mL de vin dopat cu 5 ng/mL OTA au fost amestecați cu 10 mL de soluție de pH 8.5 conținând 5 % NaHCO₃ și 1 % PEG (8000). Această probă a fost filtrată cu o membrană de acetat de celuloză (dimensiunea porilor de 0,2 μ m) iar 10 mL din filtrat au fost purificați printr-o coloană de imuno-afinitate (Ochraprep®). Coloana a fost spălată cu 5 mL de soluție conținând 2,5 % NaCl și 0,5 % NaHCO₃ și cu 5 mL de apă. OTA a fost eluată din coloană cu 2 mL de

metanol, care a fost apoi eliminat prin barbotare de aer până la evaporarea completă. OTA a fost reconstituită în tampon KPB și concentrația a fost măsurată prin injecție în HPLC-FD.

3.1.4.2 Extracția și purificarea în fază solidă pentru obținerea OTA din vinuri

S-a obținut o coloană de extracție în fază solidă prin umplerea unei seringi de plastic (volum total 2,5 mL) cu 500 mg de siliciu modificat cu 3-aminopropil (Si-NH₂). Coloana a fost condiționată cu 2 mL de tampon KPB, fără a permite uscarea acesteia. Apoi, 2 mL de vin dopați cu 9 ng de OTA au fost trecuți prin coloană iar fracții a câte 0,5 mL au fost colectate. Prezența OTA în aceste fracții precum și procentul de recuperare au fost verificate prin injectare în HPLC-FD.

3.2 Rezultate și discuții

3.2.1 Caracterizarea materialului bio-sensibil

3.2.1.1 Imobilizarea ocratoxinei B pe microbilele de sticlă

Alegerea microbilelor de sticlă CPG pentru imobilizarea OTB este justificată de raportul mare între suprafața (17 m²/g) și volumul (3,2 cm³/g) acestora, care permite utilizare unei cantități mici de material și reduce implicit toate volumele soluțiilor necesare. Acest material a fost deja folosit pentru umplerea canalelor unor microcipuri [15, 37] sau a diverselor coloane [38] în care, având în vedere porozitatea ridicată a materialului, s-au atins debite de 2,5 mL/min. Astfel, viteza de analiză a eșantioanelor este foarte mare. Pe acest material, s-a reușit imobilizarea de enzime, anticorpi [39] și bacterii [38]. Însă, există puține exemple cu privire la utilizarea acestui material pentru teste imunologice de tip deplasare.

Succesul imobilizării ocratoxinei B pe CPG a fost dovedit prin măsurători de fluorescență pentru soluția de OTB utilizată înainte și după procesul de imobilizare. Valorile fluorescenței sunt corelate cu concentrația de OTB printr-o curbă de calibrare (figura 12). S-a exprimat concentrația soluției de OTB folosită la imobilizare în funcție de cantitatea de microbile folosite (μmol/g). Cantitatea de OTB imobilizată depinde de cantitatea de OTB în soluție, iar randamentul de imobilizare a variat între 5 și 26 % (tabelul 2). Având în vedere că gradul de acoperire a microbilelor cu grupările amino este de 0,66 mmol/g, s-a calculat că doar 0,04 % din aceste grupări sunt implicate în legături covalente cu OTB. Această valoare este doar aparent scăzută deoarece imobilizarea unui cantități mari de OTB ar însemna imobilizare unei cantități mari de anticorpi ceea ce ar reduce sensibilitatea testului imunologic.

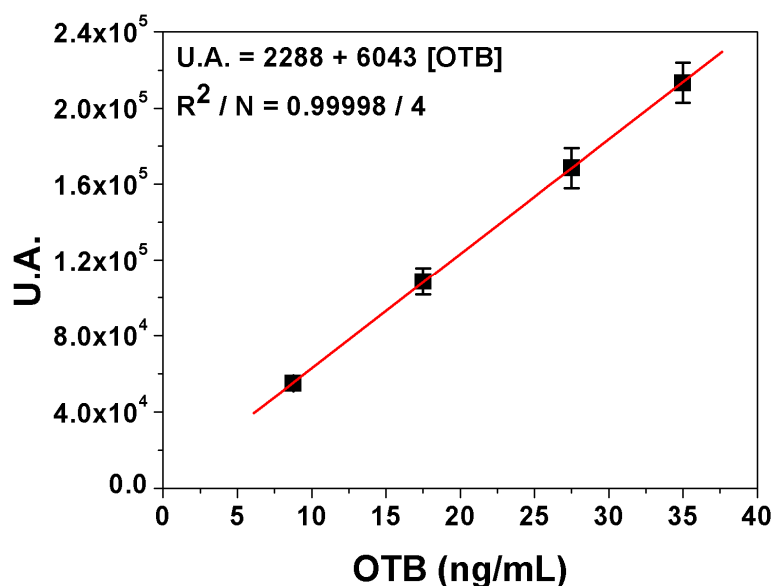


Figura 12. Curba de calibrare pentru soluții de OTB, cu măsuratori de HPLC-FD. U.A. semnifică unități arbitrare de fluorescență.

Tabelul 2. Dependența cantității de OTB imobilizată de cantitatea de OTB din soluția de imobilizare. Cantitățile de OTB sunt măsurate cu HPLC-FD.

	OTB ($\mu\text{mol/g}$)			
În soluție, înainte de imobilizare	$0,212 \pm 0,008$	$0,733 \pm 0,001$	$1,17 \pm 0,02$	$6,22 \pm 0,11$
Imobilizată	$0,055 \pm 0,008$	$0,19 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,02$

Legarea specifică a anticorpului anti-OTA de microbulele OTB-CPG a fost dovedită prin experimentele de control în care câte o etapă din procesul de obținere a materialului bio-sensibil este eliminată. Ultima etapă, cea de utilizare al celui de-al doilea anticorp (anti-IgG-HRP) este mereu păstrată pentru obținerea semnalului analitic (valorile de absorbanță la 450 nm, corespunzătoare formării produsului enzimatic, TMB_{ox} , tabelul 3, coloana 8). Prezența cazeinei de grad Hammerstein reduce adsorbția nespecifică a anticorpilor anti-OTA și a anticorpilor anti-IgG-HRP. Alți doi agenți de blocare, lapte praf integral și cazeină Sigma au fost testați fără succes. Cea mai mare valoare a absorbantei se obține pentru materialul bio-sensibil complet, ceea ce dovedește specificitatea fiecărei etape. În plus, prin înlocuirea OTB cu OTA, se obține o valoare de absorbantă mai mare, deoarece anticorpul anti-OTA prezintă față de această toxină o afinitate mai ridicată decât pentru OTB.

Curba de afinitate a anticorpilor anti-OTA pentru OTB a fost trasată cu o serie de materiale bio-sensibile modificate cu diferite cantități de OTB (figura 13). Forma sigmoidală a curbei este cea caracteristică unei reacții imunologice, descrisă de o ecuație neliniară cu patru parametrii (ecuația 2).

Tablelul 3. Experimente de control efectuate prin adăugarea substratului colorimetric pe mai multe materiale bio-sensibile.

NH ₂ (μmol/g)	OTB (μmol/g)	OTA (μmol/g)	EDC/NHS (mM/mM)	Blocaj Cazeină H. (da/nu)	Anticorpi anti-OTA (μg/mL)	Anti-IgG- HRP (da/nu)	D. O. la 450 nm
0	0	0	0	nu	0	nu	0.043 ± 0.005
660	0	0	40/50	da	0	da	0.059 ± 0.006
	0	0	40/50	da	10	da	0.068 ± 0.007
	0.18	0	40/50	da	0	da	0.069 ± 0.005
	0.18	0	40/50	da	10	da	0.093 ± 0.008
	0	0.18	40/50	da	0	da	0.065 ± 0.004
	0	0.18	40/50	da	10	da	0.128 ± 0.003

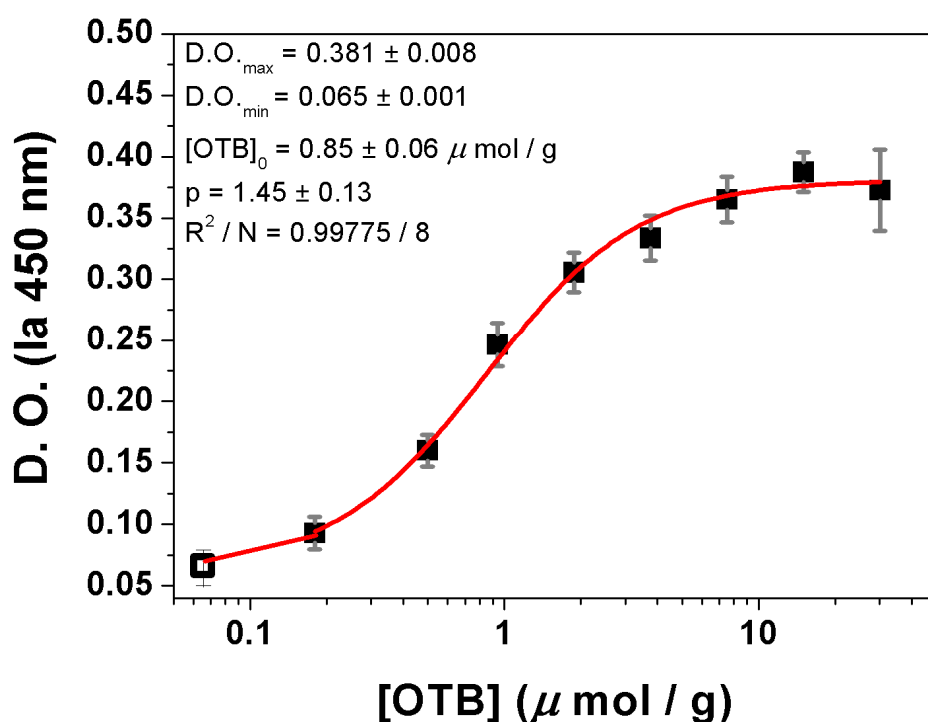


Figura 13. Curba de afinitate a anticorpului anti-OTA pentru OTB imobilizată pe microbulele CPG. Simbolul □ este pentru valoarea D.O. înregistrată pe microbule în absența OTB.

Ecuția 2. Regresie liniară cu 4 parametrii

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + y_{\min}$$

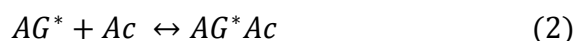
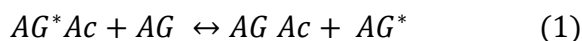
Unde: $y_{\max}$ și $y_{\min}$ corespund valorilor maxime și minime ale curbei sigmoideale;

p corespunde la panta porțiunii liniare ale aceleiași curbe în punctul de concentrație x_0 ;

x_0 corespunde punctului de inflexiune al sigmoidei.

3.2.1.2 Optimizarea testului imunologic prin deplasare pentru detecția OTA

Testul imunologic prin deplasare (DIA) se bazează pe disocierea complexului dintre anticorpi (Ac) și antigenul cu afinitate redusă (AG^*) cauzată de prezența antigenului cu afinitate mare (AG) (1). Anticorpi formează astfel un nou complex cu antigenul AG. Dar, și în lipsa antigenului, reacția de disociere poate avea loc prin deplasarea spre dreapta a echilibrului din reacția 2. Acest fenomen este unul spontan, fiind controlat de difuzie și neputând fi evitat. În plus, fenomenul apare și în cazul testelor imunologice competitive unde reproductibilitatea etapelor de spălare a suportului pe care complexul AG^*Ac este imobilizat este esențială pentru reproductibilitatea testului în sine [40].



Influența densității de anticorpi imobilizați pe diverse suporturi (mărgeli, tuburi capilare, membrane), pentru a obține diferite suprafețe reactive, asupra sensibilității testului DIA a fost studiată prin modele matematice [41]. Conform acestora, s-a presupus că o suprafață mare reactivă mărește sensibilitatea testului deoarece antigenul AG (OTA) are mai multe șanse să întâlnească complexul AG^*Ac (Ac fiind anticorpii anti-OTA și AG^* fiind OTB). Pentru a verifica acest lucru, s-a controlat suprafața reactivă prin folosirea a diferite cantități de material bio-sensibil puse în contact cu același volum de OTA.

Materialul bio-sensibil fiind dispersat într-o soluție tampon într-un raport cunoscut (1:8 w/v), trei volume diferite (5, 25 și 50 μ L) au fost incubate cu 150 μ L de OTA într-o gamă de concentrație între 0,4 și 100 ng/mL, timp de 10 minute, cu agitare orbitală de 500 rpm. După reacția imunologică, lichidul supernatant este colectat, substratul colorimetric este adăugat și activitatea HRP* (HRP legată de anticorpii anti-IgG din complexul OTA-Ac-IgG-HRP, deplasat în timpul reacției) este înregistrată timp de

20 de minute la 620 nm. Apoi, reacția este oprită și absorbanta corespunzătoare produsului enzimatic TMB_{ox} este înregistrată la 450 nm. Figura 14 arată curba de calibrare obținută cu procentul reacției de deplasare calculat față de reacția de disociere (ecuația 3). Se observă împărțirea acestei curbe în două domenii, unul pentru concentrații scăzute de OTA și unul pentru concentrații mari de OTA. Această curbă este descrisă de o ecuație cu 3 parametri (ecuația 4): parametrul A este procentul de deplasare maximă pentru gama de concentrații scăzute de OTA, parametrul B este concentrația OTA la care se atinge jumătate din valoarea parametrului A și, în cele din urmă, parametrul C este o constantă ce caracterizează gama de concentrații mari de OTA. În tabelul 4 se prezintă parametrii acestei ecuații pentru curbele de calibrare obținute cu cele trei volume de materiale bio-sensibile utilizate și limita de detecție (LOD), definită ca concentrația de OTA care dă un procent de deplasare de 20 %. Pentru volumul de 25 μL, acest test este destul de sensibil pentru a detecta OTA în probele de vin pentru care limită maximă permisă este de 2 ng/mL.

$$\% \text{ deplasare} = \frac{D \cdot O_{OTA \neq 0} - D \cdot O_{OTA=0}}{D \cdot O_{OTA=0}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ deplasare} = \frac{A \times [OTA]}{B + [OTA]} + C \times [OTA] \quad (4)$$

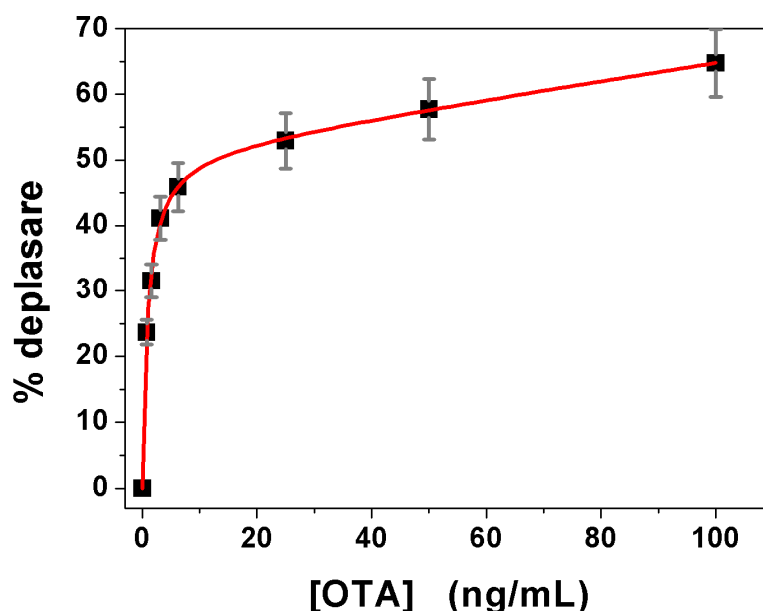


Figura 14. Curba de calibrare cu testul DIA pentru depistarea OTA prin detecție spectrofotometrică. Condiții experimentale: 25 μL material bio-sensibil modificat cu 65 nmol/g de OTB.

Tablelul 4. Influența volumului materialului bio-sensibil asupra limitei de detecție și a parametrilor curbei de calibrare pentru testul DIA.

Volumul materialului bio-sensibil (μL)	LOD (ng/mL)	Parametrii curbei de calibrare			R ² / N
		A (%)	B (ng/mL)	C (% / (ng/mL))	
5	6.5	18 ± 2	3.1 ± 0.7	0.35 ± 0.02	0.99691 / 8
25	0.8	52 ± 1	0.9 ± 0.1	0.13 ± 0.01	0.99602 / 8
50	100	4.8 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.15 ± 0.01	0.99532 / 6

Limita de detecție obținută pentru 5 μL de material bio-sensibil este mai mare decât cea obținută pentru 25 μL, ceea ce confirmă ipoteza conform căreia o densitate mai mare de anticorpi imobilizați crește șansele reacției de deplasare. Cu toate acestea, pentru 50 μL de material bio-sensibil există o densitate prea mare de anticorpi imobilizați echivalentă cu o densitate prea mare de epitopi liberi ai acestor anticorpi. Acest lucru crește șansele OTA de a se lega de acești epitopi în loc să înlocuiască OTB. Aceste rezultate experimentale confirmă concluzia studiului matematic în care s-a găsit o relație inversă între sensibilitatea testului DIA și densitatea anticorpilor imobilizați.

3.2.2 Procedee de purificare a probelor de vin

Testul imunologic DIA este astfel gândit încât, în timpul reacției cu antigenul, noul complex Ac-IgG-HRP este eliberat în aceeași soluție și de aceea detecția pe baza enzimei este efectuată *in situ*. Acest test a fost folosit pentru detecția unor analiți cum ar fi proteinele de legare a acizilor grași [42, 43] și cortizolul [44], pentru care activitatea HRP a fost măsurată în perfuzii de plasmă și ser.

Prezența OTA în diverse produse alimentare implică extracția acesteia în diferiți solvenți organici. Prin urmare, folosirea testului DIA ar implica măsurarea activității HRP* în aceste extracte iar compoziția acestora este decisă de metoda de extracție. Astfel, posibilitatea de a detecta OTA în probe reale depinde de posibilitatea de a înregistra activitate enzimatică a HRP* în aceste probe. De aceea, o provocare pentru tratarea probelor de vin este găsirea unei metode de extracție care simplifice matricea acestor probe prin eliminare componentelor colorate.

Două metode de extracție a OTA din probe de vin au fost testate cu protocolul descris în secțiunea experimentală. Prima metodă, caracterizată prin cel mai bun procent de recuperare a OTA, se bazează pe o coloană de imuno-afinitate. Cum testul DIA se bazează deja pe o reacție imunologică, cuplarea unei astfel de coloane cu acest test nu ar fi rezonabilă. A doua metodă se bazează pe utilizarea unei coloane de extracție în fază solidă, care ar reține componentele colorate ale vinului și nu ar reține OTA. Tabelul 5 conține procentele de recuperare și culorile fracțiilor colectate din această coloană.

Faza solidă este siliciu modificat cu grupări NH_2 , care, la pH 7,4 sunt încărcate pozitiv. pH-ul probelor de vin a fost ajustat la 7,4 prin tratarea cu soluție de NaHCO_3 , astfel încât, la acest pH, OTA este în formă de dianion și este reținută parțial pe coloană. Cu toate acestea, această retenție nu este completă, procentul de recuperare fiind de aproximativ 50 %. Acest lucru este justificat prin prezența în vin a unor acizi cu pK_a de aproximativ 3 care intră în competiție cu OTA pentru interacțiunile electrostatice cu faza solidă. În plus, alți constituenți ai vinului, polifenoli, în ciuda unui pK_a de 10, sunt reținuți pe coloană prin fenomenul de adsorbție. Diferitele fracții de vinuri obținute cu această coloană au fost supuse testului DIA pentru detecția OTA.

Tablelul 5. Caracteristicile fracțiilor de vin colectate din 2 mL de vin conținând 9 ng OTA, trecuți printr-o coloană umplută cu Si-NH₂.

Nr. fracție	Culoarea fracției	Culoarea fracției după ajustarea pH	OTA recuperată (ng)	Compoziția fracției
Frac. 1	Incolor	Fără ajustare de pH, incolor	0	Tamponul de condiționare (KPB)
Frac. 2	Verde	Roz	0,2	vin și KPB
Frac. 3	Verde	Roz	0,6	vin și KPB
Frac. 4	Verde	Roz	0,8	vin și KPB
Frac. 5	Verde	Roz	1,0	vin și KPB
Frac. 6	Verde	Roz	1,1	MeOH:KPB 1:1
Frac. 7	Incolor	Incolor	0,2	KPB

3.2.3 Detecția OTA *in situ* în probe de vin

Probele de vin cu o matrice simplificată prin coloana de extracție în fază solidă au fost incubate cu materialul bio-sensibil. Activitatea enzimatică a HRP* a fost înregistrată pentru 30 de minute de la adăugarea substratului colorimetric (figura 15). O bună corelare între această activitate (estimată ca panta variației absorbției în timp) și concentrația de OTA (măsurată cu HPLC-FD) arată că testul DIA poate fi folosit pentru detecția OTA în probe de vin (figura 16).

Testele imunologice competitive de tip direct și indirect au fost folosite pentru detecția OTA în probe de vin, dar matricea vinului a fost prezentă doar în timpul reacției imunologice dintre OTA și anticorpi. Etapa de detecție, bazată tot pe înregistrarea activității enzimatică a HRP, a fost realizată într-un tampon fosfat. Tabelul 6 prezintă comparativ timpi necesari diverselor etape precum și limitele de

deteție. Pentru testul DIA s-a reușit reducerea timpilor etapelor de pregătire a testului iar LOD obținută este asemănătoare cu celelalte teste.

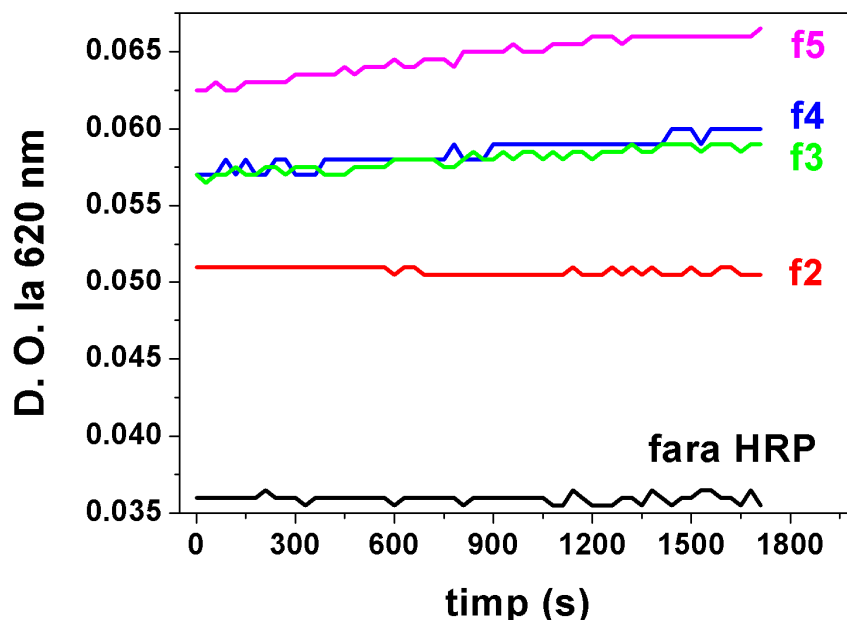


Figura 15. Măsurători spectrofotometrice ale activității enzimice a HRP* în fracțiile de vin obținute după cum este indicat în tabelul 5. HRP* este enzima din complexul OTA-Ac-IgG-HRP, deplasat de la suprafața materialului bio-sensibil.

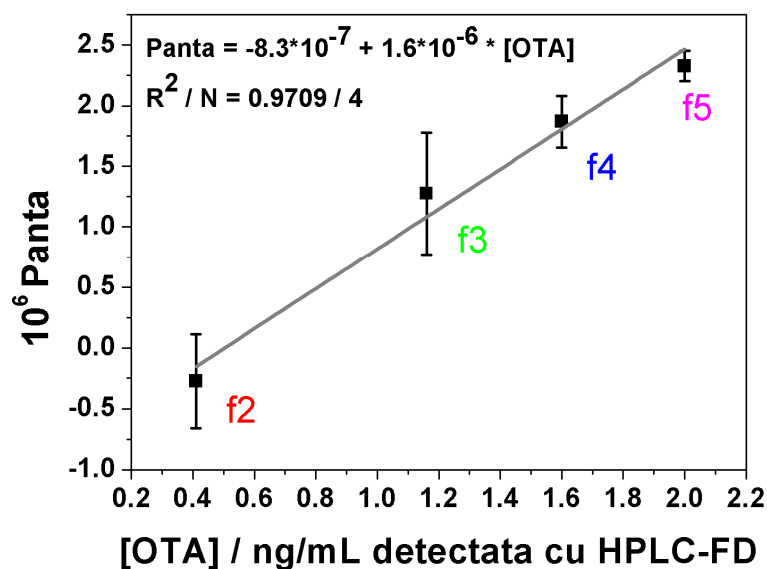


Figura 16. Corelarea între concentrația OTA în fracțiile de vin (măsurată cu HPLC-FD) și panta activității enzimice a HRP* obținută din măsurătorile spectrofotometrice prezentate în figura 15.

Tablelul 6. Comparație între performanțele testelor ELISA direct și indirect cu cele ale testului DIA pe materialul bio-sensibil.

Parametrii	Competitiv direct[29]	Competitiv indirect [31]	DIA
Durata totală a imobilizării antigenului, a etapei de blocare și de etichetare (h)	24h 30	26 h	2 h
Durata reacției imunologice (min)	60	60	10
Durata reacției enzimactice (min)	10	15	20
Limita de detecție (ng/mL)	0,36	0,7	0,8
Purificarea probelor de vin	Coloană de imuno-afinitate	Adsorbție pe PVP	Extracție în fază solidă (Si-NH ₂)
Etapă de detecție este realizată în	Tampon	tampon	În matrice simplificată de vin

3.2.4 Posibilități de utilizare a materialului bio-sensibil

Pentru materialul bio-sensibil obținut, se prefigurează două modalități experimentale de folosire. Prima implică introducerea materialului bio-sensibil direct în probele de vin, într-un raport v/v bine definit. Matricea acestor probe este simplificată în prealabil prin trecerea lor prin coloana de extracție în fază solidă. După 10 minute de reacție, materialul bio-sensibil este eliminat, se adaugă substratul colorimetric și proba se colorează în albastru cu o intensitate proporțională cu concentrația de OTA (figura 17). Acest mod de utilizare a materialului bio-sensibil implică realizarea în paralel a unui test de control pe un eșantion de vin necontaminat cu OTA. De asemenea, o bună stabilitate a componentelor biologice ale materialului bio-sensibil este un parametru calitativ necesar pentru stocarea materialului și utilizarea în timp a acestuia. Acest mod de folosire a materialului necesită și o bună reproductibilitate a prelevării cantității necesare unui test pentru care se recomandă folosirea unui vârf de pipetă bont și colectarea unui volum minim de 10 μ L.

Ca o a doua modalitate de utilizare a materialului bio-sensibil, se prevede introducerea acestuia într-un bioreactor. Acesta poate fi inclus într-un sistem de flux ceea ce ar permite o viteză mare de analiză a eșantioanelor de vin. Fezabilitatea acestui proiect a fost probată prin două experimente. În primul rând, posibilitatea de a efectua multiple teste DIA pe același material bio-sensibil a fost verificată prin incubarea materialului bio-sensibil cu o gamă de concentrații de OTA. După fiecare reacție imunologică, supernatantul este recuperat, se adaugă substratul colorimetric și se oprește reacția enzimatică după 20 min, înregistrându-se absorbanta la 420 nm (figura 18). Limita de detecție obținută a

fost 6,25 ng/mL, o valoare destul de mare ce se explică prin utilizarea unei cantități prea mari de material bio-sensibil. Această cantitate a fost aleasă pentru a umple un bioreactor cu un volum de 0,15 cm³. Cu toate acestea, aceste rezultate pot fi îmbunătățite prin optimizarea volumului de material bio-sensibil, timpilor de reacție și viteza de agitare.

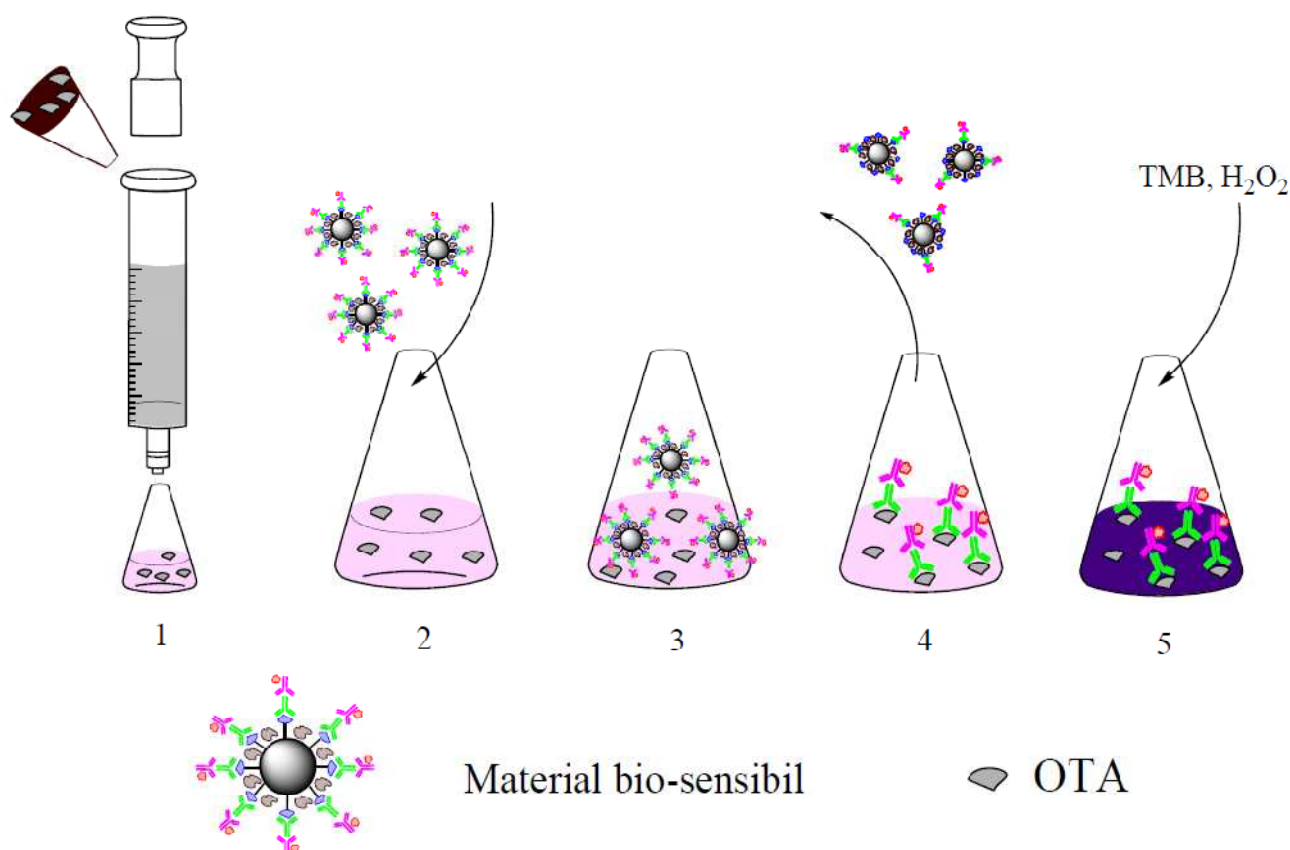


Figura 17. Protocolul de utilizare a materialului bio-sensibil pentru detecția OTA în vin. Etape: 1) simplificarea matricei vinului cu o coloană de Si-NH₂; 2) introducere microbilelor în această probă; 3) timpul pentru reacția imunologică; 4) recuperarea supernatantului; 5) adăugarea substratului colorimetric. Apariția culorii albastre semnifică prezența OTA în probă.

În al doilea rând, integrarea bioreactorului în flux necesită o metodă de detecție adecvată. Astfel, s-a testat analiza de injecție în flux cu detecție amperometrică. Produsul reacției enzimatic (TMB_{ox}) obținut pe o serie de materiale bio-sensibile, incubate cu o gamă de concentrații de OTA, a fost injectat într-un sistem în flux cu o singură linie și detectat amperometric prin aplicarea unui potențial de -0,1 V vs. pseudo Ag asupra unui electrod serigrafat de grafit. Sensibilitatea acestei metode de detecție a fost de 1,2 nA/ngmL⁻¹, o valoare relativ scăzută, care ar putea fi îmbunătățită prin optimizarea parametrilor referitori la reacția imunologică de deplasare și a caracteristicilor sistemului în flux (volumul injectat, debit).

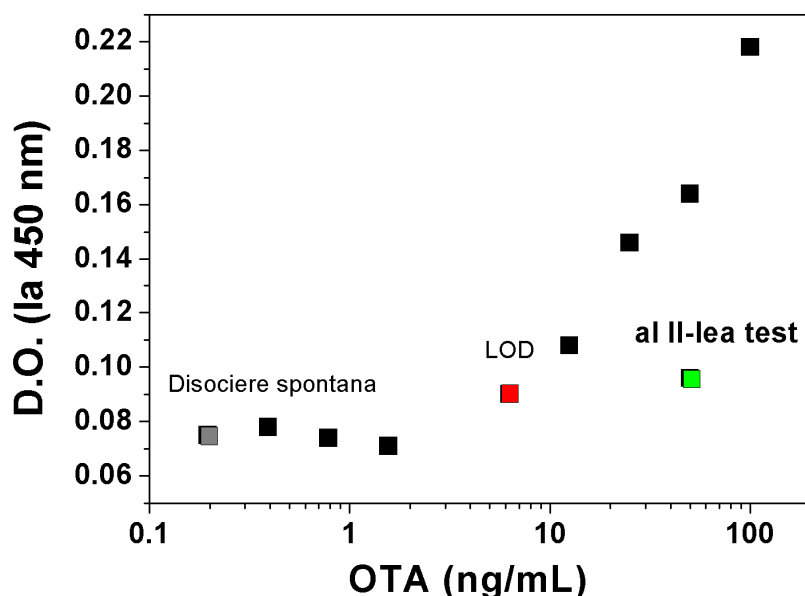


Figura 18. Teste DIA cu diferite concentrații de OTA pe același material bio-sensibil. Condiții experimentale: 30 mg de material bio-sensibil modificat cu 3,2 $\mu\text{mol/g}$ OTB; durata reacției de deplasare, 2 min; agitare magnetică, 180 rpm; durata reacției enzimatică, 20 min.

4 Concluzii

În concluzie, s-a dezvoltat un material bio-sensibil pentru detecția ocratoxinei A folosind un analog structural mai puțin toxic, ocratoxina B. Aceasta a fost imobilizată pe microbule de sticlă cu dimensiunea controlată a porilor. Avantajul acestui material solid este dat de suprafața mare de reacție care necesită un volum mic de probă și de soluții necesare obținerii materialului, reducând astfel costul final al testului. Principiul de utilizare al acestui material este cel al testului imunologic prin deplasare, permițându-se astfel detecția *in situ* a OTA în probele de vin. Singura cerință pentru realizarea acestui test cu materialul obținut, este simplificarea matricei vinului prin eliminarea componentelor colorați. Acest lucru a fost realizat cu ajutorul unei coloane de siliciu modificat cu grupări NH_2 . Deși procentul de recuperare al OTA în urma trecerii probei de vin prin această coloană este inferior celui obținut cu o coloană de imunoafinitate, această coloană de extracție în fază solidă are un timp și un cost de analiză mai mici.

Caracteristicile materialului bio-sensibil și cele ale testului imunologic prin deplasare au fost optimizate pentru a obține o limită de detecție de OTA ce satisface reglementările care stabilesc o valoare maximă admisă de 2 ng/mL OTA în vin. S-au propus două posibilități practice de utilizare a

materialului bio-sensibil. Rezultatele preliminare arată că acest material ar putea fi folosit pentru a dezvolta un bioreactor integrat într-un sistem de flux sau ca microbile sensibile pentru detecția *in situ* a OTA.

Referințe

1. A. Somogyi, K. Rosta, P. Pusztai, Z. Tulassay, G. Nagy, Antioxidant measurements, *Physiol. Meas.*, **2007**, 28, R41.
2. M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, **2002**, 127, 183.
3. Y. Tian, T. Okajima, F. Kitamura, T. Ohsaka, A SOD-based amperometric biosensor for superoxide ion, *J. Korean Electrochem. Soc.*, **2002**, 5, 212.
4. I. Fridovich, Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **1970**, 245, 4053.
5. F. Lisdat, B. Ge, R. Rezek, E. Kozniewska, An electrochemical method for quantification of the radical scavenging activity of SOD, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **1999**, 365, 494.
6. S. Ignatov, D. Shishniashvili, B. Ge, F.W. Scheller, F. Lisdat, Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants, *Biosens. Bioelectron.*, **2002**, 17, 191.
7. M. Beissenhirtz, F. Scheller, F. Lisdat, Immobilized Cytochrome c Sensor in Organic/Aqueous Media for the Characterization of Hydrophilic and Hydrophobic Antioxidants, *Electroanalysis*, **2003**, 15, 1425.
8. E. Emregul, Development of a new biosensor for superoxide radicals, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 383, 947.
9. L. Campanella, A. Bonnani, D. Bellantoni, G. Favero, M. Tomassetti, Comparison of fluorimetric, voltammetric and biosensor methods for the determination of total antioxidant capacity of drug products containing acetylsalicylic acid, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2004**, 36, 91.
10. S. Mesaros, Z. Vankova, A. Mesarosova, P. Tomcik, S. Grunfeld, Electrochemical determination of superoxide and nitric oxide generated from biological samples, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1998**, 46, 33.
11. M. Cortina-Puig, X. Munoz-Berbel, C. Calas-Blanchard, J.L. Marty, Electrochemical characterization of a superoxide biosensor based on the co-immobilization of cytochrome c and XOD on SAM-modified gold electrodes and application to garlic samples, *Talanta*, **2009**, 79, 289.
12. M. Cortina-Puig, X. Munoz-Berbel, R. Rouillon, C. Calas-Blanchard, J.L. Marty, Development of a cytochrome c-based screen-printed biosensor for the determination of the antioxidant capacity of orange juices, *Bioelectrochem.*, **2009**, 76, 76.
13. S. Banu, G.M. Greenway, T. McCreedy, R. Shaddick, Microfabricated bioreactor chips for immobilised enzyme assays, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 486, 149.
14. S. Banu, G.M. Greenway, R.A. Wheatley, Luminol chemiluminescence induced by immobilised xanthine oxidase, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 541, 91.
15. A.V. Krylov, H. Adamzig, A.D. Walter, B. Lochel, E. Kurth, O. Pulz, J. Szeponik, F. Wegerich, F. Lisdat, Parallel generation and detection of superoxide and hydrogen peroxide in a fluidic chip, *Sens. Actuators, B*, **2006**, 119, 118.

16. T. Richter, L.-L. Schultz-Lockyear, R.D. Oleschuk, U. Bilitewski, D.J. Harrison, Bi-enzymatic and capillary electrophoretic analysis of non-fluorescent compounds in microfluidic device. Determination of xanthine., *Sens. Actuat. B*, **2002**, *81*, 369.
17. H. Ukeda, A.K. Sarker, D. Kawana, M. Sawamura, Flow-injection assay of superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium, *Anal. Sci.*, **1999**, *15*, 353.
18. F. Adam, H. Osman, K.M. Hello, The immobilization of 3-(chloropropyl)triethoxysilane onto silica by a simple one-pot synthesis, *J. Colloid Interface Sci.*, **2009**, *331*, 143.
19. Sigma. *Ezymatic assay of peroxidase*. 2009; Available from: http://origin-www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/p6140enz.Par.0001.File.tmp/p6140enz.pdf.
20. D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food. Chem.*, **2005**, *53*, 1841.
21. Z. Dhaouadi, M. Nsangou, N. Garrab, E.H. Anouar, K. Marakchi, S. Lahmar, DFT study of the reaction of quercetin with O₂^{•-} and •OH radicals, *J. Molec. Struct.: THEOCHEM*, **2009**, *904*, 35.
22. K.J. Van Der Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, D.B. Scott, J.J. Theron, Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh., *Nature*, **1965**, *205*, 1112.
23. A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography *J. Chromat. A*, **1999**, *864*, 89.
24. A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, Determination of Ochratoxin A in Wine and Beer by Immunoaffinity Column Cleanup and Liquid Chromatographic Analysis with Fluorometric Detection: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **2001**, *84*, 1818.
25. L. Sibanda, S. Saeger, C. Peterghem, Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee, *J. Chromat. A*, **2002**, *959*, 327.
26. T.Y. Rusanova, N.V. Beloglazova, I.Y. Goryacheva, M. Lobeau, C. Peterghem, S. Saeger, Non-instrumental immunochemical test for rapid ochratoxin A detection in red wine, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *653*, 97.
27. *Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*, dans le rapport final de *Agence française de sécurité sanitaire des aliments*, 2009
28. *Foodstuffs - Determination of ochratoxin A in wine and beer - HPLC method with immunoaffinity column clean-up*, *European Committee of Normalization (CEN)*, 14133:2003
29. A. Radoi, L. Dumitru, L. Barthelmebs, J.L. Marty, Ochratoxin A in some french wine: application of a direct competitive ELISA based on an OTA-HRP conjugate, *Anal. Lett.*, **2009**, *42*, 1187.
30. S.H. Alarcon, G. Palleschi, D. Compagnone, M. Pascale, A. Visconti, I. Barna-Vetró, Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat, *Talanta*, **2006**, *69*, 1031.
31. B. Prieto-Simon, M. Campas, J.L. Marty, T. Noguer, Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples, *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, *23*, 995.
32. J.C. Vidal, P. Duato, L. Bonel, J.R. Castillo, Use of polyclonal antibodies to ochratoxin A with a quartz-crystal microbalance for developing real-time mycotoxin piezoelectric immunosensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, *394*, 575.
33. R. Liu, Z. Yu, Q. He, Y. Xu, An immunoassay for ochratoxin A without the mycotoxin, *Food Control*, **2007**, *18*, 872.
34. J.P. Harris, P.G. Mantle, Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*, *Phytochem.*, **2001**, *58*, 709.
35. D. Ringot, A. Chango, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update, *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, *159*, 18.

36. M.V. Kahraman, G. Bayramoglu, N. Kayaman-Apohan, A. Güngör, alpha-Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment, *Food Chem.*, **2007**, *104*, 1385.
37. H. Nakamura, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, M. Suda, S. Uchiyama, A Compactly Integrated Flow Cell with a Chemiluminescent FIA System for Determining Lactate Concentration in Serum, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 373.
38. L. Molina, G. Messina, P. Stege, E. Salinas, J. Raba, Immuno-column for on-line quantification of human serum IgG antibodies to Helicobacter pylori in human serum samples, *Talanta*, **2008**, *76*, 1077.
39. M.A. Gonzalez-Martinez, S. Morais, R. Puchades, A. Maquieira, A. Abad, A. Montoya, Development of an automated controlled-pore glass flow-through immunosensor for carbaryl, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *347*, 199.
40. Y. Fintschenko, G. Wilson, Flow injection immunoassays: a Review, *Mikrochim. Acta*, **1998**, *129*, 7.
41. D.B. Holt, A.W. Kusterbeck, F.S. Ligler, Continuous Flow Displacement Immunosensors: A Computational Study, *Anal. Biochem.*, **2000**, *287*, 234.
42. D. Voort, M. Pelsers, J. Korf, W.T. Hermens, J.F.C. Glatz, Development of a displacement immunoassay for human heart-type fatty acid-binding protein in plasma: the basic conditions., *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, *19*, 465.
43. W.A. Kaptein, J. Korf, S. Cheng, M. Yang, J.F.C. Glatz, R. Renneberg, On-line flow displacement immunoassay for fatty acid-binding protein, *J. Immunol. Methods*, **1998**, *217*, 103.
44. W.A. Kaptein, J.J. Zwaagstra, K. Venema, M. Ruiters, J. Korf, Analysis of cortisol with a flow displacement immunoassay, *Sens. Act. B*, **1997**, *45*, 63.