



Estrategias Analíticas basadas en el Diseño de Inmunoreactivos de Clase para el Control de Residuos de Quinolonas en Leche

Daniel González Pinacho

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universidad de Barcelona

Facultad de Química - Departamento de Química Orgánica

Programa de Doctorado Química Orgánica

(Bienio 2003-2005)

Estrategias Analíticas basadas en el Diseño de Inmunoreactivos de Clase para el Control de Residuos de Quinolonas en Leche

Memoria para optar al **Grado de Doctor por la Universidad de Barcelona**

presentada por:

Daniel González Pinacho

Directores:

Prof. M^a Pilar Marco Colás
Profesora de Investigación
*Dept. de Nanotecnología Química y
Biomolecular, IQAC-CSIC*

Dr. Francisco Sánchez Baeza
Investigador Científico
*Dept. de Nanotecnología Química y
Biomolecular, IQAC-CSIC*

Tutor:

Dr. Ángel Montaña Pedrero
Profesor Titular
Dept. Química Orgánica. Facultad de Química, UB

*En memoria de Francisco Sánchez Baeza,
científico excepcional y mejor persona*

*A mis hijos Sebastián y Esteban, los dos soles que iluminan cada día
y a mi mujer, Ángela, sustento y motor de mi vida*

“La realidad es tan extremadamente compleja que jamás llegaremos a su total comprensión”

A. M. P.

Agradecimientos

Ha sido largo el camino recorrido y muchas las buenas personas que me he encontrado en su trascurso, a todas ellas estoy agradecido. Aquí solamente me centraré en las que han tenido una mayor contribución a que esta tesis finalmente vea la luz.

Primero quiero agradecer al antiguo Ministerio de Ciencia y Tecnología y a la fundación EROSKI por las becas que me fueron concedidas durante la realización de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, Pilar Marco y Francisco Sánchez, por la oportunidad prestada y el apoyo recibido en todo momento. Pilar, muchas gracias acogerme en Barcelona, brindarme tu amistad y por enseñarme la amplitud de la ciencia y a mirar más allá del experimento. Francisco, muchas gracias por tu cariño, por todas las ideas aportadas y por dejarme ser la pelusilla que se pegaba a tu velcro; ha sido un privilegio conocerte y siempre estarás conmigo en el recuerdo. Gracias a los dos por ayudarme a crecer como científico y como persona.

Gracias también a mi tutor de tesis, Ángel Montaña, por la ayuda prestada en los trámites administrativos y por sus constantes palabras de ánimo. También mi agradecimiento a Montse Batalla y a Manoli Mora, por su inestimable ayuda en la etapa administrativa final.

Quiero agradecer especialmente a toda la gente del grupo AMRg que me acogió sin reservas y compartió mi andadura. Gracias a Hector por tu amistad y bondad, a Mari Carmen por tu simpatía y amabilidad, a Roger por tu buen humor reflejado en tus bromas y piques amistosos, a Raquel por tu cariño y sinceridad cruda, muchas veces necesaria, a Eva por tu fuerza y entereza y a Bego por tu empatía. A Mark, muchas gracias por los buenos ratos, por las improvisadas clases de inglés y sobre todo por tu amistad sincera. Quiero agradecer especialmente a tres grandes compañeros y amigos que siempre demostraron su apoyo y me prestaron su ayuda, Pablo Xavi y Javi. Muchas gracias por estar siempre ahí escuchando mis problemas y dándome buenos consejos y sobre todo soportando estoicamente mis historietas repetidas hasta la saciedad, riendo en los buenos momentos y arrimando el hombro en los malos. También mi especial agradecimiento a mi socia Nuria Pascual, una de las mejores personas que he conocido. Muchas gracias por tu optimismo y vitalidad, trabajar contigo ha sido un verdadero placer. Además quisiera hacer mención a Josefina Extremera, gracias por las placenteras charlas y el cariño demostrado.

También quería agradecer a mis padres y hermanos, por los valores inculcados y por vuestra paciencia y apoyo desde la distancia. Sin vosotros no sería lo que soy ahora, estoy muy orgulloso de nuestra familia y perdonadme por todos los momentos perdidos.

Finalmente quisiera agradecer a las personas más importantes de mi vida, mi mujer y mis hijos. Gracias a mis dos pequeños soles, Sebastián y Esteban, por iluminar cada día y dar sentido a mi vida, el papa por fin ha acabado el libro. Y a ti, Ángela, gracias por tu amor, fuerza y apoyo, los dos sabemos que sin ti esto no hubiese sido posible. Gracias por hacerme sentir completo y feliz cada día. Os quiero con devoción.

Abreviaturas y acrónimos

11-BSA	BSA hapténizada con el hapteno 11 de quinolonas (competidor homólogo)
17-BSA	BSA hapténizada con el hapteno 17 de quinolonas (competidor heterólogo)
17-HRP	HRP hapténizada con el hapteno 17 de quinolonas (trazador enzimático)
Ac	Anticuerpo
Ac171	Anticuerpo 171 (policlonal de conejo contra quinolonas purificado del antisuero As171)
Ac171-HRP	Anticuerpo 171 marcado con HRP
Abs	Absorbancia
AcM-ELISA	Magneto ELISA con el anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas
AcOEt	Acetato de etilo
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
Amax	Absorbancia máxima extraída del ajuste de la curva de calibrado
Amin	Absorbancia máxima extraída del ajuste de la curva de calibrado
AMP	Ampicilina
AMRg	Grupo de Receptores Moleculares Aplicados (<i>Applied Molecular Receptor group</i>)
An	Analito
AntilgG	Anti Inmunoglobulina G
As	Antisuero (policlonal de conejo)
As171	Antisuero 171 (policlonal de conejo contra quinolonas)
At	Antígeno
AT	Antígeno de Tapizado
AT-ELISA	ELISA en formato directo recubriendo las microplaclas con Antígeno de Tapizado
ATM-ELISA	Magneto ELISA con el Antígeno de Tapizado inmovilizado sobre las partículas magnéticas
BAW	Onda acústica másica (<i>Bull Acoustic Wave</i>)
BSA	Albúmina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAP	Cloranfenicol
CC	Cloruro Cianúrico
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades (<i>Center of Disease Control and Prevention</i>)
CE	Comisión Europea
CEF	Cefazolina
CLIA	Inmunoensayo de Quimioluminiscencia (<i>ChemiLuminiscence ImmunoAssay</i>)
CLR	Laboratorio de Referencia Comunitario (<i>Community Reference Laboratory</i>)
CONA	Conalbúmina

Abreviaturas y acrónimos

CPFX	Ciprofloxacino
GTQ-IMB	Grupo de Transductores Químicos del Instituto de Microelectrónica de Barcelona
CV (%)	Coeficiente de Variación
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
DFX	Difloxacino
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNFX	Danofloxacino
EARSS	Sistema europeo de vigilancia de la resistencia antimicrobiana (<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance System</i>)
EBG	Grupo de Biotecnología de Enzimas de la Universidad de Leeds (<i>Enzyme Biotechnology Group</i>)
EC	Electroforesis Capilar
EDC	1-etil 3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
EIA	Inmunoensayo Enzimático (<i>Enzyme ImmunoAssay</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EMEA	Agencia Europea del Medicamento (<i>European Medicines Agency</i>)
ERFX	Enrofloxacino
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos Estadounidense (<i>Food and Drug Administration</i>)
FIA	Inmunoensayo de Fluorescencia (<i>Fluorescence ImmunoAssay</i>)
FLUME	Flumequina
FPIA	Inmunoensayo de Polarización de Fluorescencia (<i>Fluorescence Polarization ImmunoAssay</i>)
GBEQ-UAH	Grupo Biosensores Electroquímicos de la Universidad de Alcalá de Henares
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
HCH	Hemocianina de cangrejo herradura (<i>Horseshoe Crab Hemocyanin</i>)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRP	Peroxidasa del Rábano Picante (<i>HorseRadish peroxidase</i>)
IC₅₀	Concentración al 50 % de la señal máxima (o 50 % de inhibición)
IC₈₀	Concentración al 80 % de la señal máxima (o 20 % de inhibición). Límite de cuantificación
IC₉₀	Concentración al 90 % de la señal máxima (o 10 % de inhibición). Límite de detección
ICFO	Instituto de Ciencias Fotónicas
Imax	Intensidad de corriente máxima extraída del ajuste de la curva de calibrado
Imin	Intensidad de corriente mínima extraída del ajuste de la curva de calibrado

ICMG	Instituto de Química Molecular de Grenoble (<i>Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble</i>)
IFAH	Federación Internacional de Salud Animal (<i>International Federation of Animal Health</i>)
IFoS	Laboratorio de Ingeniería y Funcionalización de Superficies de la Escuela Central de Lyon (<i>Laboratoire d'Ingénierie et Fonctionnalisation des Surfaces</i>)
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
INSPEAR	Red Internacional para el Estudio y Prevención de Resistencia Antimicrobiana Emergente (<i>International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance</i>)
IRTA	Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (<i>Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentarias</i>)
ISBT	Instituto de Biociencia y Tecnología de la Universidad de Cranfield (<i>Institute of Bioscience and Technology</i>)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LMR	Límite Máximo de Residuo
LOD	Límite de Detección (<i>Limit Of Detection</i>)
MAb	Anticuerpo Monoclonal (<i>Monoclonal Antibody</i>)
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MBFX	Marbofloxacino
M-ELISA	Magneto ELISA (ELISA utilizando como soporte sólido partículas magnéticas)
MIA	Inmunoensayo Magnético (<i>Magnetic ImmunoAssay</i>)
MIP	Polímero de Huella Molecular (<i>Molecular Imprinted Polimers</i>)
MP	Partículas Magnéticas (<i>Magnetic Particles</i>)
MP-17-BSA	Partículas magnéticas con el antígeno 17-BSA inmovilizado sobre su superficie
MP-Ac171	Partículas magnéticas con el anticuerpo 171 inmovilizado sobre su superficie
MS	Espectroscopía de Masas (<i>Mass Spectroscopy</i>)
MS/MS	Espectroscopía de Masas en Tándem (<i>Mass-Mass Spectroscopy</i>)
NARMS	Sistema Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de Bacterias Entéricas (<i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria</i>)
Nb4D	Grupo de Nanobiotecnología para el Diagnostico (<i>Nanobiotechnology for Diagnostics</i>)
NMRC	Centro Nacional de Investigación Microelectrónica de Irlanda (<i>National Microelectronics Research Centre</i>)
NRFX	Norfloxacino
OFX	Ofloxacino
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVA	Ovoalbúmina
OXO	Ácido Oxolínico
PAb	Anticuerpo Policlonal (<i>Polyclonal Antibody</i>)

Abreviaturas y acrónimos

PBS	Tampón Fosfato Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBST	PBS con Tween® (surfactante)
PBSTCa	PBST con CaCl ₂
PDCAAS	Puntuación de Aminoácidos Corregida por Digestibilidad (<i>Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score</i>)
PENG	Penicilina G
pK_a	Logaritmo negativo de la constante de acidez
PPCP	Contaminantes de Fármacos y productos de Higiene Personal (<i>Pharmaceuticals and Personal Care Pollutant</i>)
ppm	parte por millon
QN	Quinolona
RC (%)	Reactividad Cruzada
RIA	Radio Inmunoensayo (<i>RadioImmunoAssay</i>)
RMSE	Error Cuadrático Medio (<i>Root Mean Square Error</i>)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SA	Sulfonamida
SAW	Ondas Acústicas Superficiales (<i>Surface Acoustic Wave</i>)
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla (<i>single-chain variable fragment</i>)
SMZ	Sulfametazina
SN	Sustitución Nucleófila
SPR	Resonancia de Plasmón Superficial (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
SPY	Sulfapiridina
SRFX	Sarafloxacino
TC	Tetraciclina
TCA	Ácido Tricloroacético
TE	Trazador Enzimático
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFAd	Ácido Trifluoroacético deuretado
THF	Tetrahidrofurano
TIRF	Reflexión Interna Total de Fluorescencia (<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TUM	Universidad Técnica de Munich (<i>Technisch Universität München</i>)
UB	Universidad de Barcelona
UE	Unión Europea
UHT	Ultrapasteurización (Ultra-high Temperature processing)
USEPA	Agencia de Protección del Medioambiente de Estados Unidos (<i>United States Environment Protection Agency</i>)
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visible

Índice

RESUMEN	1
ESTRUCTURA DE LA TESIS	6
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL	9
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES.....	11
1.2. ANTIBIÓTICOS.....	11
1.2.1 <i>Quinolonas</i>	13
1.3. USO VETERINARIO DE LOS ANTIBIÓTICOS	16
1.4. CONSECUENCIAS DEL USO VETERINARIO DE LOS ANTIBIÓTICOS	18
1.5. LEGISLACIÓN Y CONTROL DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS	20
1.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS.....	23
1.7. PUBLICACIÓN I: APLICACIÓN DE BIOENSAYOS/BIOSENSORES AL ANÁLISIS DE FÁRMACOS EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES.....	27
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS Y CONTEXTO DE LA TESIS.....	85
2.1. OBJETIVOS DE LA TESIS	87
2.2. CONTEXTO DE LA TESIS.	88
2.2.1. <i>Proyecto ARGOS</i>	88
2.2.2. <i>Proyecto PANOPTES</i>	89
2.2.3. <i>Proyecto ELISHA</i>	89
CAPÍTULO 3 DISEÑO Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS E INMUNOREACTIVOS DE CLASE PARA QUINOLONAS	91
3.1. INTRODUCCIÓN	93
3.1.1. <i>Obtención de anticuerpos e inmunoreactivos para moléculas de bajo peso molecular</i>	93
3.1.2. <i>ELISA competitivo para moléculas de bajo peso molecular</i>	96
3.2. OBJETIVOS	99
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
3.3.1. <i>Diseño de haptenos</i>	99
3.3.1.1. Estudios de modelización molecular.....	101
3.3.2. <i>Síntesis de haptenos</i>	103
3.3.2.1. Análisis retrosintético	103
3.3.2.2. Síntesis del hapteno de inmunización	104
3.3.2.3. Síntesis de haptenos de competición	106
3.3.3. <i>Bioconjugación del haptenos</i>	107
3.3.3.1. Bioconjugación del hapteno de inmunización	107
3.3.3.2. Bioconjugación de haptenos de competición	109
3.3.4. <i>Producción de anticuerpos</i>	111
3.3.5. <i>Desarrollo del ELISA</i>	112
3.3.5.1. Valoración de la afinidad de los antisueros por los competidores	112
3.3.5.2. Optimización del formato indirecto.....	114
3.3.5.3. Optimización del formato directo.....	120
3.4. PUBLICACIÓN II: DISEÑO DE HAPTENO ASISTIDO POR MODELADO MOLECULAR PARA PRODUCIR ANTICUERPOS CON SELECTIVIDAD DE CLASE PARA ANTIBIÓTICOS DE TIPO FLUOROQUINOLONAS	122
3.5. PUBLICACIÓN III: HAPTENOS E INMUNOREACTIVOS Y SU USO EN LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS DE FAMILIA E INMUNOENSAYOS PARA QUINOLONAS	122
3.6. APORTACIONES MÁS RELEVANTES.	189
ANEXO I. PARTE EXPERIMENTAL ADICIONAL COMPLEMENTARIA Y TABLA CON LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS SINTETIZADOS.....	190

CAPÍTULO 4 ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO ANALÍTICO BASADO EN ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN LECHE BOVINA	195
4.1. INTRODUCCIÓN.....	197
4.1.1. <i>Leche como producto alimenticio</i>	197
4.1.2. <i>Problemática asociada al contenido de antibióticos en leche</i>	198
4.1.3. <i>Legislación y control del contenido de antibióticos en leche</i>	199
4.1.4. <i>Diferentes ensayos inmunoquímicos en leche para quinolonas</i>	201
4.2. OBJETIVOS.....	202
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	202
4.3.1. <i>Formato indirecto</i>	202
4.3.1.1. Efecto matriz provocado por la leche.....	202
4.3.1.2. Pretratamiento de la leche.....	204
4.3.1.3. Utilización de leche certificada como referencia.....	205
4.3.1.4. Caracterización del método analítico para la detección de quinolonas en leche.....	206
4.3.1.4.1. Reproducibilidad, exactitud y precisión del método.....	206
4.3.1.4.2. Especificidad del método.....	208
4.3.1.5. Establecimiento de un protocolo semicuantitativo de identificación de quinolonas.....	209
4.3.2. <i>Formato directo</i>	214
4.3.2.1. Efecto matriz provocado por la leche.....	214
4.4. PUBLICACIÓN IV: ANÁLISIS SEMI-QUANTITATIVO PARA EL CRIBADO DE RESIDUOS DE QUINOLONA EN LECHE BASADO EN UN ELISA INDIRECTO GENÉRICO.....	215
4.5. APORTACIONES MÁS RELEVANTES.....	238
CAPÍTULO 5 DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR AMPEROMÉTRICO BASADO EN PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA LA DETECCIÓN DE QUINOLONAS EN LECHE DE VACA	239
5.1 INTRODUCCIÓN.....	241
5.1.1. <i>Biosensores</i>	241
5.1.1.1. Clasificación de los Biosensores.....	242
5.1.2. <i>Partículas Magnéticas</i>	246
5.2. OBJETIVOS.....	247
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	248
5.3.1. <i>Biomodificación de partículas magnéticas</i>	248
5.3.2. <i>Desarrollo de un magneto ELISA directo con el antígeno inmovilizado a las partículas magnéticas (ATM-ELISA)</i>	250
5.3.2.1. Marcaje enzimático del anticuerpo específico para QNs.....	250
5.3.2.2. Desarrollo del ATM-ELISA.....	250
5.3.3. <i>Desarrollo de un magneto ELISA directo con el anticuerpo inmovilizado a las partículas magnéticas</i>	251
5.3.4. <i>Especificidad del método y efecto matriz provocado por la leche</i>	253
5.3.5. <i>Magneto Inmunosensor Amperométrico</i>	254
5.4. PUBLICACIÓN V: DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE ANTIBIÓTICOS DE TIPO FLUOROQUINOLONA UTILIZANDO UN MAGNETO INMUNOSENSOR.....	256
5.5. APORTACIONES MÁS RELEVANTES.....	273
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES GENERALES	275
<u>ANEXO II. ELECTROGENERACIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS FUNCIONALIZADAS CON ANÁLOGOS DE FLUOROQUINOLONA</u>	279
PUBLICACIÓN VI: ELECTROGENERACIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS FUNCIONALIZADAS CON ANÁLOGOS DE FLUOROQUINOLONA PARA EL DESARROLLO DE INMUNOSENSOR PARA ANTIBIÓTICOS.....	281
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	289

RESUMEN

Resumen

La presencia de contaminantes y residuos químicos en los alimentos es un problema que actualmente genera gran preocupación, ya que presenta importantes implicaciones para la salud y la seguridad pública. En este sentido, el uso indiscriminado, inadecuado y/o fraudulento de fármacos veterinarios puede dar lugar a la presencia de residuos de los mismos en los alimentos de origen animal, entrando de esta forma en la cadena trófica y ocasionando riesgos para la salud [1, 2]. Por otro lado, este tipo de residuos puede ser liberado al medioambiente directamente o indirectamente a través de la utilización del estiércol procedente de animales tratados, generando de esta manera la contaminación de suelos y aguas. En el caso de los antibióticos, la presencia de cantidades residuales en alimentos y en el medioambiente ha sido identificada como una de las causas de la aparición de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos por parte de patógenos que causan enfermedades humanas [3, 4], lo que es motivo de gran preocupación por parte de las autoridades sanitarias, diferentes agencias y organizaciones gubernamentales y de la sociedad en general. Por lo tanto existe la necesidad de garantizar la seguridad y la calidad de los productos alimenticios, tal es así que los consumidores son cada vez más exigentes, obligando a la industria alimenticia a tener en cuenta sus preocupaciones, en términos de una producción de alimentos más naturales, ecológicos y saludables con un origen claramente rastreable de todos sus ingredientes.

Hoy en día, el control de los alimentos se realiza en laboratorios centralizados que, en la mayoría de los casos, utilizan procedimientos muy fiables y robustos, pero que a su vez requieren de la utilización de instrumentación cara, personal especializado y procedimientos de tratamiento de muestra que consumen tiempo, limitando de esta forma el número de muestras analizadas. Con el objetivo de mejorar drásticamente esta situación, la Comisión Europea (CE) y las agencias de los Estados miembros están apoyando con decisión las actividades de investigación orientadas al aumento en la eficiencia de los métodos de análisis actuales. Una estrategia consiste en aprovechar los últimos avances tecnológicos y las habilidades complementarias de equipos de investigación multidisciplinarios, para desarrollar metodologías más rápidas, sensibles y específicas, capaces de detectar gran variedad de sustancias químicas, biológicas o cualquier otro riesgo para la salud asociado a la industria agroalimentaria a lo largo de toda la cadena alimentaria.

En esta tesis se describe la investigación realizada respecto al desarrollo de técnicas de análisis alternativas que permitan incrementar la eficiencia del control de residuos de antibióticos en alimentos, en base a la utilización de receptores selectivos (anticuerpos). Concretamente, el objetivo final de esta tesis se enfocó al desarrollo de técnicas inmunoquímicas e inmunosensores para la detección de residuos de antibióticos de tipo quinolona en leche. En este sentido, la producción de anticuerpos con selectividad de clase para quinolonas, una de las familias de antibióticos más importante en el ámbito veterinario, ha sido uno de los objetivos principales de este trabajo de investigación. De esta manera, se ha abordado la producción de dichos anticuerpos mediante el diseño racional y síntesis de los haptenos apropiados, utilizando el criterio químico y herramientas de modelización molecular. La evaluación de las características de los anticuerpos generados se ha realizado a través del desarrollo de ensayos de tipo ELISA en microplaca. Los resultados muestran que ha sido posible obtener anticuerpos de clase selectivos para quinolonas, ya que pueden ser detectados hasta diez congéneres de dicha familia con una detectabilidad adecuada para los

requerimientos de la CE. A su vez, se han desarrollado los protocolos necesarios para la aplicación de estos procedimientos inmunoquímicos al análisis de muestras de leche, estableciéndose un formato semicuantitativo capaz de identificar claramente las muestras libres de quinolona de las contaminadas. Asimismo, los inmunoreactivos y procedimientos inmunoquímicos establecidos se han implementado en un dispositivo inmunosensor amperométrico, basado en la utilización de partículas magnéticas. En este caso, a pesar de la complejidad de la leche, el uso de partículas magnéticas ha permitido la eliminación de las posibles interferencias causadas por los componentes de la matriz, pudiéndose realizar mediciones cuantitativas directamente en muestras de leche, sin ningún tratamiento de muestra adicional o etapa de extracción. Dicho inmunosensor es capaz de detectar hasta siete quinolonas diferentes por debajo de los límites máximos de residuos (LMRs) definidos por el CE para la leche, ofreciendo una estrategia prometedora para el análisis *in situ*, rápido, simple y de bajo costo, de antibióticos de tipo quinolona en muestras complejas.

Como resultado de la investigación realizada, se han publicado 2 artículos en revistas de reconocido prestigio como son *Analytical Chemistry* y *Sensors* y un tercero ha sido remitido para su evaluación a la revista *Food Control*.

Además el esfuerzo realizado para generar de forma racional, y mediante un apropiado diseño de haptenos, anticuerpos de familia frente a los antibióticos de tipo quinolona, se ha concretado en una patente internacional (WO/2012/069683A1), que actualmente se encuentra implementada en Europa (EP2644596A4), Estados Unidos (US20130273581) y China (CN 103328448A). Dicha patente a su vez ha sido licenciada y se encuentra en fase de explotación por parte de una compañía de biotecnología con sede en Bélgica activa en el campo del diagnóstico agroalimentario.

En base a la relevancia de los resultados obtenidos en el contexto de esta tesis doctoral, y en paralelo a esta, se han establecido importantes alianzas con otros grupos de investigación Europeos y Españoles. Como consecuencia, se ha colaborado en el desarrollo de varios dispositivos inmunosensores, basados en diferentes arquitecturas o elementos de transducción, lo que ha generado un número importante de publicaciones en revistas de alto impacto y de prestigio internacional. A continuación se muestra el listado de publicaciones que han sido consecuencia de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral.

1. Tufa, R.A., D.G. Pinacho, N. Pascual, M. Granados, R. Companyó and M.P. Marco, Development and Validation of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Fluoroquinolones in Animal Feeds. *Food Control*, 2015, *In press*.
2. Fernández, F., D.G. Pinacho, M. Gratacós-Cubarsí, J.-A. García-Regueiro, M. Castellari, F. Sánchez-Baeza and M.P. Marco. Immunochemical determination of fluoroquinolone antibiotics in cattle hair: A strategy to ensure food safety. *Food chemistry*, **2014**. 157 (0), 221-228.
3. Fernández, F., D.G. Pinacho, F. Sánchez-Baeza and M.P. Marco. Portable Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Detection of Fluoroquinolone Antibiotic Residues in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**. 59 (9), 5036-5043.
4. Giroud, F., K. Gorgy, C. Gondran, S. Cosnier, D.G. Pinacho, M.P. Marco and F.J. Sánchez-Baeza. Impedimetric immunosensor based on a poly(pyrrole-antibiotic model) film for

- the label-free picomolar detection of ciprofloxacin. *Analytical Chemistry*, **2009**. 81 (20), 8405-8409.
5. Adrian, J., S. Pasche, D.G. Pinacho, H. Font, J.M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, B. Granier, G. Voirin and M.P. Marco. Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone, beta-lactam and tetracycline antibiotics in milk. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2009**. 28 (6), 769-777.
 6. Tsekenis, G., G.Z. Garifallou, F. Davis, P.A. Millner, D.G. Pinacho, F. Sánchez-Baeza, M.P. Marco, T.D. Gibson and S.P.J. Higson. Detection of Fluoroquinolone Antibiotics in Milk via a Labelless Immunoassay Based upon an Alternating Current Impedance Protocol. *Analytical Chemistry*, **2008**. 80 (23), 9233-9239.
 7. Adrian, J., D.G. Pinacho, B. Granier, J.M. Diserens, F. Sánchez-Baeza and M.P. Marco. A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and beta-lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**. 391 (5), 1703-1712.
 8. Ionescu, R.E., N. Jaffrezic-Renault, L. Bouffier, C. Gondran, S. Cosnier, D.G. Pinacho, M.P. Marco, F.J. Sánchez-Baeza, T. Healy and C. Martelet. Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic. *Biosensors & Bioelectronics*, **2007**. 23 (4), 549-555.
 9. Garifallou, G.Z., G. Tsekenis, F. Davis, S.P.J. Higson, P.A. Millner, D.G. Pinacho, F. Sánchez-Baeza, M.P. Marco and T.D. Gibson. Labelless immunosensor assay for fluoroquinolone antibiotics based upon an AC impedance protocol. *Analytical Letters*, **2007**. 40 (7), 1412-1422.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta sección pretende dar una visión general de cómo se presentan el trabajo de investigación realizado y los resultados obtenidos en esta tesis. La memoria de la tesis se presenta como un compendio de publicaciones y se divide estructuralmente en cinco capítulos, además de las conclusiones finales y dos anexos. Básicamente, el **Capítulo 1** presenta una amplia revisión del estado del arte en temas relacionados con la seguridad alimentaria, enfocado en los residuos de fármacos veterinarios, la problemática que presenta este tipo de residuos, la legislación y los métodos analíticos para su control. En el **Capítulo 2** se presentan los objetivos de la tesis y el contexto en el que fue realizada, incluyendo una breve descripción de los proyectos involucrados. El **Capítulo 3** describe el trabajo realizado durante la producción y caracterización de anticuerpos policlonales contra los antibióticos de tipo quinolona, a través de un diseño racional de haptenos. La parte experimental de dicho trabajo se completa en el **Anexo I**. El **Capítulo 4** detalla el trabajo realizado durante el establecimiento de un método inmunoquímico de tipo ELISA para la detección selectiva de quinolonas en leche, incluyendo la evaluación del efecto matriz y la caracterización analítica del procedimiento mediante la evaluación de la reproducibilidad, exactitud, precisión y especificidad del método, así como la demostración de su utilidad mediante la medición de muestras fortificadas con quinolonas. En el **Capítulo 5** se describe el trabajo realizado durante el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para la detección de quinolonas en leche, abarcando desde la inmovilización de inmunoreactivos sobre partículas magnéticas hasta la implementación del inmunosensor con transducción amperométrica en leche. Finalmente en el **Capítulo 6** se recogen las principales conclusiones extraídas del trabajo realizado durante la tesis. En el **Anexo II** se recoge una publicación en la revista ITBM-RBM, resultado de una estancia predoctoral en el grupo Laboratorio de Electroquímica Orgánica Fotoquímica y Redox de la Universidad Joseph Fourier de Grenoble, liderado por el Dr. Serge Cosnier.

Los resultados fruto de esta investigación han sido publicados en varias revistas científicas de relevancia internacional. A modo de resumen, la **Figura 1** muestra esquemáticamente la estructura de la tesis y las publicaciones asociadas a cada capítulo.

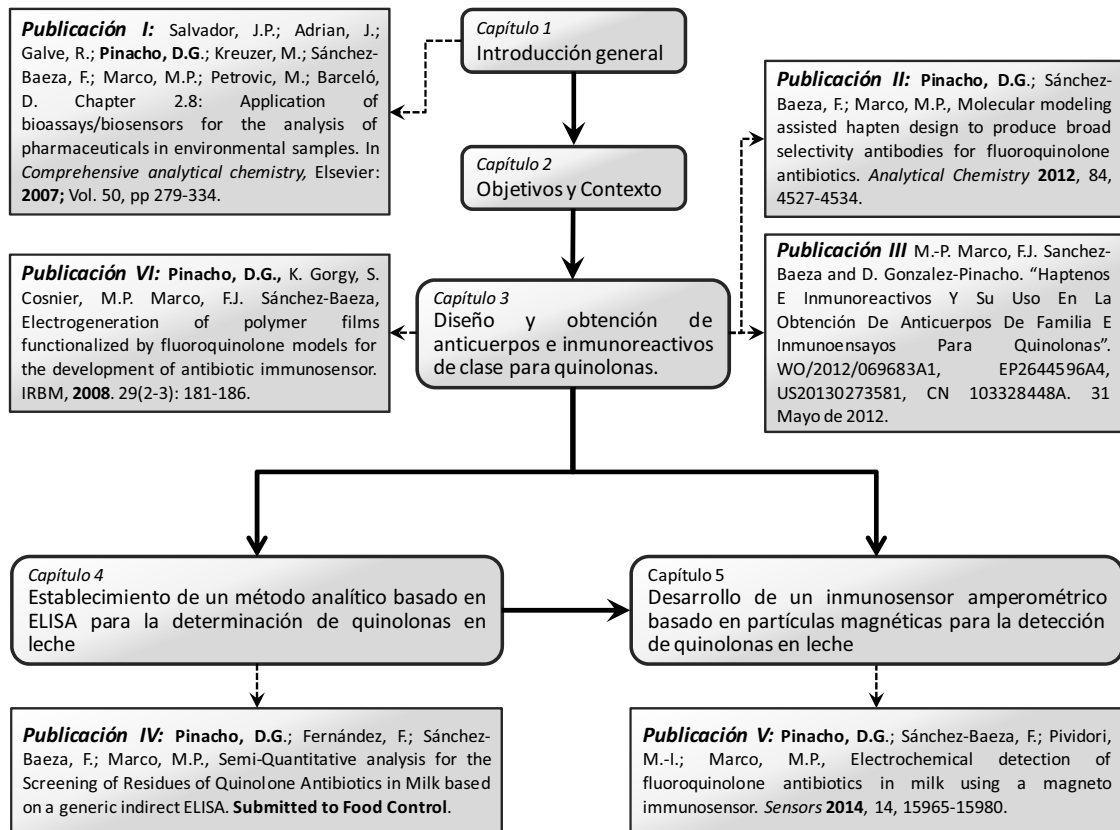


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra la conexión entre los diferentes capítulos y las publicaciones correspondientes.

Capítulo 1

Introducción general

1.1. Consideraciones generales

Durante el pasado siglo el aumento de la cantidad de sustancias químicas liberadas al medio ambiente ha sido notable, debido en su mayor parte a la revolución industrial (residuos de detergentes, metales...), agrícola (residuos de pesticidas, fertilizantes...) y farmacéutica (residuos de antibióticos, cosméticos...). Es obvio que la gran mayoría de los productos químicos han sido y son muy útiles para el desarrollo de la humanidad, pero la eliminación inadecuada o la acumulación incontrolada de este tipo de sustancias pueden generar graves problemas. Dentro de esta problemática se incluye la contaminación de recursos naturales tales como aguas, suelos, atmosfera y también de alimentos, lo que origina repercusiones negativas sobre la salud humana y animal y a su vez sobre la sostenibilidad ambiental.

En este sentido, a partir de los años 50 la industria ganadera ha experimentado un incremento espectacular de su productividad a través de la incorporación progresiva de innovaciones tecnológicas, entre las que se encuentra el uso de fármacos para prevención y tratamiento de enfermedades en animales estabulados, siendo los antimicrobianos los más empleados. Los tratamientos zootécnicos, profilácticos y terapéuticos de animales son la causa más frecuente del ingreso de contaminantes químicos en la cadena alimentaria, generando un problema de salud pública importante, ya que los consumidores de alimentos de origen animal están potencialmente expuestos a residuos de sustancias con cierto grado de toxicidad. Todo esto ha llevado a que la legislación alimentaria a nivel mundial se haya reorientado hacia una política dirigida a la vigilancia de residuos como mecanismo de prevención, con el objetivo de mejorar los sistemas de detección empleados para garantizar el control de dichos contaminantes, elevando de esta manera la protección del consumidor.

Por esta razón, la Unión Europea ha publicado varios reglamentos y directivas centrándose en el uso y control de antibióticos, especialmente en las especies de animales productoras de alimentos, con la finalidad de que la exposición a este tipo de compuestos sea toxicológicamente aceptable para el hombre y los animales. Sin embargo, el cumplimiento de la normativa requiere de las herramientas analíticas adecuadas, capaces de identificar y cuantificar de forma fiable la presencia de dichas sustancias en diferentes matrices. A su vez en muchos casos, es indispensable realizar un gran número de análisis de forma rutinaria, surgiendo la necesidad de disponer de metodologías sencillas y eficientes, fáciles de automatizar y de bajo coste al alcance de diferentes usuarios.

1.2. Antibióticos

La palabra antibiótico proviene del griego αντί (anti) "en contra" y βιοτικός (biotikos) "dado a la vida". El primero en emplear el término "*antibiotique*" fue el doctor Hallopeau en 1871, para describir una sustancia que se opone a la vida. Posteriormente a Selman Waksman se le atribuye haber acuñado la palabra en inglés "*antibiotic*" para describir este tipo de compuestos. Inicialmente este término se utilizaba para referirse a sustancias químicas producidas por microorganismos (bacterias, hongos y aminocetos) y que resultaban tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad se emplea para definir las sustancias químicas producidas por un ser vivo o fabricadas por síntesis, capaces de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por acción bacteriostática, o de causar su muerte, por acción bactericida [5].

Este tipo de sustancias han desempeñado un papel crucial en el desarrollo de la sociedad desde su descubrimiento, siendo este uno de los logros médicos más significativos del siglo XX. Se han aplicado y se aplican al tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos patógenos tanto en medicina humana como en veterinaria, acuicultura e incluso en plantas [6, 7]. Aunque ya se conocía desde la antigüedad la utilización de compuestos orgánicos en el tratamiento de infecciones, se puede decir que la historia de los antibióticos comienza con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928. Casi 10 años después, comienza la terapia con este tipo de compuestos mediante el uso clínico de las sulfonamidas (SAs) contra ciertas bacterias en 1936 [8] y el punto de inflexión tuvo lugar con la producción a gran escala de la penicilina durante la segunda guerra mundial. Posteriormente se han descubierto y desarrollado un gran número de sustancias con propiedades antimicrobianas.

No existen datos realmente precisos del volumen de antibióticos producido a nivel mundial, aunque se estima toscamente que se manufacturan al año entre 100,000 y 200,000 toneladas [9-11], de las cuales prácticamente la mitad se destina a los sectores agrícolas, hortícolas, y veterinarios, siendo este porcentaje superior al 70 % en los Estados Unidos [12]. La Unión Europea y los Estados Unidos concentran casi la mitad de la demanda mundial, aunque un reciente estudio sobre los datos de ventas en farmacias y hospitales en 71 países entre 2000 y 2010 [13], revela un aumento del 36 % del consumo humano de antibióticos (de 54 millones a casi 74 millones de dosis), siendo Brasil, Rusia, India, China y Sudáfrica los responsables del 76 % de dicho incremento.

Se puede establecer la clasificación de este tipo de sustancias en base a distintos criterios, como su espectro de acción (gramnegativos, grampositivos, de amplio espectro o de espectro selectivo), su origen (biológico, sintético o semisintético), su mecanismo de acción antibacteriana (inhibidores de síntesis de pared celular, modificadores de la función de la membrana celular, inhibidores de síntesis proteica e inhibidores de la síntesis o función de ácidos nucleicos) o su estructura química. Actualmente este último es el más utilizado por la comunidad científica, agrupando los compuestos por similitud química, que a su vez les confiere cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas. La **Figura 1.1** muestra una clasificación de los antibióticos más utilizados en el ámbito veterinario, agrupándolos según su estructura química.

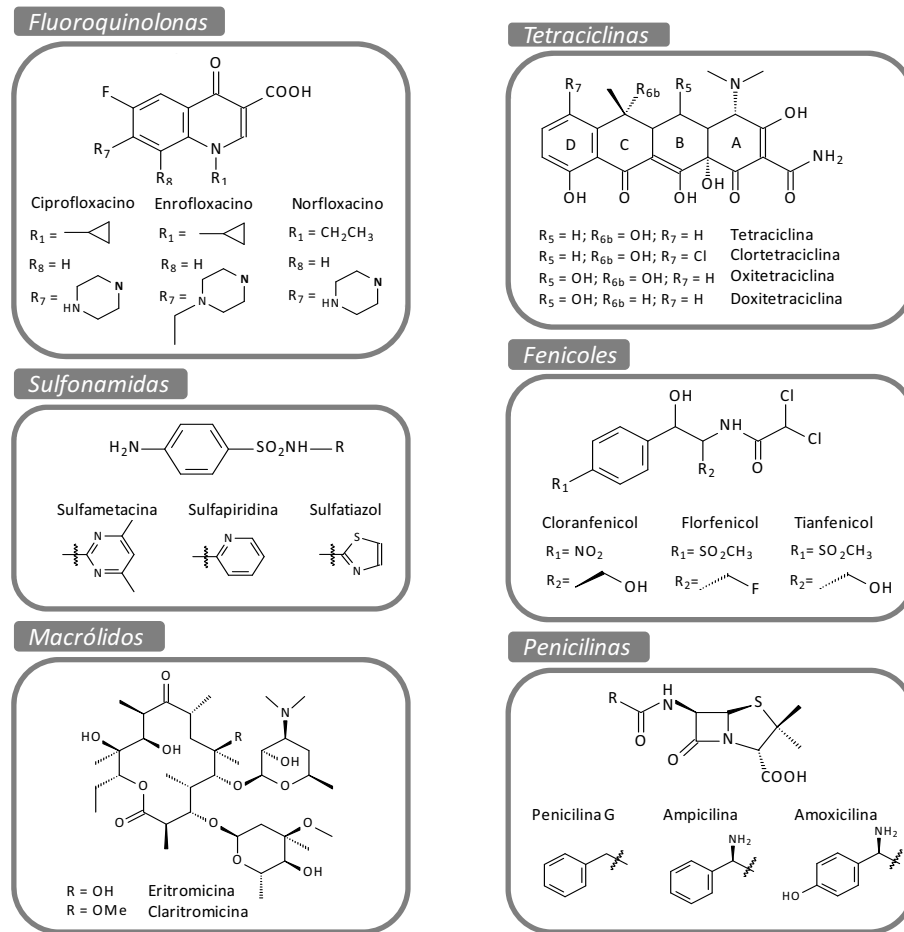


Figura 1.1. Estructura química de las diferentes familias de antibióticos más utilizadas en el ámbito veterinario.

1.2.1 QUINOLONAS.

Las quinolonas (QNs) son una familia de antibióticos sintéticos ampliamente utilizada tanto en la práctica clínica como en veterinaria, y que ha presentado un gran desarrollo en las últimas tres décadas. Su descubrimiento fue casual ya que el ácido nalidíxico, que resultó ser el precursor de este tipo de compuestos, fue aislado como subproducto por *Lesher et al.* durante la síntesis de la cloroquina, un agente antimalárico [14]. A pesar de su actividad oral, acción bactericida y facilidad de síntesis, su espectro antimicrobiano limitado y sus pobres características farmacocinéticas limitaron su uso al tratamiento de infecciones del tracto urinario. Con el objetivo de mejorar y ampliar la actividad antibacteriana y las propiedades farmacológicas, se han realizado numerosas modificaciones en la estructura de las QNs, dando lugar a un numeroso grupo de compuestos.

Presentan una estructura química en común formada por un núcleo de 1,4-dihidroquinolina con un β -cetoácido en la posición 3,4 (véase **Figura 1.2**). Cuando la posición 6 aparece fluorada se denominan fluoroquinolonas, y en la posición 7 generalmente presentan heterociclos nitrogenados derivados de la piperazina. La relación entre la estructura y la actividad antibacteriana de las QNs se muestra en la **Figura 1.2** [15].

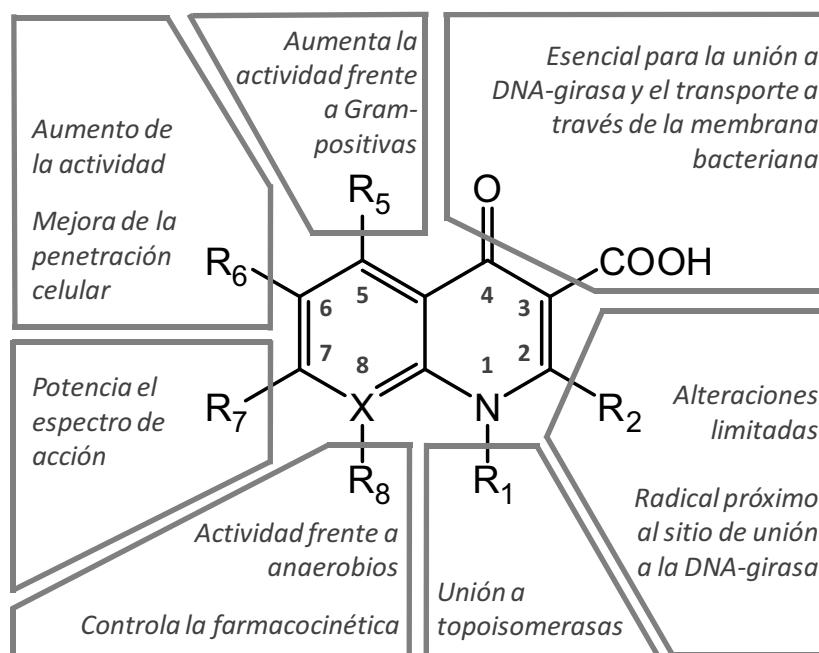


Figura 1.2. Estructura general de las QNs y relación con la actividad bacteriana. Los radicales R1, R2, R5, R7 y R8 indican la posición de posibles modificaciones estructurales. X generalmente corresponde a un átomo de C o N.

Las QNs se suelen clasificar en generaciones, de acuerdo con su época de aparición y principalmente su espectro de actividad [16-18]. De esta manera a la *primera generación* pertenecen las primeras QNs sintetizadas como el ácido nalidíxico, el ácido pipemídico, el cinoxacino, el ácido oxolínico (OXO) y la flumequina (FLUME). Ofrecen un estrecho margen de actividad microbiana (principalmente bacterias Gram-negativas) y presentan una rápida eliminación renal y bajas concentraciones séricas, por lo que se utilizan principalmente para el tratamiento de infecciones urinarias [17]. La *segunda generación* viene determinada por la introducción del átomo de flúor en la posición 6 (fluoroquinolonas), y el grupo piperazino en la posición 7, lo que aumentó de manera drástica la actividad antimicrobiana y el espectro de acción, mejorando a la par sus propiedades farmacocinéticas. Dentro de esta generación destacan el norfloxacin (NRFX), enrofloxacin (ERFX), pefloxacin, ciprofloxacin (CPFX), sarafloxacin (SRFX), ofloxacin (OFX), levofloxacin y lomefloxacin.

La *tercera generación* surge ante la necesidad clínica de ampliar el espectro antibacteriano a bacterias Gram-positivas. Se incorporan nuevos átomos de fluor en la estructura y se modifican los sustituyentes de la posición 7, mejorando de esta manera el espectro de acción frente a gran-positivos, anaeróbios y micobacterias. Pertenecen a esta generación el marbofloxacin (MBFX), esparfloxacin, grepafloxacin, gatifloxacin y temafloxacin. En cuanto a la *cuarta generación*, presentan pequeñas modificaciones respecto a la anterior aunque el espectro antibacteriano, la potencia y la biodisponibilidad mejoran sustancialmente. A esta generación pertenecen el trovafloxacin, gemifloxacin, clinafloxacin y el sitafloxacin. Cabe destacar que tanto el trovafloxacin como el temafloxacin han sido retirados del mercado por sus efectos hepáticos adversos [19].

Las QNs ejercen un efecto bactericida inhibiendo la síntesis de ADN bacteriano mediante la formación de un complejo ternario entre la topoisomerasa, el ADN y la propia QN. La ADN-Girasa es la diana asociada a bacterias gram-negativas, mientras que para bacterias gram-

positivas este tipo de compuestos actúan sobre la topoisomerasa IV [20-22]. Ambas enzimas son vitales para la bacteria ya que dictan la topología apropiada del ADN bacteriano. La formación de dichos complejos ternarios interfiere con la transcripción del ADN, su replicación y su reparación, promoviendo su escisión y desembocando en una rápida muerte celular de la bacteria. En este sentido, el efecto ejercido sobre el mismo tipo de enzimas presentes en células procariotas (humanas) es muy inferior [22], debido en parte a que están formadas por solo dos subunidades en lugar de las cuatro que poseen las bacterianas [23].

Debido a su elevada actividad antimicrobiana, amplio espectro de acción y perfil farmacocinético, las QNs poseen numerosas indicaciones terapéuticas, siendo ampliamente utilizadas en el ámbito hospitalario, la clínica ambulatoria y la medicina veterinaria [24]. Este grupo de fármacos está indicado para el tratamiento de pacientes con infecciones en el tracto urinario, enfermedades de transmisión sexual, infecciones gastrointestinales, infecciones respiratorias tanto del tracto superior como del inferior y en menor medida infecciones de la piel y tejidos blandos, osteoarticulares e intraabdominales y pélvicas [24, 25]. En cuanto al su uso veterinario, las QNs están aceptadas para el tratamiento de cistitis e infecciones urinarias, respiratorias (ej.: neumonía en terneros), de piel y tejidos blandos.

Este tipo de compuestos presentan una absorción prácticamente total a nivel del tracto gastrointestinal tras su administración oral, generando una biodisponibilidad entre moderada y excelente (entre el 12 % y el 93 % dependiendo del compuesto), uniéndose a proteínas en un porcentaje inferior al 50 %. Su velocidad de absorción es rápida alcanzando la concentración máxima en plasma entre 0.5 y 2 horas después de su administración, viéndose dicha absorción afectada por la administración conjunta de compuestos que contengan metales catiónicos (Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} ...). También exhiben una rápida y amplia distribución en tejidos y fluidos corporales, y una elevada capacidad de penetración intracelular [26, 27], presentando un volumen de distribución de entre 1 y 3 L/Kg. Se eliminan principalmente por vía renal, tanto por filtrado glomerular como por secreción tubular, con una tasa de metabolización baja que tiene lugar fundamentalmente sobre el anillo piperazínico de la posición 7, generando varios tipos de metabolitos por hidrólisis, oxidación, dealquilación o sulfonación del mismo [28, 29].

Las QNs son fármacos generalmente seguros y bien tolerados, considerándose sus efectos secundarios leves o moderados, comparables a los provocados por otros antibióticos, afectando al sistema gastrointestinal, al sistema nervioso central e incluyendo erupciones cutáneas, fotosensibilidad, artropatía e inflamación articular [30]. Sin embargo se han observado casos comparativamente raros pero severos, de toxicidades con algunos de los congéneres en particular. Por ejemplo, el esparfloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, fleroxifloxacino, trovafloxacino y grepafloxacino pueden causar una prolongación significativa del intervalo QT cardiaco, lo que puede provocar la aparición de arritmias peligrosas y ha provocado la salida del mercado del grepafloxacino [31]. A su vez, el trovafloxacino puede causar toxicidad hepática lo suficientemente grave como para requerir de un trasplante o incluso causar la muerte [32] siendo retirado del mercado europeo. También se ha asociado a los miembros con la posición 8 halogenada con una mayor incidencia de fototoxicidad [33].

1.3. Uso veterinario de los antibióticos

Los antibióticos comenzaron a utilizarse en veterinaria poco después de su aplicación en humanos, con un impacto en el sector veterinario similar al ejercido en medicina humana, generando un efecto muy positivo no sólo en la salud animal sino también en los niveles de bienestar. En la actualidad hay disponibles una gran cantidad de sustancias para el tratamiento y profilaxis de animales tanto domésticos como de abasto. En los actuales sistemas de explotación intensiva animal, en los cuales se ve favorecida la aparición y rápida diseminación de infecciones y procesos parasitarios, los antibióticos juegan un papel crucial en el control de enfermedades, mediante su utilización en el tratamiento de infecciones y su uso profiláctico para la prevención de las mismas, siendo necesario en todos los casos un adecuado control veterinario. La terapia implica el tratamiento de los animales enfermos, aplicándose el control sobre el grupo de animales en el cual la mortalidad es superior a la normal, mientras que la profilaxis se aplica al grupo de animales en situación de riesgo de contraer la infección pero que no presentan ningún síntoma.

Además los antibióticos también se pueden utilizar como promotores de crecimiento, ya que se ha observado que este tipo de compuestos mejora la tasa de crecimiento animal [34, 35]. Se cree que la causa del aumento de crecimiento con el uso de antibióticos consiste en una compleja interacción entre factores nutritivos, fisiológicos, microbianos y patológicos. Básicamente este efecto puede ser ejercido a través de la eliminación de microorganismos causantes de infecciones subclínicas, la reducción de sustancias tóxicas que retardan el crecimiento (ej.: amoniaco) y una menor destrucción y competencia por nutrientes por parte de la flora intestinal [36]. Como promotores de crecimiento, los antibióticos se emplean en dosis subclínicas durante largos periodos de tiempo, estimándose una ganancia de peso de hasta un 10 % [37, 38].

La forma de administración de los antibióticos varía dependiendo de la especie animal y del uso empleado. Así, para animales de gran tamaño, el antibiótico se suele administrar en forma de píldoras o soluciones inyectables, mientras que en animales pequeños, como aves de corral o conejos, suele administrarse disuelto en agua o en forma de pienso medicamentoso, siendo esta última la forma más común de administración cuando su utilización es como promotor de crecimiento, considerándose en este caso como aditivos alimentarios.

Es difícil hacer una estimación del volumen de antibióticos utilizado con fines veterinarios a nivel mundial, aunque en los últimos años debido a la presión social, se ha puesto una especial atención a este tema, estableciéndose organizaciones de control y vigilancia. El último informe de la FDA estima que en 2012 los EEUU emplearon alrededor de 14500 toneladas de antibióticos para uso veterinario, experimentando un aumento del 16 % respecto a datos del 2009 [12]. En Europa sin embargo este consumo disminuyó un 15 %, estimándose el consumo en unas 8000 toneladas, de las cuales alrededor de 1700 toneladas se emplearon en España, siendo el segundo país consumidor después de Alemania [39]. En la **Tabla 1.1** se muestran los datos de ventas en Europa, en toneladas de principio activo en 2012, de los antibióticos de uso veterinario utilizados principalmente para animales productores de alimentos, por país y por familia de antibiótico.

Tabla 1.1. Ventas, en toneladas de principio activo en 26 estados de la Unión Europea, de los antibióticos de uso veterinario utilizados en animales productores de alimentos, incluidos equinos, por familia de antibiótico (de acuerdo con el sistema jerarquizado de ATVvet) por países para el año 2012 [39].

País	Tet	Fen	Pen	Cef	Sulf	Tri	Mac	Linc	Quin	Ami	Pol	Otr ^a	Total
Alemania	599	5.4	565	4.2	162	26.2	133	16.4	10	31.4	124	31.9	1707.5
Austria	29.9	0.3	7.9	0.4	5.7	0.8	4.4	0.3	0.5	1.3	0.7	0.8	53.0
Bélgica	60.0	1.4	76.5	0.9	71.7	14.4	12.3	5.2	4.1	1.6	9.6	9.1	267.2
Bulgaria	17.3	0.5	4.3	0.03	1.0	0.1	6.5	1.2	2.5	1.6	1.5	2.0	38.4
Chipre	14.2	0.1	7.4	0.10	8.7	1.7	2.4	5.6	0.4	0.6	0.9	2.9	45.0
Dinamarca	32.5	0.8	27.4	0.2	11.1	2.2	12.4	2.5	2.1	3.6	0.6	11.7	107.0
Eslovaquia	2.6	0.1	3.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.8	1.1	0.5	1.0	10.2
Eslovenia	0.8	0.2	2.7	0.06	0.3	0.1	0.2	0.2	0.7	0.5	0.02	0.9	6.8
España	657	11.6	262	1.4	56.2	9.6	148	116	53.4	97.6	177	103	1692.8
Estonia	1.8	0.02	2.6	0.2	0.1	0.02	0.5	0.1	0.1	0.6	0.6	0.8	7.3
Finlandia	1.8	0.1	6.4	0.05	2.5	0.5	0.6	0.1	0.1	0.03	---	0.1	12.2
Francia	323	4.7	80.9	3.9	141	21.2	57.9	4.4	9.9	54.8	50.1	9.3	761.4
Holanda	96.6	3.0	54.7	0.3	41.0	7.8	25.5	0.9	3.1	6.0	3.2	3.7	245.7
Hungría	99.5	2.0	32.6	0.4	4.9	1.1	4.3	4.5	8.2	1.9	5.7	13.4	178.5
Irlanda	37.2	2.0	21.7	0.8	19.7	1.5	6.7	0.4	1.0	8.4	0.2	0.51	100.0
Islandia	0.04	---	0.3	c	0.04	0.01	---	---	0.02	0.2	---	0.01	0.7
Italia	478	16.9	358	2.9	174	22.8	139	59.6	41.6	22.0	135	83.8	1534.3
Letonia	2.5	0.01	1.6	0.13	0.2	0.05	0.3	0.02	0.03	0.7	0.4	0.5	6.7
Lituania	2.4	0.2	4.9	0.32	0.9	0.2	1.5	0.1	0.3	1.5	0.4	0.6	13.4
Luxemburgo	0.8	0.05	0.4	0.05	0.4	0.1	0.1	0.04	0.03	0.04	0.1	0.12	2.2
Noruega	0.2	0.2	2.8	---	1.5	0.3	---	---	1.42	0.6	---	0.1	7.1
Polonia	211	7.1	129	1.4	44.6	3.2	22.8	5.3	32.7	35.6	15.6	7.6	516.4
Portugal	55.5	1.0	26.7	0.3	2.9	0.7	14.2	6.7	9.4	3.4	18.5	17.1	156.5
Reino Unido ^b	198	---	81.8	2.0	65.0	12.8	40.9	5.0	2.3	13.6	---	26.4	447.4
Rep. Checa	20.0	0.4	12.3	0.4	8.6	0.8	3.8	0.3	1.2	1.7	0.6	0.6	53.7
Suecia	0.8	c	6.5	0.01	1.6	0.3	0.5	---	0.1	0.3	0.1	0.3	10.6
Total	2943	58	1780	20	826	129	638	235	186	291	545	331	7982

Tet: Tetraciclinas, **Fen:** Fenicoles, **Pen:** Penicilinas, **Cef:** Cefalosporinas, **Sulf:** Sulfonamidas, **Tri:** Trimetoprim, **Mac:** Macrolidos, **Quin:** Quinolonas, **Ami:** Aminoglucoosidos, **Pol:** Polimixinas, **Otr:** Otros. ^a Se incluyen Pleuromutilinas, Bacitracina, paromicina y espectinomocina. ^b Se han incluido Polimixinas y fenicoles en "otros" por razones de confidencialidad. ^c Valores < 0.001.

En cuanto a las QNs, son compuestos muy utilizados en veterinaria, generalmente en el tratamiento o prevención de infecciones respiratorias, urinarias, gastrointestinales, oculares o heridas en general. Se administran a ganado bovino, porcino, ovino así como son utilizadas en avicultura, acuicultura y para el tratamiento de animales de compañía. El uso veterinario de estos antibióticos varía en función de la especie animal, la distribución geográfica y de la QN empleada. De esta manera, en Norteamérica son pocas las QNs aprobadas para el uso veterinario (ERFX y SRFX) y en Australia no está autorizado su uso en animales destinados al consumo humano. Sin embargo en los países asiáticos, como Japón, las QNs son ampliamente utilizadas sobre todo en avicultura.

1.4. Consecuencias del uso veterinario de los antibióticos

El uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano genera innegables ventajas y permite una mejora en la producción, facilitando al consumidor el fácil acceso a proteínas de origen animal. Aparte de un mejor control de enfermedades infecciosas y el aumento del bienestar animal, el incremento de productividad también permite la reducción significativa de los animales necesarios para alimentar a una determinada población, redundando en una menor carga medioambiental en lo que se refiere a recursos consumidos y residuos generados. Sin embargo el uso abusivo, incontrolado o fraudulento de los antibióticos, induce la posibilidad de que residuos de este tipo de compuestos persistan en los alimentos derivados de animales y en sus propios desechos, pasando a formar parte de la cadena alimenticia o pudiéndose dispersar en el medioambiente. Así pues, la presencia de residuos de antibióticos comporta una serie de riesgos de índole sanitaria, tecnológica y medioambiental, que está generando un notable incremento de la preocupación social, que exige una garantía de salubridad en los alimentos destinados al consumo humano.

El consumo de alimentos contaminados con residuos de antibióticos puede producir efectos perjudiciales relacionados con la propia toxicidad del compuesto, aunque en general los efectos tóxicos son poco probables debido a que las dosis son bajas. Sin embargo la ingestión repetida de pequeñas dosis puede generar procesos alérgicos, que en casos extremos pueden llevar a la anafilaxia, así como perturbaciones pasajeras en la flora intestinal y reacciones de intoxicación frente a determinados antibióticos de gran toxicidad [40].

El principal problema sanitario que presenta la utilización de los antibióticos, tanto en medicina humana como en veterinaria, es la aparición de cepas bacterianas resistentes a dichas sustancias. Numerosas publicaciones científicas han puesto de evidencia la relación entre el uso de antibióticos en animales y el aumento de resistencia a dichas sustancias en bacterias, tanto en los propios animales como en los consumidores de alimentos que proceden de los mismos [41, 42]. La administración de antibióticos a bajas dosis durante tiempos relativamente largos (e.j.: uso como promotores del crecimiento) contribuye en gran medida a la aparición de dicha resistencia, ya que se ejerce una presión positiva y se promueve la diseminación de cepas resistentes en el medioambiente y en los sistemas gastrointestinales del animal. Las vías de transmisión consisten principalmente el contacto directo con animales tratados y en el consumo o manipulación de alimentos contaminados con bacterias resistentes. El hecho de que se empleen las mismas familias de antibióticos en animales y humanos junto con el escaso desarrollo de nuevos antibióticos ha provocado que las administraciones aborden el problema poniendo especial énfasis en el uso racional de los

antibióticos, tanto en medicina humana como en veterinaria, incluyendo programas de farmacovigilancia tanto de consumo de antibióticos como de aparición o aumento de cepas resistentes a los mismos.

Por otro lado, la elaboración de productos fermentados a nivel industrial puede verse afectada por la presencia de residuos de antibióticos en las materias primas, provocando elevadas pérdidas tanto económicas como de calidad. Este tipo de residuos es capaz de provocar fermentaciones anormales en embutidos y otros productos cárnicos, así como fallos en los iniciadores de la fermentación. La presencia de antibióticos en leche, puede dar lugar a alteraciones en la flora láctica, produciendo retrasos en la acidificación o dificultad de cuajado y maduración durante la elaboración de productos fermentados como queso o yogurt [43]. A su vez, este tipo de residuos puede afectar al control de calidad en la industria alimentaria influyendo en el recuento de gérmenes, ya que los antibióticos son capaces de alterar el desarrollo de la flora bacteriana contaminante, pudiendo enmascarar la presencia de patógenos durante el proceso de control bacteriológico del alimento.

La entrada de los antibióticos al medioambiente deriva de los residuos generados durante su producción y de su empleo en medicina humana y veterinaria, incluyendo su uso en acuicultura (véase **Figura 1.3**), siendo estos importantes focos de aparición de resistencia antimicrobiana. Este tipo de compuestos está englobado dentro de los contaminantes ambientales denominados PPCPs (*“Pharmaceuticals and Personal Care Pollutants”*) y el estudio de la presencia y efectos de este tipo de contaminantes en el medioambiente ha generado un creciente interés [44-46].

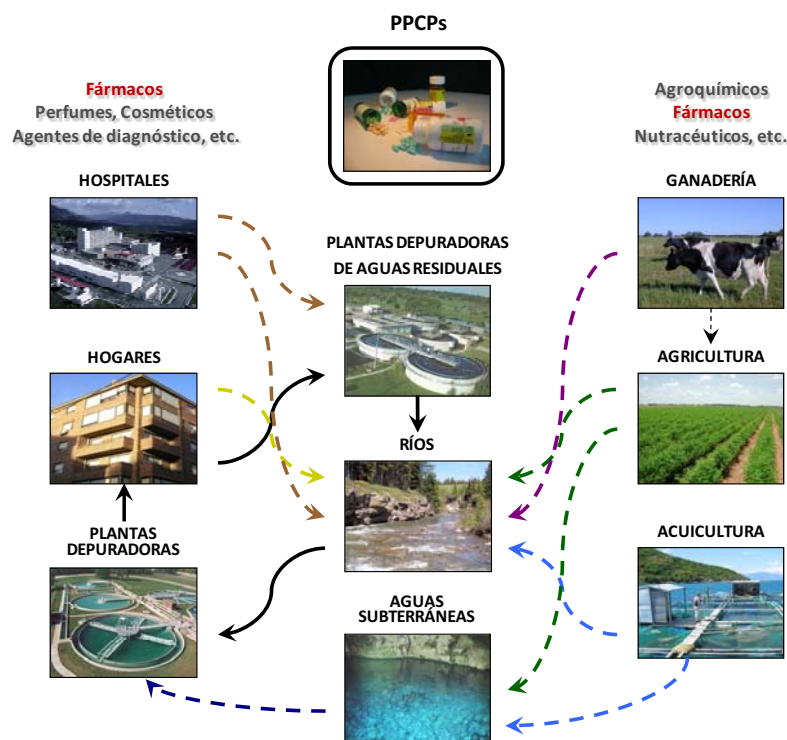


Figura 1.3. Fuentes y rutas de los PPCPs en el ciclo medioambiental.

La principal vía de entrada de los antibióticos al medioambiente a causa de su utilización en veterinaria, es la utilización del estiércol o purines procedentes de animales tratados como abono. Dependiendo de las propiedades físico-químicas de este tipo de residuos (fármacos,

metabolitos o productos de degradación) y las características del suelo, pueden alcanzar las aguas subterráneas contaminando los acuíferos, o quedar retenidas en el suelo y acumularse, pudiendo afectar al ecosistema y a la población a través de la cadena trófica [47]. A su vez los medicamentos utilizados en acuicultura se vierten directamente a los ríos y al mar. Recientes estudios han demostrado la presencia de antibióticos en suelos agrícolas [47, 48], aguas [49] y otras muestras de origen medioambiental [50] así como un aumento de cepas bacterianas resistentes a algunos antibióticos en sedimentos cercanos a explotaciones ganaderas [51, 52].

1.5. Legislación y control de residuos de antibióticos

Debido a la problemática y los riesgos que conlleva la utilización de antibióticos en veterinaria, y con el objeto de proteger la salud de los consumidores, surgió la necesidad de establecer una regulación relativa al uso y control de este tipo de sustancias. Para ello se está fomentando una política de “*uso racional de antibióticos*” tanto en medicina humana como en veterinaria, para garantizar que los tratamientos contra infecciones continúen siendo efectivos. Son muchos los organismos e instituciones involucrados en esta temática, como por ejemplo OMS [53] (*Organización Mundial de la Salud*), CE [54], IFAH [55] (*International Federation for Animal Health*), EMEA [56] (*European Medicines Agency*), FDA [57] (*Food and Drug Administration*), CDC [58] (*Center for Disease Control and Prevention*), USEPA [59] (*United States Environment Protection Agency*), EFSA [60] (*European Food Safety Authority*) entre otros.

En lo que se refiere a la gestión de la resistencia antimicrobiana, una aproximación internacional es esencial para su vigilancia y monitorización, ya que es un problema a nivel mundial. En Europa, se lleva a cabo por el EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) y en Estados Unidos por la INSPEAR (*International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance*) y el NARMS (*National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria*). Los objetivos de estas redes de vigilancia consisten en servir como sistemas de alerta temprana de aparición de patógenos resistentes, así como facilitar la rápida distribución de información fiable sobre los patógenos resistentes a múltiples fármacos a hospitales y autoridades de salud pública a nivel mundial. De la misma forma sirven de modelo para el desarrollo e implementación de las intervenciones necesarias para el control de infecciones, con objeto de prevenir la aparición o transmisión de bacterias resistentes a antibióticos en centros de salud.

Así mismo, el objetivo de la política de seguridad alimentaria de la Unión Europea (UE) es proteger la salud y los intereses de los consumidores, garantizando el buen funcionamiento del mercado interior. Es por ello que la UE ha regulado estrictamente los controles sobre el uso de medicamentos veterinarios, sobre todo en las especies de animales productoras de alimentos, mediante la emisión de varios reglamentos y directivas. De esta forma, desde 1998, ha prohibido la adición de antibióticos utilizados en medicina humana a piensos [61] y la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento animal o con fines profilácticos [62, 63], quedando su uso únicamente restringido a aspectos terapéuticos.

El uso de medicamentos veterinarios se reguló en principio a través del Reglamento (CEE) Nº 2377/90 del Consejo de la UE, que describía los procedimientos para el establecimiento de

límites máximos de residuos (LMR) [64] de los fármacos veterinarios en los alimentos de origen animal (e.j.: leche, huevos o carne). Se define este LMR como “contenido de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario, legalmente autorizado en la UE y considerado como admisible, desde el punto de vista de la seguridad del consumidor, en un producto alimenticio”. Dichos LMRs son fijados en función de las características toxicológicas de cada medicamento y a su vez sirven como referencia para determinar el tiempo de espera que debe transcurrir desde la administración del fármaco hasta el sacrificio del animal o la venta de productos alimenticios derivados del mismo (ej.: Leche y huevos).

El Reglamento (CEE) Nº 2377/90 ha sido derogado y actualmente es el Reglamento (CE) Nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo [65] el que recoge, regula y establece los procedimientos comunitarios para fijar de los LMRs de este tipo de sustancias, modificando la Directiva 2001/82/CE [66] y el Reglamento (CE) Nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo [67]. Sus objetivos son dos fundamentalmente: 1) la protección de la salud humana y animal y 2) garantizar la disponibilidad de fármacos veterinarios apropiados para enfermedades que afecten a animales productores de alimentos. Para ello establece que un medicamento sólo podrá utilizarse en animales productores de alimentos si ha sido objeto de una evaluación favorable por la EMEA, obligando a que el dictamen considere todo hallazgo científico pertinente de la EFSA. Además, el Reglamento (CE) Nº 470/2009 clasifica las sustancias activas y las categorías terapéuticas a las cuales pertenecen, indicando: un LMR, un LMR provisional, la ausencia de establecer un LMR, o bien la prohibición de uso de la sustancia.

En el caso concreto de las QNs, los LMRs varían dependiendo del compuesto y de la matriz o tejido a analizar. En el caso concreto de la leche oscilan entre 30 y 100 µg/kg, estando prohibida la utilización del difloxacino (DFX) y el OXO en animales cuya leche está destinada al consumo humano. La **Tabla 1.2** especifica los LMRs establecidos por la EMEA para este tipo de compuestos y las matrices a analizar para cada especie animal.

De forma complementaria al Reglamento (CE) Nº 470/2009, se ha publicado el Reglamento (UE) Nº 37/2010 [68] que recoge los LMRs de sustancias previamente contenidos en los anexos I a IV del derogado Reglamento (CEE) Nº 2377/1990. La principal novedad es la creación de dos listas únicamente, en lugar de los cuatro anexos anteriores: 1) LMRs para sustancias permitidas y 2) lista de sustancias prohibidas. Además, se introduce información acerca de la clasificación terapéutica de las sustancias, así como posibles condiciones o restricciones de su utilización.

Tabla 1.2. Límites Máximos de Residuos (LMRs) para las QNs establecidos por la EMEA.

Principio activo	Especies animales	LMRs ^a	Tejidos objetivo
Ácido oxolínico	Porcino y aves de corral ^b	50-150	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
	Pescado	50-150	Músculo y piel ^c
	Resto de especies ^e	200-1000	Músculo, grasa, hígado y riñón
Danofloxacino	Bovino, ovino, caprino	30-400	Músculo, grasa, hígado, riñón y leche
	Aves de corral ^b	100-400	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
	Porcino	50-200	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
	Resto de especies ^d	50-200	Músculo, grasa, hígado y riñón
Difloxacino	Bovino, ovino, caprino ^e	100-1400	Músculo, grasa, hígado y riñón
	Porcino	100-800	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
	Aves de corral ^b	300-1900	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
	Resto de especies ^d	100-800	Músculo, grasa, hígado y riñón
Enrofloxacino ^f	Bovino, ovino, caprino	100-300	Músculo, grasa, hígado, riñón y leche
	Conejo	100-300	Músculo, grasa, hígado y riñón
	Porcino y aves de corral ^b	100-300	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
	Resto de especies ^d	100-200	Músculo, grasa, hígado y riñón
Flumequina	Bovino, ovino, caprino	50-1500	Músculo, grasa, hígado, riñón y leche
	Porcino	200-1500	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
	Aves de corral ^b	250-1000	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
	Pescado	600	Músculo y piel ^c
	Resto de especies	200-1000	Músculo, grasa, hígado y riñón
Marbofloxacino	Bovino	50-150	Músculo, grasa, hígado, riñón y leche
	Porcino	50-150	Músculo, piel y grasa ^c , hígado y riñón
Sarafloxacino	Aves de corral ^b	10-100	Piel y grasa ^c e hígado
	Salmónidos	30	Músculo y piel ^c

^a Expresado en µg/Kg. ^b No debe utilizarse en animales que producen huevos para consumo humano. ^c En proporciones naturales. ^d Para pescado el LMR para músculo se aplica a "músculo y piel en proporciones naturales" y no se aplican LMRs para grasa, hígado y riñón. ^e No debe utilizarse en animales que producen leche para consumo humano. ^f Suma de enrofloxacino y ciprofloxacino.

Los requisitos de muestreo y directrices analíticas para el control de estas sustancias se encuentran definidos en la Directiva 96/23/EC [69] y en la Decisión 2002/657/CE [70], estableciendo criterios y procedimientos para la validación de métodos analíticos que garanticen la calidad y la comparabilidad de los resultados analíticos de los laboratorios oficiales [71], así como criterios comunes para la interpretación de los resultados. La Directiva 96/23/CE también establece a su vez que las muestras recogidas a través de los Programas Nacionales de Vigilancia deben ser analizadas en laboratorios acreditados y en consecuencia, se ha creado una amplia red de laboratorios para el análisis de residuos. Es un sistema jerárquico que comprende unos cuarenta laboratorios nacionales de referencia en el nivel más bajo, llamados laboratorios de rutina y/o de campo, y cuatro Laboratorios de Referencia Comunitarios (CLRs) situados en Alemania, Francia, Italia y los Países Bajos, cada uno responsable de una serie de compuestos. A pesar de que la Directiva 96/23/CE y la Decisión 2002/657/CE dictan la frecuencia, los análisis totales a realizar y el número de sustancias que

deben ser controladas, la mayoría de los métodos de análisis disponibles actualmente son insuficientes para cumplir con estos requisitos, debido a la baja capacidad de procesamiento de muestras de los métodos actuales, relacionado en gran parte con la necesidad de efectuar procedimientos de extracción y de tratamiento de las muestras biológicas [72, 73].

Por otro lado, aunque existe una amplia legislación y normativa que regula la calidad del agua, estableciendo la Directiva 2000/60/CE el marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, actualmente no hay disponible ninguna legislación que establezca unos límites máximos recomendables de residuos de fármacos veterinarios en el medioambiente. Situación poco regular considerando que estudios realizados en los últimos años demuestran la clara relación existente entre el consumo de antibióticos tanto en medicina humana como en veterinaria y la aparición de bacterias resistentes en el medio acuático [74-76].

1.6. Métodos de análisis de antibióticos

Debido a la problemática expuesta anteriormente y a la legislación al respecto, el interés en el análisis de residuos de antibióticos en alimentos y muestras medioambientales se ha incrementado de forma ostensible en las últimas décadas, como queda patente en diferentes artículos de revisión [61, 77, 78]. Los procedimientos utilizados para la identificación y cuantificación de estas sustancias se basan principalmente en el uso de test microbiológicos, técnicas inmunoquímicas, electroforesis capilar y técnicas cromatográficas. Dependiendo del objetivo y tipo de análisis se recomienda el uso de una técnica u otra (véase la **Figura 1.4**).

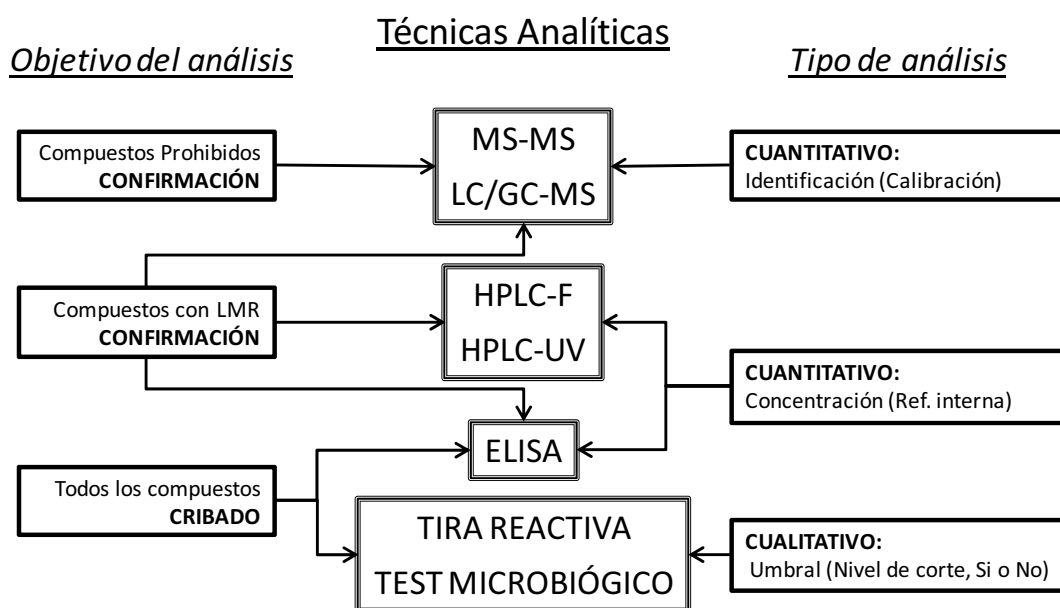


Figura 1.4. Esquema de las técnicas analíticas más utilizadas para la detección de antibióticos clasificadas según el objetivo y el tipo de análisis.

Todas estas técnicas son necesarias y complementarias entre sí, sirviendo cada una a un objetivo en concreto. Los métodos de confirmación cuantitativos (e.j.: técnicas cromatográficas acopladas a detectores de MS) pueden ser automatizados, manteniendo la supervisión de procesos y disminuyendo el coste de mano de obra, aunque a veces el tiempo de análisis supone una limitación a la hora de analizar un gran número de muestras. Así pues,

es necesario disponer de técnicas de rastreo masivo para el cribado de gran número de muestras (e.j.: ELISA, tiras reactivas o test microbiológicos) que sean fáciles de usar, rápidas, precisas, fiables y rentables, siendo capaces de detectar varios contaminantes a la vez obteniendo negativos claros, disminuyendo de esta forma el número de muestras a analizar mediante los métodos de confirmación.

Las *técnicas cromatográficas* son consideradas el “patrón oro” y son utilizadas como técnicas de rutina en muchos laboratorios para la separación y detección de antibióticos. Sin embargo, la elevada complejidad de las matrices biológicas generalmente implica una etapa previa de extracción del analito de dicha matriz, seguida de una o varias etapas de limpieza con el fin de eliminar el máximo número de interferentes y a su vez lograr preconcentrar la muestra. Estas técnicas presentan elevada detectabilidad y robustez y son adecuadas para la multidetección, cuantificación, confirmación e identificación del residuo. A pesar de que suelen proporcionar resultados reproducibles y exactos, para su desarrollo es necesario disponer de instrumentación de elevado coste así como de personal cualificado. El tiempo de análisis requerido también suele ser un inconveniente, limitando de esta manera su uso para el cribado de gran número de muestras. En concreto, el análisis cromatográfico de QNs se realiza generalmente por cromatografía líquida (HPLC) y en menor medida cromatografía de gases (GC) mediante previa derivatización [79-81]. Las técnicas de detección más empleadas son la espectrometría de fluorescencia [82-84] y de masas (MS) [85, 86]. El empleo de este último sistema de detección es cada vez más habitual para la detección de antibióticos, debido a que es muy sensible y selectivo, y puede ser empleado en el desarrollo de métodos de confirmación, ya que proporciona información estructural de los compuestos detectados. A su vez ofrece la posibilidad de analizar un gran número de residuos de diferentes familias de modo simultáneo, dando lugar al desarrollo de métodos multiresiduo. Sin embargo, una de sus limitaciones es la alta susceptibilidad al efecto matriz de esta técnica, que puede traducirse tanto en supresión como aumento de la señal de los analitos de interés, afectando a la sensibilidad y exactitud del método.

Una alternativa a la utilización de métodos cromatográficos para la separación de residuos es la *electroforesis capilar* (EC), que permite una rápida separación de gran número de compuestos. Uno de los campos de mayor aplicación de la EC es el de análisis de medicamentos, incluyendo los antibióticos [87]. Para el caso de las QNs, el análisis mediante EC se realiza generalmente mediante electroforesis capilar en zona, aunque también se ha descrito el empleo de cromatografía micelar electrocinética o de electroforesis capilar en medio no acuoso [87]. Utilizando como método de detección la espectrometría de UV, se ha utilizado para la determinación de QNs en tejidos de pollo [88, 89] y cerdo [90] o en muestras de leche [91]. Con el fin de aumentar la detectabilidad del análisis, se han empleado técnicas de preconcentración en línea [92] y se ha sustituido la detección UV por detectores amperométricos [93], electroquimioluminiscentes [94], de fluorescencia inducida por láser [95] y MS [96, 97]. También se ha descrito el análisis multiresiduo de antibióticos empleando EC-MS/MS [98]. Aunque el coste de estas técnicas es relativamente inferior, en general presentan menor detectabilidad y son menos robustas que los métodos cromatográficos, debido principalmente a procesos de dispersión y a la vulnerabilidad a cambios en la muestra (ej.: pH, T^a).

Por otra parte, los *test microbiológicos* se basan fundamentalmente en la inhibición del crecimiento de un microorganismo específico debido a la capacidad bacteriostática y bactericida de los antibióticos [99-101]. Para la detección de dicha inhibición se utilizan diversos sistemas como indicadores de pH, redox, bioluminiscencia etc. que aprovechan la capacidad del microorganismo de producir ácido, reducir colorantes o generar halos de inhibición en un medio de cultivo, de forma que el resultado puede interpretarse visualmente [102, 103]. Sus principales ventajas residen en que son baratos, fáciles de realizar, son ensayos de amplio espectro, aplicables como métodos de cribado y no requieren instrumentación especializada o disolventes tóxicos. Sin embargo, las principales desventajas consisten en que en muchos casos requieren tiempos de incubación largos y principalmente en que son inespecíficos (es decir, no se identifica el contaminante en cuestión). Otra desventaja consiste en la alta probabilidad de obtener un elevado porcentaje de falsos positivos y negativos debido a la influencia de la matriz y los bajos niveles de detección para muchos antibióticos. Concretamente se han aplicado este tipo de técnicas para la detección de QNs en muestras de carne de pollo y pescado [104-106], musculo bovino, porcino y ovino [107], huevo [108] y leche [99, 109].

En cuanto a las *técnicas inmunoquímicas*, son métodos de análisis basados en el empleo de anticuerpos (Ac), y su interacción con el correspondiente antígeno (At) mediante el uso de marcadores. Esta interacción es altamente específica y se emplea para medir la concentración de un contaminante en una muestra dada. Son técnicas simples, rápidas, muy específicas y de elevada detectabilidad, siendo excelentes herramientas para el análisis de un gran número de muestras en un corto período de tiempo [110]. Para la detección de analitos de bajo peso molecular, como es el caso de los antibióticos, es necesario trabajar en formato competitivo, en el cual el analito y el antígeno compiten por el anticuerpo, los dos últimos en cantidades constantes [111]. Generalmente uno de los inumoreactivos (At o Ac) está marcado con un elemento que genera una respuesta medible, de manera que la concentración de analito se determina indirectamente. El elemento de marcaje puede consistir en radioisótopos, (RadiImmunoAssay, RIA) [112, 113] enzimas (Enzyme ImmunoAssay, EIA) [114, 115], fluoróforos (Fluorescent ImmunoAssay, FIA) [116-119], quimioluminescentes (Chemiluminescent ImmunoAssay, CLIA) [120-122], o marcadores magnéticos (Magnetic ImmunoAssay, MIA) [123, 124]. De entre ellos, los más empleados son los EIA, y más concretamente el ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), en el cual uno de los inmunoreactivos es inmovilizado en un soporte sólido, generalmente microplacas de 96 o 384 pocillos. Las técnicas inmunoquímicas se han aplicado ampliamente a la determinación de residuos de QNs en alimentos [125-135] y aguas [136]. En la **Tabla 1.3** se muestran ejemplos ilustrativos de este tipo de técnicas para la detección de QNs desarrollados utilizando anticuerpos diferentes a los desarrollados en esta tesis, la mayoría publicados después del comienzo de esta tesis.

Otro formato de inmunoensayo muy empleado es el de tira reactiva, también denominado inmunoensayo de flujo lateral, ensayo inmunocromatográfico o dipstick [137]. Tras la primera aplicación de este formato al test de embarazo, se ha extendido su utilización para la detección de hormonas, alérgenos, toxinas y fármacos. En este caso uno de los inmunoreactivos se deposita sobre un soporte sólido, generalmente una membrana de nitrocelulosa, y se determina la presencia de analito mediante el flujo capilar de la muestra o

Capítulo 1

extracto, mezclado con el inmunoreactivo complementario a través de la membrana. La detección es generalmente visual, mediante el marcaje de uno de los inmunoreactivos con oro coloidal. Son métodos rápidos, de bajo coste, muy versátiles y de fácil uso que permiten la determinación de residuos *in situ*, proporcionando una detección cualitativa o semicuantitativa. Sus principales desventajas consisten en que son dispositivos de uso único y generalmente los límites de detección están próximos o incluso son superiores a los valores máximos establecidos para los contaminantes monitorizados. Se ha descrito su uso para detección de QNs en alimentos de origen animal, como músculo e hígado de pollo y cerdo [138-141] o muestras de leche [141-143]. Además, diferentes empresas como BIOO Scientific Co., Charm Sciences Inc, Randox Laboratories, R-BiopharmAG o Unisensor S.A., comercializan métodos analíticos basados en anticuerpos para la detección de QNs, tanto en formato de ELISA como en el de tira reactiva.

Tabla 1.3. Ejemplos representativos de técnicas inmunoquímicas publicados para la detección de QNs en alimentos y muestras medioambientales.

Técnica Inmunoquímica	Analitos	Matriz	Detectabilidad	Ref.
ELISA	12 QNs	Huevo, pescado, pollo	CCβ: 4 µg/kg	[126]
FPIA	13 QNs	Pollo, leche	CCβ: 50 µg/kg ,15 µg/L	[118]
CLIA	19 QNs	Pescado, gamba	LOD: 0,2 µg/kg	[122]
ELISA	11 QNs	Huevo, pescado, gamba, pollo, miel	IC ₅₀ : 2.1 µg/kg	[127]
ELISA	13 QNs	Leche	LOD: 2.4 µg/L	[133]
ELISA	9 QNs	Leche	IC ₅₀ : 20.7 µg/L	[134]
ELISA	9 QNs	Leche	IC ₅₀ : 5.7 µg/L	[135]
ELISA	Norfloxacin	Agua	IC ₅₀ : 2.2 µg/L	[136]
Sensor SPR	Flumequina	Pollo	LOD: 15 µg/kg	[144]
Sensor SPR	6 QNs	Pollo	IC ₅₀ : 2.8 µg/kg	[145]
Tira reactiva	12 QNs	Pollo	LOD: 5-10 µg/kg	[139]
Sensor SPR	13 QNs	Huevo, pescado, pollo	IC ₅₀ : 1-3.1 µg/kg	[146]
Sensor de Impedancia	Enrofloxacin	Suero porcino	LOD: 1 µg/L	[147]
Tira reactiva	4 QNs	Leche	LOD: 2 µg/L	[142]
Tira reactiva	Ofloxacin	Cerdo, pollo, leche	LOD: 28.8 µg/L, 30 µg/L	[141]

CCβ: Detection capability, CLIA: ChemiLuminescent ImmunoAssay, ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent assay, FPIA: Fluorescence polarization immunoassay, IC₅₀: concentración de analito correspondiente al 50 % de inhibición, LOD: Límite de detección, SPR: Surface plasmon resonance.

A pesar de sus importantes ventajas los ensayos inmunoquímicos no están exentos de limitaciones. Uno de sus principales inconvenientes es el hecho de que las señales inespecíficas conducen a resultados de sobreestimación, pudiendo generar falsos positivos, aunque por el contrario, estas técnicas presentan rara vez falsos negativos. Por lo tanto, son

eficaces como técnicas de cribado, siendo pertinente la posterior confirmación de las muestras positivas con un contenido de contaminante mayor a un límite previamente establecido, mediante un método de referencia generalmente cromatográfico.

Otra técnica en auge en los últimos años son los *biosensores*, que consisten en dispositivos analíticos que incorporan un elemento de reconocimiento de origen biológico (receptor), íntimamente asociado o integrado a un transductor. En la introducción del **Capítulo 5** de la presente tesis se describen en detalle este tipo de técnicas analíticas. Las principales ventajas son un bajo coste por análisis y que son dispositivos fáciles de utilizar que no requieren de personal especializado para su manejo. Además, a diferencia de las técnicas de análisis convencionales, los biosensores generalmente permiten la miniaturización dando lugar a resultados cualitativos o semicuantitativos *in situ*. Cuando se emplean Ac como elementos de reconocimiento biológico se denominan inmunosensores, siendo estos los más empleados en el análisis de antibióticos. En el caso concreto de las QNs, se han aplicado para su detección en alimentos inmunosensores ópticos de tipo SPR [146, 148-152], de onda evanescente [153] y de tipo electroquímico [147, 154, 155]. En la **Tabla 1.3** se muestran ejemplos ilustrativos de inmunosensores desarrollados para la detección de QNs utilizando anticuerpos diferentes a los desarrollados en esta tesis, todos ellos publicados con posterioridad al inicio de esta tesis.

En el momento de iniciar esta tesis doctoral tan solo habían sido descritos en la bibliografía cinco anticuerpos para la determinación de QNs en matrices de origen animal. En todos los casos se utilizaba una QN comercial para generar el inmunógeno con el que obtener los anticuerpos. La mayoría de ellos estaban enfocados a la detección de una única QN, mostrando perfiles de reactividad cruzada generalmente específicos para la QN diana [156-159]. Solamente uno de ellos tenía como objetivo la obtención de anticuerpos genéricos para QNs [125], aunque tanto la detectabilidad (IC_{50} 10-30 $\mu\text{g/L}$), como la especificidad no fueron del todo buenas, ya que QNs importantes en el ámbito veterinario, como el ERFX y la FLUME presentaban porcentajes de reactividad cruzada inferiores al 10 %. Así pues, el objetivo principal de la presente tesis consistió en desarrollar técnicas inmunoquímicas para la determinación de QNs en leche, a partir del diseño y preparación de anticuerpos de clase para esta familia de antibióticos, y su completa evaluación en muestras de leche para su aplicación final en diferentes dispositivos, tales como inmunosensores.

Con objeto de completar esta introducción se ha incluido un capítulo de libro (**Sección 1.7**) que contiene información complementaria sobre los contaminantes más relevantes y ejemplos de métodos inmunoquímicos para su detección en muestras ambientales. También contiene información acerca de los principios de transducción, métodos y ejemplos de biosensores basados en nuevos enfoques de micro y nanotecnología.

1.7. Publicación I: Aplicación de bioensayos/biosensores al análisis de fármacos en muestras medioambientales.

La siguiente publicación consiste en una revisión sobre los bioensayos, ensayos bioquímicos y biosensores para el análisis de contaminantes de productos farmacéuticos en el medioambiente. Este trabajo se publicó como un capítulo de libro en el volumen 50 de la serie *Comprehensive Analytical Chemistry* publicada por la editorial Elsevier. El conjunto de la información que se recoge, ha sido el resultado de una colaboración entre diversos miembros del equipo de investigación, siendo mi principal contribución la compilación y evaluación crítica de la información referente a las técnicas de análisis de antibióticos del tipo quinolonas, macrolidos y amfenicoles, así como de bioensayos en general.

Un amplio conjunto de contaminantes de origen farmacéutico y/o veterinario entran en el medio ambiente a través de numerosas vías, pero principalmente a través de su vertido en las aguas residuales de industrias (incluyendo el sector agropecuario), domésticas y de hospitales. A partir de ahí, su transporte, destino y las posibles consecuencias adversas de estos contaminantes sobre la salud humana y el ecosistema son generalmente desconocidos, o en el mejor de los casos no se entienden de forma clara. Esto genera preocupaciones que incluyen el deterioro reproductivo, el aumento de la incidencia de cáncer, el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos, o la toxicidad potencialmente elevada de mezclas químicas debido a efectos sinérgicos. El objetivo de las normas y métodos de regulación para evaluar y controlar el impacto de estas sustancias en el medio ambiente acuático es proteger el ecosistema y la salud pública, manteniendo vigilancia sobre sus niveles de contaminación y los posibles efectos negativos. Para lograr estos objetivos, es necesario desarrollar técnicas analíticas más eficientes que permitan una monitorización de los residuos de fármacos de una manera rápida, sencilla y a un precio razonable. El desarrollo técnico debe ir acompañado de esfuerzos organizativos por parte de los organismos oficiales para encontrar formas de validación de este tipo de técnicas de detección y el reconocimiento de las mismas como posibles métodos de rutina en los laboratorios de vigilancia ambiental.

Chapter 2.8

Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples

J.-Pablo Salvador, Javier Adrian, Roger Galve, Daniel G. Pinacho, Mark Kreuzer, Francisco Sánchez-Baeza and M.-Pilar Marco

2.8.1 INTRODUCTION

Pharmaceuticals are diverse groups of chemically active compounds used in humans, animals and plants for the treatment or prevention of different diseases. They include human and veterinary drugs, such as antibiotics, hormones, analgesics, cytostatics and β -blockers. Their presence in the environment has become an important parameter of the impact of human activity in the environment due to their frequent use by the general population or by farming. Thousand of tons of pharmacology active compounds are used yearly and excreted to the waste. As an example of this use, of the 50,000 registered drugs for human use in Germany, 2700 are responsible for 90% of the total consumption and which, in turn, contain 900 different active substances [1]. Also, these drugs have been employed in farming as a usual practice for the prevention of the animal health or as growth promoters (i.e. antibiotics, feed additives and hormones). Regarding hormones, it is important to mention that in the latest decades the animal population has greatly increased, the endogenous substances excreted by the animal can have an important environmental impact. In this context, several reviews have discussed and presented real data, environmental fate and occurrence of these drugs [1–4].

Pharmaceuticals are inherently biologically active. Often they are resistant to biodegradation since they have been designed to show certain metabolic stability for their pharmacological action. Pharmaceuticals can remain unaltered in the environment or as persistently active

J.-P. Salvador et al.

metabolites. As well as deconjugated drug, human and veterinary drugs are also excreted as glucoronide or sulphate conjugates that can be easily hydrolyzed to obtain the active parent compound in the environment. Distinct drugs have different behaviour depending on their hydrophilicity or hydrophobicity, moreover combined with a low biodegradability, their removal in wastewater treatment plants (WWTPs) can be intricate [3,5]. Additionally, certain drugs, such as steroids, are lipophilic, thus can be bioaccumulated in organisms or deposited in sediments in the environment [6]. However, the presence of antibiotics in the aeration tanks of sewage treatment plants (STPs) may produce resistant bacteria [1].

In light of this emerging problem, through early warnings by the scientific community, the authorities and governmental bodies have established several regulations [7,8]. Thus, Directive 2001/82/EC regulates the requirements for ecotoxicity testing of pharmaceuticals. Moreover, a joint effort is being made to establish a uniform risk assessment criteria by the International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Authorization of Veterinary Medicinal Products (VICH) formed by the EU, USA and Japan (Australia and New Zealand participate as observers) [9].

Because of the bioactivity of these pharmaceuticals and the impact they can cause on the environment and the public health, it is necessary to provide analytical methodologies to control them. Environmental monitoring of pharmaceuticals requires efficient methodologies to detect trace levels of contamination in the environment by the parent drugs and the still active metabolites. In the food safety field Directives 96/23/EC and 2377/90/EC regulate the maximum residue limits (MRLs) and the requirements of the analytical methods that should be used by the veterinary and public health control laboratories to detect residues. In addition to the usual chromatographic methods coupled to mass spectrometry detectors analysis can also be carried out using bioassays, biochemical assays and biosensors. These types of analytical methodologies can offer important advantages as screening methods due to their simplicity and high-throughput capabilities. This chapter intends to provide information on existing bioanalytical methods for the determination of these emerging pollutants in environmental samples.

Antibiotics, hormones, analgesics, NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs), cytostatics agents and β -blockers (see Fig. 2.8.1) are some of the drug families that, attending to their actual use and activity, may have a more strong negative environmental impact. In this chapter, we will give some examples on the bioanalytical methods

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

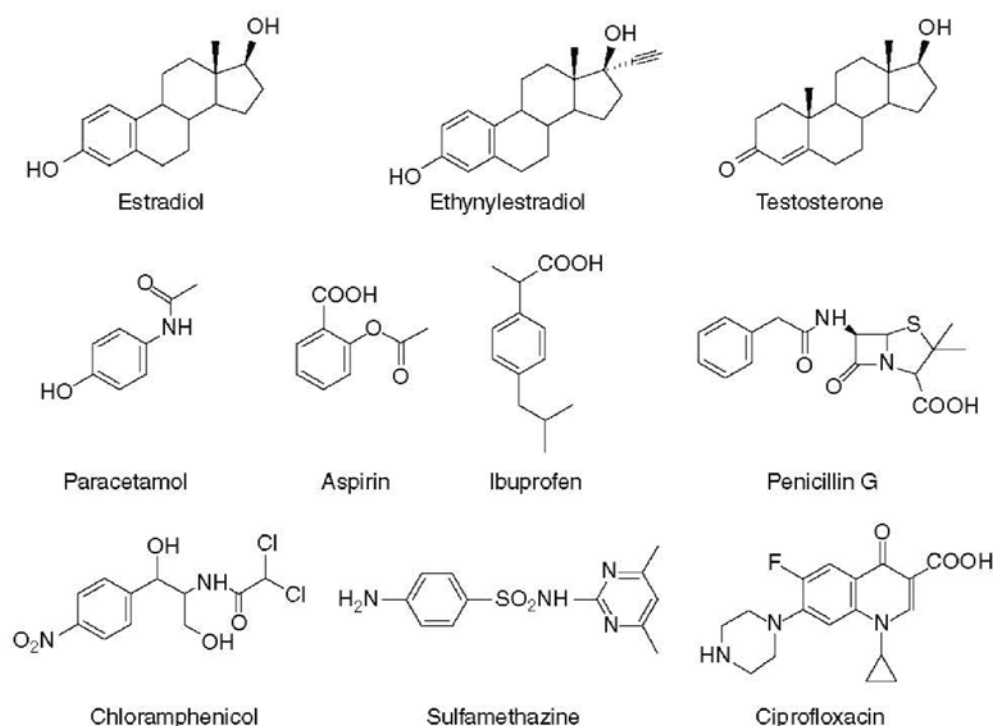


Fig. 2.8.1. Most relevant pharmaceuticals with environmental interest.

available to analyse these substances. For some of these substances there are bioassays/biochemical methods or biosensors available that have never been applied in the environmental analytical field. However, the availability of the necessary bioreagents opens up the possibility to develop new methodologies for the determination of pharmaceuticals in environmental samples. Furthermore, often these bioreagents have been applied to complex biological matrices, therefore the application to environmental water samples can be considered straightforward.

Antibiotics are chemical substances that are able to suppress or kill the growth of bacteria. They have been widely used in human and veterinary medicine as well as in aquaculture for the treatment of infectious diseases produced by bacteria. Furthermore, some of these antibiotics have also been used as growth promoters in cattle. After administration in humans or animals, these substances pass to the environment. The most important impact is related with the development of resistance mechanism. It has been reported that more than 70% of bacteria are insensitive against at least one antibiotic. This situation causes a problem for public health, because certain infections cannot be

J.-P. Salvador et al.

treated with traditional antibiotics. Antibiotics are classified into several families such as penicillins, fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides, tetracyclines and chloramphenicol.

Steroid hormones are a group of biologically active compounds controlling human body functions related to the endocrine system and the immune system. Steroids are synthesized from cholesterol and have in common a cyclopentan-*o*-perhydrophenanthrene ring. Natural steroids are secreted by the adrenal cortex, testis, ovaries, and placenta in humans and animals, and include *progestagens*, *corticoids*, *androgens* and *estrogens* [10]. As a result of the continuous growth of the population and of livestock farming, the level of endogenous hormones excreted into the environment has gradually increased. However, non-ethical human and veterinary practices related to the use of the natural and synthetic sex hormones as anabolic substances and growth promoters are of great concern. The use of hormones to enhance growth and as reproductive aids for synchronization of the ovarian cycle has been regulated for animal drugs because they alter the structure or function of the animal. For these reasons, the EU has banned the use of these compounds as growth promoters in food-producing animals (Directive 2003/74/EC and related). However, hormone implants are widely used in the USA, Australia and Canada where their use is regulated but allowed. Thus, the use of progesterone, testosterone, estradiol, zeranol and trenbolone acetate for animal food production has been regulated by the US Food and Drug Administration (FDA) and by the Food and Agriculture Organization of the World Health Organization (FAO/WHO).

From the broad range of pharmaceuticals that reach the environment, drugs such as *analgesics* and NSAIDs are regularly employed, often even without prescription. However, *cytostatic agents* are of concern not because of their production volume but for their high-pharmacological potency. For instance, in Germany the total quantity of *acetylsalicylic acid* sold per year has been estimated to be greater than 500 tons, 75 tons for *diclofenac* and 180 tons for *ibuprofen* [11]. The same occurs in other EU countries where common drugs such as *paracetamol* or *aspirin* are sold in quantities comparable to high-production volume materials – close to or exceeding 1000 tons per year [12]. Ibuprofen, which is in the top ten list of pharmaceuticals used in Denmark in 1995, was used annually to the extent of 33 tons and analgesics 28 tons [2]. During the same year, *psychiatric* drugs were used to the tune of 7.4 tons [11]. *Antineoplastics* (*cytostatic agents*) differ from the other groups by the fact that

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

they are mainly utilized in the hospital sector and by their intrinsic mutagenic action. About 13–14 kg of *cyclophosphamide* is used in hospitals per year [13]. In addition, 5969 kg are prescribed for sale at private pharmacies.

As mentioned previously, throughout this chapter we will present some of the bioassays, biochemical assays and biosensors currently used or described in the literature for the determination of pharmaceuticals. Often some literature reports apply the terms biosensor, biochemical assay or bioassay indistinctly, however, according to our point of view there are clear differences between these methods. Thus, in this chapter the following definitions have been used as criteria to identify each of these techniques.

A *bioassay* is a tool for the determination of a biological activity, or the quantification of a target analyte based on this activity, using as a recognition element bacteria, cells or tissues. This recognition event is mainly determined by physical or indirect measurement methods. For instance, in the case of the determination of antibiotics, most of the bioassays are based in the measurement of the diameter of the growth inhibition zone produced for the antibiotic in a bacteria culture. In other bioassays, antibiotics are determined by measuring the CO₂ production rate in relation of microbial growth. In the food industry, the majority of antibiotic residues are determined through bioassays and in particular microbial tests are the preferred methods for quality control.

By *biochemical assay* we understand an assay where the biorecognition element is a biomolecule such as an enzyme, an oligonucleotide or a protein, that can be either a nuclear or a membrane protein, or an antibody. Several types of biochemical assays have been described for the determination of small organic molecules. Regarding pharmaceuticals, biochemical assays exist for the detection of antibiotics, hormones, cytostatics and analgesics.

A *biosensor* is a self-contained integrated device, consisting of a biological recognition element in direct contact with a transduction element, which converts the biological recognition event into a useable output signal. Biosensors are usually classified into various basic groups according either to the method of signal transduction or to the biorecognition principle. Accordingly, biosensors can be categorized as electrochemical, optical, piezoelectric and thermometric sensors on the basis of the transducing element, and as immunochemical, enzymatic, non-enzymatic receptor, whole-cell and DNA biosensors on the basis of the biorecognition principle.

J.-P. Salvador et al.

2.8.2 BIOASSAYS

A bioassay is defined as a procedure for determining the concentration and/or biological activity of a substance (i.e. vitamin, hormone, plant growth factor, antibiotic, enzyme) by measuring its effect on an organism, tissue, cell, enzyme or receptor preparation compared to a standard preparation [14]. Depending on the type of observed effect and on the biorecognition element chosen, there are a large number of bioassays. Bioassays are widely used for drug development, environmental monitoring and pollutant detection. In the pharmaceutical field, bioassays are employed in different stages of the drug discovery process, mainly to test the biological activity of libraries of potential therapeutic agents for lead identification and optimization. Each target must be screened against different libraries that can exceed one million compounds, for this reason it is suitable for high-throughput approaches are necessary. The major type of bioassays being conducted in pharmaceutical laboratories today are cell-based assays [15]. For environmental monitoring, bioassays have been used to assess toxicity of different chemicals substances on environmental living organisms. Thus, bioassays have been used to assess toxicity of an effluent or a pollutant by exposing a standard test organism to several concentrations of the suspected samples and observing the resulting effect established by the US Environmental Protection Agency [16]. The test organisms incorporated in that type of assays include representatives from four groups: microorganisms, plants, invertebrates and vertebrates. In the case of microbial bioassays the test are based on microbial transformations, growth and mortality, respiration inhibition and luminescent [17]. For the plant and algae bioassays the tests are based on growth responses of plant (length measurement of root and shoot of the plants) and the detection gaseous agents (oxygen, carbon dioxide) or fluorescence emission of photosynthetic processes. The two main freshwater toxicity tests with invertebrates, which are routinely used, are survival and reproduction tests. In the case of vertebrate, the tests are usually based on larval growth and survival [18]. Metals, pesticides, herbicides, surfactants, endocrine disrupting compounds, toxic gases and hydrocarbons [17,18] can be detected on these bioassays. Moreover, pharmaceutical drugs present in environmental and food samples are also seldom analysed with bioassays, used as a screening methodology to minimize the number of samples to be assessed by the official control routines.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

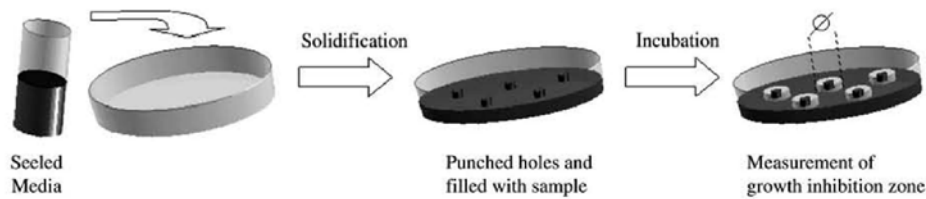


Fig. 2.8.2. General procedure for growing inhibition test.

The most commonly employed bioassays are the microbiological inhibition tests. Agar test plates with the medium seed for a relevant bacterial test strain (see Fig. 2.8.2) are prepared. Holes are punched out of the agar and filled with the antibiotic. After the appropriate incubation time the growth inhibition diameters around the holes are measured with a caliper [19–23]. Table 2.8.1 summarizes bioassays for the detection of pharmaceuticals, classified according to the biorecognition element and notices on the assay length, detectability and matrix application.

On another type of bioassays for antibiotics, measurements are made through a colour change. A solid agar medium that contains a standardized number of spores of the test microorganism is used. The potential inhibitors (or antibiotics) present in the unknown samples reduce or prevent the metabolic activity and thereby also the growth of the microorganism. During the incubation, growing test culture reduces a specific indicator or modifies the pH of the medium, leading to a colour change. Normally, after a 1-h diffusion period at 4°C, the test was floated on a water bath and incubated at 64°C for 3 h and visual interpretation is carried out. For the statistical calculations, those visual results that presented at least two similar interpretations are considered [24,25].

Microbiological tests are non-expensive, easy to perform on a large scale and do not require specialized equipment or toxic solvents. The main disadvantages are the possibility of false-positives and -negatives for the influence of the matrix, so the use of confirmatory techniques is necessary [26]. Specific bioassays, based on bacteria cells, genetically modified to produce a particular enzyme or receptor for a particular family of antimicrobials have been developed and applied to different matrices. A bacterial whole-cell assay has been used to measure chlor-tetracycline in pig feces using *Escherichia coli* GM10.1 that produces measurable β -galactosidase in a quantitative response to the presence of tetracyclines. The limit of detection obtained was around 0.03 mg/kg [27]. On a different study, a bioluminescent *E. coli* K-12 strain is prepared for the detection of the tetracycline antibiotics in fish samples. In

TABLE 2.8.1
Bioassays employed for the detection of pharmaceuticals classified according to the biorecognition element (type of cell). It is also considered the matrix studied and the time of the assay

Type of cells	Analyte	Sensitivity	Matrix	Time	Reference	Miscellaneous
Bacteria	Recombinant <i>E. Coli</i> (B-Galactosidase)	LOD: 0.03 mg/kg	Pig feces		[27]	Bacterial whole-cell bioassay. Specificity not determined
	<i>Escherichia coli</i> S30 (Transcription – Translation reactions)	Concentrations lower than 10ng/mL could be detected	Aqueous Solution		[30]	A cell-free bioassay compared to whole-cell bioassay. Better sensitivity for the detection of Tetracycline. The system omits cell cultivation and bacterial membranes as molecule passage inhibitors. Use of genetically modified organisms not required
	<i>E. coli</i> K-12 (Luciferase)	LOD Tc: 20 µg/kg OxyTc: 50 µg/kg	Fish samples	2 h per assay	[29]	Biohuminescent sensor strain incorporating bacterial luciferase reporter genes. Results correlated well with those obtained by conventional HPLC (R) 0.81
<i>E. coli</i> (Tc inducible promoter P _{ext-lac})	Tetracycline Oxytetracycline	LOD: 0.01 µg/mL	Milk		[175]	Three Tn5 plasmids, P _{ext} and a regulatory gene, tetR, in operon fusions with areporter gene system (lacZYA, luxCDABE, or gfp), were constructed. The bioassay responds to Tc producing L-galactosidase, light or green fluorescent protein

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Ofloxacin	12-27 µg/mL	Commercial formulation	19 h	[19]	It is an agar diffusion bioassay. Measurement of diameters of growth inhibition zones (mm), using the cylinder-plate method.
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Erythromycin Thiocyanate	0.3-2.5 µg/mL	Medicated premix and mixtured with feed	18 h	[20]	Laboratory quality control Test-agar was no. 1 Difco laboratories (commercial). Measurement of diameters of growth inhibition zones (mm).
<i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C 953	Penicillins cephalosporins	LOD 2-20 µg/L 50,40 µg/L	Raw milk	3 days	[21]	Validation of the method Microbiological multiplate system Measurement of diameters of growth inhibition zones (mm)
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 11778 <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 <i>Bacillus subtilis</i> BGA	Tetracyclines Macrolides Aminoglycosides Sulfonamides	10-30 µg/L 6-100 µg/L				
<i>E. coli</i> ATCC 11303 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 <i>E. coli</i> ATCC 11303	Quinolones Novobiocin, rifamycin Tetracycline quinolone	25-150 µg/L 20-150 µg/L 5-150 µg/L 25 µg/L 60 µg/L 25 µg/mL	Milk	3 h	[176]	Measurement of carbon dioxide production rate in relation to inhibition of microbial growth. Based on the use of a high-performance, non-invasive, specific carbon dioxide sensor (CO2-S)

TABLE 2.8.1 (continued)

Type of cells	Analyte	Sensitivity	Matrix	Time	Reference	Miscellaneous
<i>B. steurothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C953	Penicillins	LOD	Ewes' milk	4 h	[25]	Commercially available blackreduction test, BRT Inhibitor Test with prediffusion AImS (BRT AImS), (microbiological inhibition test). Interpreted by visually assessing the colour change of an indicator (brilliant black) in the test medium
	aminoglycosides	2–230 µg/kg				
	Macrolides	69–1300 µg/kg				
	Sulfonamides	120–6000 µg/kg				
	Tetracyclines	3500–6500 µg/kg				
	chloramphenicol	390–6200 µg/kg				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	Enrofloxacin	WR	Commercial formulation	18 h	[23]	Measurement of diameters of growth inhibition zones (mm).
						Laboratory quality control Grove Randal number 1 agar (Merck)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	Gatifloxacin	3.2–12.8 µg/mL	Tablets and raw material	18 h	[22]	Measurement of diameters of growth inhibition zones (mm).
		WR				
		4–16 µg/mL				
<i>B. steurothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> . Eclipse 100®	Penicillins	LOD	Ewe milk	3.5 h	[24]	Quality control Eclipse 100® (Commercial) interpreted by visually assessing the colour change of an acid–base indicator (bromocresol purple) in the test medium
	aminoglycosides	5–65 µg/kg				
	Macrolides	28–15 µg/kg				
	Sulfonamides	230–10,100 µg/kg				
	Tetracyclines	170–750 µg/kg				
	Fluoroquinolones	260–1500 µg/kg				
<i>Vibrio Fischeri</i>	Acetaminophenol	4000/76,200 µg/kg	Saline solution		[177]	Bioluminescence assay
	Diclofenac	EC ₅₀ (µg/mL)				
	Ibuprofen	173				
	Ketoprofen	13.5				
	Ketoprofen	12.1				
		15.6				
		21.2				

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

Species	Pharmaceutical	EC ₅₀ (µg/mL)	ADaM (natural fresh water imitation for cultures)	Duration	Reference	Test Type
<i>Daphnia magna</i>	Ibuprofen	108		48 h	[178]	Immobilisation Test
	Diclofenac	68				
	Naproxen	174				
<i>Lemna minor</i>	Ibuprofen	EC ₅₀ (µg/mL)	Steinberg-medium+2 phosphate species added	7 days	[178]	Growth Inhibition Test
	Diclofenac	22				
	Naproxen	7.5				
<i>Desmodium subspicatus</i>	Ibuprofen	24.2		4 days	[178]	Algal Growth Inhibition Test
	Diclofenac	315	Water + algal chemicals			
	Naproxen	72				
Microtox® <i>Daphnia magna</i> <i>C. Dubia</i>	Diclofenac	> 340		30 min	[179]	Assessment endpoint Bioluminescence at 15°C Mobility inhibition
		11.45	Buffer	48 h		
		22.43		48 h		
		22.70				
<i>P. subcapitata</i>	Naproxen	IC ₅₀ (µg/mL) 31.82		96 h	[180]	Algae test, measured endpoint by IC ₅₀
<i>B. calyciflorus</i>	Naproxen	EC ₆₀ (µg/mL) 0.56		48 h	[180]	Rotokit (rotifer), measured endpoint by EC ₅₀
<i>C. dubia</i>	Naproxen	EC ₅₀ (µg/mL) 0.33		7 days	[180]	Ceriodaphnids (crustaceans) measured endpoint by EC ₅₀

J.-P. Salvador et al.

this case, the strain contains a plasmid incorporating a bacterial luciferase under the control of the tetracycline responsive element from transposon Tn10 [28]. The optimized assay, using the appropriate luminometer, is able to detect oxytetracycline residues below the MRLs established by the UE, in 2 h, with a well correlation of results with the ones obtained by conventional HPLC [29]. However, a cell free assay for the detection of transcriptional inducers has been developed to compare it with common whole-cell assays reported. Thus, *E. coli* S30 extract containing firefly luciferase, detectable by a luminometer, as reporter gene was prepared for coupled transcription–translation reactions. This methodology omits cell cultivation and bacterial membranes as molecule passage inhibitors making possible to carry out assays in much shorter times and without the use of genetically modified organism. Results obtained for detection of tetracyclines in aqueous solution presented LOD around 10 ng/mL improving sensitivity observed in whole-cell configurations [30].

Antimicrobial compounds are not the only substances analysed by this type of determination procedure, there are also bioassays described to detect different hormones such as androgens, estrogens and thyroids. The main purpose of this sort of assays is to analyse how chemicals and environmental extracts are capable of mimic or block human hormone receptors.

The E-screen is a cell-culture based assay developed to assess the estrogenicity of environmental chemicals, using the proliferative effects of estrogens on their target cells (MCF-7) as an endpoint. Because this cell line proliferates in response to estrogens, compounds that cause proliferation are considered estrogenic. Different compounds and water samples have been tested with that methodology [31]. The quantitative assay compares the cell number achieved by MCF-7 cells, using a coulter count, in the absence of estrogens (negative control) and in the presence of 17 β -estradiol (positive control) and a range of concentrations of the chemicals suspected to be estrogenic. The assay is very sensitive; proliferation can be detectable in the picomolar range of estradiol but require between 4 and 6 days to be performed. However, the assay called A-screen uses the same MCF-7 cells but transfected with the androgen receptor. These cells will respond to androgens (such as testosterone) by inhibiting proliferation. Configuration of the assay is very similar to E-screen assay described above with a similar range of detectability being also tested jointly with river water samples [31].

The Yeast Assay is another useful tool to assess potential impacts to the endocrine system capable to produce infertility, endometriosis and

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

certain cancers such as breast, uterine and prostate. Yeast cells not only are transformed to contain human estrogen (hER) and androgen receptors but also contain expression plasmids carrying reporter genes, such as lac-Z (encoding β -galactosidase), which is used to measure receptor's activity. As example, surfactants have been tested with that methodology to know if there are estrogenic or not [32]. When the estrogen receptor is occupied, β -galactosidase is synthesized and secreted to the medium, where it causes a color change from yellow to red that can be measured by a spectrometer after 3 days incubation. All the results obtained were compared to the effects presented by a 17β -estradiol, arriving to a limit of detection near 2 ng/L. Only alkylphenol polyethoxylate surfactants were weakly estrogenic.

Another in vitro bioassay is the T-Screen that is based on thyroid hormone dependent cell proliferation of a rat pituitary tumor cell line (GH3) in serum-free medium. As the other assays mentioned above, it has been used to study interference of compounds or sediment extracts with thyroid hormone at the cellular level [33]. Detectability of the assay is around the nanomolar range. For concluding, all the hormone screen assays described have very good sensitivity but time required to perform the analysis is too high in some occasions.

The fact that β -blockers may induce insulin resistance in obese animal models through the expression of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) by adipocytes, have lead to set up and assay to detect this type of activity. The assay uses LM cells, a cell line of TNF- α -sensitive murine fibrosarcoma and recombinant human TNF- α as a standard. The TNF- α , immunoreactivity in the culture cell is then measured with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) [34]. A new way of assaying β -adrenoreceptors antagonists has been proposed by measuring their ability to prevent catecholamine-induced myotoxicity [35].

2.8.3 BIOCHEMICAL ASSAYS

As mentioned above, on a biochemical assay, the biorecognition element has been isolated. The biorecognition element consists in a biomolecule such as an enzyme, a nuclear or membrane receptor or an antibody that recognizes selectively or specifically the analyte of interest. The mode of action of each biomolecule depends on different mechanism. In the case of enzymes, the mechanism involves the catalytic transformation of the pollutants. Regarding the nuclear receptors, their affinity versus

J.-P. Salvador et al.

particular endogenous and exogenous substances is exploited. For instance, the affinity of the estrogen receptor (ER) for estrogenic compounds such as estradiol, estrone and ethynylestradiol has been used to develop a variety of methods. One of the most important biorecognition elements are the antibodies. Because of the broad variety of specificities that can be achieved, several immunochemical assays have been developed for a great variety of substances, such as pharmaceuticals. However, the use of these biochemical assays for the detection of pharmaceuticals in the environment has not been frequently reported. Following we will describe some of the most frequently described biochemical assays available for the detection of pharmaceuticals with a great potential for environmental analysis.

2.8.3.1 Biochemical assays based on receptors

Many biochemical processes, essential for the functioning and survival of cells (and the organism), are regulated by hormones, neurotransmitters, cytokines and other “messenger” molecules. This regulation proceeds by interaction of these naturally occurring molecules with receptors that are either embedded in the cell membrane (membrane-bound) or present in the cytoplasm (soluble receptor) or the nucleus of the cell. The membrane-bound receptors can be subdivided into G-protein coupled receptors (GPCRs), ion channels and receptors with a single transmembrane segment. Nuclear or soluble receptors are represented by the group of steroid receptors (i.e. the estrogen receptor) and the non-steroidal receptors (i.e. Vitamin D receptor) that regulate biological functions by controlling gene expression. This class of receptors consists of a DNA-binding and a ligand-binding domain.

Receptor-screening methodologies can be based on either the determination of a functional response (i.e. cell proliferation), the production of second messengers (i.e. Ca^{2+}) or the interaction of a ligand with its receptor. While in the first two cases, we would consider those methods as bioassays, the third case can readily be considered as a biochemical assay. Moreover, it is sometimes still costly and difficult to obtain stable eukaryotic cell lines to perform these types of functional measurements, for which reason receptor biochemical assays can be contemplated as excellent alternatives. Binding of a ligand (agonist or antagonist) to its cognate receptor is the initial and indispensable step in the cascade of reactions that finally cause a pharmacological effect and many successful and widely used techniques are thus based on measuring ligand binding.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

As with the well-known immunochemical assays (see below), receptor–ligand binding assays may be classified according to the need for separation of bound from free ligand or the detection technique. According to the first criterion, the assay types can be heterogeneous (use of a solid phase for separation) or homogeneous (no need of separation steps). Regarding detection methods, receptor assay formats usually require labelling of either the ligand or the receptor. Radio-isotopic labels such as ^3H , ^{125}I and ^{32}P have been used (RRA, radio receptor assay; SPA, scintillation proximity assay), however because of the disadvantages of disposal of radioactive waste, costs, health hazards, the requirement for special licenses, etc., efforts have increased to develop new technologies based on either colorimetric (ELRA, enzyme-linked receptor assay), fluorescence (i.e. FRET, fluorescence resonance energy transfer; FP, fluorescent polarization, etc.) or (chemo-/bio-) luminescence detection systems. The ideal assay should be specific, sensitive, easy to perform, reliable and reproducible, unexpensive, rapid and suitable for automation. Moreover, the possibility to quantify multiple analytes in a single assay (multiplexed assays) is becoming one of the important goals in this area. For more information on these types of assays the reader is addressed to recent reviews [36].

RRA assays have been reported for the determination of benzodiazepines [37,38], neuroleptics [39,40], opioids [41], antipsychotic [42] and antihypertensive drugs [43,44]. SPA has been developed for a range of receptors including the α_1 - and α_2 -adrenergic receptors (α -AR) [45,46].

The first receptor assays that made use of fluorescence was described by McCabe et al. [47] for the benzodiazepine receptor using a fluorescein-labelled ligand. The significant background signal presented was reduced in the assay developed by Takeuchi et al. [48], who made use of time-resolved fluorescence (TRF), by labelling the benzodiazepine ligand with a europium chelate. Neuroactive drugs have been determined by means of a FRET assay through their competitive binding to the labelled human M1 muscarinic receptor (hM₁-R) in the presence of a labelled antagonist [49] or also by measuring the binding to the ligand-gated ion channel GABA_A receptor α_1 -subunit, using the same assay format [50]. The luminescent variant of FRET, where energy transfer occurs between a luminescent donor and a fluorescent acceptor, is called bioluminescence resonance energy transfer (BRET). The enzymatic oxidation of a substrate results in the emission of energy from the donor, which means that no excitation light is needed in contrast to FRET. Moreover, the enzyme reaction does not produce a background signal and the assay is therefore more sensitive than

J.-P. Salvador et al.

FRET [51]. Because of the fact that there is no requirement of a light source, the instrumentation for BRET assays is simpler and cheaper [52] which makes these assays very valuable in high-throughput screening. BRET has been mainly used in protein–protein interaction research, for example in studying the β_2 -adrenergic/ β -arrestin interaction [53] and the determination of insulin receptor activity [54,55], where the latter is governed by a conformational change in the β -subunits of the receptor, bringing them into close proximity. The FP technology has been applied to, i.e. the soluble estrogen receptor [56], the G-protein coupled delta-opioid receptor [57] and the ligand-gated ion channel serotonin 5HT₃ receptor [57,58]. This receptor is involved in rapid signal transduction in the central nervous system and the peripheral nervous system. Strong interest for this receptor has been provoked by the ability of 5HT₃ receptor antagonists to treat emesis caused by anticancer chemotherapy. Moreover, antagonists for this receptor show promise for the treatment of colonic dysfunction. Fluorometric microvolume assay technology (FMAT) has also been used on few cases to set up receptor assays. This technology makes use of a scanner that measures multiwell plates. It is a mix-and-measure assay where the small molecule ligand is labelled with a fluorophore and the receptor is immobilized on beads or in the bottom of special multiwell plates (either 96-, 384- or 864-well with a clear bottom and black sidewalls). The FMAT scans a 1 mm² area at the bottom of the multiwell plate where the generated images indicate the size and amount of bound fluorescence. The capillary-based scanner uses as an excitation source a Helium–Neon (He–Ne) red laser ($E_x = 633$ nm) and makes simultaneous detection of two independent red dye emissions, i.e. Cy5 and Cy5.5, possible via two photomultiplier tubes with band-pass filters for the respective labels (multiplexing). Multiplexing minimizes reagent consumption and increases the throughput [59]. A different format of a homogeneous bead-based assay, called AlphaScreenTM (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay [60]) makes use of singlet oxygen (¹O₂, half-life 4 μ s) production on donor beads, and a chemiluminescent reaction on the acceptor beads is observed. This assay allows probing interactions over longer distances than FRET and BRET. An example of a receptor–ligand-binding assay, which made use of the AlphaScreenTM methodology, was described for the estrogen (ER $_{\alpha}$)-receptor by Rouleau et al. [61]. Flow cytometry has also been used to discriminate between agonist and antagonist binding using the solubilized β_2 -adrenergic receptor fused to green fluorescent protein (β_2 AR-GFP) [62,63].

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

Finally, a variety of ELRA assays have been established in parallelism with the well-known ELISAs (see below). The amplification provided by the enzyme allows reaching excellent detection limits for a variety of drugs and environmental contaminants with specific activity on the isolated protein receptor. In some examples, the detectability has been increased by substituting the chromogenic substrate by a luminescent one (ELBRA, enzyme-linked bioluminescent receptor assay). As a result of the increasing concern regarding the hormonal effects of a wide variety of pollutants (endocrine disrupter compounds, EDC), several research groups have invested great efforts on developing biochemical assays based on the use of the nuclear receptors responsible of such type of bioactivity. Steroid hormone receptors are the members of the nuclear receptors family, which are ligand-dependent transcriptional modulators. These kind of receptors can be produced by genetic engineered bacteria, for instance by fusion of glutathione-S-transferase (GST) with the D, E and F domains of native receptors in *E. Coli* [64]. With this technology human receptors for estrogens (hER), androgens (hAR) and progestagens (hPR) have been produced. These receptors have been used to set up ELRAs with excellent detectability limits. As an example, the androgenic receptor has been used assess binding of a variety of pesticides and industrial pollutants [65–67]. Similarly, hER has been used to detect 17β -estradiol (E2), tamoxifen, bisphenol-A and resveratrol. A detection limit of 20 ng/L has been found for E2 [68–70]. Recently, an ELRA and a yeast estrogen screen (YES) assay has been applied to determine whether automobile tires immersed in fresh water can leach chemicals, which display estrogenic activity [71]. Table 2.8.2 shows some of the most frequently used biochemical assays for the detection of hormones using nuclear receptors.

Other receptor assays have been established for the determination of antibiotics. One of the most well known is based on the use of a specific β -lactam receptor (β -StarTM). By using appropriate labels, the assay can detect a wide range of penicillins and cephalosporins with excellent detectability. For instance, the limit of detection for the determination of Penicillin G and Amoxicilin is between 2–4 ppb in milk samples [72]. The assay that is commercialized as a test strip is commonly used to determine antibiotic contamination of dairy products. However, to our knowledge the application to the analysis of environmental samples has not been described.

TABLE 2.8.2
Biochemical assays for the detection of pharmaceuticals classified by the biorecognition element and the type of assay developed. It is described the matrix applied and the sensitivity achieved

Antibodies	Assay	Analyte	Sensitivity	Matrix	Ref.	Miscellaneous
	SPIA	Sulfadimidine	LOD	Urine	[85]	Soil particle immunoassay (SPIA) based on the use of dyed colloidal particles as labels.
	ELISA	Sulfachloropyridazine	10 ng/mL 20 ng/mL Easy detection at the MRL levels	Milk Porcine tissues (kidney, liver, muscle and fat) Liver tissue	[181]	One-step strip test. Use of Pabs Good cross-reactivity against several Sulfonamides in buffer Specificity not described
	ELISA	Sulfadimethoxine	IC ₅₀ 1.5 µg/mL	Honey	[182]	Enzyme immunoassay (EIA)
	EIA	Tetracycline	Detection level of 20 µg/kg	Aqueous solution	[183]	Use of polyclonal antibodies Chlortetracycline, rolitetracycline and minocycline also recognized
	ELISA	Tetracycline	Detection between 0.1–6 ng/mL	Milk	[184]	Kit commercially available (RIDASCREEN EIA) Can also recognise rolitetracycline and minocycline Also used for matrices such as meat and honey
	EIA	Tetracyclines	LOD (µg/L) Tetracycline: 1.5 OxyTc: 15.5		[86]	

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

RIA	Penicillins	LOD: 2 µg/L	Water	[84]	Charm II RIA test in water samples proximal to a US farm
Electrochemical ELISA	Macrolide	0.4-4 ng/mL 1.4-13 ng/mL	Milk	[87]	MAb (mouse) competitive indirect assay Electrochemical detection (µA)
ELISA	Quinolone	LOD 2-6 µg/kg IC ₅₀ 11.7-30 µg/kg	Bovine Milk, Ovine Kidney	[88]	PAB competitive direct assay Generic and specific
ELISA	Chloramphenicol	12.5/50 µg/kg	Milk, milk powder, honey, shrimps, meat, fishmeal and eggs	[86]	Commercial Kit
ELISA Dip strip	Enrofloxacin	LOD 1-10 ppb ELISA LOD 50-100 ppb Dip strip	Chicken liver Cattle milk	[89]	Mab Competitive direct assay
ELISA	Ciprofloxacin	LOD 0.32 ng/mL IC ₅₀ 50 ng/mL	Milk, chicken, and pork	[91]	Pab Competitive indirect assay
ELISA Dip-Strip	Bacitracin	LOD 0.1 ppb, 0.28 ppm ELISA	Chicken plasma Chicken serum	[185]	PAB Competitive direct assay
ELISA	Flumequine	LOD 100 µg/L dip strip LOD 12.5 µg/kg IC ₅₀ 90 µg/kg ⁻¹	Raw milk	[90]	IgY Competitive indirect assay
ELISA	Ciprofloxacin	LOD 0.32 ng/mL	Pork	[186]	PAB competitive indirect assay
ELISA	Sarafloxacin	IC ₅₀ 7.3-48.3 ppb	Liver	[187]	MAB (mouse) competitive indirect assay
ELISA	Tilmicosin	LOD 9.2 and 4.45 ng/mL IC ₅₀ 48 and 32 ng/mL	Buffer	[188]	MAB (mouse) competitive indirect assay
ELISA	Macrolides	LOD 0.3 ng/mL IC ₅₀ 8 ng/mL	Buffer	[189]	
RIA	Erythromycin	10 µg/L	Water	[84]	

TABLE 2.8.2 (continued)

Assay	Analyte	Sensitivity	Matrix	Ref.	Miscellaneous
RIA	Chloramphenicol	LOD 0.5–0.3 ng/g	Tissue	[190]	(1) Ridascreen ELA Competitive enzyme immunoassay (2) Charm II assay Radioimmunoassay
EIA		LOD 5–20 ng/mL	Urine		
ELISA	Chloramphenicol	3 ng/mL	Muscle	[191]	
ELIFA Dipstick	Chloramphenicol	0.7–1.7 ng/mL	Milk	[92]	
EIA					
ELISA	Chloramphenicol	2 mg/kg	Meat	[192]	Le carte test
EIA Kit	Chloramphenicol	LOD 0.1 µg/kg	Shrimp tissue	[193]	5091CAP1p PAb Competitive direct assay
ELISA	Testosterone	LOD 10 pg per well	Human Serum	[194]	
ELISA	Boldenone	LOD 26 pg per well	Urine	[195]	
IA	Stanozolol		Water	[196]	
ELISA	Trenbolone	LOD 0.1 ppb	Meat samples	[197]	
ELISA	Trenbolone	LOD 0.1 ng/mL	Urine	[198]	
ELISA	Nandrolone	LOD 0.02 ng/g	Muscle tissue		
ELISA	Estradiol	LOD 1 ng/mL	Equine urine	[199]	
ELISA	Estradiol Ethynylestradiol	LOD 5 pg per ml	Waste water	[200]	
		LOD 0.1 ng/L	Waste water effluent	[93]	
		LOD 0.05 ng/L	Surface water		
		LOD 0.1 ng/L	Waste water effluent		
		LOD 0.05 ng/L	Surface water		
		LOD 5 ng/L	Water samples		
RIA	Ethynylestradiol	LOD 4 ng/L	Water samples	[94]	
	Progesterone	LOD 12 pg per well			
ELISA	Estrilol	LOD 3.8 pg per tube	Saliva	[201]	
ELISA	Progesterone	LOD 10 ng/L	Human serum	[202]	
EIA	Norethindrone	LOD 2.8 ng/mL	Water samples	[94]	
ELISA	Cortisol	LOD 2.8 ng/mL	Human Serum	[203]	
ELISA	Betamethasone	LOD 12.5 ng/mL	Urine	[204]	
	Dexamethasone	LOD 3.1 ng/mL			
	Flumethasone	LOD 2.5 ng/mL			
ELISA	Dexamethasone	LOD 4 ng/mL	Urine	[205]	

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

Nuclear receptors						
RRA hER	Estradiol	IC ₅₀ 2 nM	Buffer	[206]	Radio-Receptor assay using hER, hAR, hPR and hGR	
RRA hAR	Dihydrotestosterone (DHT)	IC ₅₀ 50 nM	Buffer	[206]	High cross-reactivity with ethynylestradiol and no matrix interferences observed in the ELRA with lake water and sewage plant outflow	
RRA hPR	Progesterone	IC ₅₀ 50 nM	Buffer	[206]		
ELRA	Estradiol	LOD 0.1 µg/L	Buffer	[68]		
ER-CALUX	Estradiol	IC ₅₀ 6 pM	Buffer	[207]	Estrogen receptor-mediated, chemical-activated luciferase reporter gene expression	
Androgen receptor assay	DHT Trembolone Testosterone	IC ₅₀ 2.23 nM IC ₅₀ 2.75 nM IC ₅₀ 15.9 nM	Buffer	[208]		

J.-P. Salvador et al.

2.8.3.2 Antibodies

Immunochemical techniques are based on the affinity of the antibody against an antigen. The formed complex has a high-affinity constant (k_a) that can reach values around 10^{-10} M^{-1} . This interaction is specific between the antigen and the corresponding antibody. The immunochemical techniques use this characteristic as a powerful tool for the detection of pollutants at low concentrations. Several immunochemical techniques have been developed for the determination of small molecules. The reader can be addressed to recent reviews to find more information on immunochemical technologies for residue analysis [73–76].

Immunoassays (IAs) are the most frequently used methodologies for the detection of pollutants [77–79] such as pesticides and other industrial residues at trace levels. They have been applied to the analysis of environmental samples (wastewaters, river water, sediments and other kinds of matrices) and also to complex biological matrices, such as urine, serum and saliva. IAs have found wide application in forensic, clinic and veterinary analysis. In immunoassays for small organic molecules such as pharmaceuticals, the reaction Antigen–Antibody (Ag–Ab) is quantified under competitive conditions. As with the receptors, most of these techniques rely on the use of labels that are responsible of the signal generated. There are several kinds of labels for the indirect determination of the analyte. In the firsts, in IAs developed, the label was always a radioisotope and the assay was called RIA (Radioimmunoassay). However, the drawbacks of using radioisotopes are not friendly prompted to the employment of other kind of labels less hazardous. Thus, fluorescent labels, such as rodhamine, fluoresceine or more recently lanthanides, are used in fluoroimmunoassays (FIA). The use of enzyme labels (EIA, enzyme immunoassay) offers the possibility to increase detectability, by amplifying the signal produced by a substrate. Enzymes like horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase (AP) and glucose oxidase (GOx) are the most used labels.

Most of the immunoassays developed for pharmaceuticals have been applied in biological samples. Certain drugs show significant toxicity that claims for therapeutic drug monitoring (TMD) of the real internal doses attending to individual idiosyncrasies. TMD significantly reduced risks associated to unappropriate doses or treatment protocols in particular patients. For this reason high-throughput screening immunochemical methods have been develop to provide efficiency to these monitoring programs. As an example several EIA or PFIA (Polarization

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

Fluorescent Immunoassay) do exist available to routinely monitoring antiarrhythmic drugs (see review by Campdell et al. [80]) but not so much to the analysis of environmental matrices. However, pharmaceutical residues in the environment have become a matter of concern recently. The significant immunochemical methods already available can therefore offer a great potential on environmental monitoring programs due to the important benefits of this type of methods. As an example, Table 2.8.2 summarizes some of the different biochemical assays described for the determination of pharmaceuticals.

As mentioned before, IAs can work under homogeneous or heterogeneous conditions. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) are the most well known and frequently used heterogeneous IA formats. One of the immunoreagents is immobilized onto a solid support and, for the case of small molecules, the assay takes under competitive configuration. The most usual are the direct and the indirect formats (see Fig. 2.8.3). In the direct format, usually the immunoreagent immobilized onto the well is the antibody. Then, equilibrium is established between the antibody, the analyte and the enzymatic tracer (both in solution). After a washing step, the unbound reagents are removed; the amount of label bound to the Ab is measured, the signal being inversely proportional to the amount of analyte in the sample. In the indirect format (see Fig. 2.8.3), the coating antigen is coated on the plate, but in this case the amount of analyte present in the sample is indirectly measured by measuring the bound Ab with a second Ab that is conveniently labelled (Anti-IgG-enzyme). ELISAs have been developed for the antihypertensive agents enalapril

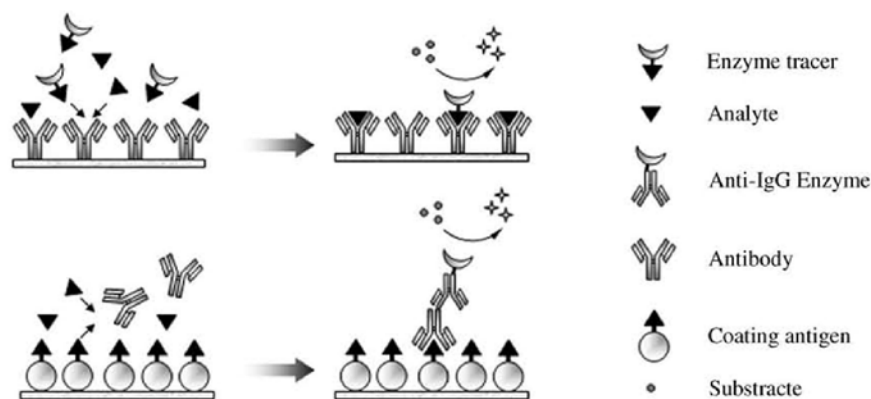


Fig. 2.8.3. Scheme of two of the ELISA formats most frequently used. Above is described the competitive direct format and below the competitive indirect format.

J.-P. Salvador et al.

and amlodipine in human plasma [81,82]. Amlodipine is detected using a biotin-avidin-based ELISA in just 50 μL of plasma for TMD pharmacokinetic studies and pharmaceutical analysis. The free form of amlodipine is detected down to 0.1 ng/mL and the intra- and interassay coefficient of variation ranged from 1.6–10.2%. Regarding multiplexed methods, a sensitive and rapid multi-residue technique method for the detection of five tranquillizers and one β -blocker using a single ELISA plate has been reported to detect sedative misuse [83]. The assay uses three polyclonal antibodies raised against azaperol, propionylpromazine and carazolol conjugates and taking advantage of the cross-reactivity with related substances. Azaperol, azaperone, carazolol, acepromazine, chlorpromazine and propionylpromazine are detected in liver at 5, 15, 5, 5, 20 and 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. ELISAs have also been developed for the detection of antibiotics. However, the matrices that have been developed are biological samples such as milk, tissues, urine or plasma. It is remarkable the limit of detection using the Charm II RIA test for the determination of penicillins in water [84]. A LOD of 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ was achieved using the commercial test, value closed to the regulation established for the FDA. The main application for the detection of antibiotics is measuring in milk. The detection limits obtained were very low for sulfadimidine [85], tetracyclines [86], macrolide [87], quinolones [88–91] and chloramphenicol [86,92], examples were summarized in Table 2.8.2. Huang et al. [93] have been developed an ELISA for the determination of estradiol and ethynylestradiol in wastewater effluent and surface water with a LOD of 0.1 and 0.05 ng/L, respectively. Aherne et al. [94] have been analysed by immunoassay ethynylestradiol (LOD of 5 ng/L), progesterone (LOD of 4 ng/L) and norethindrone (LOD of 10 ng/L) in water samples.

Fluoroimmunoassays (FIAs) for pharmaceuticals are based on the same competitive principle described above, but with the difference that a fluorescent label despite of an enzymatic label is used. FIAs have also been developed on heterogeneous and homogenous formats, being now the last case the most frequently employed. Thus, homogeneous FIAs have been reported for the determination of different types of pesticides and industrial residues [95–97]. FIAs have been developed for the determination of β -lactam antibiotics by automated fluorescent immunoassay [98]. It has been achieved an IC_{50} of 30 ng/mL for Penicillin G. A high cross-reactivity value was observed for Penicillin V (145%) and Amoxicillin (50%). The determination of cortisol in saliva [99] has been measured by DELFIATM (dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay) method achieving sensitivity of 0.5 nmol/L.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

2.8.4 BIOSENSORS

Biosensors are integrated analytical devices, usually small in size, consisting of a biological component in intimate contact with a physical transducer that converts the biorecognition process into measurable signal (see Fig. 2.8.4).

A biosensor should be capable of providing specific quantitative or semi-quantitative analytical information using a biological recognition element that translates information from the biological domain into a chemical or physical output signal [100,101]. In recent years many efforts have been made to develop biochemical techniques, integrating specific recognition elements and electronic components to obtain small devices with the ability to carry out direct, selective and continuous measurements of one or several analytes present in the samples (see Table 2.8.3 for the main biosensor features in comparison with conventional analytical methods). The development of new techniques such as

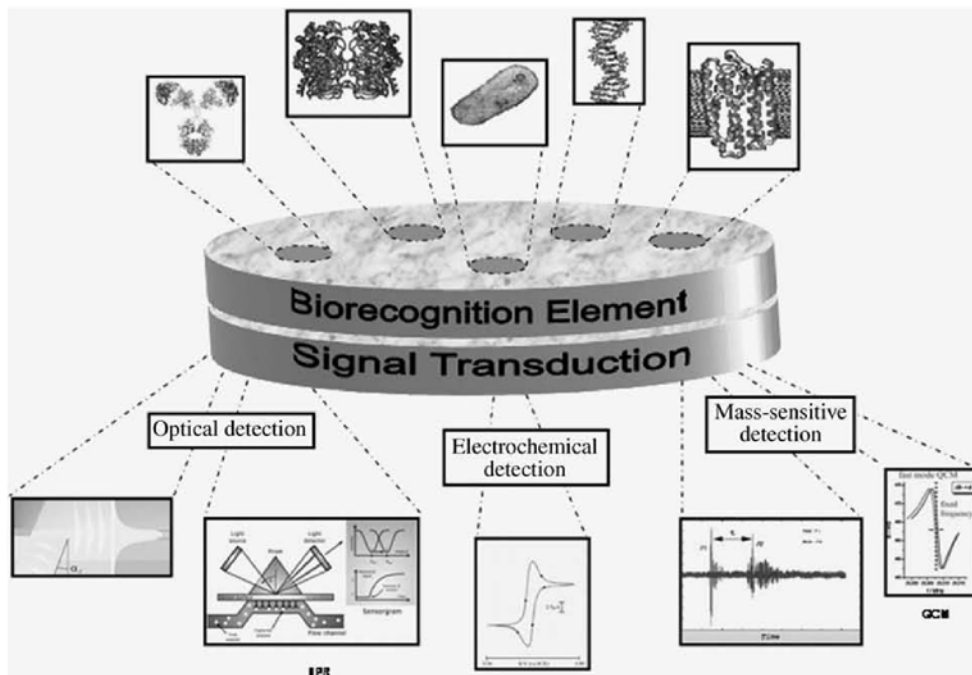


Fig. 2.8.4. Schematic view of a biosensor, classified according the biorecognition element (antibodies, enzymes, bacteria, DNA or membrane receptors) or the signal transduction method (optical, electrochemical or piezoelectric detection).

J.-P. Salvador et al.

TABLE 2.8.3

Advantages and disadvantages for biosensors vs. conventional methods for the detection of pharmaceuticals in real samples

Biosensors	Conventional methods
Direct Analysis	Pretreatment procedures
Simplicity, user friendly	Trained Personnel Required
Portability	Laboratory Methods
Small volume sample	High volume sample
No organic solvents	Organic solvents consumption
Cost-effective	Expensive
Fast results in real time detection	Long analysis time
Low biological material stability	No biological stability restrictions
Single analyte determination	Multianalyte determination
Mostly prototypes	Mostly commercial

array configurations has recently allowed multianalyte determinations. To accomplish the analytical requirements of these TMD, clinical, food safety programs and environmental studies, there is a demand for new analytical devices, able to be integrated into automated devices to provide efficiently fast and reliable data. Table 2.8.4 summarizes the biosensors developed for the determination of pharmaceuticals according to the type of transducer used to transform the biochemical signal into a physical signal.

Biosensors can be classified according to the biological recognition element or to the signal transduction principle (see Table 2.8.4).

2.8.4.1 Transducing principle

Biosensors also can be classified into four different basic groups on the basis of the signal transduction principle: electrochemical, optical, piezoelectric and thermometric. The transducer is an essential part of the biosensor since it is responsible of converting the (bio)-chemical response to an electrical signal. It may have a dramatic effect on both the specificity and sensitivity of the system. Thus, selecting the appropriate transducer giving the optimum detection for a particular system is crucial. Following a brief description of the main transducing principles is given, although the reader is addressed to other reviews for more information [101–106].

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

TABLE 2.8.4

Biosensor classification according to the biorecognition element and the signal transduction

<i>Recognizing biomolecule</i>	
Antibodies (Immunosensors)	Monoclonal or polyclonal
Protein receptors	Metallotropic receptors, Ionotropic receptors
Whole cells:	Microbial sensors, Mammalian cells, Tissue
Nucleic acids:	Hybridization, Low weight compound interaction
Enzymes	Oxidases, Esterases, etc.
<i>Signal transduction</i>	
Electrochemical	Amperometric, Conductimetric, Impedimetric, Potentiometric
Optical	Absorption, Fluorescence or Phosphorescence, Bioluminescence or Chemiluminescence, Reflectometric Interference Spectroscopy (RIFS) and Surface Plasmon Resonance (SPR), Evanescent wave.
Piezoelectric	Surface acoustic wave, Bulk acoustic devices, Cantilever
Thermometric	Calorimetric

2.8.4.1.1 Electrochemical sensors

Owing to its simplicity, electrochemical transduction constitutes a successful route to create low-cost biosensors when coupled to enzymes. However, electrochemical detection of just a biorecognition process is difficult. Catalysis leading to the formation of electroactive substances is frequently necessary. Electrochemical sensors may work under amperometric, potentiometric, conductimetric and impedimetric transducing principles.

For *amperometric* devices the current generated by oxidation or reduction of redox species at the electrode surface maintained at the appropriate electrical potential is measured. The current observed has a linear relationship with the concentration of the electroactive species. The electrode is usually constructed of platinum, gold or carbon. The potential applied to the working electrode is largely dependent on the enzyme-substrate system utilized. Adjacent to the electrode, bound by a membrane or directly immobilized, is placed one of the bioreagents

J.-P. Salvador et al.

involved in the recognition event. Enzymes used in such electrochemical assays are usually oxidoreductases such as horseradish peroxidase (HRP), or hydrolytic enzymes such as alkaline phosphatase (AP), that yield electroactive species as products of the enzymatic reactions. Other enzymes commonly used as sensing catalysts for environmental monitoring are tyrosinase, laccase, aldehyde deshydrogenase, etc. Sometimes the substrate or the product of the enzymatic reaction can be monitored amperometrically, without the need of a mediator. These electrodes are called *unmediated amperometric enzyme biosensors*. However, a number of factors must be taken into account when assessing the suitability of an enzyme substrate to be used on an electrochemical detection system: the electrochemistry of the substrate, the electrochemistry of the product of the enzymatic reaction, the medium in which the measurements will be performed and the electrochemistry of endogenous materials in the test sample. A problem often encountered with unmediated sensors is that other species present in the samples being analysed are also electroactive at the potential applied. For example, ascorbic acid and uric acid, present in many biological samples, are oxidized at an anodic potential of +0.35 V [107]. AP combined with *p*-aminophenyl phosphate (pAPP) as substrate has been shown to be a good alternative when measuring with such a kind of system [108–111]. Although *p*-aminophenyl phosphate has an irreversible wave in cyclic voltammetry at around 0.45 V vs Ag/AgCl, its hydrolysis product *p*-aminophenol (pAP) shows a reversible electrochemistry with a half wave potential of –0.065 V vs Ag/AgCl. Consequently, measurements on biological matrices can take place at lower potentials avoiding interference of endogenous compounds. Choosing an alternative electron transfer acceptor can also circumvent these problems. Usually the *mediator* is a species of low MW that shuttles electrons between the redox centre of the enzyme and the working electrode. These sensors are called *mediated amperometric enzyme biosensors*. A mediator should react rapidly with the enzyme, exhibit reversible heterogeneous kinetics, possess a low overpotential for regeneration and to be stable at certain range of pH, temperature, redox state and dioxygen. Some mediators frequently used are I^- , $[Fe(CN)_6]^{4-}$, *o*-phenylenediamine, diaminobenzidine, hydroquinone and 5-aminosalicylic acid [112–118]. Joseph et al. [119] developed a biosensor based on the redox properties of an immobilized human CYP3A4, a member of the P450 enzyme superfamily, to directly monitor electron transfer to the heme protein. Addition of substrates such as verapamil, midazolam, quinidine or progesterone, at low concentrations (μM), to the

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

oxygenated solution cause a concentration-dependent increase in the reduction current in cyclic voltammetric and amperometric experiments.

In *potentiometric* biosensors changes in potential after the specific binding of the target to the immobilized partner, under zero-current conditions, are detected. For example, proteins in aqueous solution are polyelectrolytes and consequently the electrical charge of the antibody can be affected by binding the corresponding antigen due to charge redistribution. The potential difference is measured between the sensing electrode, where the specific antibody has been immobilized, and the reference electrode. The main disadvantage of this system is that variations in the potential due to the antibody–antigen interaction are too small (1–5 mV) and therefore the reliability and sensitivity of the analysis are limited to background effects. The potential of a single electrode in solution is caused by the tendency of the solution to either donate or accept electrons and may be calculated by the Nernst equation. Thus, the potential of an ion-selective electrode is a logarithmic function of ionic activity. The best-known potentiometric device is the ion-selective electrode (ISE). Coupling an ISE with a field-effect transistor (FET) result in an ISFET, which is a sensitive device for measuring ions such as H^+ , Na^+ and K^+ . Because of the problems encountered when directly measuring affinity reactions, attention shifted towards systems detecting the products of an enzymatic reaction. Thus, ISFETs are frequently associated to the use of urease as label. Marshall et al. [120] described a pH-sensitive holographic sensor for penicillin detection. The holograms have been used as transducer systems to monitor the pH changes associated with specific enzymatic reactions.

Conductimetric and *Impedimetric* biosensors are essentially based on the same physical principle. *Conductimetry* describes the dependence of the current generated by ions in solution while *impedance* refers to the voltage as a function of the current. In both cases, the conductimetric or impedimetric properties are influenced by a sensing layer placed between the two electrodes. Conductimetric detection is well suited to chemical measurement as many chemical reactions produce or consume ions, thus altering the overall electrical conductivity of the solution. A drawback may be the fact that the overall conductivity determined is the sum of all the conductivities. Therefore, unless, this background response can be quantified, the method lacks specificity. Impedance-based devices in the 1990s was largely developed by the work of McNeil and Martelet. Formation of complex on a conductive or semiconductive surface alters the capacitance and the resistance at the

J.-P. Salvador et al.

surface–electrolyte interface. Furthermore, the build-up of the sensing biomaterial film on the conductive or semiconductive support alters the capacitance and resistance properties of the solid support–electrolyte interface. Impedance spectroscopy is a very powerful tool for the analysis of interfacial properties changes of modified electrodes upon biorecognition events occurring at the modified surfaces. Impedance measurements provide detailed information on capacitance/resistance changes occurring at conductive or semiconductive surfaces. Thus, impedance spectroscopy, including non-Faradaic impedance measurements resulting in capacitance sensing, is becoming an attractive electrochemical tool to characterize biomaterial films associated with electronic elements, thus, allowing transduction of biorecognition events at the respective surfaces [121]. Yagiuda et al. [122] developed a simple immunosensor based on a conductivity method for determination of methamphetamine in urine. This sensor uses anti-MA antibody immobilized onto the surface of a pair of platinum electrodes. The working range of this biosensor was found between 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$.

2.8.4.1.2 *Optical transducers*

First developments of these kinds of sensors took advantage of the flexibility and low cost of the optical fibres measuring the absorption or emission of light of one of the components of the bioreaction. Many optical transducers exploit properties such as simple light absorption, fluorescence/phosphorescence, bio/chemiluminescence, reflectance, Raman scattering and refractive index [123]. Apart from speed, sensitivity and robustness, other attractive features of optical sensors include their suitability to component miniaturization, remote sensing and their multi-analyte sensing capabilities. A variety of sophisticated optical sensing principles have been developed mainly based on the evanescent wave (EW) or on the surface plasmon resonance (SPR) phenomena.

An *evanescent wave* is produced in the external media (refractive index, n_2) of a waveguide (n_1) by the electromagnetic field associated to the light guided by total internal reflection (TIR). The electromagnetic field does not abruptly switches to zero at the interface between the two media ($n_1 > n_2$), but decays exponentially with the distance from the interface. The penetration depth of the evanescent field is defined as the distance where its strength is reduced to $1/e$ of its value at the interface and generally has a value around one hundred of nanometers. The penetration depth is dependent of the incidence angle at the interface and is proportional to the wavelength of the excitation light.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

When molecules with an absorption spectrum including the excitation wavelength are located in the evanescent field, they absorb energy leading to attenuation (attenuated total reflection, ATN) in the reflected light of the waveguide. One of the advantages of the biosensors based in this principle is that possible interferences from the bulk media are avoided since only directly absorbed substances interfere with the electromagnetic field. However, as mentioned before, the sensitivity reached with this simple setup is often not sufficient to accomplish the necessary detection limit. For this reason most of the immunosensors reported make use of labelled molecules that are able to re-emit the absorbed evanescent photons at a longer wavelength as fluorescence. This phenomenon is known as total internal reflection fluorescence (TIRF). The RIANA immunosensor (see Fig. 2.8.5) based on the EW principle allows measuring small organic molecules, such as estrone or certain pesticides, in water samples. Particularly, estrone can be detected with a LOD of 0.20 ng/L and a LOQ 1.40 ng/L with the aid of fluorescent labels [124]. Recently, a new prototype called AWACSS [125,126] has been developed based on the previous experience with the RIANA prototype for the determination of antibiotics, hormones, endocrine-disrupting chemicals and pesticides in real in water and sediment samples (see Fig. 2.8.6). Theoretically, the prototype would allow detection of 32 different analytes in a single analysis. The emitted light is collected for detection with 32 polymer

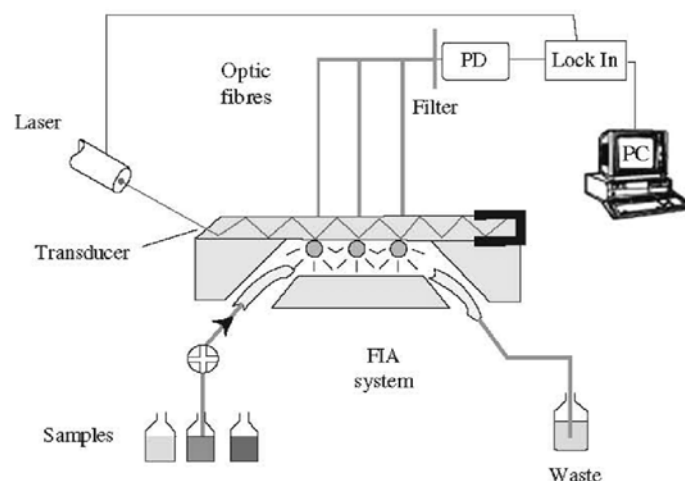


Fig. 2.8.5. Scheme of the River Analyser immunosensor (RIANA). Reprinted from Ref. [124]. Copyright (2004), with permission from Elsevier.

J.-P. Salvador et al.

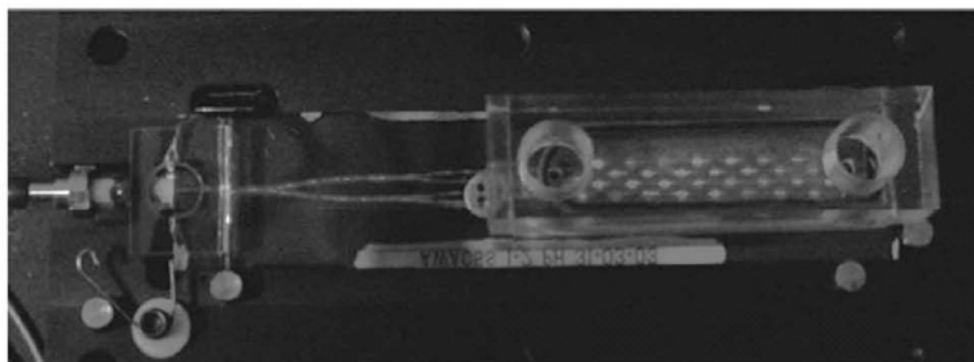
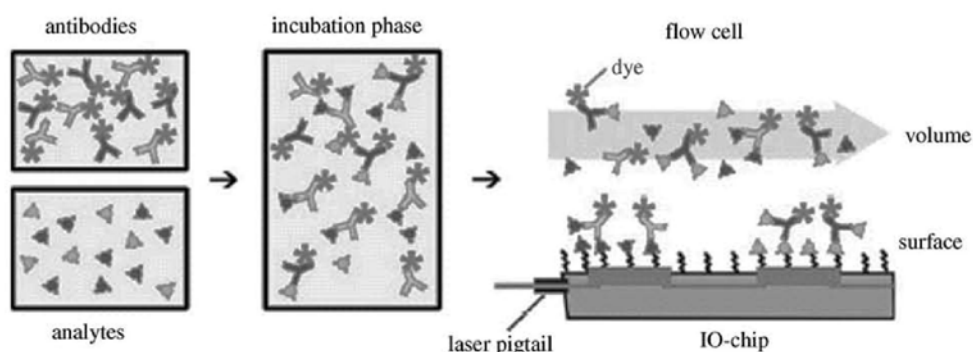


Fig. 2.8.6. The AWACSS instrument employs fluorescence-based detection of the binding of fluorophore-tagged biomolecules to the surface of an optical waveguide chip (upper part of the figure). The design of AWACSS allows for the fast simultaneous measurement of up to 32 different analytes with the IO-transducer chip shown in the lower part of this figure. Reprinted from Ref. [125]. Copyright (2005), with permission from Elsevier.

fibres. The possibility of using this multianalyte biosensor to quantify pharmaceuticals has been demonstrated through the quantification of estrone sulfamethiazole and caffeine in addition to other environmental contaminants. For instance, estrone has been determined in water samples at concentrations ranging between 0.1 and 1.0 $\mu\text{g/L}$ and in sediments at 50–500 ng/g , with coefficient of variations between 3 and 10%.

More recently, other EW immunosensor approaches such as *Grating Couplers* [127–130] or *Mach-Zehnder Interferometers* (MZI) [130–134] have been investigated to make possible direct measurement of small analytes without the use of fluorescent labels. In the *grating coupler* the change produced in the critical angle, as a consequence of the immunoreaction, is measured. The critical angle is the angle that produces total

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

reflection and is very sensitive to the refractive index and thickness at the sensor surface. From this change the N_{eff} (total refractive index due to the effect of the evanescent field) can be calculated. Assuming that n_1 of the waveguide is constant, an optical thickness can be obtained. As an example, an integrated optical grating coupler biosensor for progesterone detection in whole blood samples has been reported [135]. In this case, the modified indirect competitive immunoassay format has been used to detect binding of progesterone antibody. Under these conditions progesterone concentration could be determined in buffer solution and whole blood in a range between 0.005 and 10 ng/mL with a LOD of 3pM. However, experiments were performed for measuring chloramphenicol immobilizing a specific antibody on a grating coupler in order to detect the analyte by optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) in the range of 10^{-7} – 10^{-3} M [136]. Using a *Mach-Zehnder interferometer* the propagating light is splinted in two arms, one of them having the appropriate sensing layer and the other acting as a reference. The evanescent field of the measuring arm collects information regarding the bioreaction, due to the change produced in the refractive index. Consequently, the velocity of the wave in this arm varies. At the end recombination of the waves from both arms allows observation of a constructive or destructive interference, which is related to the extent of the bioreaction that has occurred on the sensing arm.

Surface plasmon Resonance (SPR) is a physical phenomenon that can occur when plane-polarized light hits a metal film under total internal reflection (TIR) conditions (the incoming light is reflected on the interface of a half circular prism). When the prism is coated with a thin film of a noble metal (gold) on the reflection site, the energy of the photon electrical field can interact with the free electron constellations of the gold surface (see Fig. 2.8.7). The incident light photons are absorbed and converted into surface plasmons. A SPR is an evanescent electromagnetic field generated at the surface of a metal conductor

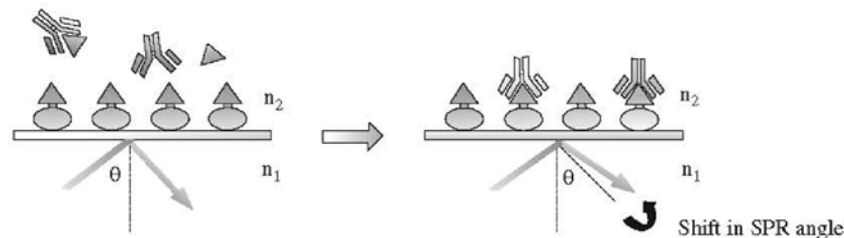


Fig. 2.8.7. Surface plasmon resonance principle (SPR). Reprinted from Ref. [75], with kind permission of Springer Science and Business Media.

J.-P. Salvador et al.

(usually Ag or Au) when excited by the impact of light of an appropriate wavelength at a particular angle (θ_p). The absorption of light energy by the surface plasmons during resonance is observed as a sharp minimum in light reflectance when the varying angle of incidence reaches the critical value. The critical angle depends of the wavelength and polarization state of the incident light, but also of the dielectric properties of the medium adjacent to the metal surface and therefore is affected by analytes binding to that surface. This principle allows monitoring of biological interactions. The pioneer of commercial SPR-based biosensing was Pharmacia Biosensor AB, now BIAcore AB. Nowadays, several other brands offer commercial SPR-based sensor devices including IASys from Fisons, IBIS iSPR from IBIS Technologies BV, SensiQ from Nomadics, Plasmoon from BioTul, SPREETA from Sensata (Texas Instruments) and β -SPR sensor from Sensia. In more recent times, surface plasmons produced from an extended flat-film have been exchanged by utilizing the three-dimensional structure of noble metals. Formed by either nanolithography methods or simple colloids covalently attached to the substrate, silver and gold materials have been used to prepare what is termed *localised plasmon resonance sensors (LPR)*. The apparent advantages are in the smaller size of the sensor. Each colloid or structure can be prepared to the order of single to tens of nanometers. This allows greater surface area through the three-dimensionality of the structures and thus lower detection limits. Enhanced resonances can be tweaked through the careful choice of material, size and shape of the structures, also contributing to decreases in detection levels. Of the nanolithography-based LPR sensors, the pioneering work of Van Duyne using silver triangles, must be quoted [137–139]. In the colloid-based systems, only model systems measuring large proteins (60–150 kDa) like streptavidin or IgG class molecules has been reported [140–142]. However, a new technique has been described for the quantitative determination of a small steroid molecule called stanozolol (MW 328Da), significantly smaller than model systems. The preliminary features for this assay showed a LOD of 6 $\mu\text{g/L}$ with good reproducibility. This work showed the viability through very simplistic means and setup, when compared to nanolithography, to offer an alternative screening method for this banned anabolic steroid [143].

With the aim to improve performance, there have been some approaches to combine the SPR principle with *grating couplers* and *Mach-Zender interferometers*. Thus, a reported high-sensitivity SPR biosensor based on the *Mach-Zender interferometer design* uses a

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

Wollaston prism through which the phase quantities of the P and S polarizations are interrogated simultaneously. Since SPR affects only the P polarization, the signal due to the S polarization can be used as the reference. The differential phase between the two polarizations allows eliminating all common-path phase noise while keeping the phase change caused by the SPR effect. A sensitivity limit of 5.5×10^{-8} refractive-index units per 0.01 degrees phase change is reached with this configuration, which has been considered as a significant improvement over previously obtained results when gold was used as the sensor surface [144]. Similarly, a new approach to SPR biosensing based on spectroscopy of multiple surface plasmons on a special multi-diffractive grating coupler has recently been reported. In this approach, the binding event at a surface of the *SPR grating coupler* is simultaneously observed by surface plasmons of different wavelengths, which makes possible the determination of binding-induced changes in the refractive index distribution at the sensor surface [145].

2.8.4.1.3 Piezoelectric transducers

Within mass-sensitive biosensors, acoustic wave biosensors operate on the basis of an oscillating crystal that resonates at a fundamental frequency. The crystal element is coated with a layer containing the biorecognition element designed to interact selectively with the target analyte. A measurable change in the resonance frequency occurs after the binding of the analyte on the sensing surface according to the mass change of the crystal. Most of these biosensors utilize piezoelectric materials as the signal transducers [123,146]. Piezoelectric materials are ideal due to their ability to generate and transmit acoustic waves in a frequency-dependent manner. Acoustic wave biosensors offer label-free, on-line analysis and cost effectiveness combined with ease of use. Disadvantages associated with these sensors include problems with crystal surface regeneration and relatively long-incubation times. Limitations may also be found in the coating or the immobilization of the biorecognition elements on the crystal surface along with the inability to measure small hapten molecules as the mass changes associated are too small to be detected by this method. An emerging group of mass-sensitive biosensors are the so-called cantilever biosensors. Adsorption of biochemical species on a functionalized surface of a microfabricated cantilever can cause surface stress and consequently the cantilever bends. The mass change causes a differential surface stress that can be detected by electric or optical methods [147,148]. Microcantilever

J.-P. Salvador et al.

biosensors offer various advantages, only small quantities of receptor and analyte are necessary, and limits of detection achieved are often lower than those obtained by classical methods [149]. Chloramphenicol antibiotic was measured in standard solutions with a label-free immunosensor using an anti-chloramphenicol antibody immobilized onto the gold surface of quartz crystal by using 3-mercaptopropionic acid (MPA) and dimethylaminopropyl-ethylcarbodiimide-hydroxysuccinimide ester (EDC-NHS) chemistry. The linear measuring range was found between 5×10^{-6} and 5×10^{-2} M [136].

2.8.4.1.4 *Thermometric transducers*

Thermometric biosensors exploit the absorption or evolution of heat in biological reactions [150]. This is reflected as a change in the temperature within the reaction medium and is monitored as a change in the resistance of the transducer. The thermal biosensors constructed have been based on direct attachment of the immobilized enzyme or cell to a thermistor. Calorimetric transducers are only useful with enzyme-catalyzed reactions. These reactions exhibit the same enthalpy changes as spontaneous chemical reactions and considerable heat is evolved, ranging from 5 to 100 KJ/mol. Therefore, calorimetric transducers are universally applicable in enzyme sensors.

2.8.4.2 **Biorecognition principle**

All biosensor technologies and transducing principles described previously require the immobilization of either the receptor or the ligand on the inorganic surface of the transducer. Immobilization of receptor on a solid support has often proven to be difficult due to the loss of functional integrity. Receptors can be covalently attached by chemical cross-linking or non-covalently deposited on the surface. Covalent immobilization may lead to irreversible structural alterations and moreover gives rise to random orientation of the proteins on the surface. Non-covalent immobilization of the receptor can be achieved via adsorption, via incorporation in lipid bilayers, via an affinity tag (i.e. biotin, hexahistidine, etc.). Crucial parameters to consider are the receptor's structural integrity and the orientation of the receptor so that the ligand can be bound without steric restrictions. In addition to the requirement of unchanged receptor affinity and specificity, the receptor should not denature or be released from its support during analysis and the support should demonstrate limited

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

non-specific ligand binding. Moreover, immobilization of the receptor onto a solid support is a key aspect. Enzymes, protein receptors, nucleic acids, antibodies, whole cells and biomimetic receptors are some of the most frequently used biorecognition molecules employed [151].

2.8.4.2.1 *Enzymes*

Enzyme biosensors are catalytic biosensors which principle relies on the conversion of a non-detectable substrate into an optically or electrochemically detectable product. This process allows the detection of substrates, products, inhibitors and modulators of the catalytic reaction. Combination of different enzymes has been described to extend the range of detectable analytes by converting a non-detectable primary product to a secondary detectable one by the action of a second or third enzyme or to improve sensitivity by increasing amplification. Detection of a particular analyte is thus dependent on its enzymatic transformation or on its capability to act as an inhibitor of an enzyme reaction. Although in nature may exist enzymes able to transform or degrade the pharmaceutical, it is not always possible to have them available on an isolated form, which limits the possibility to develop enzymatic devices [152–155]. Enzyme biosensors have been reported for penicillin V and G using penicillinase [156,157] as biorecognition element. Similarly, enzyme-based amperometric biosensors have been described for the enantioselective analysis of antihypertensive agents [158–160]. S-Enalapril and S-ramipril are angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors which are used for treatment of hypertension. Owing to the fact that only the S-enantiomer possesses the ACE-inhibiting activity, enantioselective analytical method is necessary in the pharmaceutical industry to discriminate them from the less active R-enantiomers. This system is based on the immobilization of L-amino acid oxidase in a carbon paste electrode. A sequential injection device allows enantioanalysis of the S-enantiomer from the raw materials as well as from their pharmaceutical formulations, with a rate of 75 samples per hour and R.S.D. values better than 0.1% ($n = 10$) [160]. As an example of an enzymatic biosensor, Gustavsson et al. [161] developed a SPR-based biosensor (BIAcore) using as biorecognition element a β -lactamase enzyme, achieving LOD of $2.6 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ for Penicillin G.

2.8.4.2.2 *Protein receptors*

As mentioned above, many biochemical processes involve biomolecular recognition events and this fact can be used to develop biochemical

J.-P. Salvador et al.

assays and consequently also biosensors (see Section 2.8.3). The advantage of this biosensor approach is that the activity of pharmaceuticals has usually been designed to specifically interact with certain protein receptor or process. To overcome denaturation or loss of activity, often transmembrane receptor proteins are successfully immobilized onto the transducer within a lipid bilayer to keep their natural environment. Several receptors have been immobilized onto SPR sensor surfaces, amongst them the β_2 -adrenergic receptor. This receptor was incorporated into a solid-supported egg phosphatidylcholine lipid bilayer and followed the binding of full agonists (isoproterenol, epinephrine), a partial agonist (dobutamine), an antagonist (alprenolol) and an inverse agonist (ICI-118,551) to the receptor [162,163]. Seifert et al. [68] used the BIAcore system for the determination of substances with potential estrogenic activity in water using estrogen receptor previously employed in their ELRA (see Section 2.8.3.1). Schmid et al. [164,165] immobilized the purified histidine-tagged serotonin receptor (5HT₃-R) via a nickel(II) nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) chelating group on SiO₂ of a TIRF sensor. The pharmacological properties of agonists and antagonists towards the receptor were studied by mixing the competing ligands at various concentrations with the fluorescent tracer ligand before measuring binding to the immobilized receptor with TIRF.

2.8.4.2.3 *Antibodies*

Immunoassay biosensors make use of the specific binding between an antibody and antigen. Main advantages of these kinds of biosensors are the wide range of affinities available expanding thus the number of analytes that can be selectively detected. The scope of selectivity of the antibodies is almost unlimited. Additional benefits of using antibodies as sensing elements derive from the possibility to conveniently tailor their affinity and selectivity. Immunosensors can also profit from the monoclonal antibody technology which offers a longer supply period of antibodies with defined chemical and biological properties, and the chance to carefully screen antibodies having the desired characteristics and the feasibility of producing recombinant antibodies in hosts other than mouse at lower cost. Research on the antibody field is still growing and future perspectives also count on the use of small antibody fragments, better defined regarding their chemical structure. This fact would surely help standardization of procedures involved in immunosensor development such as immobilization, stabilization, calibration or storage. Several examples using antibodies as a biorecognition element have been described in the literature and are summarized in Table 2.8.5.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

2.8.4.2.4 Nucleic acids

Two main strategies are employed for this type of sensors. A general principle for nucleic acid recognition is base pairing leading to the construction of hybridization devices. Such sensors rely on the immobilization of a short (20–40 mer) synthetic oligomer or single-stranded DNA probe (ssDNA probe) whose sequence is complementary to the sought-after target. Exposure of the sensor to the sample containing the target results in the formation of the hybrid on the surface of the transducer. This strategy has been used for detecting a wide variety of microbial and viral pathogens. As a second approach, these biosensors monitor the interaction of small organic molecules with affinities for the immobilized single (ss) or double (ds) stranded DNA. As an example, an electrochemical technique suitable for the rapid and sensitive screening of the β -blocker atenolol has been proposed based on surface-stabilized bilayer lipid membranes (s-BLMs) composed from egg phosphatidylcholine (PC) and where ss-DNA has been incorporated for the interaction with the analyte [166]. The interactions of atenolol with the DNA modified s-BLMs produced electrochemical ion current increases that reproducibly appeared within a few seconds after the exposure of the membranes to the drug. The detection limit is $1.8 \mu\text{M}$ (for $S/N = 3$ and for noise levels of 7 nA) and has been applied in the determination of these compounds in pharmaceutical preparations.

2.8.4.2.5 Whole cells

Whole cell (bacteria, fungi, eukaryotic cells or yeast) biosensors examine the effects of the analyte on an intact microorganism. Although purified single molecules are attractive as sensing elements, their preparation can be expensive. In contrast whole living cells may be easily isolated from nature (river water, sediments, soil, activated sludge, etc.). Moreover, these whole living cells are less sensitive to inhibition by other compounds present on the matrix, are more tolerant to variations of the pH or the temperature and seem to have a longer lifetime. Living cells have been used to assess toxicity or to detect a given group of substances. The first approach is based on the fact that living cells provide information on the effects over the living systems. When speaking about pharmaceuticals, it is important to know the overall effect over a living system or organism. These types of sensors rely on measuring the change of certain biological parameters of the organisms exposed to analyte. Whole cell sensors have been developed with a variety of taxonomic groups such as invertebrates, fish, plants, algae and microorganisms; however, the latter group has provided the

TABLE 2.8.5
Reported biosensors for the detection of pharmaceuticals according the transducer classification

Electrochemical	Biorecognition element	Analyte	Sensitivity	Matrix	Time	Ref.	Miscellaneous
	<i>E. coli</i> (ATCC 11303)	Tetracycline	Possible detection $\leq 25 \mu\text{g/L}$	Milk samples	120 min	[176]	A miniaturized prototype tested suitable for field determination
	Penicillinase	Quinolone Penicillin G Ampicillin Amoxicillin	LOD $\sim 0.05 \mu\text{g}$	Suitable working buffer		[209]	Capacitive penicillin sensor based on a pH-sensitive electrolyte-insulator-semiconductor EIS sensor (Diffusion barrier)
	Penicillinase enzyme	Penicillin G	LOD $\sim 5 \mu\text{M}$	Suitable working buffer		[210]	Enzyme field-effect transistor (Enfet) pH-sensitive sensor
	Immobilised Penicillin Binding Protein (PBP)	Penicillin G	(LOD) $< \text{mg/kg}$	Milk	$< 7 \text{ min}$	[211]	Assay capable of distinguishing 10, 5, 0 mg/kg Penicillin G levels Assay reproducibility requires improvement
	Penicillinase membrane	Penicillin	0.05 mM	Aqueous solution		[157]	Sensor-based on a microarray electrode coated with pH-Responsive polypyrrole
	Double-stranded calf thymus DNA	Levofloxacin	LOD $25 \mu\text{g/ml}$	Urine		[212]	Modified carbon paste electrode with dsDNA for designing a sensitive biosensor for levofloxacin
	Polyphenol oxidase (PPO)	Paracetamol	LR 1.2×10^{-4} to $3.8 \times 10^{-3} \text{ M}$ LOD $8.8 \times 10^{-5} \text{ M}$	Pharmaceutical formulations (tablets)	70 s	[213]	<i>Persa</i> <i>Americana</i> source of PPO, -0.12 V reduction, chronopotentiometry, Vaseline carbon paste (graphite) WE Recovery 97.9-100.7%
	Prussian Blue (PB) - Indium Tin Oxide	Morphine (MO)	LOD 0.1 mM	Buffer, pH 5	60 s	[214]	Oxidation (+0.7V) of MO by PB mediator. PB acts as artificial peroxidase for MO. Discriminates Codeine (vs. similar)
	Diclofenac selective electrode (SE) with a PVC membrane incorporating cyclodextrin	Diclofenac	LOD $4 \times 10^{-6} \text{ M}$	Buffer & Pharmaceutical formulations (tablets)	Sequential Injection Analysis, $< 20 \text{ s}$	[215]	Sensitivity of LR $80 \mu\text{M}$ to 1 mM , Sensitivity of 16.8 mA/cm^2 per mM MO Potentiometric detection based on the formation of hexacypyridinium bromide complex with diclofenac 33 samples/hr Recoveries 99-101%

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

Nonroute clay	Codeine	LR 0.625–15 μM (R^2 , 0.989) LOD 0.15 μM	Buffer, pH 6, & *Urine *Pharmaceutical formulations (tablets)	<60 s	[216]	Square Wave Stripping Voltammetry & amperometry on a clay-modified screen-printed electrode in flow Pre-concentration time, 30 s Pre-concentration potential, -0.6 V Amperometric potential, +1.4 V Specificity not determined Organism immobilized to acetyl cellulose membrane
Recombinant <i>E. coli</i> (B-Lactamase)	Penicillin G Amoxicillin	5 mM	Fermentation Broth, milk	8 min	[169]	Detection based on changes in pH Specificity not determined Organism immobilised to flat pH electrode through a membrane. Detection based on changes in pH
Recombinant <i>E. coli</i> (B-Lactamase)	Cephalosporins (Cefamandole, Cefotaxime, Cefoperazone)	Cefamandole 0.4 mM	Aqueous Solution	3.5–11 min	[170]	BIACore biosensor based on SPR. Sample pre-treatment to increase the sensitivity
Commercial antibody against ampicillin	Penicillins	LOD Ampicillin: 88 & 12.5 $\mu\text{g/L}$ Penicillins G < 4 $\mu\text{g/L}$ Penicillins M < 30 $\mu\text{g/L}$	Milk		[217]	No cross-reactions with cephalosporins Percentages of OR with 8 penicillins were often higher in milk than in buffer
Monoclonal Antibodies against Digoxigenin	Benzylpenicillin	LOD 4 $\mu\text{g/kg}$	Milk	40 min (>80 samples a day)	[218]	Surface plasmon resonance biosensor. Use of the penicillin-binding protein PBP 2x*
Monoclonal antibody (MAb) against Sulfamethazine (21C7)	Sulfamethazine	LOD Sulfamethazine: 10 $\mu\text{g/mL}$	Chicken Serum	7 min	[219]	Optical biosensor (Biacore Q) used to develop a rapid biosensor immunoassay (BIA) Can detect eight Sulfonamides at comparable sensitivities (LODs 7–20 $\mu\text{g/mL}$).
Polyclonal Antibodies	Sulfamethazine (SMZ) Sulfadiazine (SDZ)	LOD SMZ: 0.015–0.028 $\mu\text{g/mL}$ SDZ: 0.028–0.052 $\mu\text{g/mL}$	Porcine Bile	Up to 650 bile samples per day	[220]	Prototype multi-channel SPR biosensor The instrument allows simultaneous analysis of eight samples for a single or multi analyte analysis
A binding protein of Sulfonamide derivative (Qflex® Kit)	Sulfonamides	16.8 $\mu\text{g/g}$	Porcine Muscle	ND	[221]	Generic Sulfonamide SPR Biosensor. No cross-reactivity with inactive acetylated metabolites

Optical

TABLE 2.8.5 (continued)

Biorecognition element	Analyte	Sensitivity	Matrix	Time	Ref.	Miscellaneous
True type of Anti-Sulfonamide Antibodies (Mab 21C7, Qflex and M.3.4.)	17 Sulfonamides	LOD (Mab 21C7): 7–1000 ng/mL (Qflex): 15–340 ng/mL (Mutant M.3.4): 4–82 ng/mL	Chicken Serum	8–10 min	[222]	Comparison of multi-sulfonamide biosensor immunoassays in an optical BIACORE Biosensor (Mab 21C7) was sensitive for the N4-areyl SA Qflex Kit detected 5 sulfonamides registered for application in poultry in Netherlands within the narrowest measurement range Inhibition assay based on antibiotic-immobilised sensor chip and SPR detection Tested against six sulfonamides Inhibition assay based on antibiotic-immobilised sensor chip and SPR detection Good correlation with HPLC method New inhibition assay based on indirect immobilisation of SMZ to a sensor (SPR) Good HPCL correlation except in 10 µg/kg levels Inhibition assay based on SDZ immobilized sensor chip and SPR detection Qflex™ Kit SPR-based biosensor system They immobilized the Ab in the sensor chip BiacoreQ SPR-based biosensor system They immobilized the Ab in the sensor chip BiacoreQ SPR-based biosensor system They immobilized the Ab in the sensor chip
Antibodies	Sulfamethazine	1.7 µg/kg	Raw milk	8–30 min	[223]	
Antibodies	Sulfamethazine	1 µg/kg ⁻¹	Raw milk	8–30 min	[224]	
Antibodies	Sulfamethazine (SMZ)	0.5 µg/kg	Raw milk	5 min	[156]	
Antibodies	Sulfadiazine (SDZ)	0.02 µg/mL	Pig bile	2 min	[225]	
Antibody Streptomycin	Streptomycin Dihydrostreptomycin	15–70 µg/kg Depend on the matrix	Whole Cows' milk, honey, pig kidney and pig muscle		[226]	
Polyclonal antibody	Tylosin	(CCβ) 2.5 µg/kg	Honey	10 s	[227]	
Antibody Chloramphenicol	chloramphenicol chloramphenicol glucuronide	(CCα) 0.005–0.04 µg/kg (CCβ) 0.02–0.07 µg/kg ⁻¹	poultry muscle, honey, prawn and cows' milk	180–480 s	[228]	

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

<i>E. coli</i> JM-108, pQE60-EGFP	Tetracycline Chloramphenicol	Working range 0-5 0-30 µg/L	Buffer	2 h	[228]	(HEMChip) Measured of Luminescence of enhanced green fluorescent protein
Polyclonal antibody (Rabbit)	Chloramphenicol		Buffer		[136]	Anti-chloramphenicol antibody immobilization optical waveguide
Liposomes (POPC) SPR sensor	Naproxen, Ketoprofen (16 in total)	RSD <1.5% LR 15.6-500 µM LOD ~10 µM	Buffer	120 s	[330]	lightmode spectroscopy (OWLS) Sensor regenerates very well (0.4% RSD)
Tyrosinase and 3 mM Besthorn's hydrazone (MBTH)	Paracetamol	LR 10 × 10 ⁻⁶ -1.4 × 10 ⁻³ M	Pharmaceutical formulations (tablets)	<60 s	[331]	UV/Vis at 443 nm Scan rate up to 1000 nm/min
Ru(bpy) ₃ ²⁺	Codeine	LOD 0.1 µM	*Buffer & Pharmaceutical formulations		[332]	Electrochemiluminescence (ECL) in both batch & flow modes with Pt interdigitated microelectrodes.
Ru(bpy) ₃ ²⁺	Codeine	LR 100 µM to 2 mM	Buffer & Pharmaceutical formulations (tablets)		[333]	+0.75 V vs pseudo ref. in flow mode Flow injection analysis mode with Pt electrodes at 750 mV
Antibodies	Estrone	IC50 = 0.60, 0.53 and 0.56 µg/L	Bidistilled water, river water and groundwater		[124]	RIANA system
Antibodies	Estrone Sulfathiazole	LOD 0.007 µg/L LOD 0.018 µg/L	Buffer		[125,126]	AWACSS system
Estrogen receptor	Estradiol	K _D = 2.33 × 10 ⁻¹⁰ M	Buffer		[68]	The ER binds estradiol-BSA with similar binding characteristic for free estradiol, as it can be showed with the K _D
Estrogen receptor	Estradiol, Estril	IC50 12.5 nM IC50 12.5 nM	Buffer		[334]	BiAcore biosensor
Anti-CAP antibody	Chloramphenicol		Buffer		[335]	Anti-chloramphenicol antibody immobilization piezoelectric quartz crystal microbalance measurement (QCM) On Develop
Polyclonal Antibody (Rabbit)	Chloramphenicol	LOD 10 ⁻⁵ M	Buffer	10 min	[136]	Anti-chloramphenicol antibody immobilization piezoelectric quartz crystal microbalance measurement (QCM)

Mass sensitive

J.-P. Salvador et al.

most rapid, direct and sensitive approaches. Sensors based on the use of microorganisms are often named *microbial biosensors* and are usually based on direct or indirect measurement of bioprocesses such as the transformation rate of the carbon, nitrogen or sulfur, enzyme activity, growth, mortality, oxygen consumption or luminescence. Cells with a given type of receptor can be considered as sensors for agonists, although biosensors based on measuring enzyme inhibition have also been described. The reason because bacteria cells have been often used as sensing elements in biosensor field is that they can be genetically engineered to respond to specific substances [167]. This strategy has opened up new specificities and sensor possibilities. However, specific biosensors have also been reported based on the use of the genes responsible of resistance mechanisms. Microorganisms have evolved a variety of mechanisms that allow them to survive and grow in contaminated environments. The resistance implies the ability of the cell to exclude the toxic by the membrane, sequestration of metals, chemical modification to a less toxic form, etc. The genes responsible of these resistance mechanisms are organized in operons, usually found on plasmids carried by the resistant bacteria. In many cases, these plasmids confer resistance to one or more toxic substances. Because of the specificity of these regulation mechanisms, the promoters and regulatory genes can be used to construct promoter-reporter-gene fusion for specific biosensors. Non-specific biosensors have also been developed based on the heat-shock or stress-response. Exposure to heat, toxic compounds or heavy metals may induce the expression of stress-response genes linked to stress promoters. Induction of bioluminescent proteins or enzymes that can be detected electrochemically using an electrode or a chemiluminescent substrate allows development of biosensing devices. However, some limitations inherent to microbial sensors are the need of longer response time than enzymes do, and the fact that selectivity is more difficult to accomplish than with single enzymes, due to the variety of metabolic processes occurring on a living cell.

A microbial biosensor for the antihypertensive agent enalapril maleate has been reported based on the use of *Bacillus subtilis* cells. The biosensor measures the acceleration of respiration during specific metabolic pathways of this drug. It has been applied, with good results, for determination of the active ingredient in the pharmaceutical tablet formulations [168]. Microbial cells can also be the recognition element of a biosensor configuration to monitor environmental chemical contaminants. The bacteria used is genetically modified to produce a

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

recombinant organism (i.e. *E. coli*) which can exhibit different traits such as expression of cellular degradative enzymes, specific binding proteins or a reporter enzyme. Several examples of this type of biosensors are described to detect β -lactam antibiotics using a degradative enzyme (β -lactamase) as the recognition element. Penicillin and amoxicillin can be detected in milk, in 8 min, by means of the immobilization of the organism to acetyl cellulose membrane and measuring change in pH. The sensitivity described is around 5 mM [169]. Again, the change of extracellular pH observed in the transduction part of another sensor is also used as a signal for analysing some cephalosporins (cefamandole, cefotaxime and cefoperazone) in aqueous solution. Time required is around 10 min with range of sensitivity 0.1–1 mM depending of the compound [170].

2.8.4.2.6 *Biomimetic receptors*

Biomimetic biosensors employ non-biological receptors that mimic behaviour of natural biomolecules. That is the case of the molecularly imprinted polymers (MIPs) [171]. As an example, a voltammetric sensor for the β -blocker albuterol was investigated where the micro-fabrication techniques have been combined with molecular imprinting to construct on-chip devices using photoirradiation of cross-linkable polymers [172]. In this case, a selective MIP was coated as a thin film onto the gold working electrode on chip and the analyte was directly quantified by differential pulse voltammetric measurements. There have been also some examples that use other types of synthetic receptors for the determination of pharmaceuticals. Thus, a potentiometric quasi-array detection system consisting in seven polyvinyl chloride (PVC) based liquid membrane electrodes has been developed to screen libraries of β -adrenergic and β -blocking chiral drugs. Five calix[6]arene derivatives and one modified calyx[4]resorcinarene were used as neutral ionophores to compose mentioned set of PVC-based electrodes [173]. Similarly, five PVC matrix membrane sensors based on the use of the ion-association complexes of the β -blocker cations with tungstophosphate anion as electroactive materials have been developed for the analysis of β -blockers (atenolol, bisoprolol, metoprolol, propranolol and timolol) in some pharmaceutical preparations [174]. Sensors reveal fast, stable and near-Nernstian response in the interval between 10^{-2} and 2×10^{-7} M for different β -blockers and also over a wide range pH values. Many inorganic and organic cations as well as drug excipients and diluents normally used in drug formulations do not interfere.

J.-P. Salvador et al.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Ministry of Science and Technology (Contract numbers AGL2005-07700-C06-01 and TEC2004-0121-E) and by the European Community (IST-2003-508774). The AMR group is a recognized Grup de Recerca by the Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2005SGR 00207).

REFERENCES

- 1 K. Kummerer, *Chemosphere*, 45 (2001) 957–969.
- 2 B. Halling-Sorensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten-Lutzhoft and S.E. Jorgensen, *Chemosphere*, 36 (1998) 357–393.
- 3 T. Heberer, *Toxicol. Lett.*, 131 (2002) 5–17.
- 4 O.A. Jones, N. Voulvoulis and J.N. Lester, *Environ. Technol.*, 22 (2001) 1383–1394.
- 5 R. Andreozzi, M. Raffaele and P. Nicklas, *Chemosphere*, 50 (2003) 1319–1330.
- 6 C. Daughton and T. Ternes, *Environ. Health Persp.*, 107 (1999) 907–937.
- 7 C. Daughton and T. Jones-Leep, *ACS Symp. Ser.*, 791 (2001) 39–54.
- 8 J. Koschorreck, C. Koch and I. Ronnefahrt, *Toxicol. Lett.*, 131 (2002) 117–124.
- 9 VICH, in, 2000 European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, UK.
- 10 G.G. Ying, R.S. Kookana and Y.-J. Ru, *Environ. Int.*, 28 (2002) 545–551.
- 11 T.A. Ternes, *Water Res.*, 32 (1998) 3245–3260.
- 12 D.R. Dietrich, S.F. Webb and T. Petry, *Toxicol. Lett.*, 131 (2002) 1–3.
- 13 F.M. Christensen, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 28 (1998) 212–221.
- 14 A.R. Mire-Sluis, R. Gaines Das and A. Padilla, *J. Immunol. Methods*, 216 (1998) 103–116.
- 15 T. Zemlo, R. Rothrock, N. Karle and R. Street, *The Science Advisory Board*.
- 16 EPA, <http://www.epa.gov/region01/oarm/testmeth.pdf> (2003).
- 17 I.E. Tothill and A.P.F. Turner, *TrAC Trend Anal. Chem.*, 15 (1996) 178–188.
- 18 M. Farre, R. Brix and D. Barcelo, *TrAC Trend Anal. Chem.*, 24 (2005) 532–545.
- 19 L. da Silveira Ev and E.E.S. Schapoval, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 27 (2002) 91–96.
- 20 J.A. Bernabeu, M.A. Camacho, M.E. Gil-Alegre, V. Ruz and A.I. Torres-Suarez, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 21 (1999) 347–353.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

- 21 J. Nouws, H. van Egmond, I. Smulders, G. Loeffen, J. Schouten and H. Stegeman, *Int. Dairy J.*, 9 (1999) 85–90.
- 22 H.R.N. Salgado, C.C.G.O. Lopes and M.B.B. Lucchesi, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 443–446.
- 23 M.J.e. Souza, C.F. Bittencourt and P.d.S.e.S Filho, *Int. J. Pharm.*, 271 (2004) 287–291.
- 24 A. Montero, R.L. Althaus, A. Molina, I. Berruga and M.P. Molina, *Small Ruminant Res.*, 57 (2005) 229–237.
- 25 M.P. Molina, R.L. Althaus, A. Molina and N. Fernandez, *Int. Dairy J.*, 13 (2003) 821–826.
- 26 L. Okerman, K.D. Wasch and J.V. Hoof, *Analyst*, 123 (1998) 2361–2365.
- 27 L.H. Hansen, F. Aarestrup and S.J. Sorensen, *Vet. Microbiol.*, 87 (2002) 51–57.
- 28 M.T. Korpela, J.S. Kurittu, J.T. Karvinen and M.T. Karp, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4457–4462.
- 29 T. Pellinen, G. Bylund, M. Virta, A. Niemi and M. Karp, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 4812–4815.
- 30 T. Pellinen, T. Huovinen and M. Karp, *Anal. Biochem.*, 330 (2004) 52–57.
- 31 A.M. Soto, J.M. Calabro, N.V. Prechtel, A.Y. Yau, E.F. Orlando, A. Daxenberger, A.S. Kolok, L.J. Guillette, B. le Bizec, I.G. Lange and C. Sonnenschein, *Environ. Health Persp.*, 112 (2004) 346.
- 32 E.J. Routledge and J.P. Sumpter, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 (1996) 241–248.
- 33 A.C. Gutleb, I.A.T.M. Meerts, J.H. Bergsma, M. Schriks and A.J. Murk, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19 (2005) 231–238.
- 34 M. Fukuzawa, J. Satoh, S. Ohta, K. Takahashi, S. Miyaguchi, X.L. Qiang, Y. Sakata, T. Nakazawa, Y. Takizawa and T. Toyota, *Immunopharmacology*, 48 (2000) 65–74.
- 35 L.B. Tan, J.G. Burniston, W.A. Clark, Y. Ng and D.F. Goldspink, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 41 (2003) 518–525.
- 36 L.A.A. de Jong, D.R.A. Uges, J.P. Franke and R. Bischoff, *J. Chromatogr. B*, 829 (2005) 1–25.
- 37 L. Aaltonen and M. Scheinin, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*, 50 (1982) 206.
- 38 P. Hunt, J.M. Husson and J.P. Raynaud, *J. Pharm. Pharmacol.*, 31 (1979) 448.
- 39 K. Ensing, D.A. Bloemhof, W.G.i.t. Hout, J.v.d. Lende and R.A.d. Zeeuw, *Pharm. Res.*, 5 (1988) 283.
- 40 I. Creese and S.H. Snyder, *Nature*, 270 (1977) 180.
- 41 W. Sadee, D.C. Perry, J.S. Rosenbaum and A. Herz, *Eur. J. Pharmacol.*, 81 (1982) 431.
- 42 P. Odou and V. Cánovas Gustavo, *Clin. Drug Invest.*, 19 (2000) 283–292.
- 43 G.G. Belz, *Blood Pressure*, 10 (2001) 13–18.

J.-P. Salvador et al.

- 44 G.G. Belz, R. Butzer, S. Kober, C. Mang and E. Mutschler, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 66 (1999) 367–373.
- 45 N. Bosworth and P. Towers, *Nature*, 341 (1989) 167.
- 46 S. Udenfriend, L. Gerber and N. Nelson, *Anal. Biochem.*, 161 (1987) 494.
- 47 R.T. McCabe, B.R.d. Costa, R.L. Miller, R.H. Havunjian, K.C. Rice and P. Skolnick, *J. FASEB*, 4 (1990) 2934–2940.
- 48 T. Takeuchi, T. Nishikawa, R. Matsukawa and J. Matsui, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2655–2658.
- 49 B. Ilien, C. Franchet, P. Bernard, S. Morisset, C.O. Weill, J.J. Bourguignon, M. Hibert and J.L. Galzi, *J. Neurochem.*, 85 (2003) 768–778.
- 50 H.S.J. Hang, D. Li, Y. Liao, D. Lian, Y. Xiao and H. Xue, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18818; *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18818–18823.
- 51 K.D. Pflieger and K.A. Eidne, *Pituitary*, 6 (2003) 141–151.
- 52 E.G. Milligan, *J. Pharm. Sci.*, 21 (2004) 397–405.
- 53 S. Angers, A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairet, D. Chelsky, M. Dennis and M. Bouvier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2000) 3684–3689.
- 54 N. Boute, R. Jockers and T. Issad, *Trends Pharmacol. Sci.*, 23 (2002) 351–354.
- 55 T. Issad, N. Boute and K. Pernet, *Biochem. Pharmacol.*, 64 (2002) 813–817.
- 56 S. Kohler, S. Belkin and R.D. Schmid, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 769–779.
- 57 M. Allen, J. Reeves and G. Mellor, *J. Biomol. Screen.*, 5 (2000) 63–69.
- 58 A.P. Tairi, R. Hovius, H. Pick, H. Blasey, A. Bernard, A. Surprenant, K. Lundstrom and H. Vogel, *Biochemistry*, 37 (1998) 15850–15864.
- 59 J. Mellentin-Michelotti, L.T. Evangelista, E.E. Swartzman, S.J. Miraglia, W.E. Werner and P.M. Yuan, *Anal. Biochem.*, 272 (1999) 182–190.
- 60 E.F. Ullman, H. Kirakossian, A.C. Switchenko, J. Ishkanian, M. Ericson, C.A. Wartchow, M. Pirio, J. Pease, B.R. Irvin, S. Singh, R. Singh, R. Patel, A. Dafforn, D. Davalian, C. Skold, N. Kurn and D.B. Wagner, *Clin. Chem.*, 42 (1996) 1518–1526.
- 61 N. Rouleau, S. Turcotte, M.H. Mondou, P. Roby and R. Bosse, *J. Biomol. Screen.*, 8 (2003) 191–197.
- 62 P.C. Simons, S.M. Biggs, A. Waller, T. Foutz, D.F. Cimino, Q. Guo, R.R. Neubig, W.J. Tang, E.R. Prossnitz and L.A. Sklar, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 13514–13521.
- 63 A. Waller, P. Simons, E.R. Prossnitz, B.S. Edwards and L.A. Sklar, *Comb. Chem. High T. Scr.*, 6 (2003) 389–397.
- 64 M.-L. Scippo, C.V.D. Weerd, P. Willemsen, J.-M. Francois, F. Rentier-Delrue, M. Muller, J.A. Martial and G. Maghuin-Rogister, *Anal. Chim. Acta*, 473 (2002) 135–141.
- 65 E.R.S. Bauer, N. Bitsch, H. Brunn, H. Sauerwein and H.H.D. Meyer, *Chemosphere*, 46 (2002) 1107–1115.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

- 66 E.R.S. Bauer, H.H.D. Meyer, P. Stahlschmidt-Allner and H. Sauerwein, *Analyst*, 123 (1998) 2485–2487.
- 67 S.C. Maness, D.P. McDonnell and K.W. Gaido, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 151 (1998) 135–142.
- 68 M. Seifert, S. Haindl and B. Hock, *Anal. Chim. Acta*, 386 (1999) 191–199.
- 69 W. Li, M. Seifert, Y. Xu and B. Hock, *Environ. Int.*, 30 (2004) 329–335.
- 70 M. Seifert, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 684–687.
- 71 W. Li, M. Seifert, Y. Xu and E. Hock, *Fresen. Environ. Bull.*, 15 (2006) 74–79.
- 72 UCB-Bioproducs, <http://www.ucbfooddx.com/appben/betastar.htm#test%20kit%20sensitivities>.
- 73 M. Rosner, J. Grassman and R. Haas, *Environ. Health Persp.*, 94 (1991) 131–134.
- 74 M.G. Weller, *Fresen. J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 635–645.
- 75 M.-C. Estévez, H. Font, M. Nichkova, J.-P. Salvador, B. Varela, F. Sánchez-Baeza and M.-P. Marco, Immunochemical determination of pharmaceuticals and personal care products as emerging pollutants. In: D. Barceló (Ed.), *Emerging Organic Pollutants in Waste Waters and Sludge*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005, pp. 181–244.
- 76 M.-C. Estévez, H. Font, M. Nichkova, J.-P. Salvador, B. Varela, F. Sánchez-Baeza and M.-P. Marco, Immunochemical determination of industrial emerging pollutants. In: D. Barceló (Ed.), *Emerging Organic Pollutants in Waste Waters and Sludge*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005, pp. 119–180.
- 77 A. Oubiña, B. Ballesteros, P. Bou Carrasco, R. Galve, J. Gascón, F. Iglesias, N. Sanvicens and M.P. Marco, Immunoassays for environmental analysis. In: D. Barcelo (Ed.), *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance*, Elsevier Science B.V, Amsterdam, 1999, pp. 287–339.
- 78 M.-C. Hennion and D. Barcelo, *Anal. Chim. Acta*, 362 (1998) 3–34.
- 79 G.S. Nunes, I.A. Toscano and D. Barcelo, *TrAC Trend Anal. Chem.*, 17 (1998) 79–87.
- 80 T.J. Campbell and K.M. Williams, *British J. Clin. Pharmacol.*, 52 (2001) 21S–34S.
- 81 K. Matalka, T. Arafat, M. Hamad and A. Jehanli, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 16 (2002) 237–244.
- 82 K. Matalka, T. El-Thaher, M. Saleem, T. Arafat, A. Jehanli and A. Badwan, *J. Clin. Lab. Anal.*, 15 (2001) 47–53.
- 83 J. Cooper, P. Delahaut, T.L. Fodey and C.T. Elliott, *Analyst*, 129 (2004) 169–174.
- 84 E.R. Campagnolo, K.R. Johnson, A. Karpati, C.S. Rubin, D.W. Kolpin, M.T. Meyer, J.E. Esteban, R.W. Currier, K. Smith, K.M. Thu and M. McGeehin, *Sci. Total Environ.*, 299 (2002) 89–95.
- 85 R. Verheijen and W. Haasnoot, *Analyst*, 123 (1998) 2437.

J.-P. Salvador et al.

- 86 Biopharm AG. RIDASCREEN (IA kit). <http://www.r-biopharm.com>
- 87 R. Draisci, F.d. Quadri, L. Achene, G. Volpe, L. Palleschia and G. Palleschib, *Analyst*, 126 (2001) 1942–1946.
- 88 S. Bucknallt, J. Silverlightt, N. Coldhamt, L. Thorne and R. Jackmant, *Food Addit. Contam.*, 20 (2003) 221–228.
- 89 H. Watanabe, A. Satake, Y. Kido and A. Tsuji, *Analyst*, 127 (2002) 98–103.
- 90 E. VanCoillie, J. DeBlock and W. Reybroeck, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 4975–4978.
- 91 J. Duan and Z. Yuan, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 1087–1089.
- 92 E. Schneider, E. Usleber, R. Dietrich, E. Maertlbauer and G. Terplan, Rapid detection of chloramphenicol in raw milk by enzyme-linked immunofiltration and dipstick assay. In: N. Haagsma and A. Ruitter (Eds.), *Proceedings of the EuroResidues II Conference “Residues of Veterinary Drugs in Food”*, Veldhoven, Netherlands, 1993, pp. 627–631.
- 93 C.-H. Huang and D.L. Sedlak, *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 (2001) 133–139.
- 94 G.W. Aherne, J. English and V. Marks, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 9 (1985) 79–83.
- 95 P. Onnerfjord, S. Eremin, J. Emneus and G. Markovarga, *J. Immunol. Methods*, 213 (1998) 31–39.
- 96 A. Reiter, J. Hake, C. Meissner, J. Rohwer, H.J. Friedrich and M. Oehmichen, *Foren. Sci. Int.*, 119 (2001) 248–253.
- 97 S.A. Eremin, I.A. Ryabova, J.N. Yakovleva, E.V. Yazynina, A.V. Zherdev and B.B. Dzantiev, *Anal. Chim. Acta*, 468 (2002) 229–236.
- 98 E. Benito-Peña, M.C. Moreno-Bondi, G. Orellan, A. Maquieira and A.v. Amerongen, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 6635–6642.
- 99 M. Höferl, S. Krist and G. Buchbauer, *Archiv der Pharmazie*, 338 (2005) 493–497.
- 100 S. Rodriguez-Mozaz, M.-P. Marco, M.J. Lopez de Alda and D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 588–598.
- 101 M.-P. Marco and D. Barcelo, Immunosensors for environmental analysis. In: D. Barceló (Ed.), *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants. Techniques, Applications and Quality Assurance*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2000, pp. 1075–1103.
- 102 S. Girousi, *Sci. Pap. U. Pardubice, Ser. A: Fac. Chem. Technol*, 8 (2002) 5–17.
- 103 K. Durick and P. Negulescu, *Biosens. Bioelectron.*, 16 (2001) 587–592.
- 104 D.J. Monk and D.R. Walt, *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004) 931–945.
- 105 J.P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K.C. Honeychurch and R.M. Pemberton, *Anal. Lett.*, 37 (2004) 789–830.
- 106 K.K. Jain, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 3 (2003) 153–161.
- 107 I.M. Christie, P.H. Treloar, Z.B. Koochaki, P.M. Vadgama and G.N. Smith, *Anal. Chim. Acta*, 257 (1992) 21–28.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

- 108 Y. Xu, H.B. Halsall and W.R. Heineman, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 7 (1989) 1301–1311.
- 109 R.Q. Thompson, G.C. Barone III, H.B. Halsall and W.R. Heineman, *Anal. Biochem.*, 192 (1991) 90–95.
- 110 I. Rosen and J. Rishpon, *J. Electroanal. Chem.*, 258 (1989) 27–39.
- 111 O. Niwa, Y. Xu, H.B. Halsall and W.R. Heineman, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1559–1563.
- 112 B. Lu, M. Smyth, J. Quinn, D. Bogan and R. O’Kennedy, *Electroanalysis*, 8 (1996) 619–622.
- 113 D.J. Pritchard, H. Morgan and J.M. Cooper, *Anal. Chim. Acta*, 310 (1995) 251–256.
- 114 T. Kaláb and P. Skládál, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 361–368.
- 115 B. Deasy, E. Dempsey, M. Smyth, D. Egan, D. Bogan and R. O’Kennedy, *Anal. Chim. Acta*, 294 (1994) 291.
- 116 B.B. Dzantiev, A.V. Zherdev, M.F. Yulaev, R.A. Sitdikov, N.M. Dmitrieva and I.Y. Moreva, *Biosens. Bioelectron.*, 11 (1996) 179–185.
- 117 D. Ivnitiski and J. Rishpon, *Biosens. Bioelectron.*, 11 (1996) 409–417.
- 118 D.V. Brown and M.E. Meyerhoff, *Biosens. Bioelectron.*, 6 (1991) 615.
- 119 S. Joseph, J.F. Rusling, Y.M. Lvov, T. Friedberg and U. Fuhr, *Biochem. Pharmacol.*, 65 (2003) 1817–1826.
- 120 A.J. Marshall, D.S. Young, J. Blyth, S. Kabilan and C.R. Lowe, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 1518–1523.
- 121 E. Katz and I. Willner, *Electroanalysis*, 15 (2003) 913–947.
- 122 K. Yagiuda, A. Hemmi, S. Ito, Y. Asano, Y. Fushinuki, C.-Y. Chen and I. Karube, *Biosens. Bioelectron.*, 11 (1996) 703–707.
- 123 A.F. Collings and F. Caruso, *Rep. Prog. Phys.*, 60 (1997) 1397–1445.
- 124 S. Rodriguez-Mozaz, S. Reder, M. Lopez de Alda, G. Gauglitz and D. Barcelo, *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2004) 633–640.
- 125 J. Tschmelak, G. Proll, J. Riedt, J. Kaiser, P. Kraemmer, L. Barzaga, J.S. Wilkinson, P. Hua, J.P. Hole and R. Nudd, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 1499–1508.
- 126 J. Tschmelak, G. Proll, J. Riedt, J. Kaiser, P. Kraemmer, L. Barzaga, J.S. Wilkinson, P. Hua, J.P. Hole and R. Nudd, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 1509–1519.
- 127 F.F. Bier and R.D. Schmid, *Biosens. Bioelectron.*, 9 (1994) 125–130.
- 128 F.F. Bier, R. Jockers and R.D. Schmid, *Analyst*, 119 (1994) 437–441.
- 129 A. Akkoyun and U. Bilitewski, *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 655–664.
- 130 G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381 (2005) 141–155.
- 131 S.H. Hsu and Y.T. Huang, *J. Lightwave Technol.*, 23 (2005) 4200–4206.
- 132 S.H. Hsu and Y.T. Huang, *Opt. Lett.*, 30 (2005) 2897–2899.
- 133 F. Prieto, B. Sepulveda, A. Calle, A. Llobera, C. Dominguez and L.M. Lechuga, *Sens. Actuat. B-Chem.*, 92 (2003) 151–158.
- 134 B.J. Luff, J.S. Wilkinson, J. Piehler, U. Hollenbach, J. Ingenhoff and N. Fabricius, *J. Lightwave Technol.*, 16 (1998) 583–592.

J.-P. Salvador et al.

- 135 E. Ehrentreich-Forster, F.W. Scheller and F.F. Bier, *Biosens. Bioelectron.*, 18 (2003) 375–380.
- 136 N. Adanyi, M. Varadi, N. Kim and I. Szendro, *Curr. Appl. Phys.*, 6 (2006) 279–286.
- 137 A.J. Haes and R.P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 10596–10604.
- 138 A.D. McFarland and R.P. Van Duyne, *Nano Letts*, 3 (2003) 1057–1062.
- 139 A.J. Haes, W. Paige Hall, L. Chang, W.L. Klein and R.P. Van Duyne, *Nano Letts*, 4 (2004) 1029–1034.
- 140 G. Raschke, S. Kowarick, T. Franzl, C. Sönnichsen, T.A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl and K. Kurzinger, *Nano Letts*, 3 (2003) 935–938.
- 141 L.A. Lyon, M.D. Musick, P.C. Smith, B.D. Reiss, D.J. Peña and M.J. Natan, *Sens. Actuat. B*, 54 (1999) 118–124.
- 142 F. Frederix, J.M. Friedt, K.H. Choi, W. Laureyn, A. Campitelli, D. Mondelaers, G. Maes and G. Borghs, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6894–6900.
- 143 M.P. Kreuzer, R. Quidant, G. Badenes and M.-P. Marco, *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2006) 1345–1349.
- 144 N. Kinrot, *J. Lightwave Technol.*, 22 (2004) 2296–2301.
- 145 P. Adam, J. Dostalek and J. Homola, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 113 (2006) 774–781.
- 146 P. Leonard, S. Hearty, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty and R. O’Kennedy, *Enzy. Microb. Technol.*, 32 (2003) 3–13.
- 147 J. Tamayo, M. Alvarez and L.M. Lechuga, *Sens. Actuat. B*, 89 (2003) 33–39.
- 148 A.M. Moulin, S.J. O’Shea and M.E. Welland, *Ultramicroscopy*, 82 (2000) 23–31.
- 149 H.P. Lang, M.K. Baller, R. Berger, C. Gerber, J.K. Gimzewski, F.M. Battiston, P. Fornaro, J.P. Ramseyer, E. Meyer and H.J. Güntherodt, *Anal. Chim. Acta*, 393 (1999) 59–65.
- 150 K. Ramanathan and B. Danielsson, *Biosens. Bioelectron.*, 16 (2001) 417–423.
- 151 D.J. Monk and D.R. Walt, *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004) 931–945.
- 152 M.D. Rubianes and G.A. Rivas, *Electroanalysis*, 17 (2005) 73–78.
- 153 M. Trojanowicz, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1311–1328.
- 154 M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci and S. Alegret, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 69 (2000) 153–163.
- 155 P.U. Abel, T. von Woedtke, B. Schulz, T. Bergann and A. Schwock, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 7 (1999) 93–100.
- 156 M.R.S. Fuh, L.W. Burgess and G.D. Christian, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 433–435.
- 157 M. Nishizawa, T. Matsue and I. Uchida, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2642–2644.
- 158 R.I. Stefan, H.Y. Aboul-Enein and G.L. Radu, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 28 (1998) 305–312.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

- 159 R.I. Stefan, J.K.F. van Staden and H.Y. Aboul-Enein, *Electroanalysis*, 11 (1999) 1233–1235.
- 160 R.I. Stefan, J.F. van Staden, C. Bala and H.Y. Aboul-Enein, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 36 (2004) 889–892.
- 161 E. Gustavsson, P. Bjurling and A. Sternesjo, *Anal. Chim. Acta*, 468 (2002) 153–159.
- 162 R.J. Whelan, T. Wohland, L. Neumann, B. Huang, B.K. Kobilka and R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4570.
- 163 S. Devanathan, Z. Yao, Z. Salamon, B. Kobilka and G. Tollin, *Biochemistry*, 43 (2004) 3280–3288.
- 164 R. Hovius, E.L. Schmid, A.P. Tairi, H. Blasey, A.R. Bernard, K. Lundstrom and H. Vogel, *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 19 (1999) 533–545.
- 165 E.L. Schmid, A.P. Tairi, R. Hovius and H. Vogel, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1331–1338.
- 166 D.P. Nikolelis, S.S.E. Petropoulou and M.V. Mitrokotsa, *Bioelectrochemistry*, 58 (2002) 107–112.
- 167 S. Ramanathan, M. Ensor and S. Daunert, *Trends Biotech.*, 15 (1997) 500–506.
- 168 S. Fleschin, C. Bala, A.A. Bunaciu, A. Panait and H.Y. Aboul-Enein, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 28 (1998) 261–269.
- 169 R.A. Lovett, *Inside Lab. Manage.*, 2 (1998) 12.
- 170 J.L. García, C.J. Nuñez, E.G. González, J. Osuna, X. Soberón and E. Galindo, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 73 (1998) 243.
- 171 K. Haupt, Molecularly imprinted polymers as recognition elements in sensors. In: V.M. Mirsky (Ed.), *Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors*, Springer-Verlag, Germany, 2004.
- 172 H.C. Huang, C.I. Lin, A.K. Joseph and Y.D. Lee, *J. Chromatogr. A*, 1027 (2004) 263–268.
- 173 G. Bazylak, L.J. Nagels and H.J. Geise, *Combinat. Chem. High T. Scr.*, 7 (2004) 345–359.
- 174 S.S.M. Hassan, M.M. Abou-Sekkina, M.A. El-Ries and A.A. Wassel, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 32 (2003) 175–180.
- 175 L.H. Hansen and S.J. Sorensen, *FEMS Microbiol. Lett.*, 190 (2000) 273–278.
- 176 G.E. Pellegrini, G. Carpico and E. Coni, *Anal. Chim. Acta*, 520 (2004) 13–18.
- 177 M. Farre and D. Barcelo, *TrAC Trend Anal. Chem.*, 22 (2003) 299–310.
- 178 M. Cleuvers, *Toxicol. Lett.*, 142 (2003) 185–194.
- 179 B. Ferrari, N. Paxeus, R.L. Giudice, A. Pollio and J. Garric, *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 55 (2003) 359–370.
- 180 M. Isidori, M. Lavorgna, A. Nardelli, A. Parrella, L. Previtiera and M. Rubino, *Sci. Total Environ.*, 348 (2005) 93–101.
- 181 P. Cliquet, E. Cox, W. Haasnoot, E. Schacht and B.M. Goddeeris, *Anal. Chim. Acta*, 494 (2003) 21–28.

J.-P. Salvador et al.

- 182 M.T. Muldoon, S.A. Buckley, S.S. Deshpande, C.K. Holtzaple, R.C. Beier and L.H. Stanker, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 545.
- 183 W. Heering, E. Usleber, R. Dietrich and E. Martlbauer, *Analyst*, 123 (1998) 2759.
- 184 B. Lang, E. Maertlbauer and G. Terplan, *Arch. Lebensmittelhyg*, 43 (1992) 77.
- 185 M. Matsumoto, K. Tsunematsu, A. Tsuji and Y. Kido, *Anal. Chim. Acta*, 346 (1997) 207–213.
- 186 Z. Yuan, J. Duan, S. Fan and K. Kong, *Food Agric. Immunol*, 13 (2001) 199–204.
- 187 C.K. Holtzaple, S.A. Buckley and L.H. Stanker, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 1984–1990.
- 188 R.C. Beier, L.C. Creemer, R.L. Ziprin and D.J. Nisbet, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 9679–9688.
- 189 R.C. Yao and D.F. Mahoney, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (1989) 1507–1511.
- 190 L. Lynas, D. Currie, C.T. Elliott, J.D.G. McEvoy and S.A. Hewitt, *Analyst*, 123 (1998) 2773.
- 191 C. Van de Water, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73 (1990) 534–540.
- 192 H. Keukens, *J. AOAC Int.*, 75 (1992) 245–257.
- 193 S. Impens, W. Reybroeck, J. Verammen, D. Courtheyn, S. Ooghe, K. De Wasch, W. Smedts and H. De Brabander, *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 153–163.
- 194 P.N. Rao and I.B. Taraporewala, *Steroids*, 57 (1992) 154–161.
- 195 H.W. Hagedorn, R. Schulz and G. Jaeschke, *Biomed. Chromatogr.*, 8 (1994) 63–68.
- 196 N.J. Barrett, A.T. Kicman, S. Bansal and D.A. Cowan, *Pharm. Sci.*, 1 (1995) 87–89.
- 197 R.J. McConnell, S.P. Fitzgerald and J.V. Lamont, *Food Saf. Qual. Assur.: Appl. Immunoassay Syst., Proc.*, 1st (1992) 245–250.
- 198 W.N. Sawaya, K.P. Lone, A. Husain, B. Dashti and S. Al-Zenki, *Food Chem*, 63 (1998) 563–569.
- 199 P.W. Tang, D.L. Crone, C.S. Chu, H.K. Yeung and K. Chan, *Anal. Chim. Acta*, 275 (1993) 139–146.
- 200 F. Valentini, D. Compagnone, A. Gentili and G. Palleschi, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 127 (2002) 1333–1337.
- 201 M.S. Preti, S. Lodi, P. Busacchi, M. Filicori and C. Flamigni, *Steroids*, 43 (1984) 469–479.
- 202 B. Saha and C. Das, *J. Immunoassay*, 12 (1991) 391–412.
- 203 A. Basu and T.G. Shrivastav, *J. Immunoassay*, 21 (2000) 39–50.
- 204 M.L. Rodriguez, I. McConnell, J. Lamont, J. Campbell and S.P. Fitzgerald, *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 119 (1994) 2631–2634.
- 205 L.M. Ribeiro Neto, H.S. Spinosa and M.C. Salvadori, *J. Anal. Toxicol.*, 21 (1997) 393–396.

Application of bioassays/biosensors and analysis of pharmaceuticals

- 206 M.-L. Scippo, C. Argiris, C.c. Van De Weerd, M. Muller, P. Willemssen, J. Martial and G. Maghuin-Rogister, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 664–669.
- 207 J. Legler, C. van den Brink, A. Brouwer, A. Murk, P. van der Saag, A. Vethaak and B. van der Burg, *Toxicol. Sci.*, 48 (1999) 55–66.
- 208 H. Fang, W. Tong, W.S. Branham, C.L. Moland, S.L. Dial, H. Hong, Q. Xie, R. Perkins, W. Owens and D.M. Sheehan, *Chem. Res. Toxicol.*, 16 (2003) 1338–1358.
- 209 A. Poghosian, M. Thust, M.J. Schöning, M. Müller-Veggian, P. Kordos and H. Lüth, *Sensor. Actuat. B*, 68 (2000) 260–265.
- 210 A. Poghosian, M.J. Schöning, P. Schroth, A. Simonis and H. Lüth, *Sensor. Actuat. B*, 76 (2001) 519–526.
- 211 S.J. Setford, R.M. Van Es, Y.J. Blankwater and S. Kroger, *Anal. Chim. Acta*, 398 (1999) 13–22.
- 212 A. Radi, M.A. El Ries and S. Kandil, *Anal. Chim. Acta*, 495 (2003) 61–67.
- 213 O. Fatibello-Filho, K.O. Lupetti and I.C. Vieira, *Talanta*, 55 (2001) 685–692.
- 214 K.-C. Ho, C.-Y. Chen, H.-C. Hsu, L.-C. Chen, S.-C. Shiesh and X.-Z. Lin, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2004) 3–8.
- 215 M. Shamsipur, F. Jalali and S. Ershad, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 37 (2005) 943–947.
- 216 Y. Shih, J.-M. Zen and H.-H. Yang, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 29 (2002) 827–833.
- 217 V. Gaudin, J. Fontaine and P. Maris, *Anal. Chim. Acta*, 436 (2001) 191–198.
- 218 G. Cacciatore, M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck and A.A. Bergwerff, *Anal. Chim. Acta*, 520 (2004) 105–115.
- 219 W. Haasnoot, M. Bienenmann-Ploum and F. Kohen, *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 171–180.
- 220 C. Situ, S.R.H. Crooks, A.G. Baxter, J. Ferguson and C.T. Elliott, *Anal. Chim. Acta*, 473 (2002) 143–149.
- 221 T. McGrath, A. Baxter, J. Ferguson, S. Haughey and P. Bjurling, *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 123–127.
- 222 M. Bienenmann-Ploum, T. Korpimaki, W. Haasnoot and F. Kohen, *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 115–122.
- 223 V. Gaudin and M.L. Pavy, *J. AOAC Int.*, 82 (1999) 1316.
- 224 A. Sternesjö, C. Mellgren and L. Björck, *Immunoassays for Residue Analysis (Food Safety)*, ACS, Washington, DC, 1996.
- 225 C.T. Elliott, G.A. Baxter, S.R.H. Crooks and W.J. McCaughey, *Food Agric. Immunol.*, 11 (1999) 19.
- 226 J.P. Ferguson, G.A. Baxter, J.D.G. McEvoy, S. Stead, E. Rawlingsc and M. Sharmanc, *Analyst*, 127 (2002) 951–956.
- 227 M. Caldow, S.L. Stead, J. Day, M. Sharman, C. Situ and C. Elliott, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 7367–7370.

J.-P. Salvador et al.

- 228 J. Ferguson, A. Baxter, P. Young, G. Kennedy, C. Elliott, S. Weigel, R. Gatermann, H. Ashwin, S. Stead and M. Sharman, *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 109–113.
- 229 D.O. Fesenko, T.V. Nasedkina, D.V. Prokopenko and A.D. Mirzabekov, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 1860–1865.
- 230 C.L. Baird, E.S. Courtenay and D.G. Myszka, *Anal. Biochem.*, 310 (2002) 93–99.
- 231 E. Valero, P. Carrion, R. Varon and F. Garcia-Carmona, *Anal. Biochem.*, 318 (2003) 187–195.
- 232 P.E. Michel, G.C. Fiaccabrino, N.F. de Rooij and M. Koudelka-Hep, *Anal. Chim. Acta*, 392 (1999) 95–103.
- 233 E. L'Hostis, P.E. Michel, G.C. Fiaccabrino, D.J. Strike, N.F. de Rooij and M. Koudelka-Hep, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 64 (2000) 156–162.
- 234 M. Usami, K. Mitsunaga and Y. Ohno, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 81 (2002) 47–55.
- 235 I.-S. Park, D.-K. Kim, N. Adanyi, M. Varadi and N. Kim, *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2004) 667–674.

Capítulo 2

Objetivos y contexto de la tesis

2.1. Objetivos de la tesis

El objetivo principal de esta tesis ha consistido en el desarrollo de técnicas inmunoquímicas de análisis para el control de residuos de antibióticos de tipo QN en alimentos de origen animal, que sirvan de complemento a las ya existentes. El análisis de este tipo de compuestos es particularmente interesante debido al impacto negativo que puede ejercer su utilización abusiva, incontrolada o fraudulenta, sobre la salud y el medioambiente. Concretamente se ha enfocado la investigación en el desarrollo de inmunoensayos de tipo ELISA y de un inmunosensor electroquímico con transducción amperométrica, basado en el uso de partículas magnéticas. Dichas técnicas de análisis han sido aplicadas la determinación de QNs en leche procedente de ganado bovino, teniendo en cuenta los requerimientos de la legislación europea. Se propuso la leche como matriz objetivo ya que es una de las matrices más relevante para estos tipos de residuos. Para la consecución de dicho objetivo ha sido de especial importancia el establecimiento de colaboraciones entre nuestro grupo de investigación (Nb4D) y diversos grupos e instituciones especialistas en diversos campos complementarios, fruto de tres proyectos de colaboración diferentes a nivel nacional y europeo.

Para llevar a término dicho objetivo general se abordaron los siguientes objetivos concretos:

- *Producción y evaluación de anticuerpos con selectividad de clase para los antibióticos de tipo QN.* Para ello fue necesario un diseño racional del hapteno de inmunización, ya que es determinante en la especificidad y detectabilidad final de los anticuerpos. También fue necesario el establecimiento de una metodología de síntesis química para la obtención de dicho hapteno y diferentes derivados (haptenos de competición). A su vez, dichos haptenos fueron bioconjugados a diferentes proteínas y enzimas para generar el inmunógeno y los inmunoreactivos secundarios, necesarios para la implementación de inmunoensayos en formato competitivo. Finalmente los anticuerpos obtenidos fueron evaluados mediante ELISA, poniendo especial atención a la influencia de diversos parámetros físico-químicos, como son el pH de la disolución y la presencia de cationes divalentes en el medio donde transcurre la inmunoreacción.
- *Establecimiento de un método inmunoquímico de tipo ELISA para la detección selectiva de QNs en leche.* Para ello fue necesaria la evaluación del efecto matriz de la leche sobre el inmunoensayo previamente desarrollado y la posterior valoración de diferentes parámetros como son la reproducibilidad, exactitud, precisión y especificidad tras la minimización de dicho efecto. Finalmente se evaluaron muestras fortificadas con QNs y muestras ciegas enriquecidas con varias familias de antibióticos para evaluar el correcto funcionamiento del método establecido.
- *Desarrollo de un inmunosensor electroquímico de tipo amperométrico para la detección de QNs en leche.* Para ello fue necesaria primeramente la inmovilización de los inmunoreactivos sobre la superficie de partículas magnéticas y la posterior caracterización de las mismas. De la misma forma fue necesario el marcaje enzimático los inmunoreactivos necesarios para el desarrollo del inmunosensor y la caracterización de los mismos. Finalmente se evaluó el efecto matriz de la leche sobre el ensayo realizado sobre partículas magnéticas para la posterior implementación del inmunosensor con transducción amperométrica.

2.2. Contexto de la tesis.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el presente trabajo de investigación se ha realizado en el marco de dos proyectos nacionales un proyecto europeo, que han servido de apoyo en diferentes aspectos de la investigación realizada para alcanzar el objetivo final. A continuación se muestra un pequeño resumen de dichos proyectos.

2.2.1. PROYECTO ARGOS

El proyecto ARGOS tuvo como objetivo principal el desarrollo de nuevas tecnologías para mejorar el control de las familias de antibióticos SAs y QNs, así como de corticosteroides en productos alimenticios de origen animal (véase la **Figura 2.1**).

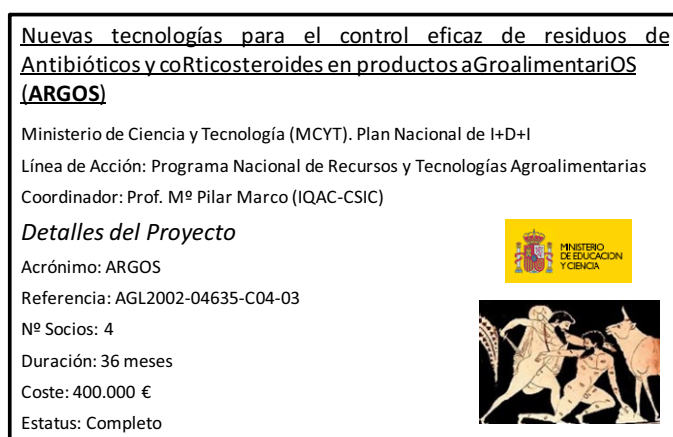


Figura 2.1. Tarjeta de resumen con la principal información sobre el proyecto ARGOS.

Así pues, las nuevas tecnologías a desarrollar dentro del proyecto se basaron en el fenómeno de reconocimiento anticuerpo-antígeno (Ac-At) y en su aplicación al desarrollo de técnicas de detección, tales como ELISA e inmunosensores, estos últimos mediante el empleo de electrodos serigrafados de oro. El consorcio del proyecto estaba formado por cuatro grupos de investigación pertenecientes a diversas disciplinas, el Laboratorio Nacional de Referencia de Productos Alimenticios (AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), el IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) especializado en la alimentación animal, que contaba con acceso a una granja experimental en donde se prepararon muestras reales controladas de animales tratados y no tratados, el GBEQ-UAH (Grupo Biosensores Electroquímicos de la Universidad de Alcalá de Henares) con una amplia experiencia en sistemas de transducción electroquímica para el análisis de elementos traza y nuestro grupo Nb4D (anteriormente AMRg), con reconocida experiencia en el desarrollo de anticuerpos para moléculas de bajo peso molecular y su integración en diversos sistemas de diagnóstico.

El grupo Nb4D fue el responsable del diseño y elaboración de anticuerpos de clase selectivos y polímeros de huella molecular (Molecular Imprinted Polimers, MIPs) para SAs y QNs y del desarrollo de los procedimientos inmunoquímicos de análisis, así como de la coordinación del proyecto. Así pues, el diseño, la preparación y la evaluación de los anticuerpos para QNs, descritos en esta tesis, se realizaron en el contexto del proyecto ARGOS.

2.2.2. PROYECTO PANOPTES

Tras los prometedores resultados obtenidos en el proyecto ARGOS, el consorcio científico establecido previamente se animó a continuar en la misma dirección en el contexto de un nuevo proyecto. El proyecto Panoptes tuvo como objetivo abordar los problemas derivados del control de los residuos de medicamentos veterinarios en muestras de alimentos con una perspectiva más global. Se dirigió la investigación al desarrollo de dispositivos inmunosensores novedosos, de respuesta rápida y basados en diferentes principios de transducción, para la determinación de las familias de antibióticos más importantes en diferentes puntos de la cadena alimentaria (véase **Figura 2.2**).

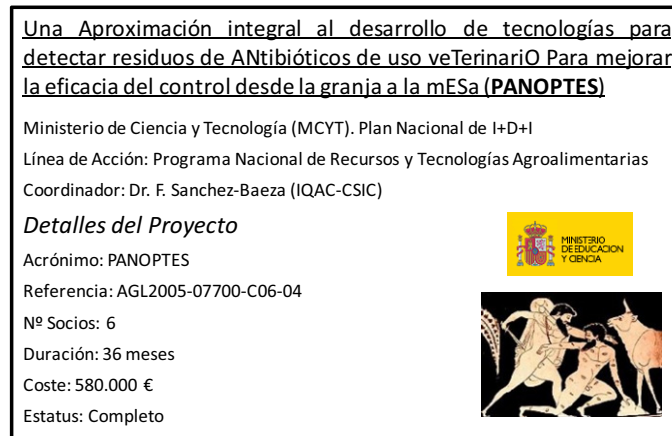


Figura 2.2. Tarjeta de resumen con la principal información sobre el proyecto PANOPTES.

Para lograr todos estos objetivos se incorporaron nuevos socios expertos en áreas de investigación diferentes al consorcio inicial ARGOS, CT-IMB (Grupo de Química de Transductores del Instituto de Microelectrónica de Barcelona) y el ICFO (Instituto de Ciencias Fotónicas), proporcionando su experiencia en microelectrónica y ciencias fotónicas respectivamente, y a su vez se incorporó el Departamento de química Analítica de la Universidad de Barcelona (UB), con reconocida experiencia en el análisis de contaminantes y residuos en alimentos y muestras ambientales así como en la preparación de materiales de referencia.

Nuestro grupo de investigación se encargó de nuevo de la coordinación del proyecto y, continuó con la investigación en el desarrollo de los receptores selectivos (Acs y MIPs) para varias familias de antibióticos, tetraciclinas (TCs), cloranfenicol (CAP), SAs y QNs. También colaboró con los grupos de desarrollo de tecnología (GBEQ-UAH, CT-IMB y el ICFO) en el establecimiento de los procedimientos químicos necesarios para la inmovilización de los inmunoreactivos, en la superficie de los transductores. La contribución de esta tesis a este proyecto consistió el desarrollo de un ELISA indirecto selectivo para los residuos de QNs en leche de ganado vacuno y muestras de pelo de cerdo obtenidas de animales tratados, trabajo realizado en estrecha colaboración con la Dra. Fátima Fernandez.

2.2.3. PROYECTO ELISHA

El proyecto ELISHA tuvo como principal objetivo el desarrollo de inmunosensores nanoestructurados de funcionamiento simple que pudiesen ser fabricados a bajo costo y con elevada calidad. Se pretendía explorar el conocimiento de la interfaz entre entidades

biológicas (anticuerpos) y no biológicas (transductor y matriz de inmovilización) mediante la comprensión de las normas de fabricación controlada a nanoescala (véase **Figura 2.3**).

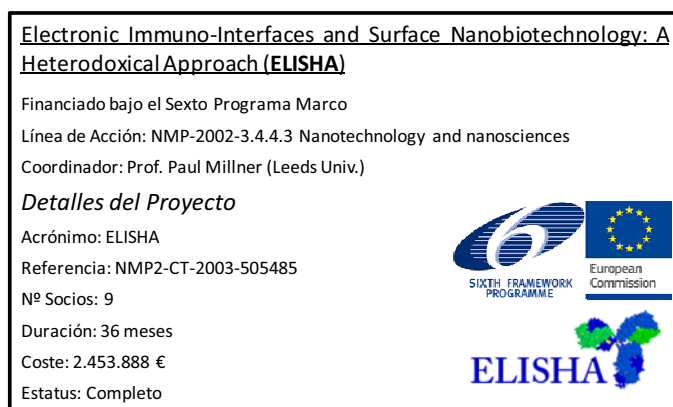


Figura 2.3. Tarjeta de resumen con la principal información sobre el proyecto ELISHA.

Así pues, las nuevas tecnologías a desarrollar dentro del proyecto se basaban en inmunosensores electroquímicos libres de marcaje, a través de la medición directa de la interacción entre el anticuerpo y el analito a través de la impedancia del sistema, tomando como analitos modelo QNs, péptidos relacionados con priones y marcadores tumorales. El consorcio del proyecto estaba formado por nueve grupos de investigación de diferentes países de Europa pertenecientes a diversas disciplinas, el grupo EBG (Grupo de Biotecnología de Enzimas de la Universidad de Leeds), con una amplia experiencia en estudios de inmovilización de proteínas y evaluación de su afinidad aplicada a la producción de biosensores, el ISBT (Instituto de Biociencia y Tecnología de la Universidad de Cranfield) con reputación en el desarrollo de biosensores tanto ópticos como electroquímicos, el grupo IFoS (Laboratorio de Ingeniería y Funcionalización de Superficies de la Escuela Central de Lyon) con contrastada experiencia en ingeniería y funcionalización de superficies e interfaces para la obtención de materiales o dispositivos para aplicaciones complejas, la TUM (Universidad Técnica de Munich) con amplia experiencia en la producción de anticuerpos monoclonales y recombinantes, el NMRC (Centro Nacional de Investigación Microelectrónica de Irlanda) con experiencia en fabricación de materiales semiconductores y electrodos así como en desarrollo de software de procesamiento de señal, la empresa Uniscan Instruments Ltd dedicada al desarrollo de instrumentos de medición electroquímica y de metrología de superficie, el ICMG (Laboratorio de Electroquímica Orgánica Fotoquímica y Redox de la Universidad Joseph Fourier de Grenoble) con gran experiencia en el campo de los biosensores electroquímicos y electrodos modificados, la empresa Technology Translators Ltd dedicada a proporcionar un servicio externo en la transferencia de tecnología y nuestro grupo Nb4D.

El grupo Nb4D se responsabilizó del suministro y evaluación de anticuerpos policlonales para pesticidas de tipo atrazina y antibióticos de tipo QN, así como de haptenos y bioconjugados para su implementación en diferentes plataformas sensoras. También se hizo cargo de la síntesis de nuevos haptenos que incluyeran grupos electroquímicamente polimerizables para generar la interfaz del sensor en colaboración con el grupo ICMG. De esta manera el diseño, preparación y evaluación de los anticuerpos para QNs, descritos en esta tesis se realizaron en el contexto del proyecto ELISHA.

Capítulo 3

Diseño y obtención de anticuerpos e inmunoreactivos de clase para quinolonas

En el siguiente capítulo se detalla la obtención de anticuerpos de clase contra la familia de antibióticos de tipo QN y los inmunoreactivos necesarios para el desarrollo de técnicas inmunoquímicas para la detección de este tipo de moléculas. También se muestra la caracterización de dichos inmunoreactivos, tanto anticuerpos como proteínas y enzimas haptenizadas, mediante ELISA y espectrometría de MS las dos últimas. La estructura del capítulo consiste primeramente en una introducción sobre la obtención de anticuerpos para moléculas pequeñas y sobre la técnica inmunoquímica ELISA y sus diferentes formatos para este tipo de moléculas. Posteriormente se discuten los resultados obtenidos. En este apartado se incluyen una publicación (**Sección 3.4**), que contiene los principales resultados obtenidos durante el diseño de haptenos y la caracterización de los inmunoreactivos mediante ELISA competitivo en formato indirecto, y una patente (**Sección 3.5**) que incluye los resultados de la síntesis química de los haptenos tanto de inmunización como de competición y su caracterización estructural mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear. El capítulo finaliza con las principales aportaciones de esta tesis doctoral en lo referente a la obtención de inmunoreactivos con selectividad de clase para QNs. También se incluye un anexo (**Anexo I**) en el que se puede encontrar la parte experimental adicional de compuestos sintetizados durante esta tesis y que por motivos de novedad y actividad inventiva no fueron incluidos en la patente (**Sección 3.5**). Asimismo dicho anexo contiene una tabla (**Tabla 3.6**) en la que se muestran las estructuras de los compuestos sintetizados a lo largo de esta tesis y la numeración correspondiente en la tesis, en las publicaciones II, IV y V (**Sección 3.4**, **Sección 4.4** y **Sección 5.4**) y en la patente (**Sección 3.5**).

3.1. Introducción

3.1.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS E INMUNOREACTIVOS PARA MOLÉCULAS DE BAJO PESO MOLECULAR

Las moléculas con pesos inferiores a 2000 Da son incapaces de generar una respuesta inmune por sí mismas. Por lo tanto para que sean inmunogénicas es necesario que estén unidas a un soporte que el sistema inmune del animal huésped reconozca como extraño, generando de esta manera lo que se conoce como inmunógeno. Con este propósito, generalmente este tipo de moléculas se unen a proteínas de elevado peso molecular como pueden ser hemocianinas, seroalbuminas, tiroglobulina, ovalbúmina o fibrinógeno, entre otras. Para realizar dicha unión es necesario que en la estructura de la molécula existan grupos funcionales apropiados ya que es deseable una unión covalente que confiera estabilidad a dicho inmunógeno. Un hapteno es una molécula que mimetiza las propiedades de la molécula objetivo y que a su vez está apropiadamente funcionalizada para permitir su unión al soporte generador de inmunogeneidad.

En este sentido, un buen diseño del hapteno de inmunización es primordial para el desarrollo de anticuerpos. La especificidad y detectabilidad de la técnica inmunoquímica viene determinada básicamente por el anticuerpo, si bien también es posible modular dichas propiedades modificando los inmunoreactivos secundarios [160, 161]. Existen muchos ejemplos en la literatura que demuestran que un diseño apropiado del hapteno de inmunización determina en gran medida las prestaciones de los anticuerpos resultantes [111, 114, 162].

El hapteno ideal debe preservar la mayoría de las propiedades estéricas y electrónicas del analito en cuestión, manteniendo intacta su estructura química lo máximo posible. El grupo funcional responsable de la unión a la proteína debe estar situado en una posición lejana a los principales epítomos^a que se deseen reconocer. Dicho grupo funcional debe estar separado de la estructura mediante un brazo espaciador lo suficientemente largo como para evitar el impedimento estérico que provoca la proteína, pero a su vez lo suficientemente corto como para que evite el plegamiento hacia dicha proteína. Se considera que la longitud óptima del brazo espaciador está entre 3 y 6 átomos de carbono [163, 164] aunque se han descrito varios anticuerpos obtenidos utilizando brazos espaciadores más cortos [165, 166]. Es preferible que la cadena del brazo espaciador sea alquílica para evitar introducir funcionalidades inmunogénicas que puedan generar una respuesta inmune secundaria no deseada.

Por otro lado, los inmunoensayos para moléculas de bajo peso molecular se realizan bajo condiciones de competencia, ya que este tipo de moléculas no tienen el tamaño suficiente como para que dos anticuerpos puedan unirse simultáneamente a diferentes epítomos presentes en su estructura, en una configuración tipo sándwich, tal y como ocurre para moléculas de elevado peso molecular (proteínas, bacterias etc.). Téngase en cuenta la gran diferencia en el tamaño molecular de un anticuerpo y una molécula de bajo peso molecular, lo que determina que la molécula orgánica, una vez ha interactuado con el anticuerpo quede prácticamente embebida en la estructura de este, haciendo prácticamente imposible que pueda interactuar con una segunda molécula de anticuerpo (véase **Figura 3.1**) [167].

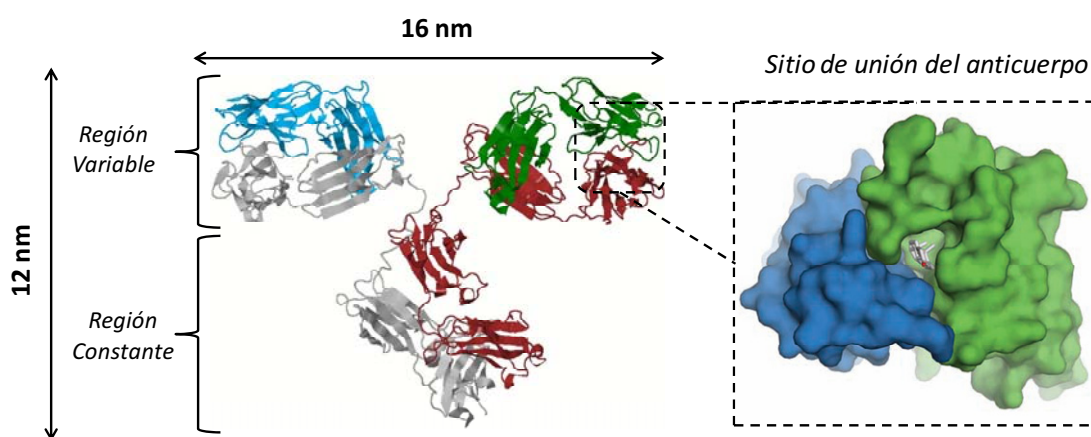


Figura 3.1. Modelo en 3D de la estructura del anticuerpo donde se muestra la región constante, la región variable y el sitio de unión del anticuerpo a una molécula pequeña como es la testosterona. (Figura parcialmente extraída y modificada de la referencia [167]).

En estas circunstancias se trabaja en formatos competitivos, en los cuales el analito a detectar y un bioconjugado hapteno-proteína, denominado competidor, compiten por su unión al anticuerpo. Dichos competidores están formados por haptenos, en este caso denominados de competición, unidos a diferentes biomoléculas dependiendo del formato de trabajo.

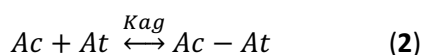
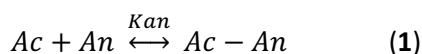
^a El epítipo o determinante antigénico es la unidad más pequeña de un antígeno que puede unirse a un receptor de linfocitos o a un anticuerpo específico. Son las regiones inmunológicamente activas de un inmunógeno.

Como se explicará más adelante (véase **Sección 3.1.2**), en ELISA se puede trabajar con dos formatos de competencia (véase **Figura 3.2**):

1) El denominado indirecto, según el cual habitualmente se prepara un bioconjugado, en el cual los haptenos de competición están unidos a proteínas para su fijación al soporte sólido, en forma de antígeno de tapizado (AT). El reconocimiento de este bioconjugado se realiza mediante el anticuerpo generado contra el hapteno de inmunización (anticuerpo primario, IgG) y posteriormente, este es reconocido por un anticuerpo secundario marcado con una enzima (antiIgG-Enzima)

2) El denominado directo, en el que frecuentemente se utiliza un trazador enzimático (TE), resultado de la unión de los haptenos de competición a una enzima capaz de generar una señal medible. Este reacciona con el anticuerpo que se ha inmovilizado sobre la superficie sólida. Alternativamente, también se puede trabajar en formato directo marcando el anticuerpo primario con una enzima, el cual reaccionará con el antígeno de tapizado, sin necesidad del anticuerpo secundario.

Las especificaciones en relación a la similitud de estos haptenos de competición respecto del analito no son tan estrictas como para el caso de los haptenos de inmunización. Generalmente el hapteno de inmunización determina la especificidad del ensayo mientras que el hapteno de competición determina la detectabilidad final, aunque esto no siempre se cumple. El objetivo de introducir heterogeneidad en el ensayo es disminuir la constante de formación del complejo anticuerpo-competidor, siendo esta menor que la constante de formación del complejo anticuerpo-analito, aumentando de esta manera la detectabilidad del ensayo (véase **Fórmula 3.1**), aunque esto no siempre es observado [168-170].



$$K_{an} \geq K_{at} \quad (3)$$

Fórmula 3.1. Ley de acción de masas aplicada a la formación de los equilibrios (1) entre el anticuerpo (Ac) y el analito (An) y (2) entre el anticuerpo (Ac) y el antígeno (At). (3) Principio de heterología por el cual la constante de formación del complejo anticuerpo-analito (K_{an}) es mayor que la de anticuerpo-antígeno (K_{at}).

Siguiendo este mismo principio, también se ha descrito casos en los que aumentando la heterogeneidad es posible disminuir la especificidad, ya que el anticuerpo puede presentar una mayor afinidad por compuestos estructuralmente similares al analito que por el competidor [171, 172]. A pesar de que ha habido numerosos intentos de racionalizar el efecto del competidor, es difícil predecir cual puede proporcionar las características más adecuadas al ensayo [173, 174], por lo que habitualmente se sintetiza una batería de haptenos de competición, que tras su unión a proteínas o enzimas para generar los competidores, se valoran frente a los anticuerpos obtenidos para obtener un inmunoensayo con las características apropiadas.

Otro factor a tener en cuenta es el método de bioconjugación, ya que es deseable que el inmunógeno y el competidor sean preparados utilizando diferentes métodos de bioconjugación. De esta manera se evita la posible respuesta de los anticuerpos generados

contra los subproductos generados durante el proceso de bioconjugación, que hayan quedado unidos al inmunógeno.

Generalmente la síntesis química de los haptenos es la etapa que más tiempo consume en el desarrollo de un anticuerpo, por lo que se ha de evaluar el esfuerzo sintético en relación con la obtención de un anticuerpo con las características deseadas. En este sentido, las herramientas de modelización molecular constituyen un complemento ideal al criterio químico, ya que permiten una mejor comparación de las propiedades electrónicas así como de las estructuras en 3D, aumentando las posibilidades de obtención de un anticuerpo con las características deseadas.

3.1.2. ELISA COMPETITIVO PARA MOLÉCULAS DE BAJO PESO MOLECULAR

El ELISA es una técnica inmunoquímica en formato heterogéneo, en la cual uno de los inmunoreactivos, bien el antígeno de tapizado o bien el anticuerpo, es inmovilizado en un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno de 96 o 384 pocillos. La señal es generada a través de la reacción del marcador enzimático con su respectivo sustrato, que a través de un reactivo de visualización genera una señal colorimétrica o quimioluminiscente.

Es la técnica inmunoquímica más empleada para el análisis de diferentes tipos de sustancias y es muy adecuada para la detección de analitos de bajo peso molecular trabajando en condiciones de competencia. En este caso permite trabajar en dos tipos de formato, el indirecto o de antígeno de tapizado y el directo o de trazador enzimático (véase **Figura 3.2**).

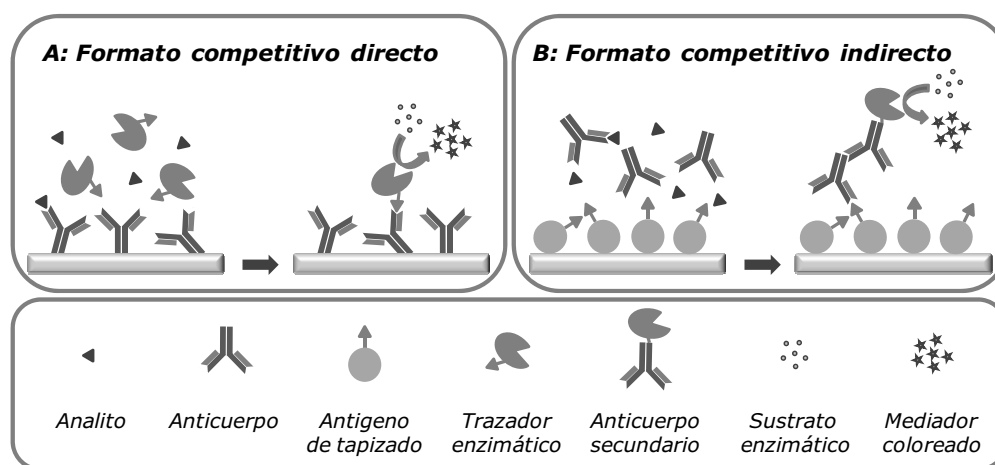


Figura 3.2. Esquema de los formatos de ELISA competitivos para la detección de analitos de bajo peso molecular. **A.** Formato directo o de trazador enzimático. **B.** Formato indirecto o de antígeno de tapizado.

En el formato directo por lo general el anticuerpo permanece inmovilizado en el soporte sólido y se establece el equilibrio con el analito y con el trazador enzimático, ambos en disolución. Tras la eliminación del exceso de reactivos se promueve la reacción de la enzima con su sustrato y a su vez el reactivo de visualización genera la señal.

Para el formato indirecto, se establece el equilibrio entre el anticuerpo y el analito en disolución y a su vez con el antígeno de tapizado inmovilizado sobre el soporte sólido. Una vez eliminado el exceso de reactivos, es necesaria la adición de un segundo anticuerpo, marcado enzimáticamente, capaz de reconocer al primero. Finalmente se promueve la reacción enzimática igual que en el caso del formato directo.

En ambos casos se genera una respuesta que es inversamente proporcional a la concentración de analito. Normalmente dicha respuesta, de tipo sigmoideal, se ajusta usando la **Fórmula 3.2**:

$$y = B + \frac{A - B}{1 + \left(\frac{C}{x}\right)^D}$$

Fórmula 3.2. Ecuación de 4 parámetros a la que generalmente se ajusta la curva de calibrado en ELISA. **A:** Absorbancia máxima. **B:** Absorbancia mínima. **C:** Concentración que produce el 50 % del valor de la absorbancia máxima menos la Absorbancia mínima. **D:** Pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoideal.

De ella se definen una serie de parámetros característicos como son la IC₅₀ (concentración de analito correspondiente al 50 % de inhibición), IC₉₀ (concentración de analito correspondiente al 10 % de inhibición) que usualmente se toma como el límite de detección, el rango lineal de trabajo situado entre la IC₂₀ y la IC₈₀, en el cual se permite la cuantificación y la pendiente que nos indica la sensibilidad del ensayo (véase **Figura 3.3**).

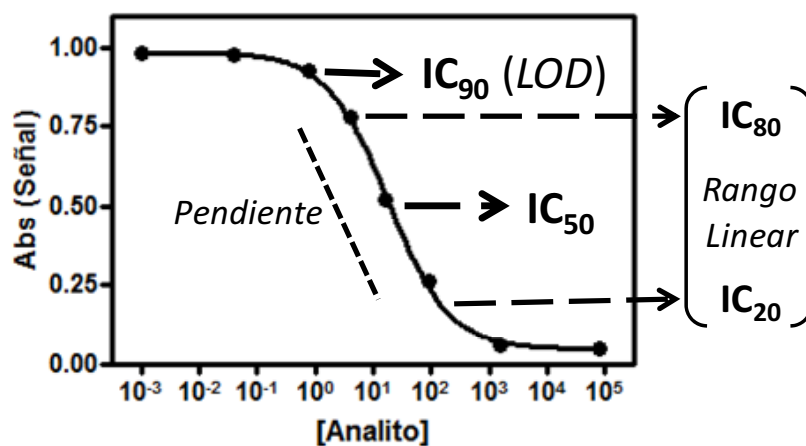


Figura 3.3. Ejemplo de curva de calibrado de un ELISA competitivo y sus correspondientes parámetros más significativos.

A modo de resumen, la **Figura 3.4** muestra de modo esquemático las diferentes etapas del proceso de producción de anticuerpos y su ensayo inmunoquímico para moléculas de bajo peso molecular.

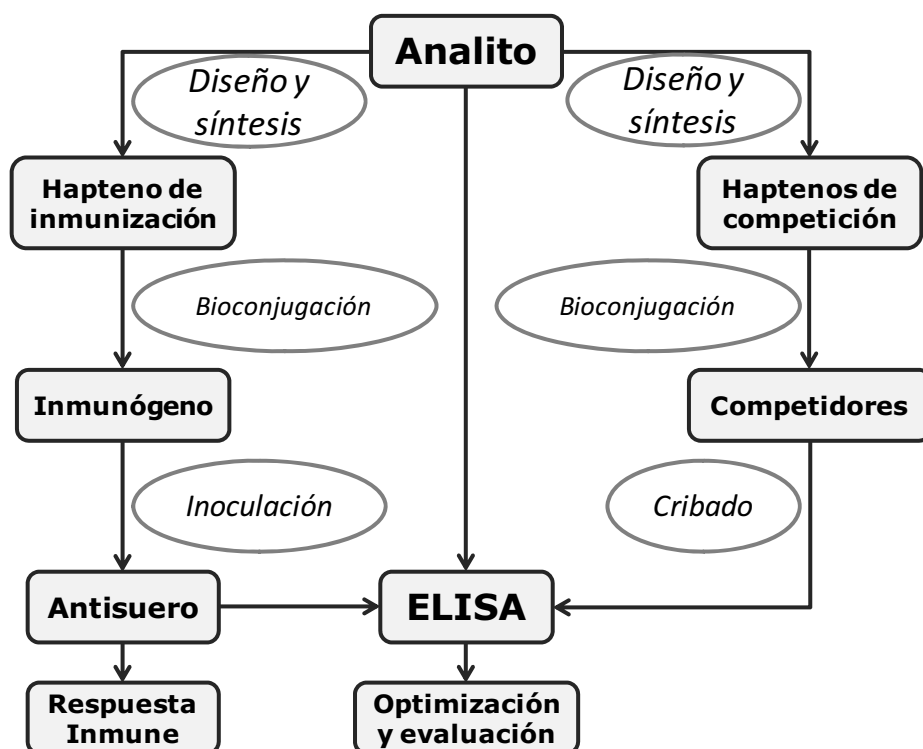


Figura 3.4. Esquema de las diferentes etapas del proceso de producción de anticuerpos policlonales y su ensayo inmunoquímico para moléculas de bajo peso molecular. En la parte izquierda se muestra la secuencia de preparación de todos los reactivos necesarios para obtener los anticuerpos y en la parte derecha se muestra la secuencia de preparación de los inmunoreactivos secundarios necesarios para el establecimiento del ELISA.

La primera etapa en la producción de anticuerpos corresponde al diseño y síntesis del hapteno de inmunización, teniendo en cuenta las características deseadas para el inmunoensayo final. En esta etapa, a parte del criterio químico y de una profunda revisión de la literatura, son de gran ayuda las herramientas de modelización molecular, ya que permiten una mejor comparación de las propiedades electrónicas y estructurales entre el analito a detectar y los haptenos propuestos. Tras su bioconjugación a una proteína de elevado peso molecular, para obtener el inmunógeno, este se inocula en el animal huésped para generar los antisueros capaces de reconocer el analito en cuestión. En paralelo, es necesario el diseño y síntesis de una batería de haptenos de competición, que se han de bioconjugarse a proteínas y enzimas para obtener los competidores necesarios para el establecimiento del inmunoensayo. Como ya se ha mencionado anteriormente, es deseable que el método de bioconjugación sea diferente al utilizado para la obtención del inmunógeno, ya que de esta manera es posible evitar la señal generada por la posible respuesta inmunogénica a los subproductos generados durante la bioconjugación. Una vez disponibles antisueros y competidores, se procede a un cribado de las combinaciones de ambos para seleccionar la que mejor cumpla con las características deseadas para el inmunoensayo final en cuanto a detectabilidad y especificidad se refiere. Finalmente se evalúa la influencia de diferentes parámetros físico-químicos sobre dicha combinación de inmunoreactivos y se realizan estudios de exactitud y especificidad para la posterior aplicación de dicho inmunoensayo al análisis de muestras reales.

La producción de anticuerpos de selectividad de clase para QNs ha sido un objetivo perseguido por muchos grupos de investigación, pero difícil de lograr. Como ya se ha expuesto en la introducción general, en el momento de inicio de esta tesis doctoral se habían descrito pocos anticuerpos para la determinación de QNs, en la mayoría de los casos los casos enfocados a la detección específica de un solo miembro de la familia, obteniendo perfiles de reactividad cruzada generalmente específicos [156-158]. Casi en todos los casos, inmunógeno era una QN comercial unida a la proteína a través del ácido carboxílico en posición 3 [156-159] o a través de la piperazina de la posición 7 [125], bloqueando en ambos casos epítomos comunes de la familia de las QNs. Solamente en uno de ellos el objetivo era la detección genérica [125], abordándose dicho objetivo mediante unión del NRFX a OVA utilizando la amina secundaria de la piperazina para generar el inmunógeno. Los resultados obtenidos tanto en términos de detectabilidad (IC_{50} 10-30 $\mu\text{g/L}$), como de especificidad no fueron óptimos, con una reactividad cruzada inferior al 10 % para QNs muy utilizadas en clínica veterinaria, como son la FLUME y el ERFX. En base a estos antecedentes se plantearon los objetivos descritos en la siguiente sección (véase **Sección 3.2**).

3.2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo presentado en el presente capítulo fue el de producir anticuerpos con selectividad de clase para los antibióticos de tipo QN, siendo estos anticuerpos, en conjunción con los inmunoreactivos secundarios necesarios, capaces de reconocer al máximo número posible de QNs.

Para lograr este objetivo, fue necesario abordar los siguientes objetivos concretos:

- Diseño racional y síntesis del hapteno de inmunización.
- Diseño y síntesis de haptenos de competición.
- Bioconjugación de dichos haptenos a proteínas y enzimas para la generación del inmunógeno y de inmunoreactivos secundarios (AT y TE).
- Producción de anticuerpos y caracterización de los mismos mediante ELISA.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. DISEÑO DE HAPTENOS

Como ya se ha expuesto en la introducción de este capítulo, la pieza clave para la obtención de anticuerpos con las características deseadas consiste en un buen diseño del hapteno de inmunización. En este sentido, es necesario un conocimiento profundo del (los) analito(s) a reconocer aparte del tipo de muestra en la que se pretende(n) detectar. En este caso, se pretendía obtener anticuerpos genéricos para su aplicación a la detección de QNs en muestras de origen animal, principalmente en leche procedente de ganado vacuno. En este sentido, identificar cuáles son las QNs más utilizadas en el ámbito veterinario, cuáles son sus estructuras químicas y propiedades físico-químicas, cuál es su metabolismo y como se excretan, a que legislación están sometidas y a que límites máximos están permitidas en las diferentes matrices de análisis; es una información esencial a la hora de diseñar el hapteno de inmunización más adecuado.

La **Figura 3.5** muestra las estructuras químicas de las principales QNs utilizadas en medicina veterinaria en Europa. Como se puede observar, todas poseen una estructura común formada por 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína o 4-quinolona. En la posición 3 presentan un ácido carboxílico y en el caso de las fluoroquinolonas, la posición 6 aparece fluorada. La posición 7 presenta heterociclos nitrogenados, generalmente derivados de anillos de piperazina. La posición 1 es la de mayor variabilidad desde el punto de vista estructural. Puede aparecer alquilada, sustituida con anillos bencénicos, ciclopropilos o extendiéndose hasta la posición 8 formando un nuevo ciclo fusionado con el resto.

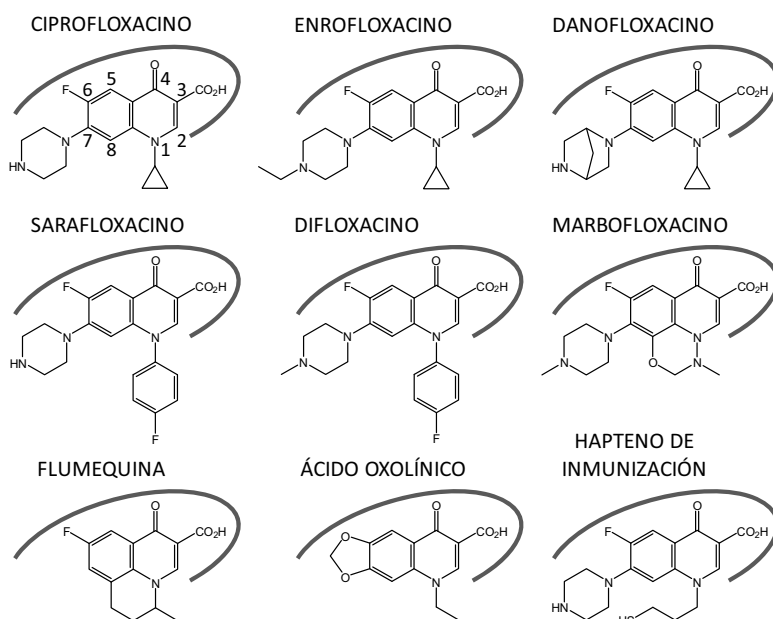


Figura 3.5. Estructuras químicas de las QNs más utilizadas en el ámbito veterinario en Europa y del hapteno de inmunización. La parte común se encuentra resaltada e incluye la 1,4-dihidroquinoleína, sistema β -cetoácido de la posición 3,4 y el fluor de la posición 6 para las fluoroquinolonas.

Otro aspecto a tener en consideración es el comportamiento anfótero de estas sustancias, ya que presentan un ácido carboxílico en la posición 3 y grupos amino en la posición 7, pudiéndose presentar hasta tres especies diferentes en disolución acuosa [175-177] (véase **Figura 3.6**).

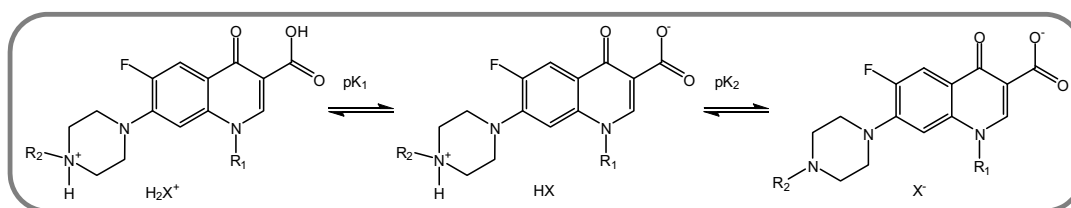


Figura 3.6. Equilibrios de transferencia protónica presentes en la mayoría de QNs.

Por otro lado, este tipo de antibióticos tiene una baja tasa de metabolismo secundario (fase II) eliminándose en su mayor parte sin metabolizar, aunque una pequeña parte sufre transformaciones oxidativas vía mono amino oxidasas, mediante reacciones básicamente en el anillo de piperazina formándose N-óxidos, oxo-compuestos y demetilándose [28, 178].

Analizada toda esta información, se decidió diseñar una estructura que fuera representativa de las QNs intactas, y se propusieron una serie de criterios que la estructura química del hapteno debía cumplir:

- Conservar los grupos funcionales comunes a todas la QNs y maximizar su exposición al sistema inmune.
- Eliminar aquellos grupos funcionales que las diferencian entre sí.
- No sacrificar ninguno de los principales epítomos.
- Presentar valores de pK_a y un LogP cercanos al de la mayoría de ellas.
- Conservar las mismas propiedades conformacionales y electrónicas.

Como principales epítomos, que además son los grupos funcionales comunes a la mayoría de las QNs, se identificaron el ácido carboxílico, la cetona y el átomo de fluor de la posición 6. La mejor forma de maximizar el reconocimiento de dichos epítomos es situando el brazo espaciador en un punto de la molécula alejado de ellos. Se consideró que el grupo amino de la posición 1 era la posición ideal, dada su situación completamente opuesta al grupo cetónico y suficientemente alejada del carboxilo, el grupo piperazínico y el átomo de fluor. En cualquier caso, el hapteno de inmunización propuesto conserva dicho grupo amino sacrificando el sustituyente R_1 , que es precisamente el de mayor variabilidad (véase **Figura 3.5**).

Atendiendo a estas consideraciones, se planteó situar una cadena alquílica como sustituyente R_1 de una longitud suficientemente larga (3 átomos de carbono) como para alejar la estructura del potencial efecto estérico de la proteína. Dicha cadena estaría sustituida en su posición final por un grupo funcional que permitiese la unión covalente a la proteína. En este caso fue necesario considerar una química ortogonal a la de grupos aminos y carboxilo, ya que estos son determinantes antigénicos presentes en otras posiciones de la molécula, y durante la preparación del inmunógeno el control sobre la posición de unión a la proteína no sería total. Para este propósito se contemplaron los grupos funcionales hidroxilo, tiol, maleimido y aldehído. Finalmente se optó por la utilización del grupo tiol debido a la experiencia previa del grupo [179] y a la disponibilidad comercial de los intermedios necesarios para la síntesis del hapteno de inmunización. Dicho grupo tiol permanecería protegido adecuadamente durante el proceso sintético para su desprotección justo antes de su unión a la proteína.

3.3.1.1. Estudios de modelización molecular

A la hora evaluar el impacto de la introducción del brazo espaciador en la posición indicada, para confirmar que el hapteno propuesto cumplía con los requisitos propuestos anteriormente, las herramientas de modelización molecular fueron un complemento ideal al criterio químico.

Previamente fue necesario conocer los valores de pK_a de cada uno de los congéneres para poder calcular la proporción de cada una de las especies ácido-base a pH fisiológico, que es donde transcurriría la generación del anticuerpo. Se consideró una media de los valores de pK_a encontrados en la bibliografía [176, 177, 180] y a partir de ella se calculó la proporción para cada analito de las especies ácido-base a pH fisiológico (véase **Tabla 3.1**). Para el caso del hapteno se realizó un cálculo predictivo del pK_a utilizando el paquete de programas

ACD/pK_a (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, ON, Canada). Como puede observarse en la **Tabla 3.1**, los valores de pK_a del hapteno no diferían en gran medida de los del resto de los congéneres.

Tabla 3.1. Valores de pK_a para el equilibrio ácido-base de las QNs y porcentajes de cada una de las especies a pH fisiológico^a.

Compuesto	% H ₂ X ⁺	pK ₁ ^b	% HX	pK ₂ ^b	X ⁻
Ciprofloxacino	3	6.01	89	8.54	8
Enrofloxacin	2	5.99	66	7.83	32
Danofloxacin	4	6.2	89	8.65	7
Difloxacino	1	5.73	63	7.75	36
Marbofloxacino	1	5.6	82	8.2	17
Flumequina	---	6.46	8	---	92
Ácido Oxolínico	---	6.9	20	---	80
Norfloxacino	3	6.13	84	8.32	13
Sarafloxacino	2	5.75	90	8.53	8
Ofloxacino	1	5.7	71	7.9	28
Hapteno de inmunización ^c	3	6.09	88	8.49	9

^a Véase **Figura 3.6** para las reacciones de equilibrio. ^b Valores calculados como media de los valores experimentales encontrados en la bibliografía [176, 177, 180]. ^c Valores obtenidos mediante un cálculo predictivo utilizando el paquete de programas ACD/pK_a.

A su vez, se realizaron estudios teóricos y de modelización molecular usando modelos semiempíricos de mecánica cuántica (PM3) de las diferentes especies ácido-base de las QNs de uso más corriente en veterinaria, buscando sus conformaciones más estables en su mínimo de energía, que serán las de mayor probabilidad.

A la hora de calcular el impacto del brazo espaciador sobre las propiedades geométricas se calculó el valor del error cuadrático medio (root mean square error, RMSE) a partir de la superposición de los 20 átomos comunes a todas las QNs de uso veterinario definidos por los 10 átomos del sistema fusionado de anillos y los 10 átomos unidos directamente a dicha estructura, incluyendo el β-cetoácido y el fluor de la posición 6 (véase **Figura 3.7A**). Se compararon las estructuras para cada una de las especies ácido-base de cada molécula dos a dos, para finalmente hacer una media ponderada teniendo en cuenta la proporción de cada una de ellas a pH fisiológico.

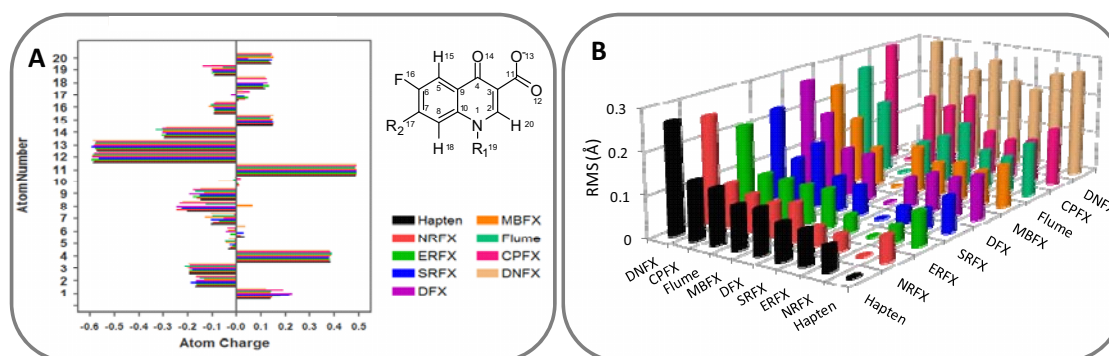


Figura 3.7. Resultados de los estudios teóricos utilizados para demostrar la idoneidad del hapteno de inmunización propuesto. **A.** Distribución de las cargas puntuales de los átomos comunes presentes en

la estructura de las QNs, correspondientes al sistema de 1,4-dihidroquinoleina y a los átomos unidos directamente a él. **B.** Error cuadrático medio en amstromgs de la superposición de los átomos equivalentes, comparando los compuestos de dos en dos.

Como se observa en la **Figura 3.7B** la introducción del linker en la posición 1 no produce cambios significativos, manteniéndose la planaridad del sistema fusionado de anillos. Los valores de RMSE de la comparación del hapteno con el resto de compuestos fueron del mismo orden que los obtenidos comparando los compuestos entre ellos. En cuanto a las propiedades electrónicas, se realizó la misma media ponderada de las cargas puntuales para los anteriormente citados 20 átomos. Como se puede observar en la **Figura 3.7A** no se observa variación sustancial en dichas cargas respecto de las otras moléculas incluidas en el estudio. A la luz de estos resultados se decidió proseguir con la síntesis del hapteno de inmunización propuesto.

3.3.2. SÍNTESIS DE HAPTENOS

3.3.2.1. Análisis retrosintético

Una vez diseñado el hapteno de inmunización se realizó un análisis retrosintético de dicha molécula. Existen principalmente dos métodos de síntesis QNs, el que utiliza la reacción de Gould-Jacobs y el que utiliza la de Grohe-Heitzer [22].

El primero consta de cinco etapas, comenzando por una reacción de adición-eliminación entre una 3-fluoro-4-halo-anilina y metoxietilmalonato de dietilo, seguida de una cicloacilación térmica para obtener la 4-hidroxi-3-carboxiquinolona. Tras la alquilación del nitrógeno 1 utilizando halogenuros de alquilo, se procede a la saponificación del éster de la posición 3, para finalmente introducir el heterociclo requerido en la posición 7 mediante una reacción de sustitución nucleófila (SN) en anillo aromático (véase **Figura 3.8A**).

El segundo a su vez consta de seis pasos de reacción. Se parte de la acilación del anillo aromático a partir del cloruro del correspondiente ácido benzóico para obtener el éster de malonato, seguido de una condensación en condiciones deshidratantes del metileno activo con un orto éster. El éter enólico así obtenido se somete a una reacción de adición-eliminación utilizando una amina primaria, y el producto resultante sufre una ciclación a través de una reacción tándem de adición-eliminación. Al igual que el método de Gould-Jacobs, la secuencia finaliza con la reacción de SN en el anillo aromático (véase **Figura 3.8B**).

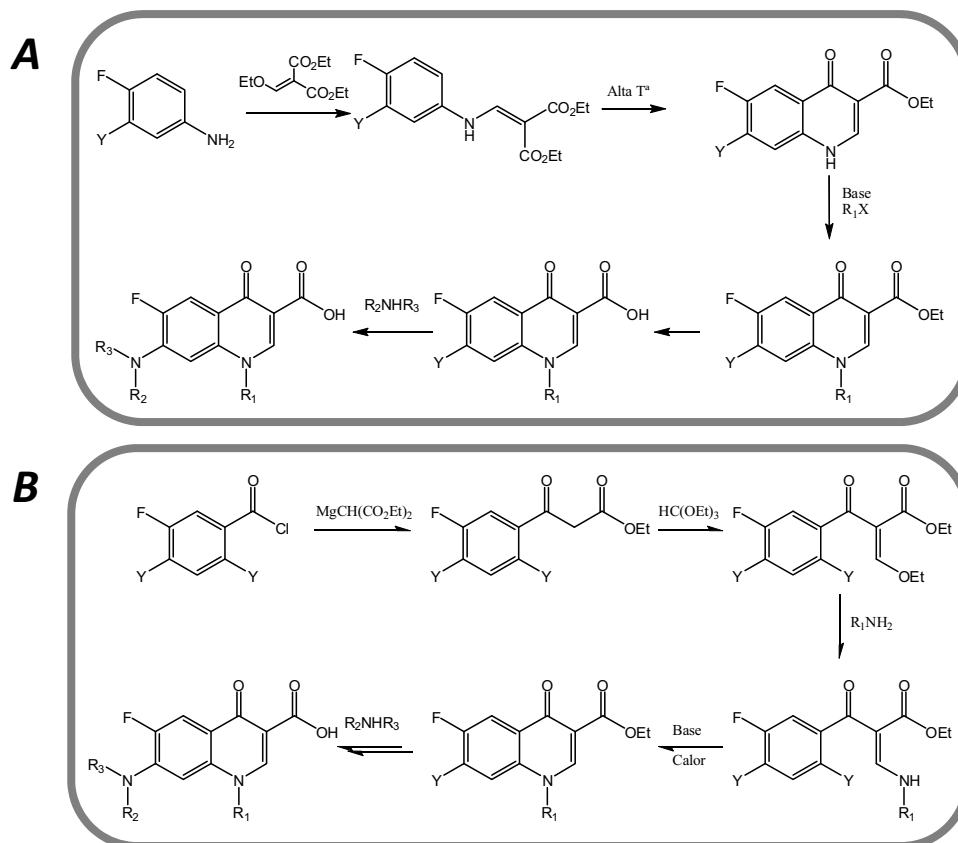


Figura 3.8. Esquema sintético de preparación de QNs **A.** A través de la reacción de Gould-Jacobs. **B.** A través de la reacción de Grohe-Heitzer.

Se decidió abordar la síntesis del hapteno de inmunización utilizando el método de Gould-Jacobs y no el método de Grohe-Heitzer por dos razones; tiene un paso menos de reacción y durante la secuencia sintética se obtiene un intermedio, la 4-hidroxi-3-carboxiquinolona, susceptible de ser modificado en las posiciones 1 y 7 con diferentes sustituyentes, lo cual resultaba muy atractivo a la hora de sintetizar una batería de haptenos de competición.

En cuanto al grupo protector del grupo tiol del brazo espaciador, finalmente se optó por el bifenil metano, ya que tras introducir dicho brazo espaciador en la posición 1 del intermedio anteriormente mencionado, la secuencia sintética proseguía con la hidrólisis del éster y la introducción del anillo de piperazina, por lo que era necesario un grupo protector no muy lábil a medios ácidos ni básicos.

3.3.2.2. Síntesis del hapteno de inmunización

La **Figura 3.9** muestra el esquema de síntesis del hapteno de inmunización **11** siguiendo el método de Goulds-Jacobs. Dicha síntesis comenzó partiendo de la 3-fluoro-4-cloro anilina para obtener el 2-((3-cloro-4-fluorofenilamino)metil)malonato de dietilo (**1**) en un primer paso de reacción y el 7-cloro-6-fluoro-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de etilo (**2**) y en un segundo paso de reacción, con muy buenos rendimientos sin etapas de purificación intermedias en ambos casos. En paralelo se procedió a la protección del grupo tiol del 3-cloropropano-1-tiol utilizando bifenilmetanol en ácido trifluoroacético (TFA). Tras 2 horas de reacción la protección fue completa obteniéndose el 3-cloropropiltiobifenilmetano (**3**) con elevada pureza y buen rendimiento tras una extracción utilizando éter dietílico.

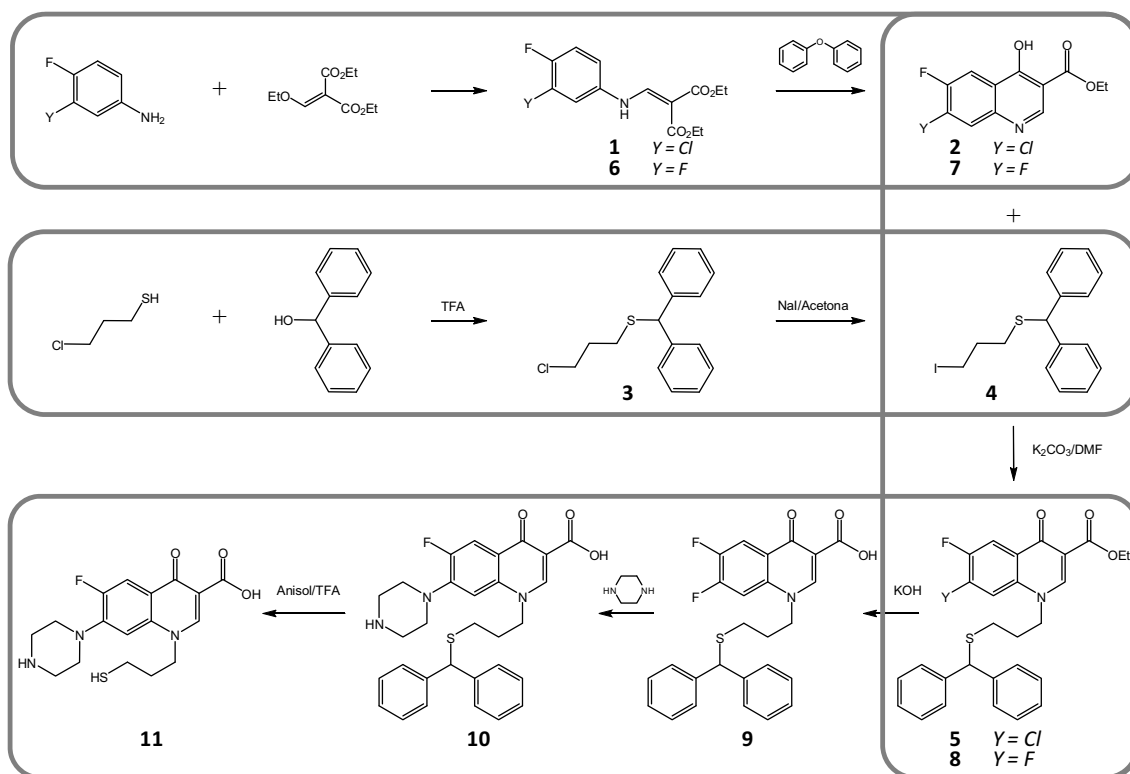


Figura 3.9. Esquema de síntesis del hapteno de inmunización **11** siguiendo el método de Gould-Jacobs.

A la hora de introducir el brazo espaciador en la posición 1 del intermedio **2**, en una primera aproximación se utilizó el 3-cloropropiltiobifenilmetano (**3**), N,N-dimetilformamida (DMF) como disolvente y K_2CO_3 como base en fase heterogénea a una temperatura de 100 °C. Trascorridas 9 horas la reacción no evolucionó, por lo que se decidió buscar alternativas. Se sustituyó el cloro del brazo espaciador por yodo mediante una reacción de Finkelstein, utilizando NaI en acetona a reflujo. De esta manera se obtuvo el 3-yodopropiltiobifenilmetano (**4**), con una alta pureza y rendimientos elevados tras la extracción del crudo de reacción con terc-butil metil éter. Tras posterior reacción de este derivado con **2** se obtuvo el 7-cloro-1-(3-(bifenilmetano)tiopropil)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (**5**) con un 70 % de rendimiento tras la purificación del crudo mediante cromatografía en fase directa, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de diclorometano (DCM): Acetato de etilo (AcOEt) 8:2 como fase móvil.

Durante la introducción del anillo de piperazina a través de una reacción de S_N en anillo aromático sobre el intermedio **5**, se utilizaron 2.5 equivalentes de piperazina a 100 °C y se probaron como disolventes N-metilpirrolidona y DMF. En todos los casos se observó la formación mayoritaria de dos regioisómeros correspondientes a la sustitución de las posiciones 6 y 7, en proporción 2 a 8 respectivamente. Tras varios intentos de purificación, utilizando sucesivas recrystalizaciones en mezclas de metanol:cloroformo, se logró enriquecer la mezcla hasta una relación 1 a 9. En ningún caso se logró que el porcentaje del subproducto de sustitución en posición 6 fuese inferior al 10 % y tras revisar la bibliografía se decidió comenzar de nuevo la síntesis, pero esta vez partiendo de la 3,4-difluoroanilina, con el objetivo de obtener el precursor de la S_N en anillo aromático con un átomo de flúor en lugar de un átomo de cloro en la posición 7. Se llevó a cabo la nueva secuencia utilizando las

condiciones optimizadas para el derivado clorado, obteniéndose los diferentes intermedios con rendimientos muy similares (**6**, **7** y **8**).

El siguiente paso consistió a la saponificación del éster etílico de **8** en medio básico, para evitar la posible sustitución de dicho éster por amida durante la reacción de introducción de la piperazina, hecho observado en baja proporción con el derivado clorado en la posición 7. Para dicha saponificación se utilizaron 2.5 equivalentes de KOH en una mezcla de tetrahidrofurano (THF):agua a reflujo, obteniéndose el correspondiente ácido 1-(3-(bifenilmetano)tiopropil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**9**) con un rendimiento elevado tras la neutralización del crudo en medio acuoso y posterior filtración del sólido generado.

La introducción del anillo de piperazina en la posición 7 del intermedio **9** se llevó a término utilizando 2.5 equivalentes de piperazina en dimetilsulfóxido (DMSO) a 110 °C. Tras una extracción del crudo con DCM logró aislarse el ácido 1-(3-(bifenilmetano)tiopropil)-6-fluoro-7-piperazinil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**10**) puro con un rendimiento del 90 %.

Finalmente se procedió al estudio de la reacción de desprotección del grupo tiol, necesaria para la unión del hapteno a la proteína. La reacción se optimizó probando diferentes condiciones en lo que se refiere a tiempo de reacción, temperatura y capturador de radicales, obteniéndose el mejor resultado a una temperatura de 50 °C, usando TFA como disolvente y anisol como capturador del carbocatión bifenilo generado. El seguimiento de esta reacción tuvo lugar por HPLC-UV determinando que en hora y media la reacción era completa, obteniéndose el hapteno de inmunización puro (**11**) tras la resuspensión del crudo evaporado en agua y su posterior lavado con DCM y liofilización.

3.3.2.3. Síntesis de haptenos de competición

Utilizando la química optimizada durante la síntesis del hapteno de inmunización, se procedió a la síntesis de una batería de moléculas modificando los sustituyentes de las posiciones 1 y 7, utilizando diferentes ioduros de alquilo y aminas respectivamente (véase **Figura 3.10**, las estructuras finales de los haptenos de competición se muestran más adelante, en la **Figura 3.12**). En este sentido en la posición 1 se introdujo el grupo propilo con la idea de simular la cadena hidrocarbonada del hapteno de inmunización, el grupo ciclopropilo emulando el sustituyente de CPF, ERF y DNF y se dejó esa posición libre de sustituyente (véase **Figura 3.10**).

Para el caso de la posición 7, se introdujeron diferentes funcionalidades a partir de las aminas piperazina, morfina, etilendiamina, dietilamina y también se mantuvo el flúor del precursor sin reaccionar (véase **Figura 3.10**). En el caso de la introducción de la dietilamina, fue necesario el uso de un reactor a presión, ya que se observó que la reacción de SN en anillo aromático no tenía lugar a una temperatura inferior a 70 °C, a la cual el reactivo estaba en la fase gaseosa. Respecto de la etilendiamina, en una primera aproximación se utilizó una relación equimolar con el correspondiente precursor para evitar la posible reacción sobre el fluor de la posición 6, ya que este reactivo presenta 2 equivalentes de grupos amina primaria, a priori menos impedidos. Sin embargo se observó la formación de un 20 % del dímero correspondiente a la entrada de dos residuos de QN en cada extremo de la etilendiamina. La proporción aumentaba al 90 % al añadir la etilendiamina gota a gota sobre la disolución de

QN en condiciones de reacción ($T=110\text{ }^{\circ}\text{C}$). Finalmente se obtuvo el producto de monoación utilizando un exceso de 2.5 moles de amina respecto al precursor.

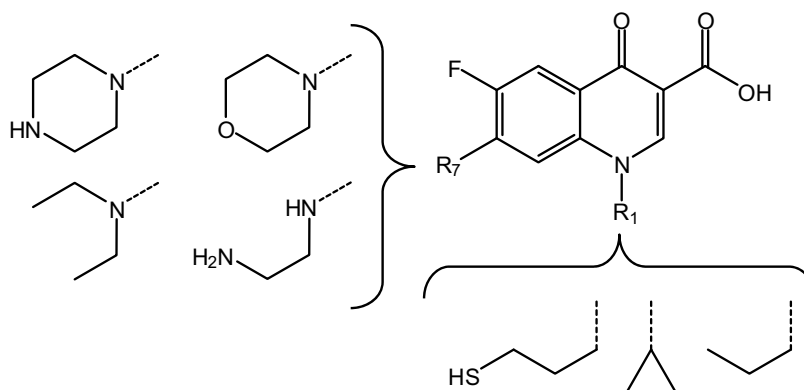


Figura 3.10. Estructuras de los diferentes sustituyentes introducidos en las posiciones 1 y 7 de la estructura base de QN para la obtención de una batería de haptenos de competición.

Las condiciones experimentales de la síntesis de todos los haptenos se encuentran descritas en la parte experimental de la patente anexa a este capítulo (véase **Sección 3.5**) y en la parte experimental adicional del **Anexo I**.

3.3.3. BIOCONJUGACIÓN DEL HAPTENOS

3.3.3.1. Bioconjugación del hapteno de inmunización

Con el hapteno de inmunización ya sintetizado y caracterizado, se procedió a su unión a proteínas para conferirle de propiedades inmunogénicas, ya que como se ha explicado en la introducción a este capítulo, compuestos de bajo peso molecular son incapaces por si solos de generar respuesta inmune. Para realizar dicha unión fue necesario activar previamente la proteína con grupos funcionales susceptibles de reaccionar con el grupo tiol del hapteno. Para ello en un primer intento se escogió el grupo maleimido ya que la reacción a priori es selectiva y existía experiencia previa en el grupo [179].

Para ello se sintetizó previamente el N-maleimidopropanoato de succinimido (**25**), un reactivo bifuncional capaz de reaccionar por un extremo con las aminas terminales de las lisinas accesibles de la proteína y por el otro con el tiol del hapteno. Tras la bioconjugación se comprobó, mediante el análisis por espectrometría de MS (MALDI-TOF) de los conjugados a BSA (Bovine Serum Albumin), que la introducción del brazo espaciador era prácticamente cuantitativa a diferentes relaciones molares entre dicho producto y las lisinas de la BSA, mientras que la reacción con el hapteno a través del grupo tiol, en todos los casos rendía del orden de un 35 % (véase **Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Densidad de hapteno para los bioconjugados de BSA unidos a haptenos con grupos tiol.^a

BE	Activación de la proteína			Bioconjugación		
	Lys/BE ^b	δ BE ^c	Rendimiento (%) ^d	Hapteno	δ-Hapteno ^c	Rendimiento (%) ^d
25	1/2	35	116-100	11	12	34
	1/1	31	103-89		10	32
	1/0.5	17	91-113		6	35
26	1/10	17	57-49	11	14	82
	1/10	17	57-49	22	2 ^e	12

BE: Brazo espaciador. ^a Se calcularon las densidades de hapteno mediante MALDI-TOF-MS y UV cuantitativo. ^b Proporción molar utilizada para la activación de la proteína respecto de los residuos de lisina accesibles de la BSA. ^c Moles de hapteno por mol de proteína. ^d Grado de bioconjugación calculado teniendo en cuenta que la BSA tiene entre 30 y 35 lisinas accesibles. ^e El hapteno **22** tuvo un bajo rendimiento de bioconjugación debido a la baja solubilidad observada en medio acuoso.

Debido a que prácticamente había el doble de restos maleimido libre que de hapteno por cada molécula de BSA, se decidió cambiar de estrategia, ya que dichos grupos maleimido podrían generar una respuesta inmune secundaria no deseada. Se escogió como nuevo brazo espaciador el grupo yodoacetilo debido a su corta longitud y al hecho de que, aunque quedaran restos sin reaccionar, estos no serían susceptibles de generar una respuesta inmune, puesto que el único grupo funcional restante sería un átomo de yodo, que posiblemente acabaría reaccionando también con el agua, convirtiéndose en OH. Además cabía la posibilidad del bloqueo final de los átomos de yodo sin reaccionar con cisteína, lo que no introduciría nuevos grupos que generasen respuesta inmune (véase **Figura 3.11**).

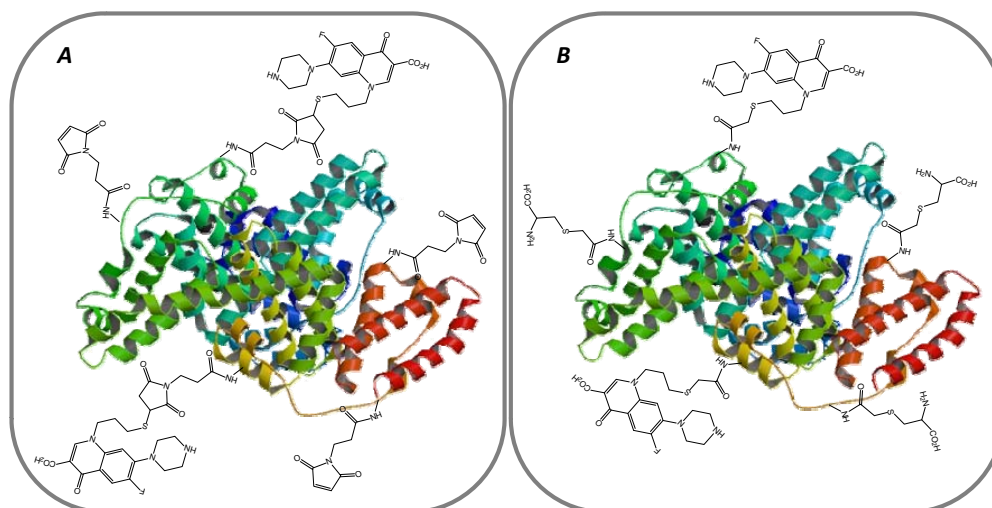


Figura 3.11. Esquema ilustrativo de las diferentes estructuras unidas a las proteínas durante la bioconjugación del hapteno **11** a BSA y HCH. **A.** Utilizando N-maleimidopropanoato de succinimido (**25**) en la activación de las proteínas. **B.** Utilizando N-yodoacetato de succinimido (**26**) en la activación de las proteínas.

En este caso también fue necesaria la síntesis previa del N-yodoacetato de succinimido (**26**) [181]. La etapa de modificación previa de la proteína rindió un 50 %, mientras que la introducción del hapteno rindió un 80 %, para finalmente bloquear los átomos de yodo sin reaccionar en la etapa previa utilizando clorhidrato de cisteína (véase **Tabla 3.2**). El

inmunógeno preparado por este nuevo método se caracterizó mediante un UV cuantitativo, comprobándose que la densidad de hapteno era de 14 restos por molécula de proteína.

3.3.3.2. Bioconjugación de haptenos de competición

En el caso de la bioconjugación de los haptenos de competición a proteína, se trata de la formación de un enlace amida entre el ácido carboxílico de la posición 3 del hapteno y las aminas de las lisinas accesibles de las proteínas, o bien para los haptenos con aminas en la posición 7, entre dichas aminas y los ácidos carboxílicos de los ácidos glutámicos y aspárticos accesibles de la proteína (véase **Figura 3.12** para las estructuras químicas).

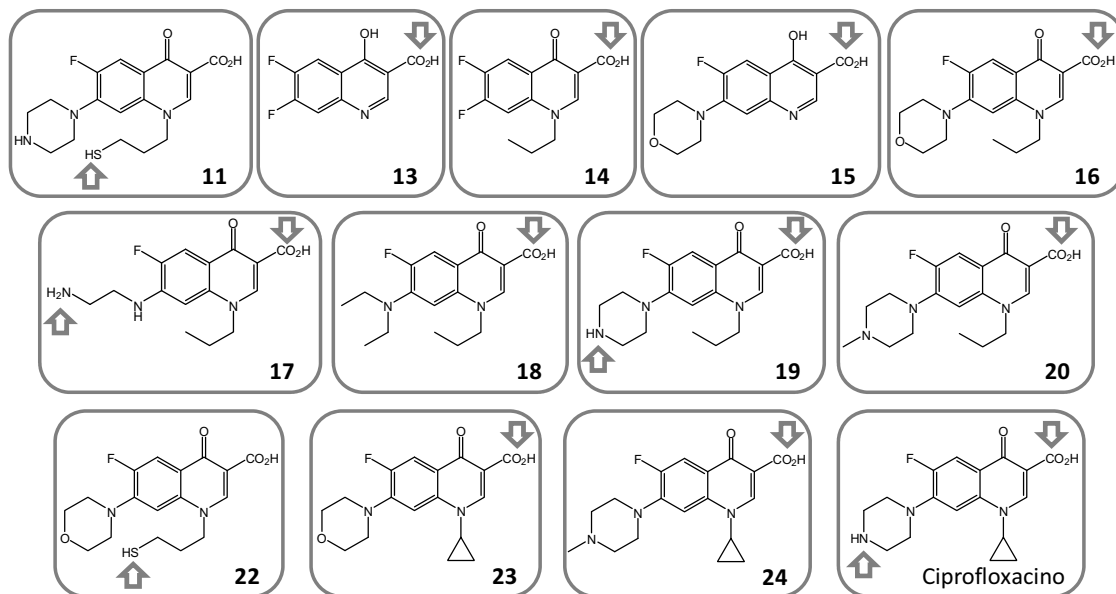


Figura 3.12. Estructuras de los diferentes haptenos de competición bioconjugados a proteínas para generar los competidores. Las flechas indican los grupos funcionales susceptibles de reaccionar con la proteína durante la bioconjugación.

Debido a la baja solubilidad de las QNs en disolventes orgánicos a T^a ambiente, se decidió realizar la reacción directamente en agua, utilizando como agente de activación de los ácidos carboxílicos una carbodiimida soluble en dichas condiciones como lo es la 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Como modelo para optimizar las condiciones de esta reacción se escogió el CPFY y la BSA. Téngase en cuenta que, por otra parte, existían varias posibilidades de reacción, entre las lisinas de la proteína y el grupo carboxilo de la QN, entre los grupos carboxilos de la proteína y el grupo amino de la QN y a su vez reacciones intermoleculares entre los grupos carboxilo y amino de la misma molécula, si bien ya existía precedentes que apuntaban a la baja reactividad del carboxilo de la QN.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó la bioconjugación utilizando 2 equivalentes de QN respecto a lisinas reactivas de la BSA y 5 equivalentes de EDC respecto a QN. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 3 horas en diferentes disoluciones: tampón citrato a pH 5.5, tampón fosfato a pH 7.5, tampón carbonato a pH 9.6 y en agua ultrapura sin tamponar. Se observaron los mejores resultados utilizando agua como disolvente, obteniéndose una densidad de hapteno de 9 restos por molécula de proteína y una recuperación del 90 %. Para las disoluciones tamponadas, se observó que la densidad de hapteno mejora en condiciones cercanas a la neutralidad (densidad de hapteno 7 para

tampón fosfato) y empeora al alejarse de dichas condiciones (densidad de hapteno 4 y 2 para disoluciones tampón citrato y carbonato respectivamente).

Por lo tanto se decidió no tamponar la disolución donde se llevaría a cabo la bioconjugación. De esta manera se bioconjugaron gran parte de los haptenos de competición a las proteínas BSA, CONA (conalbúmina) y OVA (ovoalbúmina) para obtener los antígenos de tapizado y a la enzima HRP (horseradish peroxidase) para obtener los trazadores enzimáticos. Tal como se ha comentado anteriormente, debido a que algunos haptenos poseían en su estructura grupos carboxilo y amino simultáneamente (**17,19**, y CPFX, véase **Figura 3.12** para las estructuras químicas), y a que la bioconjugación utilizando EDC no discrimina a la hora de activar los ácidos de la proteína o del hapteno, se decidió modificar la BSA utilizando anhídrido succínico y etilendiamina. El objetivo era obtener derivados proteicos en cuya superficie únicamente hubiese ácidos carboxílicos y aminos respectivamente, minimizando de esta forma la baja selectividad de la EDC. Se escogieron el hapteno **17** y el CPFX (véase **Figura 3.12** para las estructuras químicas) para bioconjugarse a BSA modificada de estas dos formas. A su vez se acoplaron estos dos compuestos a carboxi y amino dextrano con el mismo objetivo.

El principal problema de los derivados de BSA modificada, tanto con anhídrido succínico como con etilendiamina, fue la baja solubilidad de los bioconjugados resultantes, lo que hizo inviable su utilización. En cuanto a los derivados de dextrano, ambos tuvieron una respuesta muy inferior en ELISA a los bioconjugados de BSA que inicialmente se prepararon, por lo cual se decidió descartar este último tipo de competidores, a pesar de que permitían tener una caracterización más fiable respecto de cómo el hapteno se habría unido a la biomacromolécula utilizada como competidor.

Finalmente, en una etapa más avanzada de la tesis y con el objetivo de desarrollar un inmunosensor amperométrico, se utilizó el cloruro cianúrico como conector de haptenos con grupos amida a proteínas a través de sus lisinas accesibles. La ventaja que presenta este compuesto consiste en que la reactividad de cada átomo de cloro es diferente, ya que al ir reaccionando con nucleófilos el anillo aromático se torna cada vez menos electrodeficiente, por lo que la entrada del segundo nucleófilo es más difícil que la del primero y para sustituir el tercero es necesario trabajar a elevada temperatura [182] (véase **Figura 3.13**). Esta diferente reactividad permitía, a priori, realizar la bioconjugación de manera inequívoca a través de los grupos amina, además al introducirlos de forma secuencial se minimizaba el riesgo de reacciones intermoleculares de los haptenos. Así pues, en una primera etapa se realizó la reacción entre el cloruro cianúrico y la proteína (BSA y HRP), y tras la eliminación del exceso de reactivo por diálisis, se procedió a realizar la reacción entre la proteína modificada y el hapteno **17**. Se utilizó dicho hapteno, ya que esta aproximación se realizó una vez evaluados el resto de competidores mediante ELISA en formato indirecto, siendo el bioconjugado **17-BSA** el que mejor prestaciones presentaba. Como en los casos anteriores el principal problema con la BSA fue la baja solubilidad, sin embargo utilizando HRP se obtuvo un trazador enzimático con unas muy buenas prestaciones en ELISA como se verá más adelante (véase **Sección 3.3.5.3**).

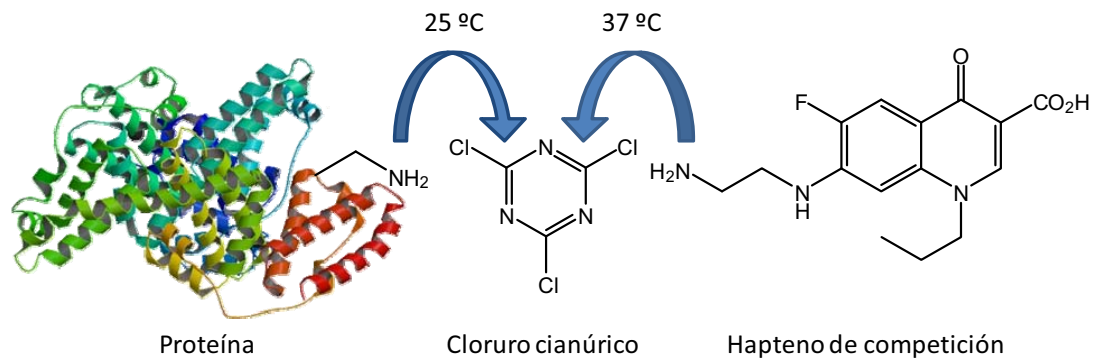


Figura 3.13. Esquema representativo de la bioconjugación utilizando cloruro cianúrico como conector de haptenos con grupos amida a proteínas a través de sus lisinas accesibles.

3.3.4. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Una vez obtenido y caracterizado el inmunógeno, se procedió a la inmunización de 3 conejos de la variedad New Zealand para obtener antisueros policlonales contra QNs. Los antisueros obtenidos fueron nombrados con el número de conejo, así este proceso dio resultado a los antisueros (As) **As171, As172 y As 173**.

Tal y como se describe en la sección experimental de la **publicación III (Sección 3.5)**, se aplicó un protocolo de inmunización de seis meses, consistente en una inoculación mensual y una extracción de suero parcial diez días después de cada inyección para monitorizar el proceso. Se inocularon 100 µg de inmunógeno por conejo y mes, en una emulsión formada por una disolución de inmunógeno en PBS (tampón fosfato salino) y adyuvante de Freund a partes iguales. Se utilizaron los dos tipos, el adyuvante de Freund completo para la primera inoculación y el incompleto para el resto. El adyuvante de Freund consiste en una mezcla de aceites minerales y un agente dispersante, conteniendo el completo además *Mycobacterium tuberculosis* inactivada. Este adyuvante es un inmunopotenciador de recuerdo y actúa liberando el inmunógeno lentamente, lo que permite una buena activación de los macrófagos.

La evolución del título de anticuerpo se realizó mediante un ELISA no competitivo en formato indirecto, en el que se tapizaron las placas con una disolución del competidor homólogo (hapteno de inmunización unido a una proteína diferente a la del inmunógeno, **11-BSA**) a 1 µg/mL y se enfrentaron a diferentes diluciones de los antisueros parciales (desde dilución 1/1000 a 1/64000). Como se puede observar en la **Figura 3.14**, en los tres casos se obtuvo buena respuesta frente al competidor homólogo siendo el de menor respuesta el As 172. Hasta el final del proceso el título de anticuerpo aumentó para los tres animales.

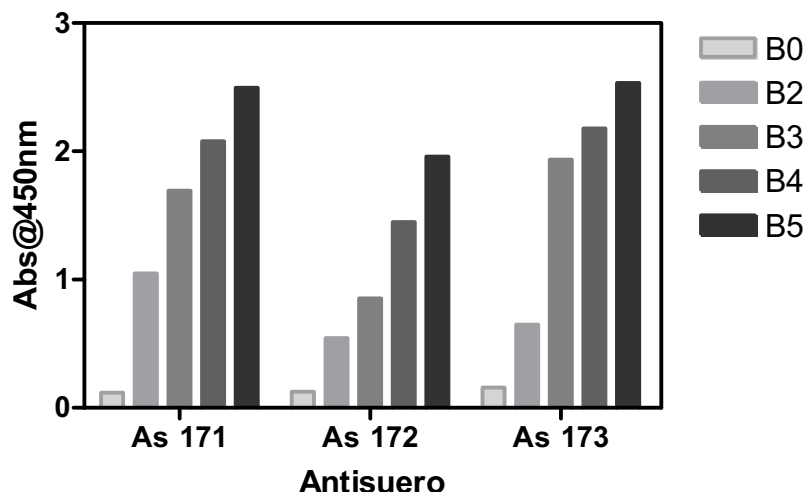


Figura 3.14. Evolución del título de anticuerpo mediante ELISA indirecto no competitivo. B0-B4 corresponde al antisuero parcial, siendo B0 el antisuero preinmune (previo a la inmunización) y B4 el correspondiente a la 5ª inoculación. Las placas fueron tapizadas a 1 µg/mL y los antisueros fueron diluidos 64000 veces.

3.3.5. DESARROLLO DEL ELISA

3.3.5.1. Valoración de la afinidad de los antisueros por los competidores

Una vez que los inmunoreactivos estuvieron a punto, se procedió a la evaluación del reconocimiento de los diferentes competidores por los antisueros generados, tanto antígenos de tapizado como trazadores enzimáticos. En una primera etapa, se realizaron experimentos monodimensionales utilizando ELISAs no competitivos en formato directo para evaluar el reconocimiento de los trazadores enzimáticos y en formato indirecto para los antígenos de tapizado (véase **Figura 3.2**).

En cuanto a los antígenos de tapizado, solamente los bioconjugados de BSA fueron capaces de generar respuesta, mientras que con los de albúminas procedentes del huevo (OVA y CONA) no se obtuvo señal (véase **Figura 3.15**), aun a pesar de que se comprobó por MALDI-TOF que la bioconjugación a CONA había funcionado, obteniéndose densidades de hapteno de entre 4.30 y 1.09. Lo mismo sucedió con los trazadores enzimáticos preparados con EDC. En este estadio, y debido a la nula respuesta de los bioconjugados de OVA, CONA y HRP, se decidió continuar únicamente con los bioconjugados a la BSA en formato de ELISA indirecto, si bien más adelante, y con el objetivo de desarrollar un dispositivo inmunosensor, se retomaría el tema de la preparación de trazadores enzimáticos mediante el método del cloruro cianúrico.

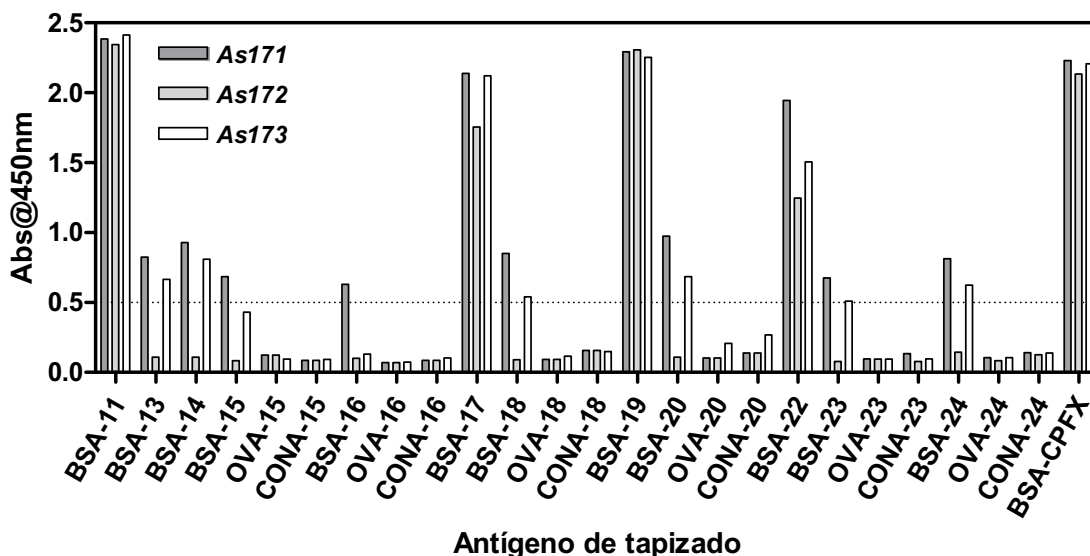


Figura 3.15. Resultados de los experimentos de valoración (ELISA indirecto no competitivo) utilizando los antisueros generados contra **11-HCH (As171-173)** frente a los diferentes haptenos de competición (**13-24** y CPIX) unidos a BSA, OVA y CONA. Condiciones del ELISA indirecto no competitivo: As 1:2000, Antígenos de tapizado a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Centrándonos en los bioconjugados de BSA, en el caso particular de los haptenos en los que la única posibilidad de bioconjugación era a través del ácido en la posición 3 de QN (haptenos **13, 14, 15, 16, 18, 20, 23** y **24**, véase **Figura 3.12** para estructuras químicas), se observó que para los tres antisueros producidos, la señal obtenida por ELISA era muy inferior a la correspondiente al resto de haptenos (véase **Figura 3.15**). Este hecho demuestra la importancia del sistema β -ceto ácido en el bioreconocimiento de los anticuerpos desarrollados utilizando el inmunógeno **11-HCH**, que expone al sistema inmune dicho grupo, el cual es común a todas las QNs, tal como se esperaba en base al diseño racional que se había realizado para el hapteno de inmunización. También se observó que con el **As172** se obtiene una señal ligeramente inferior a la del resto de los antisueros, hecho ya observado durante la monitorización del título de anticuerpo (véase **Figura 3.14**).

Las combinaciones que mostraron una absorbancia superior a 0.5 para una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno de tapizado y una dilución de antisuero de 1:2000 (un total de 36 combinaciones As/AT), fueron seleccionadas para la realización de experimentos bidimensionales (2D). En dichos experimentos se varió tanto la concentración de AT como la dilución de As, con la finalidad de obtener las concentraciones óptimas de ambos inmunoreactivos para realizar los ensayos competitivos. Dichas concentraciones corresponden a aquellas que producen valores de absorbancia en torno a 1, correspondiendo a su vez dichos valores al 70-80 % del valor de absorbancia obtenido en condiciones de saturación para dichos reactivos.

Utilizando dichas concentraciones, se realizaron los ELISAs competitivos, observándose competencia en 18 de dichas combinaciones. La **Tabla 3.3** muestra los parámetros de los 7 ensayos que mostraron una IC_{50} inferior a 25 $\mu\text{g}/\text{L}$, de las cuales 5 corresponden al **As171** y 2 al **As172**. En todos los casos la bioconjugación de los haptenos ocurre a través de las posiciones 1 o 7 de la estructura del hapteno de competición.

Tabla 3.3. Parámetros característicos de diferentes ELISAs competitivos obtenidos con los diferentes antisueros y antígenos de tapizado con una IC₅₀ inferior a 25 µg/L.

Antisuero	Antígeno de tapizado	A _{max}	A _{min}	IC ₅₀ ^a	Pendiente	R ²
As171	11-BSA	1.62	0.07	4.77	-0.66	0.998
	17-BSA	1.36	0.1	1.65	-0.79	0.969
	19-BSA	1.46	0.12	7.09	-0.60	0.992
	22-BSA	1.77	0.14	16.26	-0.86	0.998
	CPFX-BSA	0.63	0.06	5.20	-0.51	0.996
As172	17-BSA	1.43	0.08	11.45	-0.85	0.993
	19-BSA	1.42	0.07	22.76	-0.71	0.968

*Las curvas preparadas se midieron en ELISA. Cada concentración se midió en la microplaca por duplicado.^a Expresado en µg/L. El valor ha sido extraído como resultado del ajuste con la ecuación de 4 parámetros (véase **Formula 3.2**).*

La combinación que mostró los mejores parámetros, correspondiente al **As171** con el **17-BSA**, se eligió para su posterior optimización. De acuerdo con la legislación Europea mencionada anteriormente, en estas condiciones el ensayo presenta una detectabilidad muy por debajo de los límites requeridos (véase **Tabla 1.2**, página 22).

3.3.5.2. Optimización del formato indirecto

Se estudió la influencia de diferentes parámetros fisicoquímicos en el comportamiento de la combinación de inmunoreactivos escogida mediante experimentos de ELISA competitivo. Utilizando CPFX como analito se estudiaron diferentes tiempos de tapizado, de competencia y de preincubación de analito y anticuerpo, así como la estabilidad de las disoluciones patrón de los inmunoreactivos. A su vez se comprobó el efecto de la concentración de Tween® 20, de la fuerza iónica y el pH del medio de competencia, así como presencia de disolventes orgánicos y de cationes divalentes en dicho medio.

El tiempo de tapizado, la preincubación del analito con el anticuerpo y tiempos de competencia superiores a 30 min no supusieron una mejora significativa en las prestaciones del ensayo. En cuanto a la estabilidad de las disoluciones patrón almacenadas a 4 °C, se observó que tanto la disolución de analito como la de antígeno de tapizado eran estables al menos 2 meses en esas condiciones.

No se observó un efecto significativo para la concentración de tween® 20, siendo el ensayo estable hasta el 1 % (véase **Figura 3.16A**). En cuanto a la fuerza iónica del tampón en el que transcurre la etapa de competencia, el ensayo empeora a conductividades inferiores a 7.5 mS/cm, manteniéndose estable hasta al menos conductividades de 50 mS/cm (véase **Figura 3.16B**). La presencia de disolventes orgánicos apróticos, como DMF y DMSO, inhibe el ensayo (véase **Figura 3.16C**) mientras que la presencia de disolventes orgánicos próticos, como etanol y metanol, es tolerable hasta proporciones del 25 % (véase **Figura 3.16D**), si bien en el caso del metanol el valor de la IC₅₀ aumenta muy significativamente.

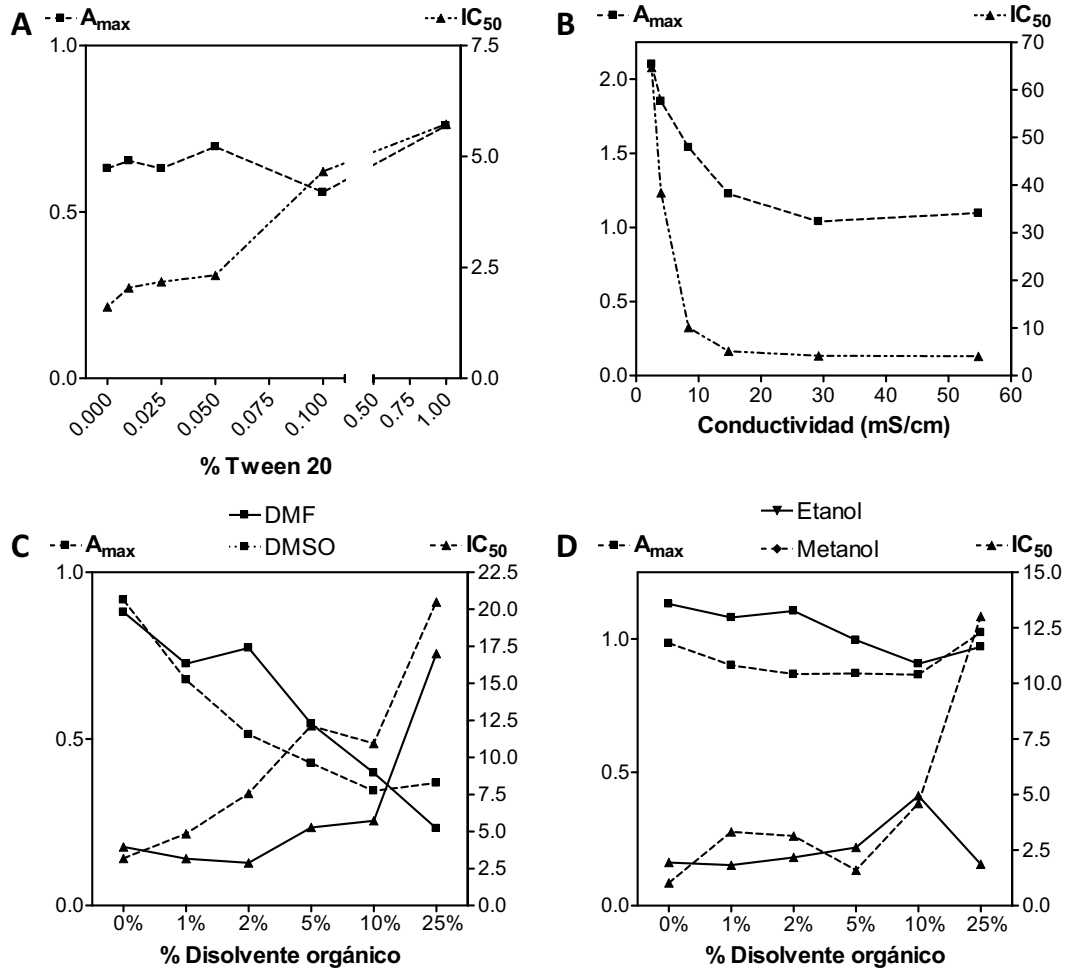


Figura 3.16. Efecto de diferentes parámetros físico-químicos en el ensayo **As171/17-BSA**. **A.** Efecto del porcentaje de Tween® 20 en el tampón de competencia. **B.** Efecto de la conductividad en el medio de competencia. **C.** Efecto del porcentaje de DMF y DMSO en el tampón de competencia. **D.** Efecto del porcentaje de etanol y metanol en el tampón de competencia. La absorbancia máxima (A_{max}) está expresada en U.A. y se representa sobre el eje de la izquierda y la IC_{50} está expresada en nM y se representa sobre el eje de la derecha. Los valores representados están extraídos de los parámetros de la ecuación de ajuste de las curvas de calibrado para CPFX.

Respecto del pH, se observó una gran influencia en la zona entre 6.5 y 8.5, aumentando la IC_{50} y disminuyendo la absorbancia máxima en el intervalo entre 7 y 8. Este tipo de efecto rara vez se observa en inmunoensayos donde se evalúa este parámetro [114, 162, 183-185], generalmente existe una tendencia y un rango de pH para el cual el ensayo permanece estable. Si comparamos este comportamiento con las proporciones de cada una de las especies ácido-base del CPFX se observa que cuanto mayor es la proporción de especie zwitteriónica (HX), mayor es el aumento de la IC_{50} (véase **Figura 3.17A**). Este efecto puede ser atribuido a la menor solubilidad del CPFX en ese intervalo de pH [180].

En cuanto a la presencia de cationes divalentes, al añadir $CaCl_2$ al tampón de competencia, se observó un aumento de la absorbancia máxima y de la pendiente del ensayo, y a su vez una disminución de la IC_{50} , teniendo esta mejora su máximo a 1 mM de $CaCl_2$ (véase **Figura 3.17B**). Es conocido que las QNs son capaces de complejar cationes divalentes y trivalentes a través del sistema β -cetoácido [186, 187], lo cual puede explicar el efecto observado, ya que durante la generación de los anticuerpos dentro del animal huésped es muy probable que el

hapteno de inmunización estuviese complejado. El efecto del pH y del Ca^{2+} , corroboran la gran contribución del sistema β -cetoácido en el fenómeno de reconocimiento de los anticuerpos generados, demostrándose que el diseño de haptenos ha sido efectivo.

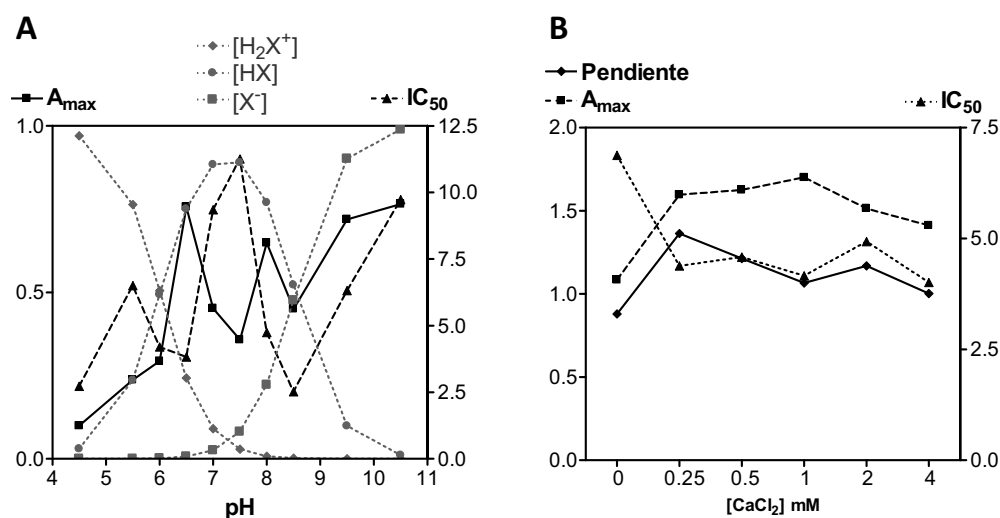


Figura 3.17. Efecto de diferentes parámetros físico-químicos en el ensayo **As171/17-BSA**. **A.** Efecto del pH del tampón de competencia y fracción molar de cada una de las tres especies para cada pH estudiado (diagrama de Bjerrum). **B.** Efecto de la concentración de CaCl_2 en el medio de competencia. La absorbancia máxima (A_{max}) está expresada en U.A. y se representa sobre el eje de la izquierda y la IC_{50} está expresada en nM y se representa sobre el eje de la derecha. Los valores representados están extraídos de los parámetros de la ecuación de ajuste de las curvas de calibrado para CPFY.

Otro parámetro a evaluar fue la exactitud del ensayo. Se prepararon una serie de muestras ciegas a concentraciones conocidas de CPFY y dentro del rango de trabajo del ensayo, midiéndose su concentración por interpolación en la curva de calibrado. En un primer momento se obtenía una subestimación significativa y generalizada. Este hecho podría deberse a la baja disponibilidad del analito, por lo se decidió agitar la placa de ensayo durante todas las etapas del ELISA. De esta manera se obtuvo una buena correlación entre la concentración teórica de cada muestra y el valor obtenido mediante ELISA, obteniéndose una pendiente en la regresión lineal del 0.85 con un R^2 de 0.982 (véase **Figura 3.18**).

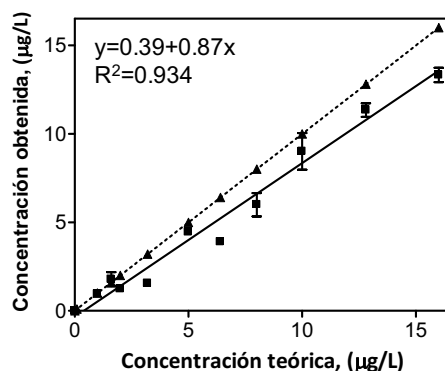


Figura 3.18. Correlación entre la concentración teórica de las muestras ciegas de CPFX y los valores de concentración obtenidos por ELISA en formato indirecto. La línea punteada corresponde a una correlación perfecta (pendiente=1). Cada punto corresponde a la media y la desviación estándar de 3 experimentos, realizados en 3 días diferentes, en los que se analizaban cada día 3 réplicas de cada muestra.

Finalmente se evaluó la especificidad de los anticuerpos desarrollados, ya que el objetivo principal era obtener un ensayo capaz de reconocer el mayor número posible de QNs. Se prepararon curvas patrón para 9 QNs a parte del CPFX y para otros antibióticos no pertenecientes a dicha familia. Todas las QNs fueron reconocidas en mayor o menor extensión y en ningún caso se observó competencia para antibióticos pertenecientes a otras familias (véase **Tabla 3.4**). Además, las detectabilidades alcanzadas estaban muy por debajo de los requerimientos de la legislación Europea para el análisis de estos antibióticos en muestras de leche (véase **Tabla 1.2**, página 22).

Debido al efecto que ejercía el pH en el ensayo, se realizó el mismo estudio a pH 8.5. Se observó una pérdida de detectabilidad para las QNs que poseen el anillo de piperazina alquilado, mientras que en las que se conserva dicho anillo sin alquilar la detectabilidad se mantenía prácticamente constante en todos los casos respecto al CPFX (véase **Tabla 3.4**). Este hecho abre la posibilidad de modular la selectividad del ensayo a través del pH, pudiendo en cierta medida no solo detectar QNs, sino también poder llegar a discriminar si pertenece al grupo con el anillo de piperazina sin alquilar o al grupo con la piperazina alquilada.

También se comprobó el efecto que ejercían los cationes divalentes en la especificidad. De esta manera se realizó el mismo estudio en tampón conteniendo 1 nM de CaCl_2 . Se observó que en el caso de ERFX y DFX el porcentaje de reactividad cruzada aumentaba hasta el 100 % respecto del CPFX. Sin embargo, el efecto del calcio no fue suficiente para el caso de QNs con un sistema de tres anillos fusionados o con grupos muy voluminosos en la posición 7 (véase **Tabla 3.4**).

Tabla 3.4. Valores de IC₅₀ y reactividad cruzada de compuestos de la familia de las QNs y otros antibióticos utilizando el ELISA desarrollado con los inmunoreactivos **17-BSA** y **As171**.

Tampón de la etapa de competencia						
Compuesto	PBST pH=7.5		PBST pH=8.5		PBST 1 mM CaCl ₂	
	IC ₅₀ ^a	% RC ^b	IC ₅₀ ^a	% RC ^b	IC ₅₀ ^a	% RC ^b
Ciprofloxacino	0.75±0.09 ^c	100	1.03±0.10 ^c	100	0.77±0.27 ^c	100
Enrofloxacin	3.75	22	8.05	14	0.65	127
Danofloxacin	9.35	9	38.45	3	7.31	11
Difloxacin	1.83	49	5.58	22	0.91	101
Marbofloxacino	---	---	---	---	4,30	19
Flumequina	4.73	13	18.31	4	3.91	15
Ácido Oxolínico	11.74	5	172.36	0.5	23,53	3
Norfloxacin	0.67	108	0.75	132	0.78	94
Sarafloxacin	0.49	177	1.01	118	0.96	93
Ofloxacin	1.29	58	12.22	9	1.84	45
Sulfametacina	---	---	---	---	>1000	<0.2
Sulfatiazola	---	---	---	---	>1000	<0.2
Cloramfenicol	---	---	---	---	>1000	<0.2
Tetraciclina	---	---	---	---	>1000	<0.2
Doxiciclina	---	---	---	---	>1000	<0.2
Ampicilina	---	---	---	---	>1000	<0.2

^a expresado en µg/L. ^b calculado utilizando IC₅₀ expresado en nM utilizando la fórmula: %RC = $\frac{IC_{50} \text{ ciprofloxacino}}{IC_{50} \text{ quinolona}} \times 100$. ^c valores de IC₅₀ y de desviación estándar correspondientes a la media de 3 ensayos realizados en diferentes días. Las curvas de calibrado se construyeron utilizando 2 réplicas.

En el momento de obtener estos resultados, era la primera vez en la que se obtenían con éxito anticuerpos con selectividad de clase. Hasta ese momento, tal como se ha comentado los anticuerpos se habían obtenido a partir congéneres particulares obteniéndose anticuerpos con una alta especificidad hacia esos compuestos en cuestión [156-158]. Con posterioridad a esta tesis doctoral, se han reportado otros trabajos en los que también se ha conseguido alcanzar una selectividad de clase. Los autores de estos trabajos consiguen ampliar el espectro de reconocimiento de las QNs no desde una aproximación química, racionalizando la estructura química del hapteno de inmunización, si no en base a incrementar las posibilidades de seleccionar un clon (en el caso de MAb) [118, 127, 129, 133, 135, 188-191], un fragmento variable mutante de cadena sencilla (en el caso de los scFv) [122, 132, 192] o un animal (en el caso de PAb) [126, 128, 134].

Concretamente respecto a los anticuerpos policlonales, Huet et al. [126] y Tittlemier et al. [128] han descrito el desarrollo de anticuerpos utilizando un mismo inmunógeno, implementando el formato indirecto el primero y el directo el segundo. Como haptenos de inmunización emplearon derivados de SRFX y NRFX por reacción del ácido 6-bromohexánico con la amina secundaria de la piperazina de la propia QN. Mediante dicha aproximación, consiguen obtener anticuerpos genéricos con buena detectabilidad (IC₅₀ comprendidas entre 0.2 y 25 µg/L), aunque no consiguen que la FLUME sea reconocida más de un 3 %. Además no

existe un control total sobre la bioconjugación, ya que en la estructura de dichos haptenos de inmunización coexisten dos grupos ácidos, a través de los cuales transcurre la unión a la proteína, por lo que la orientación final del hapteno de inmunización en el inmunógeno no está totalmente definida. Por otro lado, más recientemente Fan et al. [134] han reportado la producción de anticuerpos policlonales en base a un inmunógeno preparado mediante la unión de NRFX a BSA a través del ácido carboxílico en posición 3. Si bien consiguen reconocer 9 QNs con porcentajes de reactividad cruzada por encima del 10 %, en este caso la detectabilidad no es tan buena (IC_{50} comprendidas entre 3 y 25 $\mu\text{g/L}$), y tampoco son capaces de detectar FLUME, DNFX ni MBFX, de gran relevancia en el ámbito veterinario y legislados en leche por la CE.

En cuanto a los anticuerpos monoclonales, en todos los casos se emplean QNs comerciales como haptenos de inmunización, utilizando el ácido carboxílico de la posición 3 de las mismas para la unión a la proteína. En base a un rastreo de los clones dirigido, consiguen obtener anticuerpos genéricos, capaces de detectar entre 6 y 16 QNs según el caso, con valores de IC_{50} superiores a 1 $\mu\text{g/L}$. En la gran mayoría de los casos, no son capaces de reconocer la FLUME y cuando son aplicados al análisis de muestras reales, requieren de un tratamiento previo de la muestra. Respecto a los basados en scFv mejoran la detectabilidad de los anticuerpos de partida, aunque la principal desventaja de esta aproximación consiste en la necesidad de utilizar herramientas de biología molecular que encarecen el proceso, aparte de alargar el tiempo de desarrollo, siendo necesario además utilizar de partida un anticuerpo monoclonal con unas buenas características iniciales en lo que se refiere a detectabilidad y amplio reconocimiento.

Así pues, si bien la detectabilidad en general de estos anticuerpos es buena, como se comentará más adelante, la implementación de varios de estos ensayos al análisis de muestras de leche ha puesto en evidencia que precisan de un tratamiento de muestra previo al análisis, aparte de tiempos de análisis superiores a las 3 h por la necesidad de etapas de bloqueo, siendo a su vez indispensable trabajar a 37 °C.

A la vista de todos los resultados anteriormente expuestos se fijaron las condiciones óptimas del ensayo para el formato indirecto. No se aplica etapa de preincubación y se establece el tiempo de la etapa de competencia en 30 min. El tampón de competencia es PBSTCa, que consiste en 10 mM PBS a pH=7.5, con una concentración de Tween® 20 de 0.05 % y 1 mM de CaCl_2 . Todas las etapas del ensayo se realizan con agitación orbital.

Bajo estas condiciones óptimas se evaluó la reproducibilidad del ensayo mediante la comparación de curvas de calibrado en diferentes días (N=15, 5 ensayos durante 3 días diferentes). La **Figura 3.19** muestra la curva de calibrado promedio obtenida y en la tabla anexa se muestran los parámetros característicos de dicha curva de calibrado, destacando la IC_{50} de 0.35 $\mu\text{g/L}$ y un límite de detección de 40 ng/L (correspondiente a la concentración que produce el 90 % de la señal máxima). La desviación estándar de cada parámetro indica la buena reproducibilidad del ensayo.

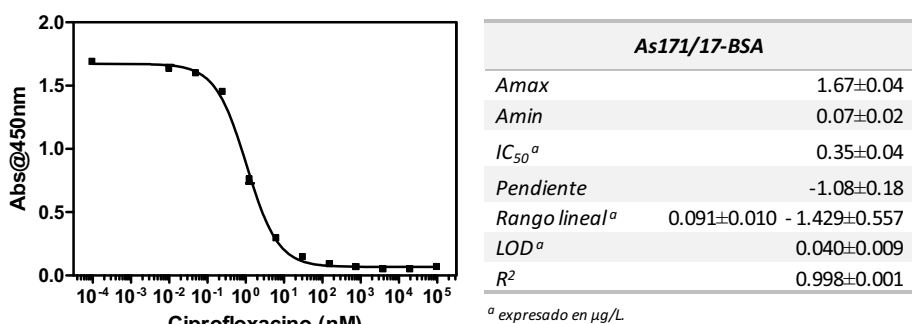


Figura 3.19. Curva de calibrado promedio y parámetros característicos obtenidos para ciprofloxacino con el ELISA indirecto tras su optimización. Los valores de IC₅₀ y de desviación estándar corresponden a la media de 5 ensayos realizados en 3 días diferentes. Cada punto corresponde a la medida de 3 pocillos para cada ensayo.

En el momento de obtener estos resultados, el presente inmunoensayo mejoraba lo anteriormente descrito en términos de detectabilidad y patrón de reconocimiento. Como ya se ha explicado anteriormente, con posterioridad a la obtención de dichos resultados se describieron inmunoensayos genéricos para QNs con buena detectabilidad, en algunos casos del orden a las conseguidas por los inmunoreactivos presentados en esta tesis [126, 135, 189] aunque por lo general no superan los resultados aquí obtenidos.

3.3.5.3. Optimización del formato directo

Tal y como se ha explicado en la **Sección 3.3.5.1**, utilizando los bioconjugados de HRP preparados con el método de la EDC no se obtuvo respuesta en ELISA directo no competitivo. En una etapa posterior de la tesis, durante el desarrollo de un inmunosensor electroquímico, se utilizó el cloruro cianúrico como conector, obteniéndose en este caso un trazador enzimático con muy buena respuesta. Solamente se preparó el bioconjugado correspondiente al hapteno **17** utilizando este método de conjugación, ya que era el hapteno que mejores prestaciones donaba al inmunoensayo final según los resultados previos obtenidos en el formato indirecto. Aprovechando la experiencia adquirida durante el desarrollo de dicho formato, para el caso del formato directo solamente se evaluó la influencia del tiempo de tapizado, del pH del tampón de competencia y también la estabilidad de la disolución del trazador enzimático. Se incluyó desde un primer momento una concentración de 1 mM de CaCl₂ en el tampón de competencia y todas las etapas del ensayo trascurrieron bajo agitación orbital.

En este sentido, se observaron mejores resultados en cuanto a señal máxima, cuando la etapa de tapizado se realizaba durante 4 horas a temperatura ambiente que cuando se realizaba toda la noche a 4 °C, duplicándose el valor de absorbancia máxima utilizando las mismas concentraciones de inmunoreactivos. La disolución del trazador resultó ser estable al menos dos meses a 4 °C, observándose un máximo en la absorbancia máxima después de un mes de la descongelación de la alícuota de trabajo.

En cuanto al pH, en este caso no se observó el mismo efecto que en el formato indirecto ya que en el rango de pH de 7 a 7.5, tanto los valores de IC₅₀ como de absorbancia máxima eran óptimos (véase **Figura 3.20A**). Esto puede ser atribuido a que durante la realización de este experimento ya se habían incluido las condiciones óptimas establecidas en el formato

indirecto, como son la introducción de CaCl_2 en el tampón de competencia y la agitación orbital de la placa durante todas las etapas del ensayo, factores que pueden atenuar la influencia del pH en el ensayo. El ensayo no solo es estable en el intervalo anteriormente mencionado, sino que se trata de un ensayo muy robusto, ya que tal como se puede ver en la gráfica, sería posible trabajar en medios con valores de pH cercanos a 9. En estas condiciones la IC_{50} se mantiene por debajo de 1 nM y la absorbancia es muy alta.

También se evaluó la exactitud del ensayo de igual forma que para el formato indirecto (Véase **Sección 3.3.5.2**). En este caso se observó una excelente correlación entre concentraciones teóricas y las obtenidas mediante ELISA, con una pendiente en la regresión lineal del 0.974 (véase **Figura 3.20B**).

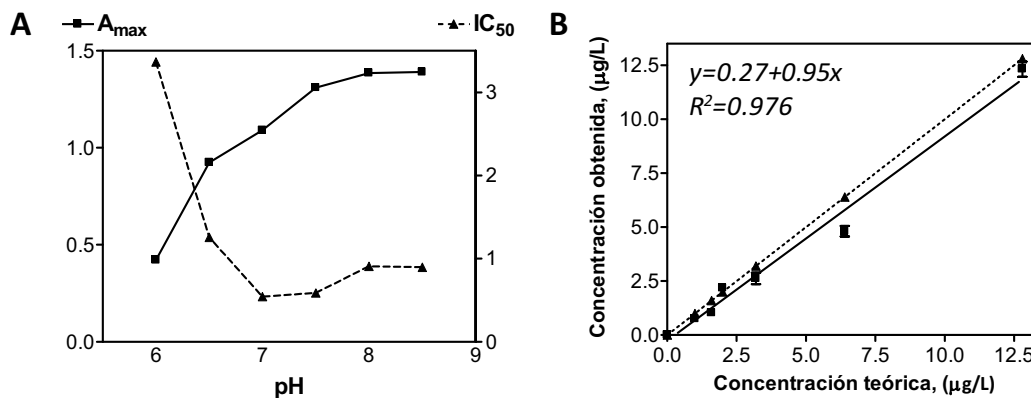


Figura 3.20. A. Efecto del pH del tampón de competencia para la combinación **As171/17-HRP**. La absorbancia máxima (A_{max}) está expresada en U.A. y se representa sobre el eje de la izquierda y la IC_{50} está expresada en nM y se representa sobre el eje de la derecha. Los valores representados están extraídos de los parámetros de la ecuación de ajuste de las curvas de calibrado de CPFX. **B.** Correlación entre la concentración real de las muestras ciegas de ciprofloxacino y los valores de concentración obtenidos por ELISA en formato directo. La línea punteada corresponde a una correlación perfecta (pendiente=1). Cada punto corresponde a la media y la desviación estándar de 2 experimentos, realizados en 2 días diferentes, en los que se analizaban cada día 3 réplicas de cada muestra.

En cuanto a la especificidad, el formato directo también fue capaz de detectar en diferente medida las 9 QNs ensayadas respecto al CPFX. En este sentido, el perfil de reactividad cruzada fue muy similar al obtenido en el formato indirecto utilizando el mismo tampón de competencia (10 mM PBST, 1 mM CaCl_2 a pH 7.5), con una ligera disminución de la IC_{50} para la mayoría de las QNs empleadas (véase **Tabla 3.5**)

Tabla 3.5. Valores de IC₅₀ y reactividad cruzada de compuestos de la familia de las QNs utilizando el ELISA desarrollado con los inmunoreactivos **17-HRP** y **As171**.

Compuesto	IC ₅₀ ^a	% RC ^b
Ciprofloxacino	0.97±0.04 ^c	100
Enrofloxacin	0.56	180
Danofloxacin	7.33	14
Difloxacin	0.46	242
Marbofloxacino	2.56	41
Flumequina	1.94	39
Ácido Oxolínico	7.07	11
Norfloxacin	1.01	86
Sarafloxacin	1.03	102
Ofloxacin	1.61	61

^a expresado en µg/L. ^b calculado utilizando IC₅₀ expresado en nM utilizando la fórmula: $\% RC = \frac{IC_{50} \text{ ciprofloxacino}}{IC_{50} \text{ quinolona}} \times 100$. ^c valores de IC₅₀ y de desviación estándar correspondientes a la media de 3 ensayos realizados en diferentes días. Las curvas de calibrado se construyeron utilizando 2 réplicas.

Así pues se fijaron las condiciones óptimas que para el caso del formato directo, que coincidían con las del formato indirecto. Bajo dichas condiciones se evaluó la reproducibilidad del ensayo comparando curvas de calibrado preparadas en diferentes días (N=15, 5 ensayos durante 3 días diferentes). En **Figura 3.21** se puede observar la curva de calibrado promedio obtenida y la tabla anexa muestra los parámetros característicos de dicha curva, con una IC₅₀ de 0.91 µg/L y un límite de detección de 200 ng/L (correspondiente a la concentración que produce el 90 % de la señal máxima). La reproducibilidad del ensayo es buena como indica la desviación estándar de cada parámetro.

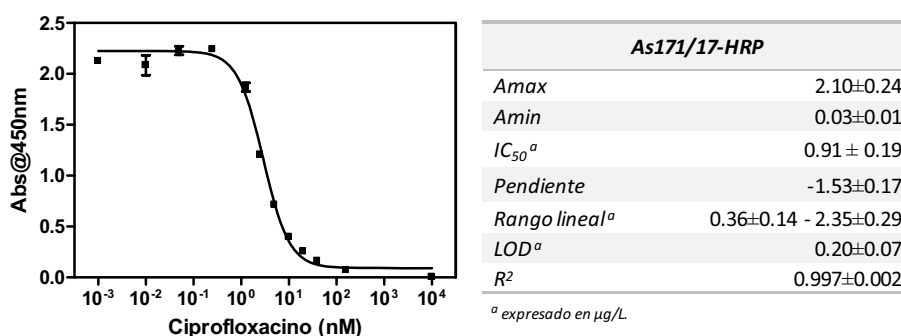


Figura 3.21. Curva de calibrado promedio y parámetros característicos obtenidos para ciprofloxacino con el ELISA directo tras su optimización. Los valores de IC₅₀ y de desviación estándar corresponden a la media de 5 ensayos realizados en 3 días diferentes. Cada punto corresponde a la medida de 3 pocillos para en cada ensayo.

3.4. Publicación II: Diseño de hapteno asistido por modelado molecular para producir anticuerpos con selectividad de clase para antibióticos de tipo fluoroquinolonas

En el siguiente artículo se presenta la producción de anticuerpos con selectividad de clase para las QNs basado en un diseño de hapteno asistido por criterios químicos, estudios teóricos y de modelización molecular. Para ello se ha tenido en cuenta el carácter zwitterionico de la mayoría de las QNs y la concentración relativa de las distintas especies en equilibrio a pH fisiológico. El hapteno de inmunización preserva los epítomos más importantes y característicos de esta familia de antibióticos y se prepara en forma de prehapteno estable a través de una ruta sintética de 5 pasos. Inmediatamente antes de la bioconjugación, el grupo tiol del hapteno de inmunización se desprotege mediante la eliminación del grupo protector bifenilmetano, para reaccionar con proteínas previamente modificadas con grupos yodoacetilo. La especificidad de los anticuerpos obtenidos se dirige hacia la zona común definida por el átomo de flúor en la posición 6 y el β -cetoácido. El ELISA desarrollado es capaz de reconocer con muy buena detectabilidad fluoroquinolonas importantes que se utilizan en la sector veterinario, tales como ciprofloxacino (CPFX, IC_{50} , 0,35 $\mu\text{g/L}$), enrofloxacin (ERFX, IC_{50} , 0,65 $\mu\text{g/L}$), danofloxacin (DNFX, IC_{50} , 7,31 $\mu\text{g/L}$), difloxacin (DFX, IC_{50} , 0,91 $\mu\text{g/L}$), sarafloxacin (SRFX, IC_{50} , 0,96 $\mu\text{g/L}$), norfloxacin (NRFX, IC_{50} , 0,78 $\mu\text{g/L}$), ofloxacin (OFX, IC_{50} , 1,84 $\mu\text{g/L}$), flumequina (FLUME, IC_{50} , 3,91 $\mu\text{g/L}$), marbofloxacin (MBFX, IC_{50} , 4,30 $\mu\text{g/L}$), y ácido oxolínico (OXO, IC_{50} , 23,53 $\mu\text{g/L}$). Los resultados presentados en el siguiente artículo demuestran que la afinidad del anticuerpo está fuertemente afectada por la presencia de cationes divalentes, debido a su formación de complejos con las moléculas de QN. Por otra parte, el resultado del efecto del pH en los ensayos inmunoquímicos sugiere que la selectividad podría ser modulada con el pH debido al carácter zwitteriónico de las fluoroquinolonas y en función de sus diferentes valores de pK_a .

Molecular Modeling Assisted Hapten Design To Produce Broad Selectivity Antibodies for Fluoroquinolone Antibiotics

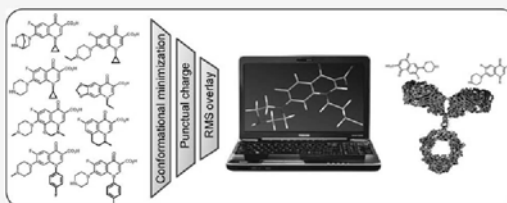
Daniel G. Pinacho,[†] Francisco Sánchez-Baeza,[†] and M.-Pilar Marco^{*,†}

[†]Applied Molecular Receptors Group (AMRg), Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology, IQAC-CSIC, CIBER de Biotecnología, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) Jordi Girona, 18-26, 08034-Barcelona, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Antibodies with a wide recognition profile of fluoroquinolone antibiotics have been produced based on chemical criteria, theoretical studies, and molecular modeling assisted hapten design. The immunizing hapten preserves the most important and characteristic epitopes of this antibiotic family. The studies have taken into consideration the zwitterionic character of most of the fluoroquinolones and the relative concentration of the different species in equilibrium at physiologic pH. The hapten is prepared in the form of a stable prehapten through a 5 step synthetic pathway.

Immediately before conjugation, the immunizing hapten is obtained by removing the diphenylmethane protecting group. The specificity of the antibodies obtained is directed toward the common area defined by the fluorine atom at position 6 and the β -ketoacid moiety. The ELISA developed is able to recognize with very good detectability important fluoroquinolones used in the veterinary field such as ciprofloxacin (CPFX, IC_{50} 0.35 $\mu\text{g L}^{-1}$), enrofloxacin (ERFX, IC_{50} 0.65 $\mu\text{g L}^{-1}$), danofloxacin (DNFX, IC_{50} 7.31 $\mu\text{g L}^{-1}$), difloxacin (DFX, IC_{50} 0.91 $\mu\text{g L}^{-1}$), sarafloxacin (SRFX, IC_{50} 0.96 $\mu\text{g L}^{-1}$), norfloxacin (NRFX, IC_{50} 0.78 $\mu\text{g L}^{-1}$), ofloxacin (OFX, IC_{50} 1.84 $\mu\text{g L}^{-1}$), flumequine (Flume, IC_{50} 3.91 $\mu\text{g L}^{-1}$), marbofloxacin (MBFX, IC_{50} 4.30 $\mu\text{g L}^{-1}$), and oxolinic acid (OXO, IC_{50} 23.53 $\mu\text{g L}^{-1}$). The results presented here demonstrate that the antibody affinity is strongly affected by the presence of divalent cations, owing to their complexation with the fluoroquinolone molecules. Moreover, the outcome from the effect of the pH on the immunochemical assays suggests that the selectivity could be modulated with the pH due to the zwitterionic character of the fluoroquinolones and as a function of their different pK_a values.



Animals in modern intensive production systems frequently receive large amounts of antibiotics for therapy, prevention, and control of diseases. It is known that the inappropriate use of antimicrobials is a decisive factor of the appearance of antibiotic resistance bacteria,¹ which constitutes a public health risk, primarily through the increased failure of disease treatment. In particular, fluoroquinolone (FQs) antibiotics display a broad spectrum of antimicrobial activity and have been widely used in food-producing animals, aquaculture, pets, and humans to treat or prevent bacterial infections. FQs metabolic pathways include glucuronidation, N-oxidation, and desmethylation being involved in the CYP 450 system.² With more than 800 million patients treated, FQs are currently some of the most widely used antimicrobials.

The chemical structures of FQs consists of 1-substituted-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acids often with a piperazinyl derivative at position 7 (see Figure S-1). Their antibacterial activity is pH-dependent since two protonation equilibria are involved due to the two ionizable moieties.³ Similarly, depending of the pH, FQs exhibit different solubilities, being their minimum aqueous solubility at the vicinity of neutral and physiological pH, when the zwitterionic specie is the most abundant.⁴ In the same way, FQs have pH-dependent chelation potential for transition metal ions, such as

copper, lead, zinc, calcium, and magnesium, and there is a great bioavailability reduction in the presence of divalent cations.^{5,6}

Because of the concerns about drug residues entering the food chain and contributing to bacterial resistance, different Directives 96/23/EC and 2377/90/EC report the maximum residue limits (MRLs) and the requirements of the analytical methods to control FQs residues in different food matrices. High-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence and ultraviolet detection and gas chromatography (GC) with mass spectrometric detection are the most commonly used analytical methods for the determination of FQs antibiotics in foods of animal origin.^{7,8} These methods are labor intensive, have limited sample throughput capabilities, and require expensive equipment and skilled workers. Luminescence, capillary electrophoresis, and microbial inhibition test^{9–11} are some of the alternative methods used to detect FQs residues but often lack of sufficient detectability and are time-consuming procedures nonviable as fast alarm methods.

Received: February 17, 2012

Accepted: April 10, 2012

Published: April 30, 2012

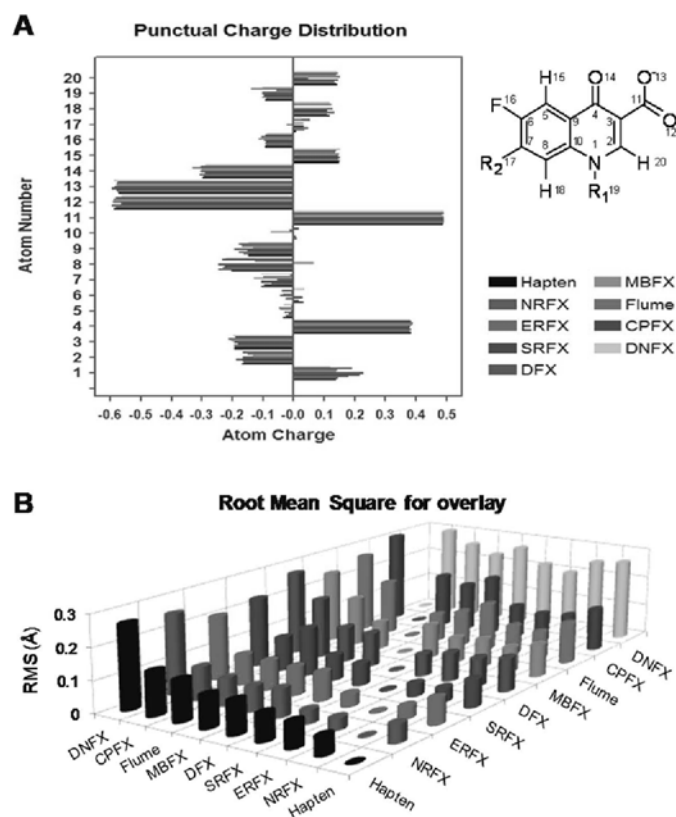


Figure 1. Results from the theoretical studies used to prove suitability of the proposed hapten **Graph A**. Punctual charge distribution of the common atoms present in the structure of fluoroquinolones, corresponding to the quinolone system and the atoms directly bond to it. **Graph B**. Root mean square (rms) in angstroms for overlay of equivalent atoms, comparing compounds two by two.

Immunochemical methods offer important advantages as screening methods due to their simplicity and high-throughput capabilities. Several immunoassays for FQs have been described in the literature addressing, in most of the cases, the detection of a particular congener.^{12–19} Almost in every case, the immunizing hapten was a commercial FQ linked to the carrier protein through the carboxylic acid in position 3^{20,21} or through the piperazine moiety at position 7,^{22–25} blocking common epitopes of the fluoroquinolone family. Production of broad selectivity antibodies has been a goal persecuted by many research groups but difficult to achieve. Molecular modeling and theoretical tools may assist immunochemists to find out the most appropriate hapten chemical structure.^{26–29} Thus, using these tools we have recently reported the production of antibodies with wide recognition profile for sulfonamide antibiotics,³⁰ and, previously, we demonstrated the need to consider the acid–base character of the target.^{27,28,31} However, sometimes intricate and complex synthetic procedures are required to prepare a hapten responding to the necessary demands, as recently pointed by Limin Cao et al.³² who reported the investigation of the conformational similarities of 27 quinolones using a new molecular model system. Hence, for the case of fluoroquinolones we should not forget the acid–base equilibria of these substances and how they do coexist at a

certain pH. Thus, taken all these considerations into account, here we report the production of broad specificity antibodies against fluoroquinolones using a new immunizing hapten. The chemical structure was designed considering the punctual charge distribution of important epitopes and the conformational and geometric features weighted in respect of the three fluoroquinolone chemical species that coexist in equilibrium at a certain pH, due to their zwitterionic character.

EXPERIMENTAL SECTION

General Methods and Instruments. See the Supporting Information.

Chemicals and Immunochemicals. The chemical reagents were obtained from Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI) and ACROS ORGANICS (Geel, Belgium). CPFX was kindly provided by UQUIFA S.A (Liça de Vall, Spain). The chemical structures of the immunizing and competitor haptens used in this study are shown in Figure S-2. The immunizing haptens 17 and 18 were synthesized as prehapten 15 and 16 as described.³³ The preparation of FQ protein bioconjugates and the antisera is described below. Other immunochemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The antibiotics used for crossreactivity studies were acquired from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Molecular Modeling and Theoretical Studies. Molecular modeling was performed using the Hyperchem 4.0 software package (Hypercube Inc., Gainesville, FL). Theoretical geometries and electronic distributions were evaluated for each acid–base species of CPFEX, DNFEX, DFX, ERFEX, Flume, MBFX, NREX, SREX, and the hapten using semiempirical quantum mechanics PM3 models.³⁴ The common atoms defined by the 10 atoms of the quinolone ring system and the 10 atoms directly linked to it, including the β -keto-acid moiety and the fluorine at position 6 (see structure in Figure 1A) were used in these studies. Theoretical calculations regarding pKa values of the haptens were carried out using the ACD/pKa 1.2 software package (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, ON, Canada) at the Department of Analytical Chemistry (University of Lund, Sweden), and the pK_a values given for the commercial fluoroquinolones were the average of the values reported in the literature.^{4,8,35}

Buffers. See the Supporting Information.

Preparation of FQ-Bioconjugates with Haptens Possessing a Thiol Group. (*17-BSA and 17-HCH, 18-BSA and 18-HCH (immunogen)*). Bioconjugation of haptens 17 and 18 was performed through a three-step procedure by removing the diphenylmethane protecting group of the prehaptens 15 and 16 immediately before their addition to freshly prepared solutions of the activated proteins (see Figure S-3).

Step 1: Activation of the Proteins. A solution of *N*-succinimidyl-3-maleimidyl propanoate (N-SMP, 15, 7.5, and 3.25 μ mol, 4, 2, and 1 mg respectively) or *N*-iodoacetoxysuccinimide (N-SIA, 70 μ mol, 20 mg) in dry DMF (400 μ L) was added dropwise to a solution of the protein (HCH or BSA, 15 mg each) in borate buffer (1.8 mL) and the pH adjusted to 8 by triethylamine. The mixture was kept overnight at 4 °C, and the activated protein was purified by size-exclusion chromatography using a HiTrap desalting Sephadex G-25 Superfine column (Amersham Biosciences) and borate buffer as eluent. The eluted fractions (0.5 mL) of the corresponding MP- or IA-protein conjugates were collected in eppendorf tubes, and those tested positive in the Bradford protein test were combined (3 mL).³⁶ A part of this solution was reserved for MALDI-TOF-MS analysis, and the rest was used for conjugation as it is described in step 3.

Step 2. 1-(3-Mercaptopropyl)-6-fluoro-7-(heterocycle)-1,4-dihydro-4-oxo-quinoline-3-carboxylic Acids (17 and 18, Immunizing Hapten). In the meanwhile, the fluoroquinolone prehaptens (15 or 16, 0.18 mmol, 1 equiv) were dissolved in TFA (2 mL) with anisole (300 μ L, 2.74 mmol, 15 equiv), and the mixture was stirred at 45 °C for 1.5 h until a total conversion of the starting product was observed by HPLC-UV. At this moment the solvent was evaporated to dryness under vacuum, and the residue was dissolved in water and washed with dichloromethane. The aqueous layer was immediately used for conjugation without further purification as described in step 3.

Step 3 Bioconjugation. Aqueous solutions of haptens 17 or 18 were added dropwise to the purified activated protein solutions (see step 1). Triethylamine was added to adjust and maintain the pH at 8. The mixture was kept under slight stirring for 2.5 h at RT to obtain the corresponding 17- and 18-MP-protein (or -IA-protein) conjugates. For the 17 and 18-IA-protein conjugates, capping of the remained unreacted iodine atoms was performed by adding a solution of cysteine (50 mM, 100 μ L) and stirring the mixture for 1 h more at RT. Finally the conjugates were purified by dialysis against 0.5 mM PBS (4 \times 5

L) and Milli-Q water (1 \times 5 L) and stored freeze-dried at –80 °C.

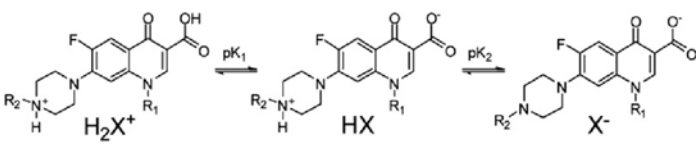
Preparation of FQ-Bioconjugates with Haptens Possessing Amino or Carboxylic Groups. The haptens 6, 7, 9–14, and CPFEX were coupled to the proteins (BSA, OVA, and CONA) by the carbodiimide method previously described.³⁷ Briefly, a solution of the hapten (10 μ mol) in DMF (100 μ L) was added to a solution of the protein (10 mg) in Milli-Q water (1 mL) followed by the addition of a solution of EDC (50 μ mol) in the same solvent (100 μ L), and the mixture was stirred for 3 h at RT. The protein conjugates were purified by dialysis against 0.5 mM PBS (4 \times 5 L) and Milli-Q water (1 \times 5 L) and stored freeze-dried at –80 °C. Unless otherwise indicated, working aliquots were stored at 4 °C in 0.01 M PBS at 1 mg mL^{–1}.

Hapten Density Analysis. Hapten densities of the conjugates were calculated by MALDI-TOF-MS by comparing the molecular weight of the native proteins to that of the conjugates (see Table S-1 and Table S-2). MALDI spectra were obtained by mixing 2 μ L of the freshly prepared matrix (*trans*-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, 10 mg mL^{–1} in ACN/H₂O 70:30, 0.1% TFA) with 2 μ L of a solution of the conjugates or proteins in ACN/H₂O 70:30, 0.1% TFA (5 mg mL^{–1}). The hapten density (δ hapten) was calculated according to the following equation: [MW(Conjugate)–MW(Protein)]/MW(Hapten).

Polyclonal Antisera. The immunization protocol was performed on female New Zealand white rabbits weighing 1–2 kg, as previously described.³⁸ Rabbits 171, 172, and 173 were immunized with 18-HCH. The concentrations of the immunoreagents were chosen from two-dimensional titration experiments by selection of those that provided 1 unit of absorbance at a concentration of the coating antigen at 70% of saturation (see the Supporting Information for more details).

Indirect ELISA (As171/11-BSA). Microtiter plates were coated with 11-BSA in coating buffer (0.25 μ g mL^{–1}, 100 μ L/well) overnight at 4 °C and covered with adhesive plate sealers. The following day, the plates were washed with PBST (four times, 300 μ L/well), and the CPFEX standards (0.01 nM–10000 nM, in PBSTCa, 50 μ L/well) followed by the As 171 (1/64000 in PBSTCa, 50 μ L/well) were added to the microtiter plates. After 30 min of incubation time at RT, the plates were washed again as before and a solution of anti IgG-HRP (1/6000 in PBST) was added (100 μ L/well) and incubated for 30 min more at RT. The plates were washed again, and the substrate solution was added (100 μ L/well). Color development was stopped after 30 min at RT with 2 M H₂SO₄ (50 μ L/well), and the absorbances were read at 450 nm. The standard curves were fitted to a four parameter equation according to the following formula: $Y = [(A - B) / (1 + (x/C)^D)] + B$, where A is the maximal absorbance, B is the minimum absorbance, C is the concentration producing 50% of the maximal absorbance, and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve.

Cross-Reactivity Determinations. Stock solutions were prepared in sodium hydroxide (50 mM) at a concentration of 10 mM for different FQs and others antibiotics. Standard solutions were prepared for each analyte in PBST pH = 7.5, PBST pH = 8.5, and PBSTCa (0.01 nM–10000 nM) and measured with the ELISA. For all FQs it was possible to build standard curves that fitted to the four-parameter equation mentioned above. The cross-reactivity values were calculated according to the following equation: (IC₅₀ CPFEX/IC₅₀ tested compounds) \times 100.

Table 1. Values of pK for the Acid–Base Equilibria of Fluoroquinolones and Percentage of Different Species at Physiologic pH (7.5)


compound	% H ₂ X ⁺	pK ₁	% HX	pK ₂	X
ciprofloxacin	2.9	6.01	89.0	8.54	8.1
enrofloxacin	2.1	5.99	66.5	7.83	31.5
danofloxacin	4.4	6.2	89.2	8.65	6.4
difloxacin	1.1	5.73	63.3	7.75	35.6
marbofloxacin	1.0	5.6	82.5	8.2	16.5
flumequine	---	6.46	8.4	---	91.6
oxolinic acid	---	6.9	20.1	---	79.9
norfloxacin	3.6	6.13	83.8	8.32	12.7
sarafloxacin	1.6	5.75	90.0	8.53	8.4
ofloxacin	1.1	5.7	70.7	7.9	28.2

RESULTS AND DISCUSSION

Considering the chemical structures of the fluoroquinolone antibiotic family, it seems clear that an ideal immunizing hapten for broad recognition of this family had to maintain the 6-fluoro-(7-heterocycle)-1,4-dihydro-oxoquinoline-3-carboxylic acid nucleus. Placing the linker at position 1, where there is the highest structural variability, exposure to the immunosystem of the 6-fluoro and the β -ketoacid, the most characteristic epitope, is maximized. Just recently, Limin Cao et al.³² arrived to the same conclusion on their paper reporting the results from molecular field-overlapping 27 quinolones, to explain the cross-reactivity results of antibodies raised against an enrofloxacin conjugate prepared through the carboxylic group at position 3 (β -ketoacid).

The potential changes that the introduction of the linker at this position could produce in the molecule were investigated with the aid of molecular modeling and theoretical tools. Particularly, we focused our attention on i) the zwitterionic nature of the fluoroquinolones and the equilibrium constants that govern the two acid–base equilibria (see Table 1), ii) the charge distribution of the species in equilibrium at pH = 7.5, and iii) the geometric and conformational features. Previous studies have already demonstrated that in order to design a representative hapten, ionizable molecules can be treated as species for which properties, such as punctual charge distribution and geometry, are an average of the different species in equilibrium.^{27,28,31} Thus, knowing the pK_a values of the fluoroquinolones was a key aspect in order to be aware of the species coexisting in equilibrium at a particular pH value. As it can be observed in Table 1, most of the fluoroquinolones could coexist as three predominant species. Hence, for a group of representative fluoroquinolones the most stable conformations and the punctual charge on relevant points of the molecule were calculated for each of the species present in equilibrium, and subsequently weighted in respect to the proportion present for each of them at physiological pH. These results were employed to compare these representative fluoroquinolones with the proposed immunizing hapten. Regarding the charge distribution, the punctual charges did not vary significantly and were within the range of the corresponding atoms of the different fluoroquinolone congeners (see Figure 1A). In the case of the geometric and

conformational features, the differences existing between the hapten and the different fluoroquinolones were defined according to the root-mean-square (rms) of the overlay of equivalent positions, comparing compounds two by two. The results showed that the introduction of the spacer arm at the position 1 does not produce either significant conformational changes, keeping the planarity of the system and the rms values for the hapten were in the same order as for the rest of the fluoroquinolones (see Figure 1B).

As a result of these studies, we concluded that haptens 17 or 18, with the linker at position 1, could be suitable for the production of antibodies with a broad recognition profile. However, due to the high number of functional groups of the fluoroquinolones, it was necessary to ensure an orthogonal chemistry on the functional group of the linker to be used for bioconjugation. Thus, neither amino, halogen, or carboxylic groups were in principle suitable due to their complementary chemistry to the functional groups present in these molecules (i.e., amino group could react with the carboxylic group in position 3, etc.). For this reason a thiol group was selected although it had to be protected to prevent oxidation and to avoid potential intra/intermolecular reactions. Alternatively, we have recently reported a convenient strategy to prepare conjugates from haptens with a thiol group, through the synthesis of disulfide symmetric dimers, as stable prehapten, that are reduced easily with the aid of a di(*n*-butyl)phenylphosphine polystyrene (DBPP) resin, just immediately before conjugation.³⁹

Additional heterologous haptens were also prepared and used as competitors to set up a high detectability assay for broad fluoroquinolone antibody recognition. Overall, three groups of haptens were synthesized showing distinct degrees of structural heterology regarding the chemical structure of the target molecule and the conjugation site. The first group enclosed the haptens with the highest homology, which were those selected for antibody production (haptens 17 and 18). On the second group, the linkage to the protein was accomplished through the amine group at position 7 (haptens 11, 13, and CPEX). Finally, for the third group, bioconjugation was performed through the carboxylic group at position 3 (haptens 6, 7, 9, 10, 12, and 14).

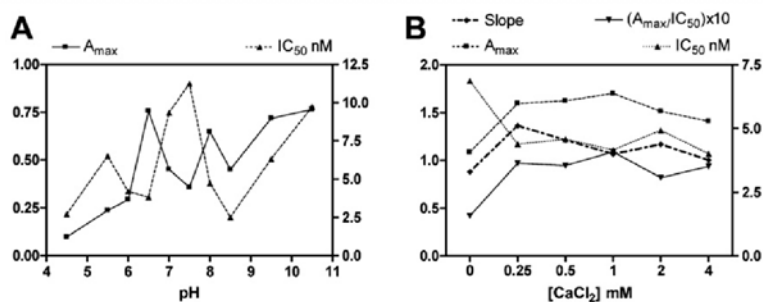


Figure 2. Results from the evaluation of the antibody performance under different physico-chemical conditions, visualized through the maximum absorbance and the IC_{50} of the ELISA. **Graph A.** Effect of the Ph. **Graph B.** Effect of the concentration of Ca^{2+} in the assay buffer. As it can be observed, the presence of Ca^{2+} improved slope and maximum absorbance, while the assay is strongly affected by variations in the pH values. Data shown are extracted from the four-parameter equation used to fit the standard curves.

The retrosynthetic scheme of the general synthetic strategy used to prepare the haptens appears in Figure S-2. The scheme chosen consisted on synthesizing the basic fluoroquinolone nucleus, the ethyl 6-fluoro-7-halo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylate 1–2, by an addition–elimination reaction of the diethyl ethoxymethylenemalonate to the 6-fluoro-7-haloaniline, followed by the cycloaddition to the aniline ring to obtain the desired product.⁴⁰ Alkylation of the nitrogen at position 1 for the introduction of the linker was accomplished by nucleophilic reaction with the corresponding reagents incorporating halogens as electrophilic groups (X-R, where X is an electrophilic group). Subsequently, hydrolysis of the ester followed by the aromatic nucleophilic substitution of the halogen at position 7 by the corresponding heterocycles yielded the desired fluoroquinolone haptens. The immunizing haptens 17 and 18 were synthesized as prehaptenes (15 and 16) with the thiol group protected with a diphenylmethane group to prevent oxidation and formation of the corresponding disulfides.

Haptens with a thiol group, generated after removal of the protecting group, were covalently linked to proteins previously activated in the form of N-maleimidepropanoyl or iodoacetyl modified proteins (MP- or IA-protein, respectively in Figure S-3). MALDI-TOF-MS analysis revealed that independently from the degree of modification accomplished in the step 1 using N-SMP, the yield of the step 3 was always around 35% (see Table S-1). In this situation there was the risk to raise a concomitant immunogenic response against the maleimido groups still present on the bioconjugates. In contrast, a 50% of yield was obtained when reacting the protein with N-SIA in the first step, but the yield of step 3 was higher (around 80% for 18). Finally, capping of the remained active iodine sites was performed treating the bioconjugates with cysteine. As a result of the mass spectrometry characterization, the 18-IA-HCH bioconjugate was selected for antibody production. Haptens with amine (11, 13, and CPFX) and carboxylic groups (6, 7, 9, 10, 12, and 14) were conjugated to BSA OVA and CONA using the carbodiimide reaction, and the hapten densities were also evaluated by MALDI-TOF-MS (see Table S-2).

Antisera (As, As171, As172, and As173) were raised against 18-IA-HCH by immunizing three rabbits as described in the Experimental Section. The avidity of the antisera for the different conjugates was tested on titration experiments. All three antisera showed excellent antibody titers against the corresponding homologous 18-IA-BSA bioconjugate, although other heterologous BSA conjugates were also well recognized

(see the Supporting Information for recognition profiles, Figure S-4). Although those bioconjugates prepared through the carboxylic acid group of the haptens (6, 7, 9, 10, 12, and 14) were slightly less recognized, As171 showed already at this stage the lowest recognition profile in these noncompetitive ELISA experiments, demonstrating that the β -keto-acid group played an important role in the biorecognition. Those As/coating antigen combinations showing good antibody titers were assessed for their ability to recognize CPFX on indirect competitive ELISAs. About eighteen usable competitive ELISAs were obtained, and seven showed IC_{50} values lower than $25 \mu g L^{-1}$ (see Table S-3) although in every case As 171 showed the best detectability.

Therefore, As171/11-BSA ELISA was chosen for further evaluation with the aim to improve detectability and to characterize its performance in media with different physicochemical parameters. Assay detectability was not significantly affected by the length of the competitive step (15–60 min), the introduction of analyte-antisera preincubation steps (from 30 to 60 min), or the concentration of Tween 20 in the assay buffer (0–0.1%). The presence of aprotic solvents such as DMF and DMSO at low concentrations caused a considerable decrease of the maximum absorbance (see Figure S-5A), while the variation of the assay was small when different concentrations of protic solvents such as ethanol or methanol were added to the buffer (see Figure S-5A). Media with ionic strength values below $15 mS cm^{-1}$ (PBST 10 mM) affected negatively assay performance, while the IC_{50} value and maximum absorbance did not vary significantly at conductivity values of up to $40 mS cm^{-1}$ (see Figure S-5B).

In contrast the pH value of the media and the presence of divalent ions were the parameters affecting most significantly to the assay. Thus, as expected from the zwitterionic nature of the fluoroquinolones (see Table 1), an important variation of the IC_{50} was observed between pH 6.5 and pH 8.5 with a decrease in the detectability when the pH values are around 7.5 (see Figure 2C). This behavior was seldom observed in other immunoassays in which this parameter has been evaluated^{29,30,38,41,42} since usually there is a trend and a pH range in which the immunoassay parameters remain stable. However, Weller⁴³ and recently Bahlmann et al.⁴⁴ have described a similar pH-dependency in the cross-reactivity of ELISAs for compounds with acidic or basic properties such as triazines and cetirizine, respectively. In the case of the present assay, the response of the assay to the pH matched very well the

Table 2. Cross-Reactivity of Related Quinolone Compounds and Other Antibiotics in the As171/11-BSA ELISA

compound	competition buffer					
	PBST pH = 7.5		PBST pH = 8.5		PBST 1 mM CaCl ₂	
	IC ₅₀ ^a	% CR ^b	IC ₅₀ ^a	% CR	IC ₅₀ ^a	% CR ^b
ciprofloxacin	0.75 ± 0.09 ^c	100	1.03 ± 0.10 ^c	100	0.77 ± 0.27 ^c	100
enrofloxacin	3.75	22	8.05	14	0.65	127
danofloxacin	9.35	9	38.45	3	7.31	11
difloxacin	1.83	49	5.58	22	0.91	101
marbofloxacin	---	---	---	---	4.30	19
flumequine	4.73	13	18.31	4	3.91	15
oxolinic acid	11.74	5	172.36	0.5	23.53	3
norfloxacin	0.67	108	0.75	132	0.78	94
sarafloxacin	0.49	177	1.01	118	0.96	93
ofloxacin	1.29	58	12.22	9	1.84	45
sulfamethazine	---	---	---	---	>1000	<0.2
sulfathiazole	---	---	---	---	>1000	<0.2
chloramphenicol	---	---	---	---	>1000	<0.2
tetracycline	---	---	---	---	>1000	<0.2
doxycycline	---	---	---	---	>1000	<0.2
ampicillin	---	---	---	---	>1000	<0.2

^aExpressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$. ^bCalculated using IC₅₀ expressed in nM. ^cIC₅₀ values corresponds to the average and standard deviation of 3 assays run in different days. Standard curves were built using two well replicates.

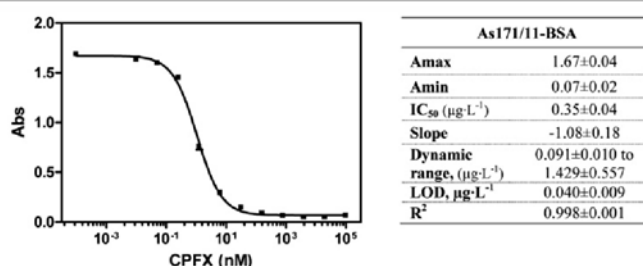


Figure 3. Standard curve and parameters obtained for CPEX with the indirect ELISA developed. The data presented correspond to the average and standard deviation of 5 assays run in 3 different days. Standard curves were built using three well replicates.

zwitterionic character of the fluoroquinolones. As it can be observed in Table 1 the zwitterionic specie is the most predominant in almost all the fluoroquinolones investigated and the solubility is lower at pH 7.5, which could explain the decrease in detectability around this pH.

On the other hand, the presence of divalent ions such as calcium had a dose-dependent significant effect on the IC₅₀ value, on the slope of the calibration curves, and on a less extent also in the maximum absorbance (see Figure 2D). Thus, as it can be observed the IC₅₀ value reaches a maximum at a concentration of CaCl₂ of about 0.5 mM in the assay media and decreases again at higher concentration values. It is known that divalent ions form complexes with FQs through the β -keto-acid moiety.^{6,45} The strong effect of the complexation through this position is in support to the great contribution that this moiety has on the antibody recognition, demonstrating that hapten design has succeeded on maximizing recognition of the β -keto-acid area.

Finally, recognition of other FQs as well as other antibiotics such as sulfonamides, tetracyclines, β -lactams, and chloramphenicol (see Figure S-1) was assessed by preparing the calibration curves and measured them with the optimized assay. The results demonstrated that all the FQs tested were recognized on a different extent, while no cross reactivity

with other antibiotics (maximum concentration tested was 1000 nM) was observed. Table 2 shows the IC₅₀ and cross reactivity values obtained.

Due to the strong effect of the pH and the presence of divalent ions, cross-reactivity was tested in buffer media at pH 7.5 and at pH 8.5, with and without Ca²⁺ ions (in the form of calcium chloride 1 mM). As it can be observed for certain FQs the IC₅₀ values vary significantly depending on the pH, particularly for DNFX, Flume, or OXO, while for those FQs in which the piperazinyl group was not alkylated (CPEX, NREX, and SREX) the IC₅₀ was not significantly affected. These results point versus the possibility to modulate the assay selectivity by changing the pH of the media. An exhaustive study in this direction could lead to different recognition patterns using these antibodies. On the other hand, the presence of calcium ions produced a considerable increase in the detectability (decrease in the IC₅₀ value). Hence, a 6-fold increase in the detectability was accomplished for EREX and 2-fold for DFX reducing the differences in recognition between the different fluoroquinolone congeners, although unfortunately the effect was not sufficiently strong to compensate the differences observed by the presence of a bulky group in the piperazine moiety (i.e., DNFX) or a third fused ring in the FQs system (OFX, OXO, and Flume).

The FQ ELISA established was evaluated to assess reproducibility. Figure 3 shows the average standard calibration curve resulting from assays performed in different days ($N = 15$, 5 assays on three different days), and the table inserted shows the average and standard deviation of the different parameters. As it can be observed the standard deviation is very low, which indicates the high reproducibility of the assay. The limit of detection (concentration producing 90% of the A_{max}) accomplished for CPFEX was $0.04 \pm 0.009 \mu\text{g L}^{-1}$ (IC_{50} is $0.35 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$) and for the rest of FQs tested varied between 0.55 and $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ (IC_{50} was between 23.53 and $0.65 \mu\text{g L}^{-1}$, see Table 2). For most of the fluoroquinolones assayed the LOD and the IC_{50} were lower than the MRLs established in several tissue samples (e.g., MRL in bovine milk: $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for EREX, $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ for Flume), which makes the assay suitable for FQ screening. In this respect, it should be noticed that experiments performed demonstrate that this assay can also work very well and in compliance with the regulations in matrices such as milk or hair extracts (data not shown).

The goal of developing broad-selectivity ELISA methods for rapid residue screening has been persecuted by many authors. In respect to the fluoroquinolone antibiotic family, several ELISA methods for FQs, using antibodies produced against haptens conjugates through the carboxylic acid in position 3 or through the piperazine moiety in position 7, have been described. Although from the synthetic point of view constitutes a simple approach, important antigenic determinants are blocked. Consequently, high specific assays have been generally obtained with a low level of cross reactivity with other FQs when the carboxylic group has been used to prepare the bioconjugates.^{12–15,18,19} This fact points to the relevance of preserving the β -keto acid moiety in the hapten molecule to raise antibodies with a wide selectivity. More generic assays have been obtained when the immunogens have been prepared by linking the fluoroquinolone through the piperazine moiety at position 7,^{22–25} but the results have not been completely satisfactory probably because of the proximity to the fluorine atom, considered also important in the recognition. Similar results have been obtained when monoclonal antibodies have been developed. Slightly generic assays have been obtained based on hybridoma clone selection addressing broad recognition.^{16,17,21} In contrast, as we demonstrated in the present paper, the use of hapten maximizing exposure of common chemical functionalities of the FQs family has succeeded in producing excellent antibodies with broad recognition profile and high detectability. Additionally, our studies demonstrate that the selectivity of the assay could be modulated by the pH, with an increase in IC_{50} values for those FQs with alkylated piperazine substituents (see Table 2). This property would allow discriminating between zwitterionic and no zwitterionic FQs by performing the assay at different pH (7.5 and 8.5) values. Moreover, the results reported also indicate that the presence of divalent ions may contribute to vary the selectivity pattern of the fluoroquinolone assays.

CONCLUSIONS

Chemical criteria, assisted by molecular modeling and theoretical tools, constitute an excellent combination to rationally design immunizing haptens with directed affinity or selectivity. In this paper, an immunizing hapten to generate broad specificity antibodies for fluoroquinolones has been designed and synthesized. The antibodies produced show a wide selectivity spectrum, and most of the important

fluoroquinolone congeners used in the veterinary field can be detected below the MRL values established by the EC in several food tissue samples. Due to the zwitterionic character of the fluoroquinolones the detectability is strongly affected by the pH value of the assay media on different degrees depending on their pK_a values, which points to the possibility to modulate selectivity by varying the pH of the media. On the other hand, complexation with calcium increases the immunoassay detectability and reduces the differences in recognition between the distinct fluoroquinolone congeners.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: 93 4006100. Fax: 93 2045904. E-mail: pilar.marco@cid.csic.es. Corresponding author address: Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology, IQAC-CSIC, Jordi Girona, 18-26 08034-Barcelona, Spain.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Ministry of Science and Technology (Spain) (Contract number AGL2008-05578-C05-01) and by the European Community (KBBE-2007-211326). The AMR group is a consolidated Grup de Recerca de la Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2009 SGR 1343). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&I Plan 2008-2011, *Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions* and financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the *European Regional Development Fund*. DG had a FPI fellowship from the Spanish Ministry of Education.

REFERENCES

- (1) Austin, D. J.; Kristinsson, K. G.; Anderson, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 1152–1156.
- (2) Bergogne-Berezin, E. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41*, 741–750.
- (3) Lin, C. E.; Deng, Y. J.; Liao, W. S.; Sun, S. W.; Lin, W. Y.; Chen, C. C. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1051*, 283–290.
- (4) Ross, D. L.; Riley, C. M. *Int. J. Pharm.* **1990**, *63*, 237–250.
- (5) Ming, L. J. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 697–762.
- (6) Ross, D. L.; Riley, C. M. *Int. J. Pharm.* **1993**, *93*, 121–129.
- (7) Andreu, V.; Blasco, C.; Picó, Y. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 534–556.
- (8) Hernandez-Arteseros, J. A.; Barbosa, J.; Compano, R.; Prat, M. D. *J. Chromatogr. A* **2002**, *945*, 1–24.
- (9) Du, L. M.; Yang, Y. Q.; Wang, Q. M. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *516*, 237–243.
- (10) Hernandez, M.; Borrull, F.; Calull, M. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 416–427.
- (11) Okerman, L.; Noppe, H.; Cornet, V.; De Zutter, L. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 252–257.
- (12) Duan, J. H.; Yuan, Z. H. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1087–1089.
- (13) Lu, S. X.; Zhang, Y. L.; Liu, J. T.; Zhao, C. B.; Liu, W.; Xi, R. M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6995–7000.
- (14) Van Coillie, E.; De Block, J.; Reybroeck, W. J. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4975–4978.

- (15) Yuan, Z. H.; Duan, J. H.; Fan, S. X.; Kong, K. *Food Agric. Immunol.* **2001**, *13*, 199–204.
- (16) Hu, K.; Huang, X.; Jiang, Y.; Fang, W.; Yang, X. *Aquaculture* **2010**, *310*, 8–12.
- (17) Huang, B.; Yin, Y.; Lu, L.; Ding, H.; Wang, L.; Yu, T.; Zhu, J.-j.; Zheng, X.-d.; Zhang, Y.-z. *J. Zhejiang Univ. Sci., B* **2010**, *11*, 812–818.
- (18) Brás Gomes, F. B. M.; Riedstra, S.; Ferreira, J. P. M. *J. Immunol. Methods* **2010**, *358*, 17–22.
- (19) Snitkoff, G. G.; Grabe, D. W.; Holt, R.; Bailie, G. R. *J. Immunoassay* **1998**, *19*, 227–238.
- (20) Holtzapple, C. K.; Buckley, S. A.; Stanker, L. H. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1984–1990.
- (21) Wang, Z. H.; Zhu, Y.; Ding, S. Y.; He, F. Y.; Beier, R. C.; Li, J. C.; Jiang, H. Y.; Feng, C. W.; Wan, Y. P.; Zhang, S. X.; Kai, Z. P.; Yang, X. L.; Shen, J. Z. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4471–4483.
- (22) Bucknall, S.; Silverlight, J.; Coldham, N.; Thorne, L.; Jackman, R. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 221–228.
- (23) Huet, A. C.; Charlier, C.; Tittlemier, S. A.; Singh, G.; Benrejeb, S.; Delahaut, P. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2822–2827.
- (24) Li, Y.; Ji, B.; Chen, W.; Liu, L.; Xu, C.; Peng, C.; Wang, L. *Food Agric. Immunol.* **2008**, *19*, 251–264.
- (25) Tittlemier, S. A.; Gélinas, J. M.; Dufresne, G.; Haria, M.; Querry, J.; Cleroux, C.; Ménard, C.; Delahaut, P.; Singh, G.; Fischer-Durand, N.; Godefroy, S. *Food Anal. Methods* **2008**, *1*, 28–35.
- (26) Estevez, M. C.; Kreuzer, M.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 559–568.
- (27) Galve, R.; Camps, F.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2237–2246.
- (28) Nichkova, M.; Galve, R.; Marco, M. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1360–1370.
- (29) Ramón-Azcón, J.; Galve, R.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 71–81.
- (30) Adrian, J.; Font, H.; Diserens, J. M.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 385–394.
- (31) Galve, R.; Sánchez-Baeza, F.; Camps, F.; Marco, M. P. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *452*, 191–206.
- (32) Cao, L.; Kong, D.; Sui, J.; Jiang, T.; Li, Z.; Ma, L.; H., L. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3246–3251.
- (33) Marco Colas, M. P.; Sánchez Baeza, F. J.; González Pinacho, D. Haptenos e Inmunoreactivos y su uso en la obtención de anticuerpos de familia e inmunoensayos para quinolonas. Spain: P201031721; 23.11.2010. **Spanish Patent Application**.
- (34) Dewar, M. J. S.; Thiel, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4899–4907.
- (35) Drakopoulos, A. I.; Ioannou, C. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *354*, 197–204.
- (36) Marion, M. B. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (37) Dilgimen, A. S.; Mustafaeva, Z.; Demchenko, M.; Kaneko, T.; Osada, Y.; Mustafaev, M. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2383–2392.
- (38) Salvador, J. P.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3734–3740.
- (39) Estévez, M. C.; Galve, R.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. *Chem.—Eur. J.* **2008**, *14*, 1906–1917.
- (40) Mitscher, L. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 559–592.
- (41) Kim, H.-J.; Ahn, K. C.; Ma, S. J.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3750–3757.
- (42) Mak, S. K.; Shan, G.; Lee, H.-J.; Watanabe, T.; Stoutamire, D. W.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *534*, 109–120.
- (43) Weller, M. G. *Technischen Universität München*, 1992.
- (44) Bahlmann, A.; Falkenhagen, J.; Weller, M. G.; Panne, U.; Schneider, R. *J. Analyst* **2011**, *136*, 1357–1364.
- (45) Urbaniak, B.; Kokot, Z. *J. Anal. Chim. Acta* **2009**, *647*, 54–59.

Supporting Information

Molecular Modeling Assisted Hapten Design to produce Broad Selectivity Antibodies for Fluoroquinolone Antibiotics

Daniel G. Pinacho, Francisco Sánchez-Baeza and M.-Pilar Marco*
Applied Molecular Receptors Group (AMRg). Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology. IQAC-CSIC. CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) Jorge Girona, 18-26, 08034-Barcelona, Spain

*To whom correspondence should be sent:

M.-Pilar Marco
Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology
IIQAB-CSIC
Jorge Girona, 18-26
08034-Barcelona
Spain

Phone: 93 4006100
FAX: 93 2045904
E-mail: pilar.marco@cid.csic.es

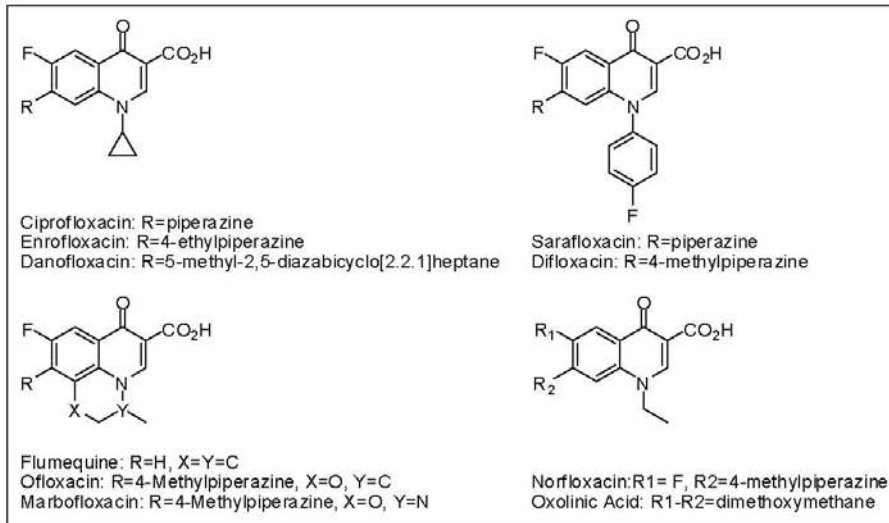
General Methods and Instruments. The HPLC-UV was a Merck Hitachi L-7100 pump provided with a diode array L-7455 detector, a L-7200 autosampler, and a D7000 interface (Merck, Darmstadt, Germany). The chromatograms were processed with the HSM software (Merck, Darmstadt, Germany). The column used was Lichrospher 100 RP-18 125x4 (5mm; Merck, Darmstadt, Germany) and the analyses were performed on gradient mode using acetonitrile (ACN): citrate buffer (50 mM, pH=3) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The reactions were monitored at two wavelengths: 280 nm and 330 nm. The MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-fly mass spectrometer) used for analyzing the protein conjugates was a Perspective BioSpectrometry Workstation provided with the software Voyager-DE-RP (version 4.03) developed by Perspective Biosystems Inc. (Framingham, MA) and Grams/386 (for Microsoft Windows, version 3.04, level III) developed by Galactic Industries Corporation (Salem, NH). The pH and the conductivity of all buffers and solutions were measured with a pH meter pH 540 GLP and a conductimeter LF 340, respectively (WTW, Weilheim, Germany). Polystyrene microtiter plates were purchased from Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK). Washing steps were performed on a SLY96 PW microplate washer (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Absorbances were read on a SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The competitive curves were analyzed with a four parameter logistic equation using the software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices) and GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Unless otherwise indicated, data presented correspond to the average of at least two well replicates.

Buffers. Unless otherwise indicated, phosphate-buffered saline (PBS) is 0.01 M phosphate buffer on a 0.8% saline solution, and the pH is 7.5. PBST is PBS with 0.05% Tween 20. PBSTCa is PBST with 1mM calcium chloride. Borate buffer is 0.2 M boric acid/sodium borate pH=8.7. Coating buffer is 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. Citrate buffer is a 0.04 M solution of sodium citrate, pH 5.5. The substrate solution contains 0.01% TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and 0.004% H₂O₂ in citrate buffer.

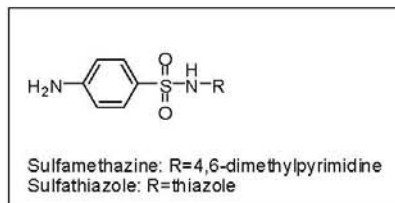
Polyclonal Antisera. The corresponding antisera (As) obtained were named with the rabbit numbers. Evolution of the antibody titer was assessed by measuring the binding of serial dilutions of the different antisera to microtiter plates coated with 18-BSA. After an acceptable antibody titer was observed, the animals were exsanguinated and the blood was collected on vacutainer tubes provided with a serum separation gel. Antisera were obtained by centrifugation and stored at -80 °C in the presence of 0.02% NaN₃. Unless otherwise indicated, working aliquots were stored at 4 °C.

Noncompetitive Indirect ELISA was used for the screening of the avidity of the 3 antisera obtained (As171-As173) *versus* the 19 coating antigens synthesized, by measuring the binding of serial dilutions (1/1000 to 1/64000, and zero, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$) of each antisera to the microtiter plates coated with a solutions of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each of the BSA, OVA and CONA conjugates. The combinations that presented more than 0.5 units of absorbance using the antiserum diluted 1/2000 (see figure S-2) were selected to perform a two-dimensional titration assay (2D-assay), consisting on measuring the binding of serial dilutions (1/1000 to 1/64000, and zero, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$) of the antisera to wells coated with different dilutions of the conjugates (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 1.95 ng mL^{-1} , and zero, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$). From these experiments, optimum concentrations for coating antigens and antisera dilutions were chosen to produce around 0.7-1 units of absorbance after 30 min of competitive step.

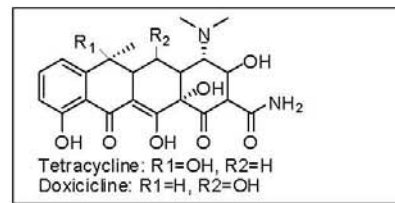
FLUOROQUINOLONAS



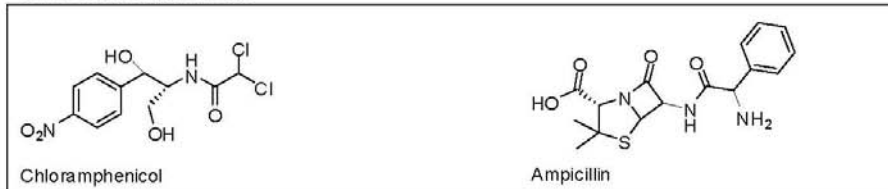
SULFONAMIDES



TETRACYCLINES

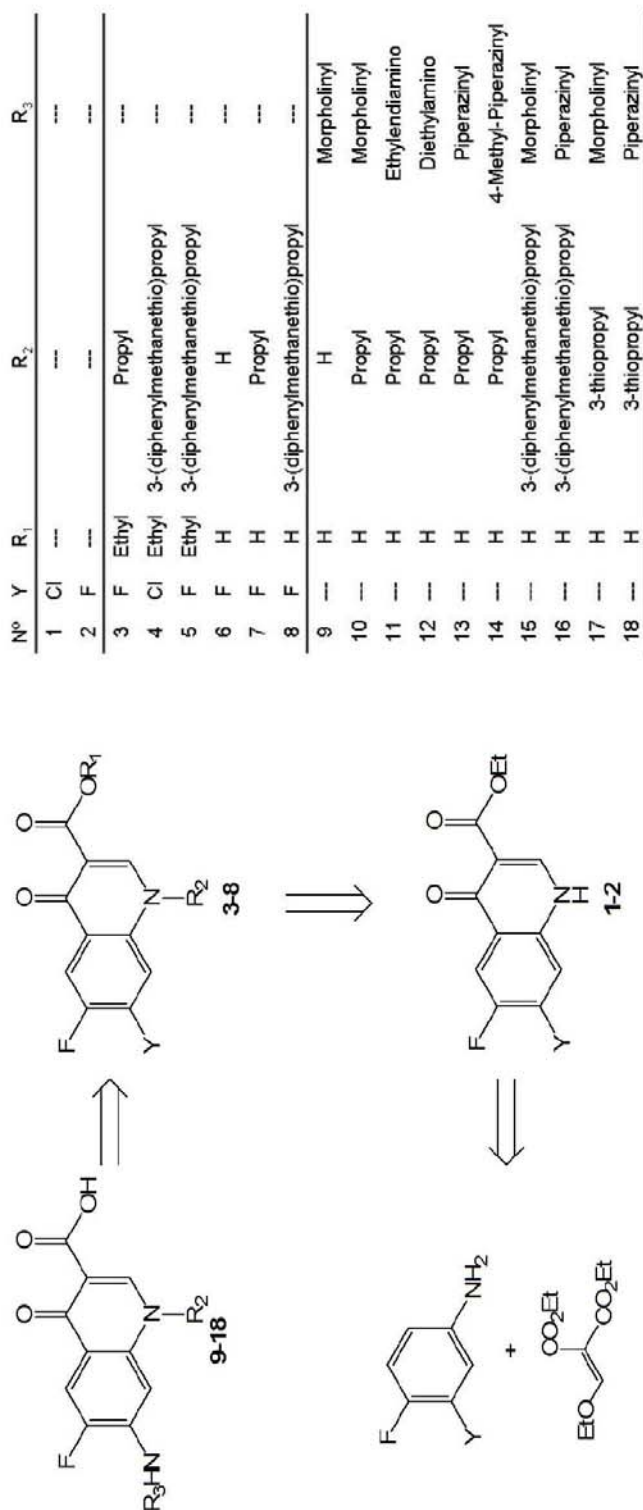


OTHER ANTIBIOTICS



Pinacho et al. Figure S-1

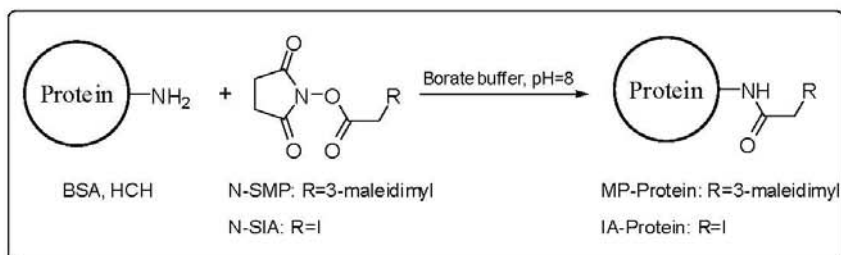
Figure S-1. Chemical structures of the fluoroquinolones and different antibiotics used for specificity studies.



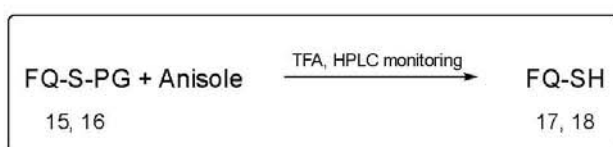
Pinacho et al. Figure S-2

Figure S-2. General retrosynthetic route used to prepare the immunizing and competitor fluoroquinolone haptens.

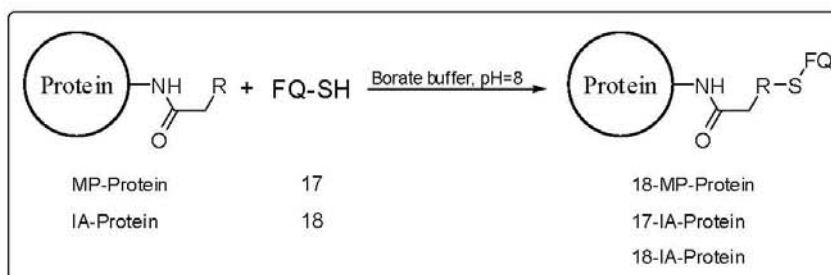
Step 1. Activation of the proteins.



Step 2. Immunizing hapten deprotection.

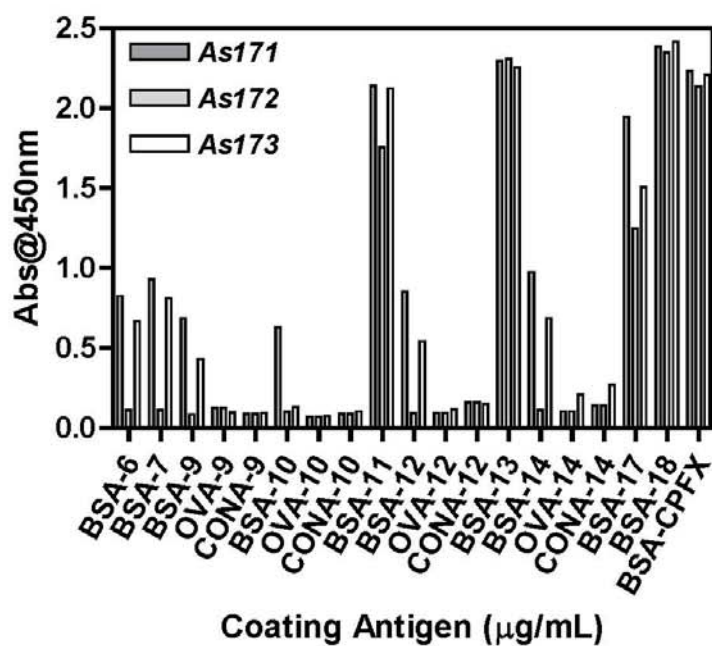


Step 3. Bioconjugation.



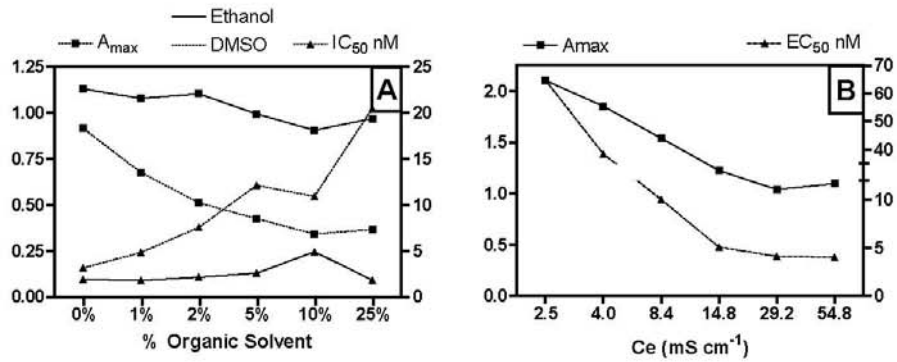
Pinacho et al. Figure S-3

Figure S-3. Scheme of the bioconjugation strategy used to prepare the conjugates with haptens through a thiol group.



Pinacho et al. Figure S-4

Figure S-4. Results from the antibody titration experiments performed using antisera generated against 18-HCH (As171-173) versus different competitors haptens (6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18 and CPFEX) coupled to BSA, OVA and CONA by Indirect ELISA (As 1/2000, Antigens 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$).



Pinacho et al. Figure S-5

Figure S-5. Results from the evaluation of the antibody performance under different physico-chemical conditions, visualized through the maximum absorbance and the IC_{50} of the ELISA. **Graph A.** Effect of the presence of aprotic (DMSO) and protic organic solvents (ethanol). **Graph B.** Effect of the ionic strength. As it can be observed, protic solvents were better tolerated by the assay. On the other hand, low ionic strength media affected negatively immunoassay performance. Data shown are extracted from the four-parameter equation used to fit the standard curves.

Table S-1. Hapten with thiol group densities of the BSA conjugates ^a

Cross-linker (CL)	Step 1			Step 3		
	Lys/CL ^b	δ CL ^c	Yield(%) ^d	Hapten	δ -Hapten ^c	Yield (%) ^d
N-SMP	1/2	35	116-100		12	34
	1/1	31	103-89	18	10	32
	1/0.5	17	57-49		6	35
N-SIA	1/10	17	57-49	17	14	82
	1/10	17	57-49	18	2 ^e	12

^aHapten densities were calculated by MALDI-TOF-MS.

^bMolar ratio used in protein activation with respect to the lysine residues of the BSA.

^cMols of hapten per mol of protein.

^dDegree of conjugation calculated on the basis that BSA has 30-35 lysine accessible moieties.

^eThe hapten 17 yielded a low conjugation rate due to the low solubility observed in aqueous media.

Table S-2. Hapten with amine or carboxylic acid group densities of the BSA conjugates ^a

Hapten	δ -Hapten ^b
6	7
7	4
9	1
10	2
11	9
12	5
13	5
14	2
CPFX	9

^aHapten densities were calculated by MALDI-TOF-MS.^bMols of hapten per mol of protein.

Table S-3. Features of the different ELISAs obtained with the different antisera and coating antigens with IC₅₀ lower than 25 µg·L⁻¹.

As	Ag	Amax	Amin	IC ₅₀ µg·L ⁻¹	Slope	R ²
As171	11-BSA	1.36	0.1	1.65	-0.79	0.969
	17-BSA	1.77	0.14	16.26	-0.86	0.998
	18-BSA	1.62	0.07	4.77	-0.66	0.998
	CPFX-BSA	0.63	0.06	5.20	-0.51	0.996
	13-BSA	1.46	0.12	7.09	-0.60	0.992
As172	11-BSA	1.43	0.08	11.45	-0.85	0.993
	13-BSA	1.42	0.07	22.76	-0.71	0.968

3.5. Publicación III: Haptenos e inmunoreactivos y su uso en la obtención de anticuerpos de familia e inmunoensayos para quinolonas

La presente invención se refiere a haptenos, inmunógenos e inmunoreactivos secundarios, su uso para la obtención de anticuerpos de amplio espectro contra los antibióticos de tipo QN y su aplicación en técnicas inmunoquímicas de análisis de dichos antibióticos en muestras biológicas.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/069683 A1

(43) Fecha de publicación internacional
31 de mayo de 2012 (31.05.2012) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07D 215/233 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070800
- (22) Fecha de presentación internacional:
21 de noviembre de 2011 (21.11.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201031721
23 de noviembre de 2010 (23.11.2010) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores: e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **MARCO COLAS, María Pilar** [ES/ES]; Instituto de Química Avanzada de Cataluña, Centro de Investigación y Desarrollo Pascual Vila, Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **SÁNCHEZ BAEZA, Francisco José** [ES/ES]; Instituto de Química Avanzada de Cataluña, Centro de Investigación y Desarrollo Pascual Vila, Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **GONZÁLEZ PINACHO, Daniel** [ES/ES]; Instituto de Química Avanzada de Cataluña, Centro de Investigación y Desarrollo Pascual Vila, Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES).
- (74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))



WO 2012/069683 A1

(54) Title: HAPTENS AND IMMUNOREACTIVE AGENTS AND USE THEREOF FOR PRODUCING FAMILY ANTIBODIES AND IMMUNOASSAYS FOR QUINOLONES

(54) Título : HAPTENOS E INMUNOREACTIVOS Y SU USO EN LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS DE FAMILIA E INMUNOENSAYOS PARA QUINOLONAS

(57) Abstract: The invention relates to haptens, immunogens and secondary immunoreactive agents, to the use thereof for producing wide-spectrum antibodies against quinolone-type antibiotics, to the application thereof to immunochemical analysis techniques, and to a kit enabling the detection of said antibiotics in biological samples from food products of animal origin.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a haptenos, inmunógenos e inmunoreactivos secundarios, su uso para la obtención de anticuerpos de amplio espectro contra los antibióticos de tipo quinolona, su aplicación en técnicas inmunoquímicas de análisis y a un kit que permite la detección de dichos antibióticos en muestras biológicas procedentes de productos alimentarios de origen animal.

**HAPTENOS E INMUNOREACTIVOS Y SU USO EN LA OBTENCIÓN DE
ANTICUERPOS DE FAMILIA E INMUNOENSAYOS PARA QUINOLONAS**

5 La presente invención se refiere a haptenos, inmunógenos e inmunoreactivos secundarios, su uso para la obtención de anticuerpos de amplio espectro contra los antibióticos de tipo quinolona y su aplicación en técnicas inmunoquímicas de análisis de dichos antibióticos en muestras biológicas.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La calidad nutricional de los alimentos, su disponibilidad y su seguridad son un elemento clave para el bienestar de la sociedad. La necesidad de aumentar la productividad animal ha originado el empleo, en ocasiones inapropiado, de
15 fármacos veterinarios.

Más en concreto, los antibióticos de tipo quinolona se utilizan con fines terapéuticos, pero también profilácticos con el fin de prevenir enfermedades en explotaciones con elevada densidad de estabulación. De esta manera se
20 incita el desarrollo de mecanismos de resistencia bacteriana, reduciendo drásticamente la eficacia del tratamiento, cuando dichas bacterias son el origen de enfermedades en humanos.

Por esta razón, la Agencia Europea para la Evaluación de los Productos
25 Médicos (EMA), en la Directiva sobre el campo de la seguridad alimentaria 2377/90/CE, ha establecido límites máximos de residuos (MRLs, maximum residue limit) en los distintos productos alimenticios de origen animal. También ha impuesto a los laboratorios de inspección una serie de pautas de frecuencia de muestreo y número de sustancias a controlar antes de que
30 estos productos lleguen al consumidor (Directiva 96/23/CE). Esto genera la necesidad de efectuar un número elevado de análisis.

Las técnicas actualmente utilizadas para la detección de quinolonas son principalmente la cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (CG-MS) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con diversos tipos de detección (principalmente ultravioleta y espectrometría de masas) (Hernández-Arteseros, *J. Chromatography A.* **2002**, 945, 1-24.). El principal inconveniente de estas técnicas es que precisan de una instrumentación compleja y personal cualificado, además de necesitar una preparación previa de la muestra, lo que prolonga el tiempo de análisis.

También se emplean ensayos de tipo microbiológico que, aunque de menor coste, la demora en la obtención de los resultados unida a su propia metodología, los convierte en inviables como métodos rápidos de alarma. Por lo tanto, los actuales métodos de análisis y preparación de muestra no responden adecuadamente a los requerimientos que la legislación exige para proteger la salud pública. Los procedimientos inmunoquímicos ofrecen importantes ventajas como procedimientos de cribado debido a su simplicidad, coste y elevadas capacidades de procesado.

Ya se han descrito diversos inmunoensayos genéricos para las quinolonas en la bibliografía. En todos los casos, el hapteno de inmunización era una quinolona comercial unida a una proteína inmunogénica mediante el ácido carboxílico en la posición 3 (Holtzapfle, *Food and Agric. Immunol.* **1997**, 9, 13-26; Bucknall, *Food Additives and Contaminants.* **2003**, 20, 221-228; Wang, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4471-4483) o mediante el resto de piperacina en la posición 7 (Huet, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 2822-2827), bloqueando de esta forma epítomos comunes e importantes de la familia de las quinolonas.

La técnica anterior no aborda el método de unir el hapteno de quinolona al soporte inmunogénico a través de la posición 1. De esta manera, los haptenos conservarían todos los epítomos característicos de las quinolonas, maximizando su exposición al sistema inmune del animal huésped y

manteniendo a su vez intactas las propiedades ácido base de este tipo de compuestos.

La presente invención proporciona dichos haptenos y los inmunoreactivos
5 derivados de estos, que son útiles en la obtención de anticuerpos de familia mejorados contra quinolonas y que proporcionan mejores prestaciones cuando se utilizan en inmunoensayos para la detección de quinolonas.

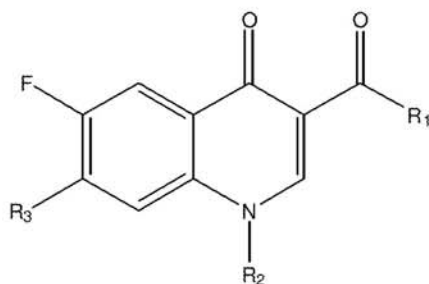
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10

La presente invención se refiere a un conjunto de haptenos estructuralmente relacionados, desde un punto de vista químico, con los antibióticos de tipo quinolona. De igual modo se refiere a los inmunoreactivos resultantes de la unión de dichos haptenos a soportes inmunogénicos y al uso de estos en la
15 obtención de anticuerpos con selectividad de clase para la familia de las quinolonas. A su vez se refiere a la utilización de alguno de dichos inmunoreactivos, a modo de inmunoreactivos secundarios, y de algún anticuerpo generado a partir de alguno de ellos, en métodos inmunoquímicos de análisis de quinolonas en muestras biológicas.

20

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



(I)

25 o sus sales, isómeros o solvatos,

donde

R_1 se selecciona entre OH, O-alquilo C_1-C_{10} , OR_4 , NHR_4 , donde R_4 es un soporte inmunogénico;

R_2 se selecciona entre H, alquilo C_3-C_{10} , $-(CH_2)_m-R_5R_6$, donde m es un valor de 3 a 6 cuando R_5 se selecciona entre, O ó NH o m es un valor de 1 a 6 cuando R_5 es S y R_6 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_6 , arilo, alquil-arilo, R_4 o LR_4 , donde L es un compuesto de unión bifuncional;

R_3 se selecciona entre heterociclo, halógeno o NR_7R_8 , donde R_7 y R_8 , se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , $-(CH_2)_n-R_9R_{10}$, donde n es un valor de 1 a 6, R_9 se selecciona entre S, O ó NH y R_{10} se selecciona entre H o alquilo C_1-C_6 , arilo, alquil-arilo, R_4 o LR_4 .

Preferiblemente, R_1 es O-alquilo C_1-C_6 y más preferiblemente O-etilo.

15 Preferiblemente, R_1 es OH.

Preferiblemente, R_1 es NHR_4 , donde R_4 es una proteína y más preferiblemente R_4 se selecciona entre albúmina de suero bovino (BSA), concanavalina A (CONA), ovalbúmina, peroxidasa de rábano picante (HRP), hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) o hemocianina de cangrejo herradura (HCH).

Preferiblemente, R_2 es $-(CH_2)_3-SR_6$ donde R_6 se selecciona entre H o LR_4 , L se selecciona entre maleimidopropanoato y iodoacetilo y R_4 se selecciona entre BSA, CONA, HRP o HCH.

25 Preferiblemente, R_2 es alquilo C_3-C_6 y más preferiblemente, R_2 es propilo.

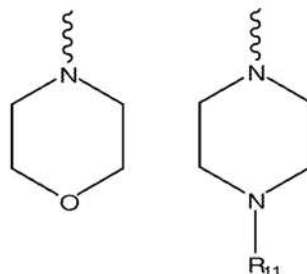
Preferiblemente, R_3 se selecciona entre halógeno o heterociclo. Más preferiblemente, R_3 se selecciona entre flúor o cloro.

30 Preferiblemente, R_3 se selecciona entre el siguiente grupo:

WO 2012/069683

PCT/ES2011/070800

5



donde R_{11} es alquilo C_1-C_6 y preferiblemente metilo.

Preferiblemente, R_3 es NR_7R_8 , donde R_7 y R_8 son un grupo alquilo C_1-C_6 igual o diferente. Más preferiblemente R_7 y R_8 son etilo.

5

Preferiblemente, R_3 es NR_7R_8 , donde R_7 es H y R_8 es un grupo alquilo C_1-C_6 sustituido. Más preferiblemente, R_3 es $-NH(CH_2)_2NH_2$.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona del siguiente grupo:

10

- 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
- 1-(3-(bencidiltio)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
- 1-(3-(bencidiltio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-
- 15 carboxilato de etilo.
- Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 1-(3-(bencidiltio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 20 - Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 7-(2-aminoetilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 25 - Ácido 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

- Ácido 1-(3-(bencidritio)propil)-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 1-(3-(bencidritio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 5 - Ácido 6-fluoro-7-(4-metilpiperacin-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 10 - Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(carboxamida de BSA)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 15 - Ácido 1-[3-(2-acetamida de HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico
- 20 - 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- 25 - 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- Ácido 7-[2-(acetamida de BSA)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 30 - 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.

- 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
 - 6-fluoro-7-(4-metilpiperacina-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
 - 5 - 6-fluoro-7-(4-metilpiperacina-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
 - Ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5,-triazin-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 10 o sus sales, isómeros o solvatos,

En la presente invención se entiende como "alquilo" radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno (denominándose haloalquilo), hidroxilo, alcoxilo, arilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

20 El término "arilo", solo o en combinación, se refiere en la presente invención, a un sistema de anillo aromático mono o policíclico que contiene átomos de anillo de carbono. Los arilos preferidos son sistemas de anillo aromáticos de 5-10 miembros monocíclicos o bicíclicos, tales como fenilo o bifenilo que
25 llevan opcionalmente uno o varios sustituyentes.

"Heterociclo" se refiere, en la presente invención, a un radical estable de anillo de 3 a 15 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y
30 azufre, preferiblemente un anillo de 4 a 8 miembros con uno o más heteroátomos, más preferiblemente un anillo de 5 ó 6 miembros con uno o más heteroátomos Para los fines de esta invención, el heterociclo puede ser

un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados, y el átomo de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclilo puede estar opcionalmente oxidado, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, y el radical heterociclilo
5 puede estar parcial o totalmente saturado o ser aromático. Ejemplos de tales heterociclos incluyen pero no se limitan a, azepinas, benzimidazol, benzotiazol, furano, isotiazol, indol, piperídina, piperazina, prina, quinolina, tiadiazol, tetrahidrofurano, cumarina, morfolina, pirrol, pirazol, oxazol, isoxazol, triazol, imidazol, etc.

10

“Halógeno” se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

“Soporte inmunogénico” se refiere a aquellos materiales con la propiedad de generar con independencia una respuesta inmune en el animal huésped y que
15 pueden estar unidos mediante enlace covalente a los haptenos descritos en la presente invención. El material soporte idóneo incluye, por ejemplo, compuestos poliméricos naturales o sintéticos, como por ejemplo polipéptidos, oligonucleótidos, también incluye proteínas, como por ejemplo, albúminas, seroproteínas, globulinas, lipoproteínas, hemocianinas. Ejemplos ilustrativos
20 de soporte inmunogénico incluyen seroproteína bovina, ovalbúmina, concavalina A, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

Teniendo en cuenta que los compuestos de fórmula (I) poseen grupos y
25 átomos susceptibles de perder o ganar cargas, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I) en forma de sal.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), y más concretamente, los compuestos específicos pertenecientes a esta
30 fórmula general anteriormente descrita pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los

isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

5

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente para la obtención de anticuerpos de amplio espectro contra antibióticos del tipo quinolonas.

10

Algunos ejemplos de quinolonas son, pero sin limitación, marbofloxacino, enrofloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, sarafloxacino, ácido oxolínico, flumequina, ofloxacino, danofloxacino o difloxacino.

15

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de anticuerpo contra antibióticos del tipo quinolonas que comprende:

- a) activación de un soporte inmunogénico con un compuesto de unión bifuncional,
- b) conjugación del soporte inmunogénico activado en (a) con un compuesto de fórmula (I),
- c) inmunización de un animal no humano con el conjugado obtenido en (b),
- d) extracción de los anticuerpos generados en (c).

20

25

El soporte inmunogénico puede ser cualquier polímero sintético o natural, oligonucleótido, polipéptido o proteína para conjugación de haptenos conocida en el estado de la técnica aunque preferiblemente se selecciona entre las proteínas seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, concanavalina A, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

30

La activación del soporte inmunogénico se puede realizar mediante cualquier técnica bioquímica conocida aunque en el procedimiento de la presente invención preferiblemente se realiza haciendo reaccionar el soporte inmunogénico con ésteres de succinimida a modo de compuesto de unión
5 bifuncional.

“Compuesto de unión bifuncional” se refiere a aquellos compuestos con dos grupos funcionales, generalmente en extremos opuestos de la molécula, capaces de reaccionar con otros grupos funcionales incorporados bien a los
10 haptenos o bien a los soportes inmunogénicos. Si los grupos funcionales con los que deben reaccionar son idénticos, son compuestos de unión homobifuncional y si los grupos con los que deben reaccionar son diferentes, son compuestos de unión heterobifuncional”.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenible por el procedimiento según se ha descrito.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los anticuerpos descritos para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en
20 una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario y más preferiblemente son muestras de leche.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso como inmunoreactivos secundarios de los compuestos de fórmula (I) descritos, en la detección y/o
25 cuantificación de antibióticos tipo quinolona en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario y más preferiblemente en muestras de leche.

30 “Inmunoreactivos secundarios” se refiere a aquellos reactivos necesarios en un inmunoensayo de competencia para la detección de moléculas de bajo

peso molecular. Pueden ser antígenos de tapizado, los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia en formato indirecto y en cuyo caso se unen al soporte sólido y compiten con el analito por el anticuerpo en disolución. Pueden ser trazadores, bien enzimáticos, fluorescentes, radioactivos..., los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia en formato directo y en cuyo caso compiten en disolución con el analito por el anticuerpo inmovilizado sobre el soporte sólido.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona que comprende al menos un anticuerpo o un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente. Los componentes de este kit pueden estar unidos a distintos tipos de soportes conocidos en el estado de la técnica, tales como nitrocelulosa para un ensayo de tira o placas de poliestireno para ensayos ELISA. Asimismo, el kit también puede incluir otro tipo de componentes y reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis de la muestra problema.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit de detección descrito anteriormente para la determinación y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en productos alimentarios de origen animal. Ejemplos ilustrativos de productos alimentarios de origen animal incluyen leche y sus derivados, huevos, carnes (músculo, riñón, hígado etc.) de diferentes especies animales.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

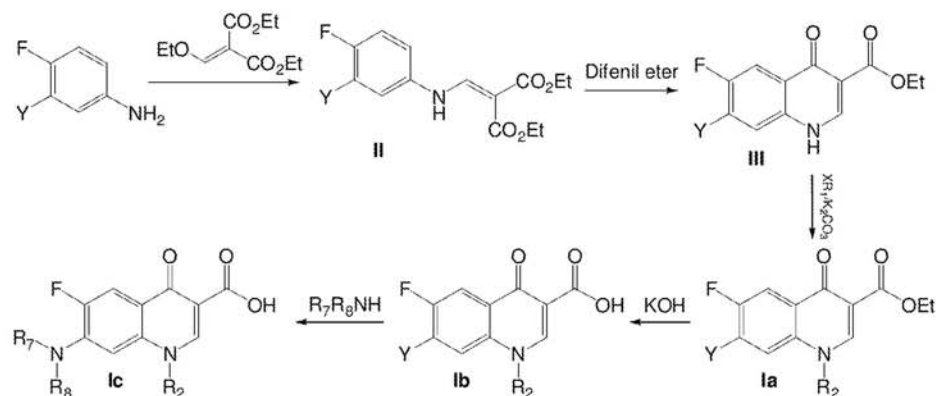
Síntesis de los haptenos

- 5 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica, en particular por los procedimientos generales que se presentan en los esquemas siguientes. Los materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar
10 mediante métodos descritos en la literatura.

Los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse a partir de los métodos y esquemas descritos a continuación:

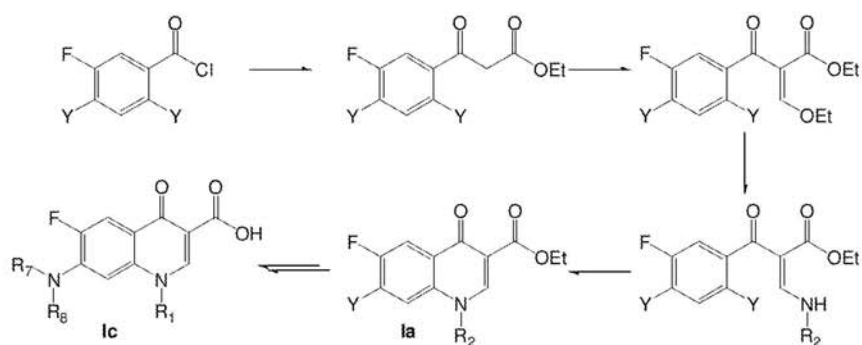
- 15 Según el método de Goulds-Jacobs (véase esquema 1), la correspondiente anilina se hace reaccionar con etoximetilmalonato de dietilo en una reacción de adición-eliminación para obtener el malonato **II**. Seguidamente se hace reaccionar en difenil éter a alta temperatura para obtener la 4-oxoquinolina **III**. A continuación se alquila el nitrógeno quinolínico con un halogenuro en medio
20 básico obteniéndose el 1-alkuil(sustituido)-4-oxoquinolina **Ia**. Se hidroliza el éster en medio básico para obtener el correspondiente ácido carboxílico **Ib** que se hace reaccionar con una amina en una sustitución nucleófila aromática para obtener la 7-amino-4-oxoquinolina **Ic**.
- 25 En el caso de que la amina utilizada en la formación del compuesto **Ic** sea piperacina, se continua la secuencia metilando el nitrógeno piperacínico utilizando formaldehído y ácido fórmico o cualquier agente metilante como ioduro de metilo o sulfato de dimetilo.

Esquema 1



- 5 Una estrategia alternativa para obtener los compuestos de fórmula I puede ser la de Grohe-Heitzer (véase esquema 2). En esta estrategia, se acila el correspondiente cloruro del ácido benzílico para obtener el éster malónico, que a su vez condensa en condiciones deshidratantes con un ortoéster para dar el éter enólico. Dicho éter sufre una reacción de adición-eliminación con la correspondiente amina primaria y el producto resultante, cicla en una reacción
- 10 tandem de adición-eliminación en la posición orto.

Esquema 2.



Las aminas y los halogenuro de alquilo utilizados están disponibles comercialmente o se pueden obtener mediante métodos conocidos (March, *Advanced Organic Chemistry*. 1991, Ed. John Wiley & Sons).

- 5 Los tioles utilizados están disponibles comercialmente y su protección y desprotección se puede realizar mediante métodos conocidos (Green, *Protective Groups in Organic Chemistry*. 1999, Ed. John Wiley & Sons).

Preparación de los inmunoreactivos

10

Los inmunoreactivos de fórmula (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica e inmunoquímica, en particular por los procedimientos generales que se presentan en los esquemas siguientes. Los materiales de partida para los
15 métodos preparativos están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos descritos en la literatura.

a) Haptenos con grupo tiol

20

Los haptenos con un grupo tiol se unen covalentemente a los soportes inmunogénicos (SI) activados con grupos susceptibles de reaccionar con dicho grupo tiol (véase esquema 3) mediante compuestos de unión heterobifuncionales.

25

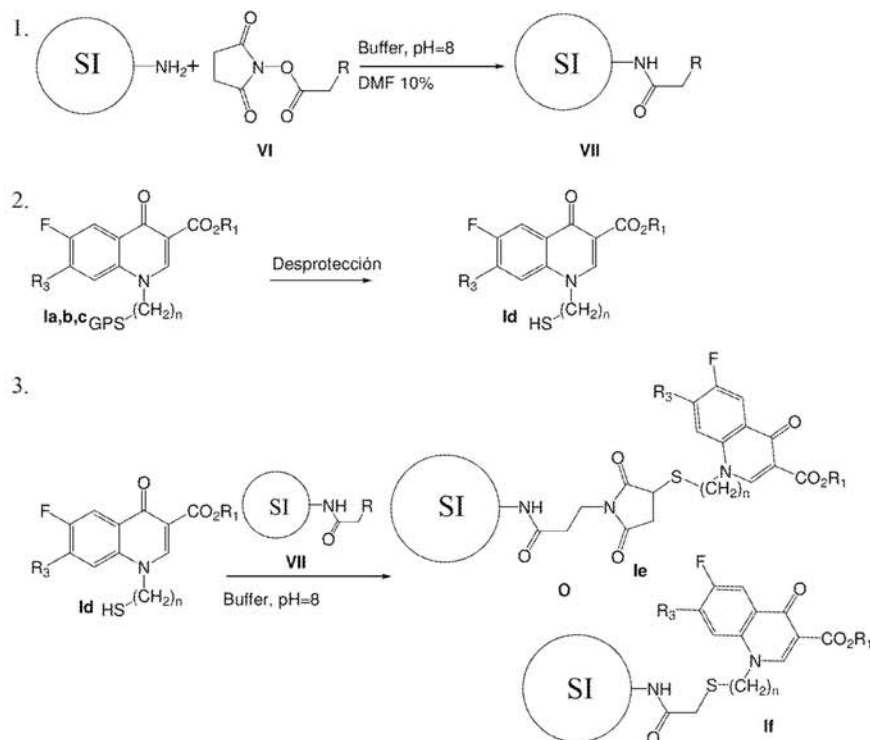
1. Activación del soporte inmunogénico. Los soportes inmunogénicos se hacen reaccionar con ésteres de succinimido o con cualquier otro éster activo o activador de la reactividad de ácidos carboxílicos que poseen en su estructura funcionalidades reactivas con el grupo tiol.

30

2. Desprotección del grupo tiol. En paralelo, se procede a la desprotección del grupo tiol siguiendo la metodología adecuada para el correspondiente grupo protector.

3. Inmunoconjugación. Se hace reaccionar el hapteno desprotegido con el soporte inmunogénico activado.

5 Esquema 3



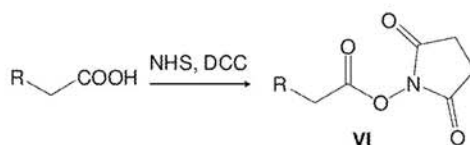
Los agentes activadores de los ácidos carboxílicos están disponibles comercialmente, al igual que los ésteres de succinimido, o se pueden obtener mediante métodos conocidos (March, *Advanced Organic Chemistry*. 1991, Ed. John Wiley & Sons) o utilizando por ejemplos los esquemas descritos a continuación.

El éster de succinimido se puede obtener por reacción del ácido correspondiente con N-hidroxisuccinimida utilizando como activador cualquier

carbodiimida, por ejemplo diciclohexilcarbodiimida (véase esquema 4, Hampton *J. Med. Chem.* **1976**, 19, 1279-1283).

Esquema 4

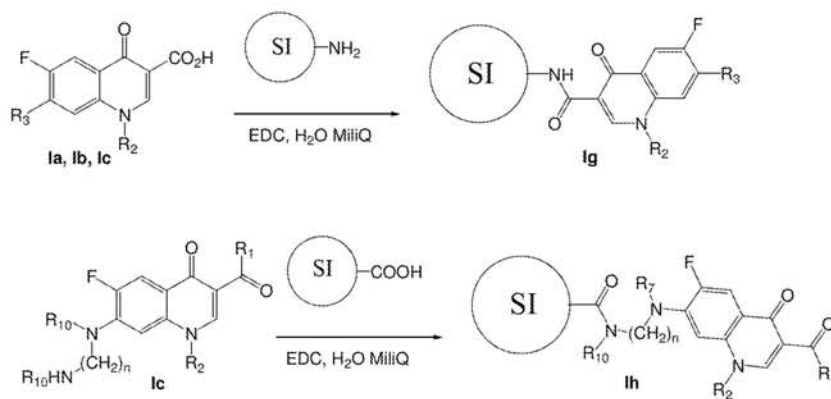
5



10 b) Haptenos con grupo NH o COOH

En el caso de haptenos con grupos amina y carboxílico se conjugan con los soportes inmunogénicos usando la reacción de la carbodiimida o cualquier otro activador de la reactividad de ácidos carboxílicos, bien procedan del hapteno o del soporte inmunogénico (véase esquema 5).

Esquema 5

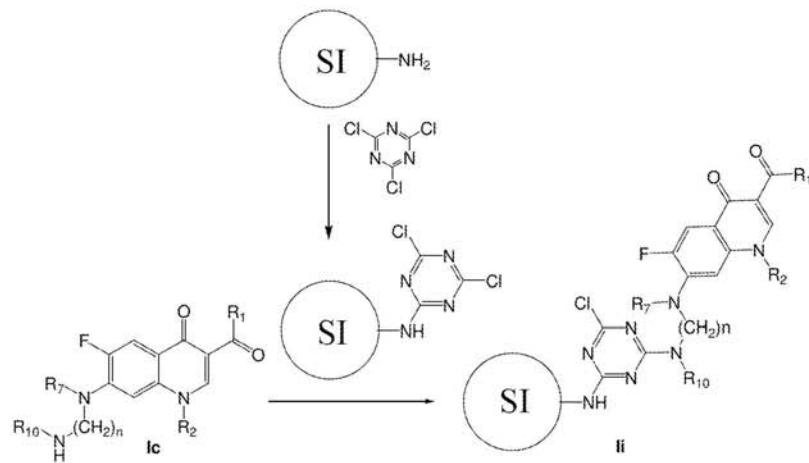


20

c) Haptenos con grupos NH₂

En el caso de haptenos con grupos amina también se conjugan a los soportes inmunogénicos previamente funcionalizados a través de sus grupos amina usando un compuesto de unión homobifuncional. Dichos compuestos de unión homobifuncional pueden ser cloruro cianúrico, bis-Imidoésteres, bis-N-Succinimidil, diisocianatos o diisotiocianatos, biacilazidas, dialdehidos, dicetonas o cualquier compuesto susceptible de reaccionar con varios grupos amina por etapas (véase esquema 6).

Esquema 6



10

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de fórmula (I) como haptenos e inmunoreactivos para la obtención de anticuerpos antifluoroquinolonas (FQ) y desarrollo de

15 inmunoensayos para la detección de dichos antibióticos.

A. QUÍMICA

Procedimientos generales y equipos.

5 La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en láminas de aluminio previamente recubiertas con gel de sílice 60 F254 (Merck, Gibbstown, NJ) y las separaciones de los diferentes compuestos sintetizados, cuando fueron necesarias, se llevaron a cabo mediante cromatografía en columna con sílice 60 A C.C. 35-70 μm SDS. Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se obtuvieron
10 con un espectrómetro Mercury-400 de Varian (Varian Inc., Palo Alto, CA) (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C). Los reactivos químicos usados en esta síntesis se obtuvieron de ACROS ORGANICS (Geel, Bélgica).

Preparación de intermedios.

15

Intermedio II

Se calentó una mezcla de la correspondiente 3,4-dihaloanilina (10 mmol) junto con etoximetilenmalonato de dietilo (10 mmol) a 120 $^{\circ}\text{C}$ con agitación. Durante
20 las 2 horas que duró la reacción se pasó una ligera corriente de nitrógeno para eliminar el etanol formado. Posteriormente se seco la mezcla bajo presión reducida obteniéndose el producto deseado.

Usando dicha metodología, utilizando la correspondiente anilina, se
25 prepararon los siguientes malonatos:

2-((3-cloro-4-fluorofenilamino)metilen)malonato de dietilo (IIa, 90% de rendimiento). ^1H RMN (CDCl_3) δ ppm: 1.32 (3 H, t, $J=7.14$ Hz), 1.36 (3 H, t, $J=7.14$ Hz), 4.24 (2 H, q, $J=7.14$ Hz), 4.29 (2 H, q, $J=7.14$ Hz), 6.98 (1 H, ddd, $J=8.97, 3.84, 2.93$ Hz), 7.14 (1 H, t, $J=8.60$ Hz), 7.18 (1 H, dd, $J=6.04, 2.93$ Hz), 8.36 (1 H, d, $J=13.36$ Hz), 10.97 (1 H, d, $J=13.36$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ ppm: 14.23 (1 C, s) 14.39 (1 C, s) 60.29 (1 C, s) 60.59 (1 C, s) 94.57 (1 C, s)

116.83 (1 C, d, J=6.84 Hz), 117.60 (1 C, d, J=22.23 Hz), 119.19 (1 C, s)
 122.33 (1 C, d, J=18.81 Hz), 136.18 (1 C, d, J=2.99 Hz), 151.69 (1 C, s)
 155.28 (1 C, d, J=247.05 Hz), 165.42 (1 C, s) 168.91 (1 C, s).

- 5 *2-((3,4-difluorofenilamino)metilen)malonato de dietilo (IIb, 90% de
 rendimiento). 1H RMN (CDCl₃) δ ppm: 1.30 (3 H, t, J=7.14 Hz), 1.35 (3 H, t,
 J=7.14 Hz), 4.22 (2 H, q, J=7.14 Hz), 4.28 (2 H, q, J=7.07 Hz), 6.78 - 6.87 (1
 H, m) 6.96 (1 H, ddd, J=11.16, 6.59, 2.74 Hz), 7.15 (1 H, q, J=8.78 Hz), 8.34 (1
 H, d, J=13.54 Hz), 10.96 (1 H, d, J=13.36 Hz). 13C RMN (CDCl₃) δ ppm: 14.20
 10 (1 C, s) 14.35 (1 C, s) 60.25 (1 C, s) 60.56 (1 C, s) 94.51 (1 C, s) 106.56 (1 C,
 d, J=20.94 Hz), 113.01 (1 C, dd, J=6.20, 3.63 Hz), 118.33 (1 C, dd, J=18.81,
 1.28 Hz), 136.04 (1 C, dd, J=7.69, 2.99 Hz), 147.47 (1 C, dd, J=246.62, 12.82
 Hz), 150.82 (1 C, dd, J=250.04, 13.68 Hz), 151.63 (1 C, s) 165.34 (1 C, s)
 168.88 (1 C, s).*

15

Intermedio III

- Se disolvió el correspondiente malonato **II** (9 mmol) en difenil éter (15 mL) y se
 calentó dicha disolución a reflujo. Después de 2 horas, la mezcla se enfrió a
 20 temperatura ambiente y se añadió hexano. Se filtró el sólido resultante, se
 lavó y se secó para obtener el producto deseado.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente malonato, se
 prepararon los siguientes 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilatos:

25

- 7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (IIIa, 92% de
 rendimiento). 1H RMN (CDCl₃) δ ppm: 1.32 (3 H, t, J=7.14 Hz), 4.47 (2 H, q,
 J=7.26 Hz), 8.10 (1 H, d, J=2.38 Hz), 8.12 (1 H, s) 9.11 (1 H, s); 13C RMN
 (CDCl₃) δ ppm: 13.60 (1 C, s) 67.53 (1 C, s) 107.03 (1 C, s) 111.70 (1 C, s)
 30 121.68 (1 C, d, J=8.98 Hz), 124.42 (1 C, s) 137.21 (1 C, d, J=21.37 Hz),
 138.00 (1 C, d, J=1.28 Hz), 147.31 (1 C, d, J=1.71 Hz), 160.23 (1 C, d,
 J=260.30 Hz), 169.04 (1 C, s) 174.53 (1 C, d, J=4.27 Hz).*

6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (**IIIb**, 85% de rendimiento). ^1H RMN (CDCl_3) δ ppm: 1.33 (3 H, t, $J=7.14$ Hz), 4.49 (2 H, q, $J=7.07$ Hz), 7.83 (1 H, dd, $J=8.87, 6.31$ Hz), 8.20 (1 H, t, $J=8.33$ Hz), 9.14 (1 H, s); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ ppm: 13.84 (1 C, s) 66.67 (1 C, s) 106.94 (1 C, s) 110.34 (1 C, d, $J=22.23$ Hz), 113.75 (1 C, dd, $J=20.94, 2.99$ Hz), 119.30 (1 C, dd, $J=8.12, 1.28$ Hz), 139.17 (1 C, d, $J=11.54$ Hz), 147.42 (1 C, d, $J=0.86$ Hz), 153.97 (1 C, dd, $J=262.65, 14.75$ Hz), 159.35 (1 C, dd, $J=270.13, 15.81$ Hz), 169.01 (2 C, s) 174.35 (1 C, d, $J=4.27$ Hz).

10 Intermedio IV

Se disolvió una mezcla de cloroalquiltiol (15 mmol) y difenilmetanol (15 mmol) en ácido trifluoroacético (30 mL) en un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética a temperatura ambiente. La reacción finalizó después de 2 horas según se observó mediante cromatografía en capa fina (diclorometano como eluyente). Se secó la mezcla a presión reducida. El residuo se disolvió en éter dietílico y se lavó con agua y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de magnesio anhidro, y se evaporaron a sequedad para obtener el compuesto deseado.

20

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente cloroalquiltiol, se prepararon los siguientes compuestos:

Bencidril(3-cloropropil)sulfano (IVa, 90% de rendimiento). RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm: 1,85 (2 H, dt, $J=13,36, 6,68$ Hz), 2,43 (2 H, t, $J=7,04$ Hz), 3,47 (2 H, t, $J=6,40$ Hz), 4,81 - 5,28 (1 H, m), 7,07 - 7,15 (2 H, m), 7,17 - 7,24 (4 H, m), 7,29 - 7,36 (4 H, m); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm: 29,19 (1 C, s), 31,64 (1 C, s), 43,42 (1 C, s), 54,13 (1 C, s), 127,18 (1 C, s), 128,17 (1 C, s), 128,51 (1 C, s), 141,10 (1 C, s).

Intermedio V

Una mezcla de yoduro de sodio (25 mmol) y **IV** (13 mmol) se disolvió en acetona (25 mL) y se llevó a reflujo en atmósfera inerte y con agitación.

5 Después de 7 horas, se observó mediante RMN ¹H una conversión total del átomo de cloro. Se secó la mezcla a presión reducida y el residuo se disolvió en *tert*-butil-metil éter y se lavó con agua y disolución saturada de disulfito de sodio en agua. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad para obtener el producto

10 deseado.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente cloroalquiltiol protegido, se prepararon los siguientes compuestos:

15 *Bencidril(3-iodopropil)sulfano (Va, 80% de rendimiento)*. RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm: 1,89 (2 H, dt, *J*=13,67, 6,84 Hz), 2,38 (2 H, t, *J*=6,96 Hz), 3,12 (2 H, t, *J*=6,84 Hz), 5,04 (1 H, s), 7,13 (2 H, s, *J*=7,48, 7,48, 1,83, 1,53 Hz), 7,21 (4 H, t, *J*=7,57 Hz), 7,30 - 7,33 (4 H, m); RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm: 5,04 (1 C, s), 32,42 (1 C, s), 32,74 (1 C, s), 54,16 (1 C, s), 127,26 (1 C, s), 128,24 (1 C, s),

20 128,59 (1 C, s), 141,13 (1 C, s).

Intermedio VI

Sobre una disolución a 0 °C de *N*-hidroxisuccinimida (12.6 mmol) y

25 dicitclohexilcarbodiimida (20.3 mmol) se añadió el correspondiente ácido (6 mmol) y se dejó reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente. En el caso del compuesto **Vla**, se añadió una disolución de anhídrido maleico (10 mmol) y β-alanina en *N,N*-dimetilformamida a la que previamente se había dejado reaccionar durante 1 hora. Trascurridas las 4 horas de reacción, la

30 mezcla se evaporó a presión reducida y el crudo fue disuelto en diclorometano y lavado con agua. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de

magnesio anhidro, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El residuo fue recrystalizado obteniéndose el compuesto deseado.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente ácido, se prepararon
5 los siguientes compuestos:

3-maleimidopropanoato de succinimido (VIa, 25% de rendimiento). ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm: 2.82 (4 H, s), 3.02 (2 H, t, *J*=7.07 Hz), 3.94 (2 H, t, *J*=7.07 Hz), 6.74 (2 H, s); ¹³C RMN (CDCl₃) δ ppm: 25.5 (2 C, s), 29.7 (1 C, s) 32.9 (1 C, s), 134.3 (2 C, s), 166.0 (1 C, s), 168.7 (2 C, s), 170.1 (2 C, s).
10

Iodoacetato de succinimido (VIb, 30% de rendimiento). ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm: 2.87 (2 H, s), 3.96 (1 H, s); ¹³C RMN (CDCl₃) δ ppm: -12.47 (1 C, s), 25.85 (2 C, s), 164.78 (1 C, s), 168.78 (2 C, s).
15

Preparación de haptenos.

Hapteno Ia

20 Se añadió carbonato de potasio anhidro (5 mmol) a una disolución de los correspondientes 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato **III** (2 mmol) y halogenuros de alquilo (sustituidos **V**) (10 mmol), en DMF anhidra (5 mL) y se agitó durante 10 horas a 110°C, en atmósfera inerte. Se evaporó la mezcla a vacío y el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con agua y disolución
25 saturada de disulfito de sodio en agua. La fase orgánica se secó con MgSO₄, y se evaporó hasta sequedad. Cuando fue necesario, se purificó el crudo mediante cromatografía líquida en gel de sílice usando diclorometano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil para obtener el producto deseado.

30 Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato, se prepararon los siguientes 1-alkil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilatos:

6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (**11**, 80% de rendimiento). RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 0,97 (3 H, t, J=7,32 Hz), 1,36 (3 H, t, J=7,14 Hz), 1,98 (2 H, td, J=15,09, 7,50 Hz), 4,52 (2 H, q, J=7,14 Hz), 4,61 (2 H, t, J=7,69 Hz), 7,91 (1 H, dd, J=10,43, 6,22 Hz), 8,33 (1 H, t, J=8,42 Hz),
 5 9,18 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm: 10,56 (1 C, s) 13,93 (1 C, s) 24,00 (1 C, s) 61,39 (1 C, s) 66,81 (1 C, s) 107,02 (1 C, s) 109,01 (1 C, d, J=24,36 Hz), 115,07 (1 C, dd, J=20,52, 3,42 Hz), 120,64 (1 C, d, J=8,12 Hz), 139,67 (1 C, d, J=10,69 Hz), 150,83 (1 C, s) 153,64 (1 C, dd, J=263,29, 14,53 Hz), 159,37 (1 C, dd, J=269,70, 15,39 Hz), 168,67 (1 C, s) 173,38 (1 C, d, J=3,85 Hz).

10

1-(3-(bencidritio)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (**12**, 80% de rendimiento). ¹H RMN (DMSO-D6) δ ppm: 1.27 (3 H, t, J=7.14 Hz), 1.91 (2 H, quin, J=7.32 Hz), 2.37 (2 H, t, J=7.23 Hz), 4.22 (2 H, q, J=7.14 Hz), 4.36 (2 H, t, J=6.86 Hz), 5.31 (1 H, s) 7.17 (2 H, t, J=7.32 Hz), 7.25 (4 H, t, J=7.41 Hz), 7.38 (4 H, d, J=7.32 Hz), 8.00 (1 H, d, J=9.51 Hz), 8.07 (1 H, d, J=6.04 Hz), 8.60 (1 H, s); ¹³C RMN (DMSO-D6) δ ppm: 13.68 (1 C, s) 27.24 (1 C, s) 27.58 (1 C, s) 51.33 (1 C, s) 51.94 (1 C, s) 59.31 (1 C, s) 109.05 (1 C, s) 111.89 (1 C, d, J=22.23 Hz), 119.40 (1 C, s) 124.86 (1 C, d, J=19.66 Hz), 126.42 (2 C, s) 127.25 (4 C, s) 127.82 (4 C, s)
 15 128.03 (1 C, d, J=5.56 Hz), 135.13 (1 C, d, J=1.28 Hz), 140.85 (2 C, s) 149.29 (1 C, s) 153.74 (1 C, d, J=247.48 Hz), 163.60 (1 C, s) 170.71 (1 C, d, J=2.14 Hz).

1-(3-(bencidritio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (**13**, 75% de rendimiento). ¹H RMN (TFAd) δ ppm: 1.36 (3 H, t, J=7.23 Hz), 2.09 (2 H, quin, J=7.14 Hz), 2.48 (2 H, t, J=6.50 Hz), 4.52 (2 H, q, J=7.14 Hz), 4.69 (2 H, t, J=7.04 Hz), 4.97 (1 H, s) 7.04 - 7.09 (2 H, m) 7.12 (4 H, t, J=7.23 Hz), 7.20 (4 H, d, J=7.14 Hz), 7.90 (1 H, dd, J=10.15, 6.13 Hz), 8.31 (1 H, t, J=8.45 Hz), 9.22 (1 H, s); ¹³C RMN (TFAd) δ ppm: 13.93 (1 C, s) 28.58
 25 (1 C, s) 29.83 (1 C, s) 56.63 (1 C, s) 58.38 (1 C, s) 66.76 (1 C, s) 106.86 (1 C, s) 109.00 (1 C, d, J=23.51 Hz), 115.07 (1 C, dd, J=20.52, 2.99 Hz), 120.48 (1 C, d, J=6.84 Hz), 128.26 (2 C, s) 129.27 (4 C, s) 130.10 (4 C, s) 139.44 (1 C,

30

d, J=9.83 Hz), 141.79 (2 C, s) 151.39 (1 C, s) 153.55 (1 C, dd, J=263.29, 14.53 Hz), 159.26 (1 C, dd, J=269.70, 15.39 Hz), 168.54 (1 C, s) 173.39 (1 C, d, J=4.28 Hz).

5 Hapteno Ib

Se mantuvo a reflujo una disolución del 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato correspondiente **III** o **la** (1 mmol) e hidróxido de potasio (2,5 mmol) en una mezcla de THF:agua (3:1, 4 mL) con agitación durante 4,5 horas. Se
10 vertió el crudo de reacción sobre una mezcla de hielo-agua (50 mL), acidificada con HCl 1M, se filtró el precipitado resultante y se lavó con agua fría para obtener los correspondientes ácidos carboxílicos.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente carboxilato, se
15 prepararon los siguientes ácidos carboxílicos:

Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (14, 80% de rendimiento). RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 7,86 (1 H, dd, J=8,87, 6,31 Hz), 8,24 (1 H, t, J=8,33 Hz), 9,23 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm 106,10 (1 C, s) 110,46
20 (1 C, dd, J=22,44, 1,07 Hz), 113,91 (1 C, dd, J=20,52, 2,99 Hz), 119,29 (1 C, dd, J=7,91, 1,50 Hz), 139,38 (1 C, d, J=11,54 Hz), 148,16 (1 C, d, J=1,71 Hz), 154,06 (1 C, dd, J=263,29, 14,53 Hz), 159,55 (1 C, dd, J=270,99, 15,81 Hz), 171,52 (1 C, s) 174,56 (1 C, d, J=4,27 Hz).

25 *Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (15, 95% de rendimiento),* RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 0,94 (4 H, t, J=7,41 Hz), 1,96 (2 H, td, J=15,00, 7,50 Hz), 4,60 (2 H, t, J=7,69 Hz), 7,90 (1 H, dd, J=10,34, 6,13 Hz), 8,31 (1 H, t, J=8,42 Hz), 9,24 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm: 10,59 (1 C, s) 24,00 (1 C, s) 61,52 (1 C, s) 106,32 (1 C, s) 109,16 (1 C, d, J=23,51 Hz),
30 115,27 (1 C, dd, J=20,52, 2,99 Hz), 120,69 (1 C, d, J=7,27 Hz), 139,95 (1 C, d, J=9,83 Hz), 151,65 (1 C, s) 153,74 (1 C, dd, J=263,93, 14,32 Hz), 159,56 (1 C, dd, J=270,13, 15,39 Hz), 171,09 (1 C, s) 173,67 (1 C, d, J=3,85 Hz).

Ácido 1-(3-(bencidrilitio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**16**, 85% de rendimiento), RMN ¹H (DMSO-d6) δ ppm: 1,96 (2 H, dt, J=14,41, 7,16 Hz), 2,36 (2 H, t, J=7,44 Hz), 4,49 (2 H, t, J=6,86 Hz), 5,29 (1 H, s) 7,17 (1 H, t, J=7,23 Hz), 7,24 (4 H, t, J=7,41 Hz), 7,36 (4 H, d, J=7,14 Hz), 8,15 (1 H, dd, J=12,26, 6,59 Hz), 8,23 (1 H, dd, J=10,34, 8,87 Hz), 8,90 (1 H, s); RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-D6) δ ppm: 27,33 (1 C, s) 27,45 (1 C, s) 51,76 (1 C, s) 52,25 (1 C, s) 106,99 (1 C, d, J=22,65 Hz), 108,54 (48 C, s) 112,79 (1 C, d, J=18,38 Hz), 122,75 (1 C, d, J=4,27 Hz), 126,39 (2 C, s) 127,25 (4 C, s) 127,82 (4 C, s) 136,13 (1 C, d, J=10,26 Hz), 140,78 (1 C, s) 147,41 (1 C, dd, J=249,83, 14,32 Hz), 148,99 - 149,42 (1 C, m) 152,65 (1 C, dd, J=253,89, 14,96 Hz), 164,98 (1 C, s) 175,47 (1 C, d, J=1,71 Hz).

Hapteno 1c1

Se calentó una disolución de la 4-oxo-1,4-dihidroquinolina **1a** o **1b** (0,75 mmol) y la amina correspondiente (1,9 mmol) en DMSO anhidro (2 mL) a 110°C en atmósfera inerte. Después de 5 horas, se eliminó el disolvente a vacío elevado y el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. Finalmente, la fase orgánica se secó con MgSO₄, y se evaporó hasta sequedad.

Usando dicha metodología, utilizando la correspondiente 4-oxo-1,4-dihidroquinolina, se prepararon las siguientes 7-amino-4-oxo-1,4-dihidroquinolinas:

Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4 dihidroquinolina-3-carboxílico (**17**, 60% de rendimiento). RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 3,54 - 3,63 (4 H, m) 4,03 - 4,11 (4 H, m) 7,36 (1 H, d, J=6,95 Hz), 8,04 (1 H, d, J=12,81 Hz), 9,08 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm 50,96 (2 C, d, J=6,41 Hz), 67,74 (2 C, s) 104,42 (1 C, s) 107,21 (1 C, d, J=4,27 Hz), 112,24 (1 C, d, J=26,07 Hz), 115,74 (1 C, d, J=10,26 Hz), 139,34 - 141,64 (1 C, m) 146,83 (1 C, s) 150,38 (1 C, d, J=10,69 Hz), 157,04 (1 C, d, J=259,02 Hz), 172,37 (1 C, s) 172,66 (1 C, d, J=4,70 Hz).

Ácido 6-fluoro-7-(*N*-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**18**, 70% de rendimiento). RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 0,94 (3 H, t, J=7,41 Hz), 1,97 (2 H, td, J=14,68, 7,23 Hz), 3,54 - 3,59 (4 H, m), 4,01 - 4,07 (4 H, m), 4,56 (2 H, t, J=7,32 Hz), 7,19 (1 H, d, J=6,77 Hz), 8,07 (1 H, d, J=12,81 Hz), 9,04 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm 10,74 (1 C, s) 23,47 (1 C, s) 51,03 (2 C, d, J=6,41 Hz), 60,72 (2 C, s) 67,90 (1 C, s) 104,56 (1 C, s) 105,60 (1 C, d, J=3,85 Hz), 113,43 (1 C, d, J=25,64 Hz), 116,94 (1 C, d, J=9,83 Hz), 141,08 (1 C, s) 150,32 (1 C, s) 150,60 (1 C, d, J=10,26 Hz), 156,84 (1 C, d, J=259,02 Hz), 171,77 (1 C, d, J=4,27 Hz), 171,97 (1 C, s).

10

Ácido 7-(2-aminoetilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**19**, 60% de rendimiento). RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 0,89 (3 H, t, J=7,32 Hz), 1,91 (2 H, dt, J=7,14 Hz), 3,54 (2 H, s), 3,82 (2 H, s), 4,48 (2 H, t, J=6,86 Hz), 6,87 (1 H, d, J=6,22 Hz), 7,96 (1 H, d, J=10,61 Hz), 8,93 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm 10,64 (1 C, s) 23,18 (1 C, s) 40,87 (1 C, s) 41,37 (1 C, s) 60,49 (1 C, s) 97,13 (1 C, d, J=3,85 Hz), 103,93 (1 C, s) 111,04 (1 C, d, J=23,08 Hz), 114,40 (1 C, d, J=9,40 Hz), 142,16 (1 C, s) 147,83 (1 C, d, J=14,11 Hz), 149,72 (1 C, s) 153,83 (1 C, d, J=256,03 Hz), 171,12 (1 C, d, J=4,27 Hz), 172,20 (1 C, s).

20

Ácido 7-(diethylamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**110**, 90% de rendimiento en un recipiente presurizado). RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 0,91 (3 H, t, J=7,41 Hz), 1,16 (6 H, t, J=7,23 Hz), 1,93 (2 H, td, J=14,59, 7,23 Hz), 3,88 (4 H, q, J=7,14 Hz), 4,68 (2 H, t, J=7,23 Hz), 8,48 (1 H, d, J=10,43 Hz), 8,53 (1 H, d, J=4,57 Hz), 9,31 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm 10,77 (11 C, s) 11,16 (2 C, s) 24,25 (1 C, s) 56,80 (2 C, s) 61,38 (1 C, s) 108,12 (1 C, s) 113,86 (1 C, d, J=66,25 Hz), 118,07 (1 C, d, J=6,84 Hz), 139,07 (1 C, s) 151,91 (1 C, d, J=48,73 Hz), 153,17 - 153,70 (1 C, m) 156,33 (1 C, d, J=259,87 Hz), 170,66 (1 C, s) 174,56 (1 C, s).

30

Ácido 1-(3-(bencidiltio)propil)-6-fluoro-7-(*N*-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**111**, 70% de rendimiento), RMN ¹H (DMSO-d₆)

δ ppm: 2,02 (2 H, dt, J=13,77, 6,93 Hz), 2,34 (2 H, t, J=6,95 Hz), 3,25 (4 H, s)
 3,73 (4 H, s) 4,56 (2 H, t, J=6,31 Hz), 5,32 (1 H, s) 7,10 (1 H, d, J=6,95 Hz),
 7,18 (2 H, t, J=7,14 Hz), 7,25 (4 H, t, J=7,50 Hz), 7,37 (4 H, d, J=7,32 Hz),
 7,90 (1 H, d, J=13,36 Hz), 20,00 (1 H, s); RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-d₆) δ
 5 ppm 27,20 (1 C, s) 27,47 (1 C, s) 49,13 (2 C, d, J=4,70 Hz), 51,72 (1 C, s)
 51,88 (1 C, s) 65,19 (2 C, s) 105,16 (1 C, s) 106,30 (1 C, s) 110,60 (1 C, d,
 J=22,65 Hz), 118,78 (1 C, d, J=7,69 Hz), 126,42 (2 C, s) 127,23 (4 C, s)
 127,83 (4 C, s) 136,58 (1 C, s) 140,77 (1 C, s) 144,70 (1 C, d, J=9,83 Hz),
 148,33 (1 C, s) 152,23 (1 C, d, J=249,62 Hz), 165,41 (1 C, s) 175,55 (1 C, d,
 10 J=2,56 Hz).

Ácido *1-(3-(bencidritio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacínil)-1,4-*
dihidroquinolina-3-carboxílico (I12, 95% de rendimiento). ^1H RMN (TFA_d) δ
 ppm: 2.17 (2 H, m) 2.49 (2 H, t, J=6.96 Hz), 3.35 (4 H, s) 3.72 (4 H, s) 4.75 (2
 15 H, t, J=6.68 Hz), 5.08 (1 H, s) 7.11 (2 H, t, J=7.14 Hz), 7.18 (4 H, t, J=7.32 Hz),
 7.28 (4 H, d, J=7.32 Hz), 7.51 (1 H, d, J=6.22 Hz), 8.13 (1 H, d, J=12.44 Hz),
 9.13 (1 H, s); ^{13}C RMN (TFA_d) δ ppm: 29.31 (1 C, s) 29.58 (1 C, s) 45.68 (2
 C, s) 47.87 (2 C, d, J=6.41 Hz), 56.90 (1 C, s) 57.22 (1 C, s) 104.92 (1 C, s)
 106.66 (1 C, s) 113.60 (1 C, d, J=25.65 Hz), 117.92 (1 C, d, J=8.98 Hz),
 20 128.22 (2 C, s) 129.34 (4 C, s) 130.19 (4 C, s) 140.67 (1 C, s) 141.80 (2 C, s)
 149.66 (1 C, d, J=10.69 Hz), 150.88 (1 C, s) 156.48 (1 C, d, J=259.02 Hz),
 171.58 (1 C, s) 172.04 (1 C, d, J=3.85 Hz).

Hapteno Ic2

25

Se agitó una disolución de la piperacínil fluoroquinolona correspondiente **Ic1** (0,5 mmol) y formaldehído (2 mmol) en ácido fórmico (1 mL) a 110°C durante 2,5 horas y se evaporó la mezcla hasta sequedad.

30 Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente piperacínil fluoroquinolona, se preparó la siguiente metilpiperacínil fluoroquinolona:

Ácido 6-fluoro-7-(4-metilpiperacina-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**I13**, Rendimiento cuantitativo), RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 0,89 (3 H, t, J=7,32 Hz), 1,92 (1 H, td, J=14,45, 7,14 Hz), 2,97 (3 H, s), 3,31 (2 H, t, J=11,16 Hz), 3,48 (2 H, t, J=12,90 Hz), 3,69 (2 H, d, J=12,26 Hz), 3,99 (2 H, d, J=13,91 Hz), 4,55 (2 H, t, J=7,32 Hz), 7,24 (1 H, d, J=6,40 Hz), 8,09 (1 H, d, J=12,26 Hz), 9,05 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm: 10,71 (1 C, s) 23,57 (1 C, s) 45,28 (2 C, s) 47,94 - 48,53 (2 C, m, J=5,98 Hz), 55,83 (1 C, s) 60,84 (1 C, s) 105,07 (1 C, s) 107,06 (1 C, d, J=2,99 Hz), 113,66 (1 C, d, J=25,65 Hz), 118,04 (1 C, d, J=10,26 Hz), 140,81 (1 C, s) 149,51 (1 C, d, J=10,68 Hz), 150,61 (1 C, s) 156,86 (1 C, d, J=258,16 Hz), 171,77 (1 C, s) 172,28 (1 C, d, J=3,85 Hz).

B. INMUNOQUÍMICA

15 Procedimientos generales y equipos.

La desprotección del grupo tiol de los haptenos correspondientes se monitorizó mediante HPLC-UV, usando una bomba Merck Hitachi I-7100 provista de un detector L-7455 de matriz de diodos, un automuestreador L-7200, y una interfaz D7000 (Merck, Darmstadt, Alemania). Los cromatogramas se procesaron con el software HSM (Merck, Darmstadt, Alemania). Se utilizó una columna Lichrospher 100 RP-18 125x4 (5mm; Merck, Darmstadt, Alemania) y los análisis se llevaron a cabo en modo gradiente usando acetonitrilo (ACN): tampón citrato (50 mM, pH=3) como fase móvil a un caudal de 1,0 mL min⁻¹. Las reacciones se monitorizaron a dos longitudes de onda: 330 nm y 280 nm. El MALDI-TOF-MS (espectrómetro de masas con detección por tiempo de vuelo, con ionización por desorción mediante láser asistida por matriz) usado para analizar los conjugados de proteína fue una Estación de Trabajo Perspective BioSpectrometry provista del software Voyager-DE-RP (versión 4.03) desarrollado por Perspective Biosystems Inc. (Framingham, MA) y Grams/386 (para Microsoft Windows,

versión 3.04, nivel III) desarrollado por Galactic Industries Corporation (Salem, NH).

Análisis de la densidad del hapteno.

5

Las densidades del hapteno de los conjugados de proteína se calcularon mediante MALDI-TOF-MS comparando el peso molecular de las proteínas naturales con el de los conjugados. Los experimentos de MALDI se realizaron mezclando 2 μL de la matriz recientemente preparada (ácido *trans*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinnámico, 10 mg mL^{-1} en ACN/ H_2O 70:30, TFA al 0,1%) con 2 μL de una disolución de los conjugados o las proteínas en ACN/ H_2O 70:30, TFA al 0.1% (5 mg mL^{-1}). Se calculó la densidad del hapteno (δ_{Hapteno}) según la siguiente ecuación: $[\text{PM}(\text{Conjugado})-\text{PM}(\text{Proteína})] / \text{PM}(\text{Hapteno})$.

10

15 El pH y la conductividad de todos los tampones y disoluciones se midieron con un pH metro pH 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Las placas de microvaloración de poliestireno se adquirieron de Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK). Las etapas de lavado del ELISA se llevaron a cabo en un lavador de microplacas SLY96 PW (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Las absorbancias se leyeron en un SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las curvas de competencia se analizaron con una ecuación logística de cuatro parámetros usando el software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices) y GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

20

25

Productos químicos e immunoquímicos.

Se obtuvieron los productos immunoquímicos de Sigma Chemical Co. (San. Luis, MO). Los productos químicos usados para los estudios de reactividad cruzada se adquirieron de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

30

Tampones.

Disolución salina tamponada con fosfato (PBS) es tampón fosfato 0,01 M en una disolución salina al 0,8%, y el pH es 7,5. PBST es PBS con Tween 20 al 0,05%. Tampón borato es ácido bórico/borato de sodio 0,2 M pH=8.7. Tampón de tapizado es tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Tampón citrato es una disolución 0,04 M de citrato de sodio, pH 5.5. La disolución del sustrato contiene TMB al 0,01% (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) y H₂O₂ al 0,004% en tampón citrato.

10

Preparación de inmunoreactivos.

Inmunoreactivo le e lf

15 La haptización de los soportes inmunogénicos en el caso de haptenos que poseen un grupo tiol se realizó mediante una secuencia de tres etapas que se describen a continuación.

Eta 1: Activación de las proteínas (VII). Se añadió gota a gota una disolución del correspondiente éster de succinimido **VI** (70 µmol) en DMF anhidra (400 µL) a una disolución de la proteína (15 mg) en tampón borato y se ajustó el pH a 8 mediante trietilamina. Se mantuvo la mezcla a 4°C durante la noche y se purificó la proteína activada mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Sephadex G-25 Superfine desaladora HiTrap de 5 mL (Amersham Biosciences) y tampón borato como eluyente. Se recogieron las fracciones eluidas (0.5 mL) de las proteínas así activadas, y se combinaron las de resultado positivo en el ensayo de la proteína de Bradford (3 mL) (Bradford, M. M. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-254). Se reservó una parte de esta disolución para el análisis MALDI-TOF-MS y se usó el resto para la conjugación según se describe en la etapa 3.

25
30

De esta manera, utilizando el correspondiente éster de succinimido, se prepararon las siguientes proteínas activadas:

3-maleimidopropanoato de BSA (VIIa). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 31.29.

5

Iodoacetato de BSA (VIIb). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 15.62.

Etapa 2. Desprotección (Id). Se disolvió el hapteno con grupo tiol protegido **la,b,c** (0,18 mmol) y anisol (2,74 mmol) en ácido trifluoroacético (2 mL) y se agitó la mezcla resultante a 45°C durante 1,5 h hasta que se observó una conversión total del producto de partida mediante HPLC-UV. En este momento, se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío y el residuo se disolvió en agua y se lavó con diclorometano. Se usó inmediatamente la capa acuosa para la conjugación sin purificación adicional según se describe en la etapa 3.

15

De esta manera se obtuvieron los correspondientes haptenos con el grupo tiol libre:

Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I14, 68% de rendimiento) RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm: 1.60 (1 H, t, J=8.06 Hz), 2.21 (2 H, tt, J=7.08, 6.84 Hz), 2.69 (2 H, q, J=7.57, 6.84, 5.86 Hz), 3.32 (4 H, t, J=4.64 Hz), 3.91 (4 H, t, J=4.64 Hz), 4.44 (2 H, t, J=7.57 Hz), 7.01 (1 H, d, J=6.84 Hz), 8.07 (1 H, d, J=13.18 Hz), 8.69 (1 H, s); RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm: 21.43 (1 C, s) 32.39 (1 C, s) 50.51 (2 C, s) 52.80 (1 C, s) 66.80 (2 C, s) 104.05 (1 C, s) 108.70 (1 C, s) 113.28 (1 C, d, J=26.55 Hz), 121.01 (1 C, s) 137.52 (1 C, s) 146.34 (1 C, d, J=10.98 Hz), 148.03 (1 C, s) 153.77 (1 C, d, J=253.12 Hz), 167.42 (1 C, d, J=0.91 Hz), 177.28 (1 C, d, J=2.29 Hz).

25

Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I15, 45% de rendimiento) RMN ¹H (D₂O) δ ppm: 1H 2.54 (2 H, s) 2.87 - 3.00 (2 H, m) 3.78 - 4.06 (4 H, m) 4.07 - 4.22 (4 H, m) 4.92 - 5.33 (2 H, m) 7.86 (1 H, d, J=6.35 Hz), 8.46 (1 H, d, J=12.21 Hz), 9.51

30

(1 H, s); ^{13}C NMR (D_2O) δ ppm: 21.49 (1 C, s), 32.87 (1 C, s), 44.17 (2 C, s), 47.44 (2 C, d, $J=5.17$ Hz), 54.18 (1 C, s), 106.69 (1 C, s), 106.82 (1 C, s), 111.85 (1 C, d, $J=23.92$ Hz), 120.02 (1 C, d, $J=8.41$ Hz), 138.05 (1 C, s), 145.78 (1 C, d, $J=10.34$ Hz), 149.32 (1 C, s), 153.99 (1 C, d, $J=251.52$ Hz),
5 169.54 (1 C, s), 176.35 (1 C, d, $J=1.94$ Hz).

Etapas 3 Bioconjugación (Ie, If). Se añadió gota a gota la fase acuosa del hapteno con el grupo tiol desprotegido de la etapa 2 **Id**, sobre la disolución de proteína activada purificada de la etapa 1 **VII**. Se ajustó el pH a 8 utilizando trietilamina. Se mantuvo la mezcla con agitación suave durante 2,5 horas a
10 temperatura ambiente. Finalmente, se purificaron los inmunoreactivos mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 L) y agua milliQ (1 x 5 L) y se liofilizaron.

15 Utilizando dicha metodología se prepararon los siguientes inmunoreactivos:

Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I16). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 2.23.

20 *Ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(carboxamida de BSA)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico. (I17).*
 δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 12.46.

25 *Ácido 1-[3-(2-acetamida de HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I18).* δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína) (UV cuantitativo): 14.37

Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I19). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 14.15.

Inmunoreactivo Ig e lh

La haptenización de los soportes inmunogénicos para el caso de haptenos que poseen un grupo ácido o amina se realizó de la siguiente manera.

5

Se añadió una disolución del hapteno **lb,c** (10 μ mol) en DMF (100 μ L) a una disolución de la proteína (10 mg) en agua milliQ (1 mL) seguido por la adición de una disolución de EDC (50 μ mol) en agua milliQ (100 μ L) y se agitó la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente. Se purificaron los conjugados de las proteínas mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 l) y agua milliQ (1 x 5 l) y se liofilizaron.

10

Utilizando dicha metodología se prepararon los siguientes inmunoreactivos:

15 *6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I20)*. MS $\bar{\delta}_{\text{Hapteno}}$ (mol Hapteno/mol proteína): 7.11.

6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA (I21). $\bar{\delta}_{\text{Hapteno}}$ (mol Hapteno/mol proteína): 2.60.

20

6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I22). $\bar{\delta}_{\text{Hapteno}}$ (mol Hapteno/mol proteína): 3.74.

25 *6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA (I23)*. $\bar{\delta}_{\text{Hapteno}}$ (mol Hapteno/mol proteína): 1.09.

6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I24). $\bar{\delta}_{\text{Hapteno}}$ (mol Hapteno/mol proteína): 1.37.

30 *6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I25)*. $\bar{\delta}_{\text{Hapteno}}$ (mol Hapteno/mol proteína): 1.79.

Ácido 7-[2-(acetamida de BSA)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico BSA (**I26**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 5.28.

7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (**I27**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 4.62.

7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA (**I28**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 4.30.

6-fluoro-7-(4-metilpiperacina-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (**I29**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 2.16.

6-fluoro-7-(4-metilpiperacina-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA (**I30**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 1.36.

15

Inmunoreactivo Ii

La haptenización de los soportes inmunogénicos en el caso de haptenos que poseen un grupo amino también se realizó mediante una reacción en dos etapas que se describen a continuación.

Se añadió una disolución de cloruro cianúrico (1.5 μmol) en DMF (150 μL) a una disolución de la proteína (6 mg) en tampón carbonato a pH 9.6 (1 mL). Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas, tras las cuales se añadió gota a gota una disolución del correspondiente hapteno **Ic** (2 μmol) en DMF (60 μL). Se mantuvo la mezcla con agitación suave durante 4 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se purificaron los inmunoreactivos mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 L) y agua milliQ (1 x 5 L) y se liofilizaron.

Utilizando dicha metodología se prepararon los siguientes inmunoreactivos:

Ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5,-triazin-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I31). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 1.76.

5 Preparación de antisueros policlonales.

Se llevó a cabo el protocolo de inmunización en hembras de conejos blancos New Zealand que pesaban 1-2 kg, según se ha descrito anteriormente (Salvador, *Analytical Chemistry*. **2007**, 79, 3734-3740). Los inmunógenos (100 μg) disueltos en PBS (0.5 mL) fueron emulsionados con adyuvante de Freund, completo la primera vez e incompleto el resto, en una relación 1:1. Inmediatamente fueron inyectados de manera intradérmica en diferentes lugares de la espalda del animal huésped (una inyección al mes). Se evaluó la evolución de los títulos del anticuerpo midiendo la unión de las diluciones en serie de los diferentes antisueros en placas de microvaloración recubiertas con el correspondiente inmunoreactivo. Después de observarse un título aceptable de anticuerpos, se desangraron los animales y se recogió la sangre en tubos vacutainer provistos de un gel de separación del suero. Se obtuvieron los antisueros mediante centrifugación y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de NaN_3 al 0,02%.

Desarrollo de ELISAs competitivos indirectos para quinolonas

Las placas de microvaloración se recubrieron con el correspondiente antígeno de tapizado (formato indirecto) o antisuero (formato directo) disuelto en tampón de de tapizado (100 μL /pocillo) durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o 4 horas a temperatura ambiente y se cubrieron con placas adhesivas herméticas. Posteriormente, se lavaron las placas con PBST (cuatro veces, 300 μL /pocillo) y se añadieron los patrones de quinolona (0.01 nM - 10000 nM, en PBST, 50 μL /pocillo) seguidos por el correspondiente antisuero (formato indirecto) o trazador enzimático (formato directo) (50 μL /pocillo) a las placas de microvaloración. Después de 30 min a temperatura ambiente, se lavaron las

placas como se ha descrito anteriormente y para el caso del formato indirecto se añadió una disolución de IgG antiIgG de conejo marcada con HRP (1/6000 en PBST) (100 μ L/pocillo) y se incubaron durante 30 min más a temperatura ambiente. Se lavaron las placas de nuevo, y para ambos formatos se añadió la disolución del sustrato (100 μ L/pocillo). Se detuvo el desarrollo del color después de 30 min a temperatura ambiente con 4 H₂SO₄ N (50 μ L/pocillo), y se leyó la absorbancia a 450 nm. Las curvas patrón se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros según la siguiente fórmula: $Y = [(A - B)/1 - (x/C)D] + B$, en la que A es la absorbancia máxima, B es la absorbancia mínima, C es la concentración que produce el 50% de la absorbancia máxima, y D es la tangente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea.

De esta manera se obtuvieron los siguientes ELISAs competitivos para ciprofloxacino:

15

As	IR	[IR] μ g/mL	[As] Dilución	Abs max	Abs min	IC50 μ g/L	Pendiente	R ²
171	I16	2.5	1/16000	1.767	0.137	16.40	-0.857	0.9980
171	I19	0.0156	1/128000	1.615	0.073	4.81	-0.661	0.9985
171	I26	0.25	1/16000	1.360	0.098	1.66	-0.793	0.9691
172	I16	2.5	1/4000	1.900	0.090	38.39	-0.770	0.9959
172	I19	0.0156	1/32000	1.817	0.088	27.60	-0.646	0.9928
172	I26	0.25	1/4000	1.427	0.079	11.56	-0.845	0.9939
173	I16	5	1/16000	1.748	0.144	134.68	-0.538	0.9959
173	I19	0.0156	1/128000	1.710	0.165	48.55	-0.547	0.9939
173	I26	0.25	1/16000	0.915	0.013	1.49	-0.253	0.9825
171	I31	0.0625	1/8000	1.49	0.032	0.81	-1.46	0.9952

Tabla 1: Parámetros de ensayos ELISA competitivo para la detección de ciprofloxacino utilizando inmunoreactivos y anticuerpos desarrollados con los inmunoreactivos descritos en la presente invención.

Determinaciones de la reactividad cruzada.

Se prepararon disoluciones madre a una concentración de 10 mM para diferentes quinolonas y otros antibióticos en hidróxido de sodio (50 mM) y se midieron por ELISA. Se calcularon los valores de la reactividad cruzada según la ecuación: $(DI_{50} \text{ CPMX} / DI_{50} \text{ de los compuestos ensayados}) \times 100$.

En la siguiente tabla se muestran los valores de IC_{50} y reactividad cruzada utilizando los inmunoreactivos y anticuerpos desarrollados en esta invención.

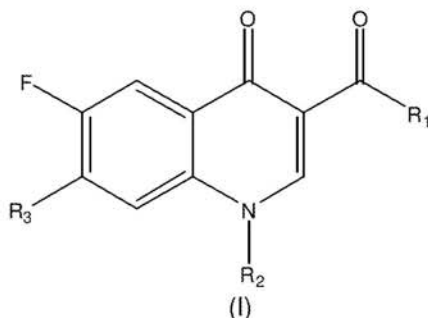
10

Compuesto	IC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	% CR
Ciprofloxacino	0.77 ± 0.27	100
Enrofloxacin	0.65	95
Danofloxacin	7.31	8
Difloxacin	0.91	75
Marbofloxacino	4,30	28
Flumequina	3.91	22
Ácido Oxolínico	23,53	4
Norfloxacin	0.78	81
Sarafloxacin	0.96	80
Ofloxacin	1.84	39
Sulfametazina	>1000	<0.2
Sulfatiazol	>1000	<0.2
Cloramfenicol	>1000	<0.2
Tetraciclina	>1000	<0.2
Doxiciclina	>1000	<0.2
Ampicilina	>1000	<0.2

Tabla 2: Datos de IC_{50} y reactividad cruzada para distintos antibióticos utilizando anticuerpos desarrollados con los inmunoreactivos descritos en la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



5

o sus sales, isómeros o solvatos,

donde

10 R_1 se selecciona entre OH, O-alquilo C_1 - C_{10} , OR_4 , NHR_4 , donde R_4 es un soporte inmunogénico;

15 R_2 se selecciona entre H, alquilo C_3 - C_{10} , $-(CH_2)_m-R_5R_6$, donde m es un valor de 3 a 6 cuando R_5 se selecciona entre O ó NH o m es un valor de 1 a 6 cuando R_5 es S y R_6 se selecciona entre H o alquilo C_1 - C_6 , arilo, alquil-arilo, R_4 o LR_4 donde L es un compuesto de unión bifuncional;

20 R_3 se selecciona entre, heterociclo, halógeno o NR_7R_8 , donde R_7 y R_8 se seleccionan independientemente entre H o alquilo C_1 - C_6 , $-(CH_2)_n-R_9R_{10}$, donde n es un valor de 1 a 6, R_9 se selecciona entre S, O ó NH y R_{10} se selecciona entre H o alquilo C_1 - C_6 , arilo, alquil-arilo, R_4 o LR_4 .

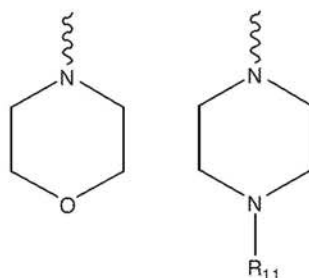
20

2. Compuesto según la reivindicación 1 donde R_1 es O-alquilo C_1 - C_6 .

3. Compuesto según la reivindicación 2 donde R_1 es O-etilo.

25 4. Compuesto según la reivindicación 1 donde R_1 es OH.

5. Compuesto según la reivindicación 1 donde R_1 es NHR_4 siendo R_4 es proteína que se selecciona entre albúmina de suero bovino, concanavalina A, ovalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura o hemocianina de cangrejo herradura.
- 5
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde R_2 es $(CH_2)_3-R_5R_6$, donde R_5 y R_6 se definen como en la reivindicación 1.
7. Compuesto según la reivindicación 6 donde R_5 es S y R_6 se selecciona entre H o LR_4 , siendo L maleimidopropanoato o iodoacetilo y R_4 una proteína que se selecciona entre albúmina de suero bovino, concanavalina A, ovalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura o hemocianina de cangrejo herradura.
- 10
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde R_2 es alquilo C_3-C_6 .
- 15
9. Compuesto según la reivindicación 8 donde R_2 es propilo.
10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R_3 se selecciona entre halógeno o heterociclo.
- 20
11. Compuesto según la reivindicación 10 donde R_3 se selecciona entre fluor o cloro.
- 25
12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R_3 se selecciona entre el siguiente grupo:



donde R_{11} es alquilo C_1-C_6

13. Compuesto según la reivindicación 12 donde R_{11} es metilo.
- 5 14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R_3 es NR_7R_8 , siendo R_7 y R_8 un grupo alquilo C_1-C_6 igual o diferente.
15. Compuesto según la reivindicación 14 donde R_7 y R_8 son etilo.
- 10 16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R_3 es NR_7R_8 , siendo R_7 hidrógeno y R_8 un grupo alquilo C_1-C_6 sustituido.
17. Compuesto según la reivindicación 16 donde R_3 es $-NH(CH_2)_2NH_2$
- 15 18. Compuesto según la reivindicación 16 donde R_3 es $-NH(CH_2)_2NHLR_4$, siendo L 2,4-dicloro-1,3,5-triazina y R_4 una proteína que se selecciona entre albúmina de suero bovino, concanavalina A, ovoalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura o hemocianina de cangrejo herradura.
- 20 19. Compuesto de fórmula (I) que se selecciona del siguiente grupo:
- 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
 - 1-(3-(bencidiltio)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
 - 25 - 1-(3-(bencidiltio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
 - Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
 - Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
 - 30 - Ácido 1-(3-(bencidiltio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

- Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4 dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 5 - Ácido 7-(2-aminoetilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 10 - Ácido 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 6-fluoro-7-(4-metilpiperacin-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 15 - Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 20 - Ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(carboxamida de BSA)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- Ácido 1-[3-(2-acetamida de HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 25 - Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico
- 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- 30 - 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.

- 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 5 - 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- Ácido 7-[2-(acetamida de BSA)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 10 - 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- 6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 15 - 6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- Ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5,-triazin-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico
- 20 o sus sales, isómeros o solvatos,

20. Uso de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la obtención de anticuerpos contra antibióticos del tipo quinolona.

25

21. Uso según la reivindicación 20 donde el antibiótico se selecciona entre marbofloxacino, enrofloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, sarafloxacino, ácido oxolínico, flumequina, ofloxacino, danofloxacino o difloxacino.

30

22. Procedimiento de obtención de anticuerpos contra antibióticos del tipo quinolonas que comprende:

- 5 a) activación de un soporte inmunogénico utilizando un compuesto de unión bifuncional,
b) conjugación del soporte inmunogénico activado en (a) con un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19,
c) inmunización de un animal no humano con el conjugado obtenido en (b),
d) extracción de los anticuerpos generados en (c).
- 10 23. Procedimiento según la reivindicación 22 donde el soporte inmunogénico se selecciona entre seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, concanavalina A, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de cangrejo herradura, hemocianina de lapa ojo de cerradura.
- 15 24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 donde la activación del soporte inmunogénico se realiza haciéndolo reaccionar con ésteres de succinimido o carbodiimidas.
- 20 25. Anticuerpo obtenible por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24.
- 25 26. Uso de los anticuerpos según la reivindicación 25 para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en una muestra biológica aislada.
- 30 27. Uso de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 como inmunoreactivo secundario para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en una muestra biológica aislada.
28. Uso según la reivindicación 26 ó 27 donde la muestra biológica procede de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario.

29. Uso según la reivindicación 28 donde el producto de origen animal es leche.
30. Kit para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona que comprende al menos un anticuerpo según la reivindicación 25 o un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
31. Uso del kit de detección según la reivindicación 30 para la determinación y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en productos alimentarios de origen animal.

3.6. Aportaciones más relevantes.

Se ha conseguido desarrollar inmunoreactivos con un amplio reconocimiento de diferentes congéneres de la familia de antibióticos de tipo QN, así como una técnica inmunoquímica en formato de microplaca, robusta y fiable desde el punto de vista analítico, que permite determinar estos antibióticos a concentraciones muy bajas. En el momento de realizar este trabajo, era la primera vez que se desarrollaban inmunoreactivos para QNs con estas características. Este resultado ha sido fruto de una investigación racional, y en base a ello a continuación se describen las aportaciones más relevantes de esta tesis doctoral en lo referido al objetivo abordado en este capítulo son las siguientes:

- Se ha demostrado que la metodología de síntesis de derivados de QN utilizando la reacción de Goubs-Jacobs es robusta y versátil, permitiendo la síntesis de numerosos derivados para su utilización como haptenos. En este sentido cabe destacar que la nucleofilia del grupo amino del compuesto **2** no es muy elevada, siendo necesario la utilización de compuestos de reactividad elevada para que esta reacción tenga lugar. De la misma forma la presencia de un átomo de flúor en la reacción de sustitución electrófila en el anillo aromático aumenta la reactividad de la posición deseada respecto a la del átomo de cloro, evitándose de esta manera la formación del regioisómero correspondiente a la reacción sobre la posición 6.
- La detectabilidad del ensayo desarrollado se muestra notablemente afectada por el pH del medio de competencia debido al carácter zwitteriónico de las QNs. Este efecto ocurre en diferente grado dependiendo de los valores de pK_a de la QN y abre la posibilidad de modular la selectividad del ensayo mediante la variación de dicho parámetro.
- De la misma manera, y debido a que las QNs son capaces de complejar cationes divalentes, la presencia de iones Ca^{2+} en el medio de competencia aumenta la detectabilidad del ensayo y disminuye las diferencias en cuanto a reconocimiento se refiere entre los diferentes congéneres de la familia de las QNs.

Queda patente que la aplicación del criterio químico, complementado con el uso de herramientas de modelización molecular, constituye una combinación excelente para el diseño racional de haptenos de inmunización para la obtención de anticuerpos con selectividad dirigida. De esta manera se ha conseguido una respuesta inmune selectiva en los conejos inoculados con el hapteno de inmunización sintetizado, obteniéndose unos anticuerpos capaces de reconocer eficazmente a las QNs más importantes utilizadas en el ámbito veterinario, con una detectabilidad muy por debajo de los LMRs establecidos por la UE para diferentes matrices de origen animal. El efecto del pH y de la adición de Ca^{2+} en el ensayo corroboran la gran contribución del sistema β -cetoácido en el fenómeno de reconocimiento de los anticuerpos generados, demostrando a su vez que el diseño de haptenos ha sido efectivo.

Anexo I. Parte experimental adicional complementaria y tabla con la estructura química de los diferentes compuestos sintetizados.

En esta sección se describe la parte experimental adicional complementaria, ya que por razones de novedad y actividad inventiva, tres haptenos de competición no se incluyeron como ejemplos dentro de la patente anterior (**Sección 3.5**). A su vez se incluye una tabla con la estructura química de los diferentes intermedios y haptenos sintetizados en la tesis, así como la correspondencia entre la numeración presentada en la tesis, en las **publicaciones II, IV y V (Sección 3.4, Sección 4.4 y Sección 5.4)** y en la **publicación III (Sección 3.5)**.

A continuación de muestra la metodología de obtención y la caracterización por resonancia magnética de los haptenos no incluidos como ejemplos en la patente anterior.

Usando la metodología de obtención de los haptenos de tipo Ic1 anteriormente descrita en la **Sección 3.5**, utilizando la correspondiente 4-oxo-1,4-dihidroquinolina, se prepararon las siguientes 7-amino-4-oxo-1,4-dihidroquinolinas:

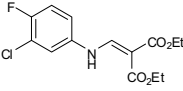
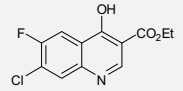
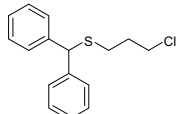
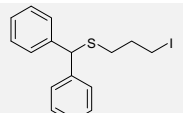
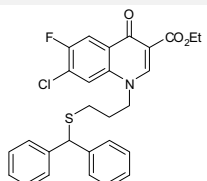
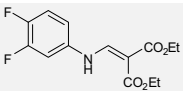
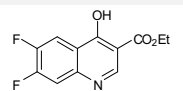
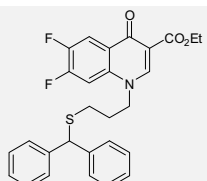
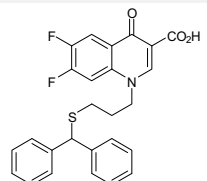
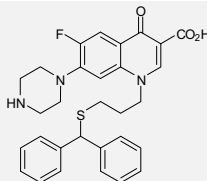
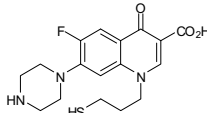
Ácido 6-fluoro-4-oxo-7-(1-piperanzil)-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (19, 65 % de rendimiento). RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 1.00 (3 H, t, J=7.32 Hz) 2.03 (2 H, h, J=7.50 Hz) 3.61 - 3.70 (4 H, m) 3.81 - 3.90 (4 H, m) 4.66 (2 H, t, J=7.32 Hz) 7.34 (1 H, d, J=6.59 Hz) 8.19 (1 H, d, J=12.44 Hz) 9.15 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm: 10.63 (1 C, s) 23.49 (1 C, s) 46.04 (2 C, s) 47.73 (2 C, d, J=5.98 Hz) 60.76 (1 C, s) 104.89 (1 C, s) 106.67 (1 C, d, J=3.42 Hz) 113.56 (1 C, d, J=25.65 Hz) 117.79 (1 C, d, J=10.26 Hz) 140.78 (1 C, s) 149.81 (1 C, d, J=10.69 Hz) 150.49 (1 C, s) 156.78 (1 C, d, J=258.59 Hz) 171.70 (1 C, s) 172.13 (1 C, d, J=4.27 Hz).

Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-(4-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (23, 70 % de rendimiento). RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 1.25 (2 H, q, J=6.77, 3.11 Hz) 1.51 (2 H, q, J=6.95, 5.85 Hz) 3.61 (4 H, s) 3.90 (1 H, s) 4.07 (4 H, s) 7.70 (1 H, d, J=6.95 Hz) 8.06 (1 H, d, J=12.81 Hz) 9.11 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm: 9.08 (2 C, s) 39.89 (1 C, s) 50.97 (2 C, d, J=6.41 Hz) 67.84 (2 C, s) 104.45 (1 C, s) 106.22 (1 C, d, J=3.85 Hz) 113.22 (1 C, d, J=26.07 Hz) 116.20 (1 C, d, J=10.26 Hz) 142.99 (1 C, s) 150.45 (1 C, d, J=7.27 Hz) 150.42 (1 C, s) 156.86 (1 C, d, J=259.02 Hz) 171.94 (1 C, d, J=4.27 Hz) 171.96 (1 C, s).

Usando la metodología de obtención de los haptenos de tipo Ic2 anteriormente descrita en la **Sección 3.5**, utilizando correspondiente piperazinil fluoroquinolona (ciprofloxacino), se preparo la siguiente metilpiperazinil fluoroquinolona:

Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-(4-metil-1-piperazinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (24, Rendimiento cuantitativo), RMN ¹H (TFAd) δ ppm: 1.23 (2 H, q, J=6.95, 6.22 Hz) 1.49 (2 H, q, J=7.14, 6.77 Hz) 3.00 (3 H, s) 3.30 - 3.39 (2 H, m) 3.52 (2 H, t, J=12.53 Hz) 3.73 (2 H, d, J=12.44 Hz) 3.92 (1 H, ddd, J=10.84, 7.09, 4.21 Hz) 4.05 (2 H, d, J=13.72 Hz) 7.74 (1 H, d, J=6.95 Hz) 8.09 (1 H, d, J=12.44 Hz) 9.13 (1 H, s); RMN ¹³C (TFAd) δ ppm: 9.14 (2 C, s) 40.15 (1 C, s) 45.22 (2 C, s) 48.12 (2 C, d, J=6.41 Hz) 55.77 (1 C, s) 104.93 (1 C, s) 107.62 (1 C, d, J=2.99 Hz) 113.43 (1 C, d, J=25.65 Hz) 117.32 (1 C, d, J=10.26 Hz) 142.71 (1 C, s) 149.36 (1 C, d, J=10.26 Hz) 150.77 (1 C, s) 156.89 (1 C, d, J=258.59 Hz) 171.71 (1 C, s) 172.51 (1 C, d, J=3.85 Hz).

Tabla 3.6. Estructura química de los diferentes intermedios y haptenos sintetizados en esta tesis y correspondencia entre la numeración presentada en la tesis, en las **publicaciones II y IV y V (Sección 3.4, Sección 4.4 y Sección 5.4)** y en la **publicación III (Sección 3.5)**.

Producto	Nº tesis	Nº Publicaciones II, IV, V	Nº Publicación III
	1	---	IIa
	2	1	IIIa
	3	---	IVa
	4	---	Va
	5	4	I2
	6	---	IIb
	7	2	IIIb
	8	5	I3
	9	8	I6
	10	16	I12
	11	18	I15

Capítulo 3

Tabla 3.6. Continuación.

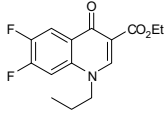
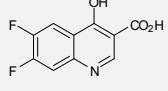
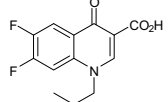
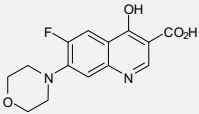
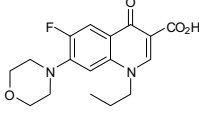
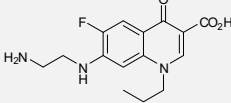
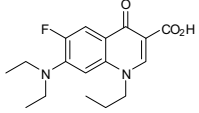
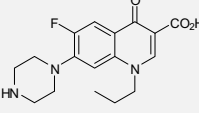
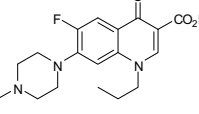
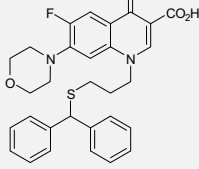
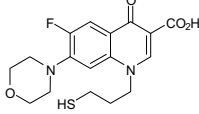
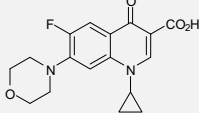
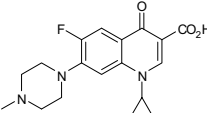
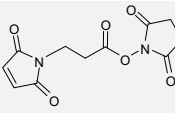
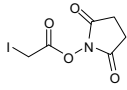
Producto	Nº tesis	Nº Publicaciones II, IV, V	Nº Publicación III
	12	3	I1
	13	6	I4
	14	7	I5
	15	9	I7
	16	10	I8
	17	11	I9
	18	12	I10
	19	13	---
	20	14	I13
	21	15	I11
	22	17	I14
	23	---	---

Tabla 3.6. Continuación.

Producto	Nº tesis	Nº Publicaciones II, IV, V	Nº Publicación III
	24	---	---
	25	N-SPM	VIa
	26	N-SIA	VIb

Capítulo 4

Establecimiento de un método analítico
basado en ELISA para la determinación de
quinolonas en leche bovina

En el siguiente capítulo se describe el establecimiento de un método analítico basado en el ELISA desarrollado en el **Capítulo 3** para la determinación de QNs en leche bovina. El trabajo ha sido realizado en estrecha colaboración con la Dra. Fátima Fernandez. El capítulo está estructurado partiendo de una introducción sobre la leche, la problemática específica asociada al contenido de antibióticos en dicha matriz, la legislación y el control del contenido de antibióticos en leche, así como los diferentes ensayos inmunoquímicos para la detección de QNs en dicha matriz. Posteriormente se discuten los resultados obtenidos, incluyéndose una publicación (**Sección 4.4**) que contiene los principales resultados obtenidos durante desarrollo y la caracterización del método analítico establecido. El capítulo finaliza con las principales aportaciones de esta tesis doctoral en lo referente al establecimiento del método analítico basado en el ELISA desarrollado en el capítulo anterior.

4.1. Introducción

4.1.1. LECHE COMO PRODUCTO ALIMENTICIO

La leche es un producto alimenticio de primera necesidad con incuestionable valor nutricional no solo para los niños, sino también para adultos y ancianos, aportando numerosos beneficios para la salud [193]. Es un líquido fisiológico complejo que proporciona simultáneamente nutrientes y componentes bioactivos, incluyendo vitaminas liposolubles (A, D y E) e hidrosolubles (B1, B2 o riboflavina, B5 o ácido pantoténico y B12), proteínas (caseínas y seroproteínas), péptidos bioactivos, oligosacáridos (lactosa), ácidos grasos (saturados e insaturados) y sales minerales (calcio, fósforo, magnesio zinc y selenio) [194, 195]. Se la considera una de las principales fuentes de calcio y una excelente fuente de aminoácidos esenciales para la nutrición humana [196]. Además el contenido proteico de la leche es de elevada calidad según el método de puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad (PDCAAS, Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) [197].

Los beneficios para la salud de los productos lácteos son el resultado de componentes biológicamente activos presentes en la leche y también en los productos lácteos fermentados o agrios, debido a sus actividades adecuadamente moduladas producidas por la acción de bacterias probióticas. Además de la modificación de varios componentes de la leche, los probióticos pueden actuar también directamente como agentes preventivos o en la terapia de algunas enfermedades contagiosas, atópicas, tumorales u otras enfermedades graves [198, 199]. El efecto promotor de la salud de los productos lácteos fermentados se materializa directamente a través de la interacción con los microorganismos consumidos (efecto probiótico) o indirectamente, como resultado de la acción de los metabolitos microbianos generados durante el proceso de fermentación (efecto biogénico).

Se estima que en el mundo 363 millones de vacas y búfalas se emplean para producir leche en unas 122 millones de granjas [200]. La producción mundial anual estimada es de 644 millones de toneladas, de las cuales el 84 % (541 millones de toneladas) provienen de vaca. En este sentido, los mayores productores de leche de vaca son la UE (142 millones de toneladas), Norteamérica (91 millones de toneladas), India (46 millones de toneladas), Rusia (32 millones de toneladas) y Brasil (25 millones de toneladas) [201]. Así mismo, la UE es el mayor exportador de productos lácteos con un 32 % de todas las ventas en base equivalente de leche (en términos de volumen total de leche cruda necesaria para la producción de todos

los productos lácteos comercializados) [201]. El consumo per cápita es mayor en los países desarrollados (>150 kg/cápita/año) aunque la demanda en países en desarrollo está aumentando debido al incremento de ingresos, el aumento demográfico, la urbanización y el cambio en la dieta [202].

Por otro lado, la leche es un producto alimenticio perecedero y necesita de un procesamiento para evitar su rápido deterioro. El enfriamiento extiende la vida útil de la leche varios días, mientras que tratamientos térmicos como la ultrapasteurización (UHT) la extiende a meses, reduciendo a su vez la presencia de patógenos a niveles que no presentan riesgo significativo para la salud. La leche también es procesada para convertirse en una gran variedad de productos lácteos de alto valor añadido como son el queso, la mantequilla y el yogurt entre otros (véase **Figura 4.1**).

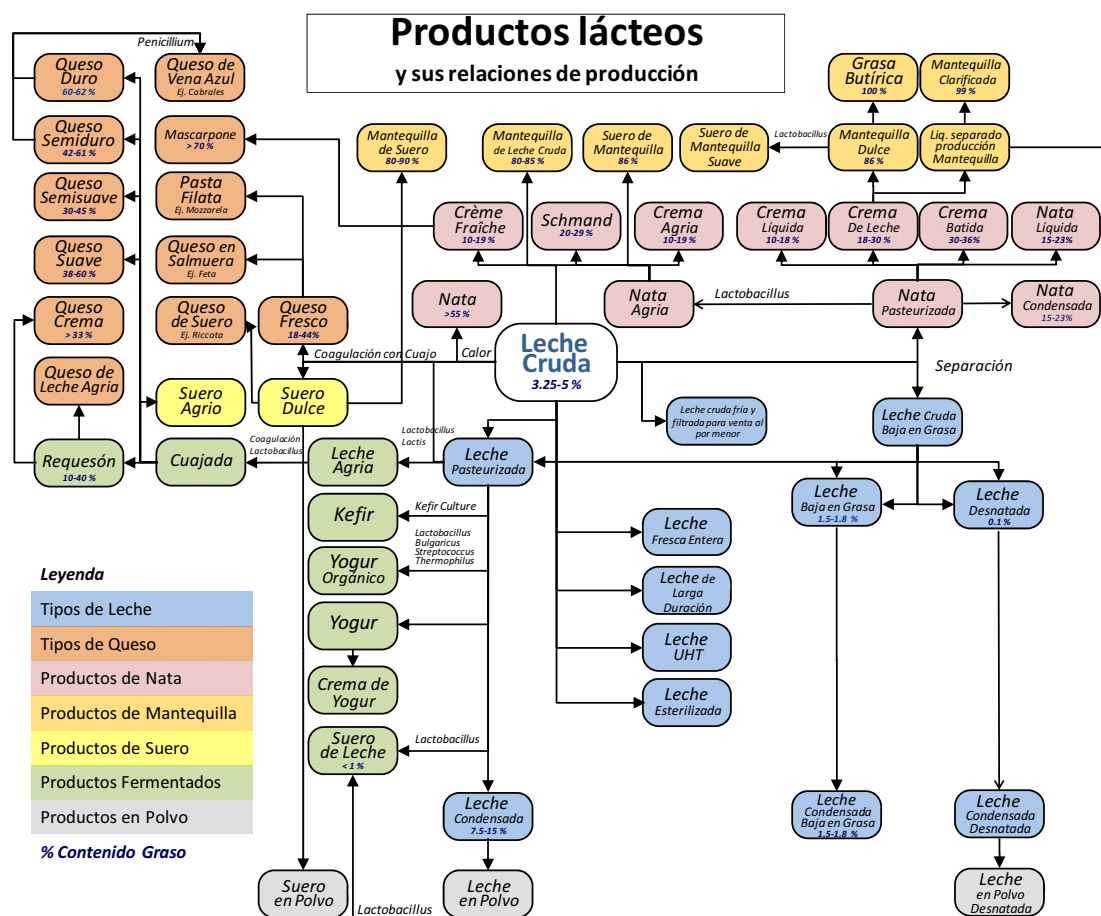


Figura 4.1. Diferentes productos lácteos y sus relaciones durante la producción (figura extraída y modificada de la página web http://en.wikipedia.org/wiki/Dairy_product).

4.1.2. PROBLEMÁTICA ASOCIADA AL CONTENIDO DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE

Como ya se ha explicado en la introducción general de la tesis (véase **Capítulo 1, Sección 1.4**), la presencia de antibióticos en alimentos tiene un impacto en la salud principalmente a través del aumento de la resistencia bacteriana, posibles reacciones alérgicas en consumidores hipersensibles y el impacto en la flora intestinal humana [203, 204]. Asimismo el uso de antibióticos en explotaciones ganaderas permite que este tipo de residuos pasen al

medioambiente a través de la alimentación animal y los residuos orgánicos animales sin un control adecuado [205-207].

Además de todo lo expuesto y desde un punto de vista tecnológico, cuando la leche contaminada con antibióticos se destina a la fabricación de productos lácteos fermentados puede provocar graves consecuencias tecnológicas, causando una disminución en la calidad de los productos finales y por lo tanto, repercutiendo en pérdidas económicas para la industria láctea [208]. Como consecuencia de la presencia de estos residuos, los procesos de fermentación durante la fabricación de queso, yogur u otros lácteos fermentados pueden ser parcial o totalmente inhibidos, ya que las bacterias utilizadas generalmente son sensibles a dichos antibióticos (en mayor o menor medida dependiendo del antibiótico y del tipo de bacteria). Esto provoca un retraso en la acidificación y una deficiente coagulación, generando texturas desiguales y cuerpos pastosos. De la misma manera inducen sabores anormales y a su vez pueden reducir la intensidad del sabor particularmente en quesos de leche cruda [43]. También se puede facilitar la selección de cepas resistentes indeseables en los productos finales [209]. Por otra parte, cabe destacar que el proceso de pasteurización no elimina completamente los antibióticos [210] y la ingesta de leche o productos lácteos que contengan estos compuestos, puede causar las reacciones adversas anteriormente mencionadas. A su vez, los antibióticos pueden inhibir el desarrollo de bacterias que pudiesen estar contaminando la leche, enmascarando la presencia de dichas bacterias cuando se realiza el análisis bacteriológico. De esta manera dicha leche o producto lácteo, potencialmente peligroso, puede ser comercializado pudiéndose desarrollar los patógenos una vez el efecto inhibidor del antibiótico se haya disipado.

4.1.3. LEGISLACIÓN Y CONTROL DEL CONTENIDO DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE

Toda la problemática asociada a la presencia de residuos de antibióticos en leche expuesta anteriormente, hace que esta sea uno de los alimentos más vigilados en cuanto al análisis de este tipo de residuos se refiere. Como ya se ha mencionado en la introducción general de la tesis (véase **Capítulo 1, Sección 1.5**), la CE a través de la Directiva 96/23/CE, ha establecido la obligatoriedad de detectar la presencia de fármacos veterinarios y otro tipo de sustancias (pesticidas, micotoxinas, etc.) en todos los productos de origen animal destinados al consumo humano, estableciendo unos LMRs para este tipo de compuestos a través del Reglamento (CE) Nº 470/2009 que deroga el Reglamento (CEE) Nº 2377/90. A su vez, a través de la Decisión 2002/657/CE, se establecen los requerimientos a cumplir por los métodos analíticos utilizados para la detección de estas sustancias por parte de los laboratorios veterinarios y de salud pública. En España, el Real Decreto 1728/2007 especifica la normativa básica para el control lácteo y el Real Decreto 217/2004 regula la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores involucrados en el sector lácteo, así como establece un registro de los movimientos de leche cruda de vaca. A partir del Real Decreto 217/2004, se creó el módulo de trazabilidad de la “base de datos letra Q” (Leche TRAzabilidad, Quality), que es un registro informático en el que se registran todos los movimientos producidos entre contenedores desde que la leche cruda de vaca sale de la explotación productora hasta que llega a un centro de transformación. Esto permite la gestión homogénea de las muestras de leche cruda de vaca, de los controles obligatorios y su asociación al movimiento, así como la gestión de las muestras oficiales. La **Figura 4.2** representa el esquema de las diferentes

etapas implicadas en el sistema de gestión para asegurar la trazabilidad de la leche cruda de vaca, expuesto en el Real Decreto 217/2004.

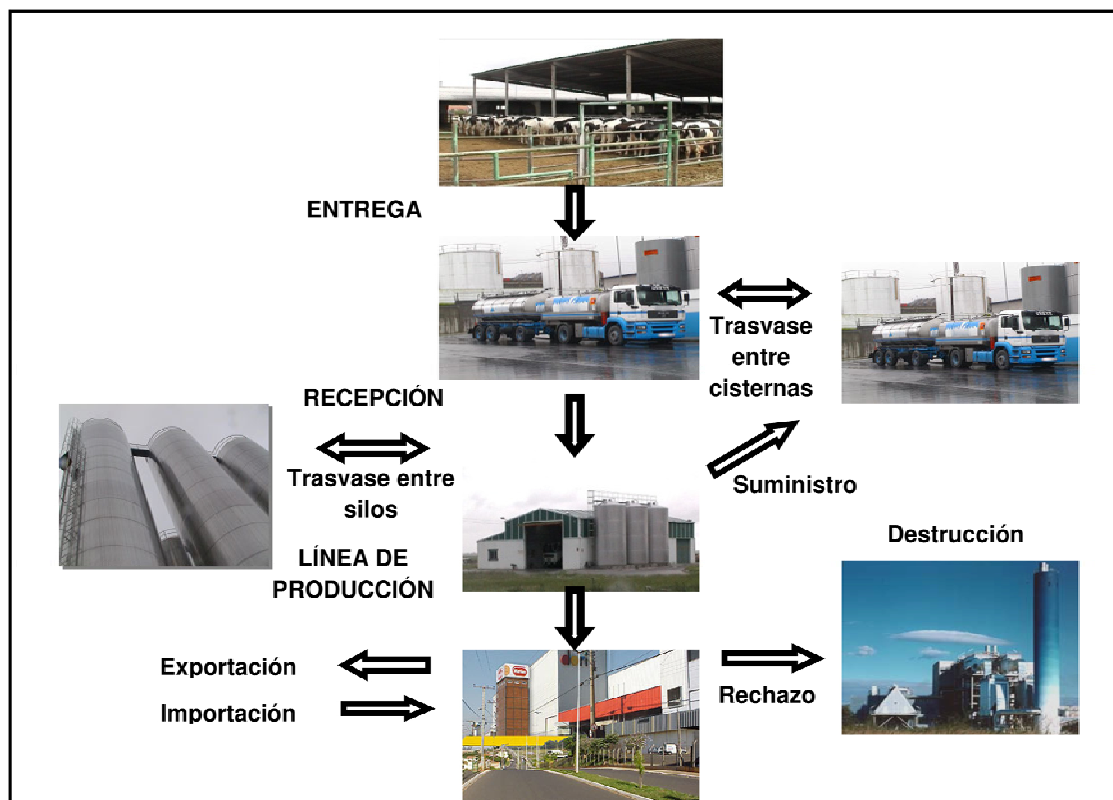


Figura 4.2. Esquema de las diferentes etapas implicadas en el sistema de gestión de la trazabilidad de la leche cruda de vaca.

EL Real Decreto 1728/2007 establece la obligatoriedad de la realización de controles tanto en la explotación como en la central lechera, tomando muestras para el análisis de antibióticos (entre otros parámetros) en un laboratorio de análisis acreditado, siendo obligatoria una prueba de detección *in situ* en ambos casos. En la **Figura 4.3** se muestra un esquema de las diferentes etapas de control para la detección de antibióticos en leche [211], que fundamentalmente se diferencian dos etapas. Una primera de control primario de cribado y confirmación preliminar, que se realiza generalmente utilizando métodos cualitativos microbiológicos o específicos (enzimáticos, de unión a receptores, etc.) y cuya principal finalidad consiste en establecer la presencia o ausencia de residuos de antibióticos por encima de los LMRs. Posteriormente, la segunda etapa de confirmación y cuantificación, tiene como objeto la identificación inequívoca de la presencia de dichos residuos y la determinación de la cantidad exacta de residuo presente en la muestra. En este sentido, las técnicas inmunoquímicas son muy apropiadas para la primera etapa de control, ya sean en formato de ELISA, que permite el cribado de un elevado número de muestras en poco tiempo y a bajo coste, o bien en formato de inmunosensor o tira reactiva, que permite el análisis de muestra *in situ* de una manera rápida y barata.

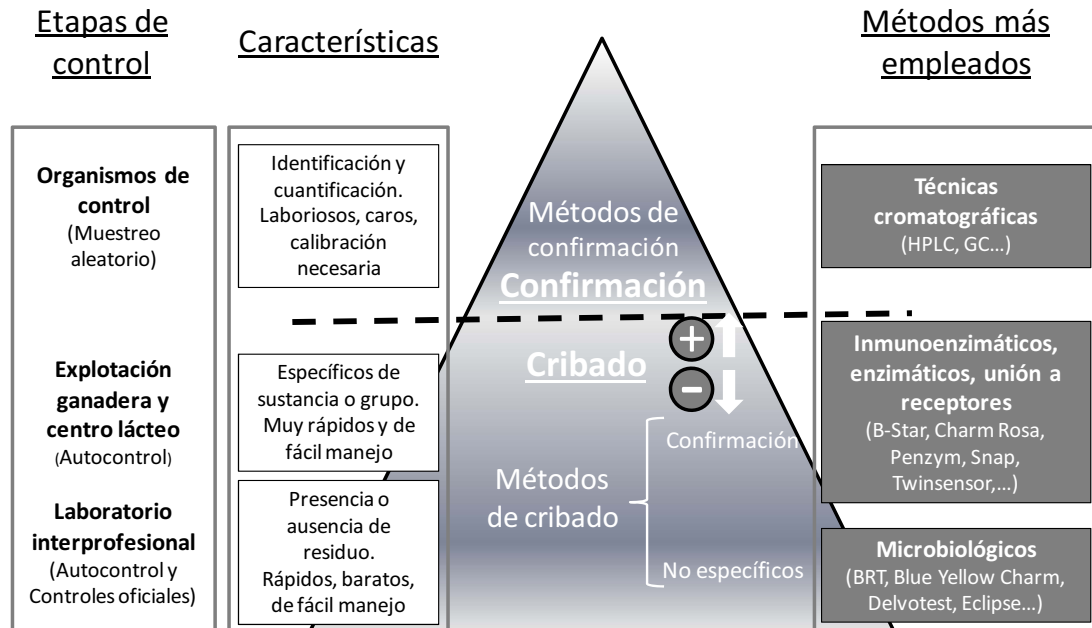


Figura 4.3. Etapas de control, clasificación y características de los métodos de detección de antibióticos en leche.

4.1.4. DIFERENTES ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS EN LECHE PARA QUINOLONAS

La detección de antibióticos en leche de vaca utilizando técnicas inmunoquímicas tiene su inicio a principios de la década de los 90 [212] demostrándose en ese entonces que las detectabilidades obtenidas eran equivalentes a las técnicas cromatográficas.

En el caso concreto de la determinación de QNs, se han descrito varios trabajos para la detección inmunoquímica de este tipo de antibióticos en leche, la mayoría publicados con posterioridad al comienzo de esta tesis. El tratamiento de muestra consiste generalmente en la eliminación de la grasa mediante centrifugación, seguida de una dilución, habitualmente 1/10, en el tampón de competencia [130, 134, 135, 158, 213-215]. En algún caso se describe la precipitación utilizando ácido tricloroacético [142] o nitroprusiato sódico en conjunción con sulfato de zinc, seguido de una dilución del sobrenadante en el tampón de competencia [119, 133]. La especificidad y detectabilidad de cada ensayo viene fijada por el anticuerpo empleado, estando en la mayoría de los casos enfocados, tal como ya se ha comentado en capítulos previos, a la detección de uno o pocos congéneres de la familia de QNs. Por lo general los porcentajes de recuperación son buenos, alcanzando límites de detección inferiores a los LMRs establecidos por la UE.

Más en concreto, al comienzo de esta tesis solamente había descritos cinco inmunoensayos para la detección de QNs, de los cuales solamente cuatro habían sido aplicados en leche [125, 157-159] y a su vez tres de ellos solamente podían reconocer una sola o muy pocas QNs. Recientemente, y con posterioridad al trabajo realizado en esta tesis doctoral, varios autores han desarrollado inmunoensayos para la detección genérica de QNs en leche [118, 133-135, 189, 216], aunque a pesar de lograr buenas detectabilidades en todos casos son incapaces de detectar FLUME, una de las QNs prescritas para el tratamiento de infecciones en ganado vacuno y que a su vez está regulada por la UE en leche. Con excepción de Suryoprabowo et al. [135] a su vez es necesario el tratamiento previo de la muestra mediante la adición de

agentes precipitantes, centrifugación o extracción y a su vez los tiempos de análisis por lo general son superiores a las 3 h, lo que presenta una desventaja cuando el objetivo es el cribado de un número elevado de muestras. Con base a estos antecedentes se plantearon los objetivos descritos en la siguiente sección (véase **Sección 4.2**).

4.2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo que se describe en este capítulo fue el de implementar el ELISA desarrollado y descrito en el **Capítulo 3**, al análisis de residuos de antibióticos en leche procedente de ganado vacuno. Dada la complejidad de esta matriz, nuestra prioridad era mantener las excepcionales características analíticas de este ensayo sin que la preparación de la muestra complicara el procedimiento analítico. Para ello se abordaron los siguientes objetivos concretos:

- Evaluación del efecto matriz causado por la leche sobre el ensayo e investigación de las estrategias oportunas para eliminar o minimizar dicho efecto.
- Caracterización analítica del procedimiento inmunoquímico en leche, evaluando parámetros como la reproducibilidad, exactitud, precisión y especificidad del ensayo, y demostración su utilidad mediante el análisis de muestras de leche fortificadas con varias familias de antibióticos

4.3. Resultados y discusión

El principal objetivo de la presente tesis doctoral es la determinación de QNs en leche. Para ello y en una primera aproximación, se procedió a la implementación de la técnica inmunoquímica ELISA al análisis de leche, y a la evaluación de la técnica en esta matriz. Se acotó el estudio a la leche procedente de ganado vacuno, ya que es la de mayor consumo a nivel mundial.

4.3.1. FORMATO INDIRECTO

4.3.1.1. Efecto matriz provocado por la leche

El termino efecto matriz en química analítica es definido por la IUPAC como el efecto combinado de todos los componentes de la muestra diferentes al analito en la cuantificación de uno o varios analitos concretos [217]. Si un componente específico puede ser identificado como causante de un efecto se le denomina interferencia. Concretamente, la leche es una matriz biológica de gran complejidad, compuesta por miles de compuestos incluyendo un elevado contenido de grasa, proteínas, carbohidratos y minerales [218], y puede afectar al fenómeno de reconocimiento del analito por el anticuerpo. Generalmente se cree que el efecto matriz de la leche es debido principalmente al contenido graso y proteico, sin embargo, las características y propiedades del analito también pueden tener un papel crucial en la respuesta de la técnica analítica

Partiendo de estas premisas, se evaluó el efecto matriz provocado por la leche mediante la preparación de curvas de calibrado de CPFx en leche sin diluir y diluida sucesivas veces en tampón PBST, procediéndose a la comparación de dichas curvas con la generada en el tampón de referencia (PBST). Se escogieron tres tipos diferentes de leche de distinta procedencia y contenido graso, todas ellas adquiridas en un supermercado local. Como se

puede observar en la **Figura 4.4A**, **Figura 4.4B** y **Figura 4.4C** el efecto matriz ejercido por la leche sobre el ensayo era complejo, consistiendo en una disminución de la absorbancia máxima a diluciones inferiores a 1/10 y un aumento general de la pendiente del ensayo.

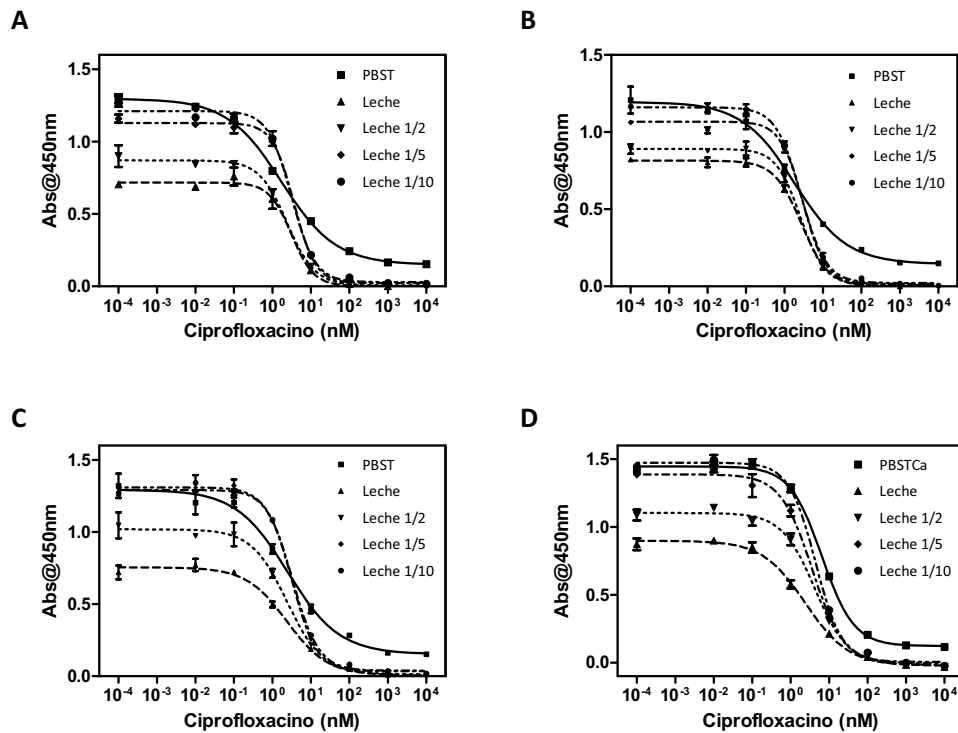


Figura 4.4. Efecto matriz ejercido por la leche sobre el ELISA indirecto para QNs. **A.** Leche fresca marca Letona. **B.** Leche ecológica marca El Corte Inglés. **C.** Leche desnatada Pascual. **D.** Leche fresca marca Letona utilizando PBSTCa como tampón para la dilución. Los resultados aquí representados corresponden a curvas de calibración preparadas en leche y medidas en el ELISA con un mínimo de 2 réplicas para cada concentración.

La disminución de la absorbancia máxima debido a un efecto de la matriz es muy habitual en los inmunoensayos y frecuentemente es eliminado por simple dilución [114, 219, 220]. Para el caso de la leche, también es común observar una disminución del ruido de fondo, no en vano se suele usar leche o alguno de sus componentes en etapas de bloqueo para evitar adsorciones inespecíficas en el inmunoensayo [221, 222]. Sin embargo, en el presente caso la pendiente del ensayo también se veía afectada, por lo que difícilmente una simple dilución de la leche podría llegar a igualar la curva generada en tampón PBST. Dicho aumento en la pendiente del ensayo ya fue observado al introducir calcio en el tampón de competencia (véase **Capítulo. 3, Sección 3.3.5.2**). Así pues, el efecto matriz observado parece consistir en la suma de varios efectos, por un lado la disminución de la absorbancia (máxima y mínima) probablemente debido a priori al contenido proteico de la leche, y por otra parte el aumento de la pendiente del ensayo muy probablemente sería debido a la presencia de calcio. Por otra parte y al contrario de lo esperado, el contenido graso apenas afectaba al ensayo, tal como se desprende del hecho que todas las leches se comporten de forma similar, independiente de si es leche entera, semidesnatada o desnatada.

En base a estos resultados y a los estudios que previamente habíamos realizado incorporando calcio al tampón del ensayo, se procedió a realizar los mismos experimentos pero diluyendo la leche en PBSTCa, con el objetivo de igualar el efecto matriz ejercido por el

calcio. Como se puede observar en la **Figura 4.4D**, el uso de PBSTCa consiguió mejorar sustancialmente la respuesta igualando las pendientes. Parámetros como el rango dinámico, la pendiente y la IC_{50} eran muy similares en PBSTCa y en leche diluida 10 veces. Si bien la cuantificación con una curva generada en PBSTCa proporciona resultados aceptables para fines de cribado, se decidió estudiar en profundidad el tratamiento previo de la muestra con el objetivo de mantener la detectabilidad del ensayo sin perjuicio de la simplicidad del mismo.

4.3.1.2. Pretratamiento de la leche

A pesar de los resultados obtenidos, de forma simultánea se estudiaron diferentes tratamientos de la muestra para evaluar los beneficios entre la ganancia en detectabilidad frente al aumento de la laboriosidad y el tiempo de análisis. Para ello se procedió a la desproteización de la leche utilizando varios métodos. Se escogió la leche fresca para optimizar el proceso, ya que era esta la que mayor efecto ejercía sobre el ensayo.

En una primera aproximación se optó por un método de desproteización muy común en la literatura, el tratamiento de la leche con ácido tricloroacético (TCA) [142, 223]. La adición de 10 mg/mL de TCA a la leche fue suficiente para una completa separación de la fase proteica del suero. El pH del suero resultante (en torno a 2) se neutralizaba con 1 M NaOH para ajustar el pH a 7.5 y se diluía en medio tamponado. En este caso el efecto matriz tampoco fue eliminado totalmente, observándose a la par una pérdida de reproducibilidad del ensayo (véase **Figura 4.5A**).

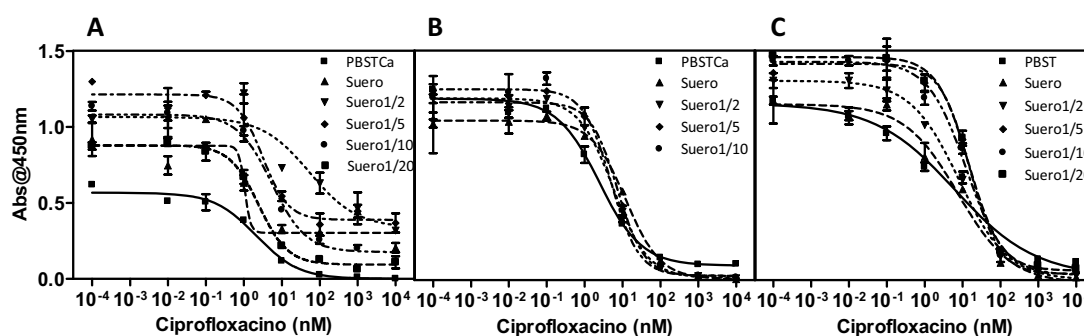


Figura 4.5. Efecto matriz observado tras el tratamiento de la leche con diferentes métodos de desproteización. **A.** Ácido tricloroacético. **B.** Sulfato amónico. **C.** Tampón Mc Ilvine.

En un segundo intento se añadieron sales inorgánicas, como son el cloruro potásico y sulfato amónico, para aumentar la fuerza iónica del medio, forzando de esta forma la precipitación de las proteínas. Para el caso del cloruro potásico, se añadieron diferentes cantidades a la leche hasta una concentración de 300 mg/mL y en ningún caso se observó una separación efectiva entre la fase proteica y el suero. A dicha concentración, la conductividad de la leche era superior a 300 mS/cm, por lo que decidimos abandonar esta aproximación. Si bien previamente habíamos estudiado la tolerancia que este ensayo tenía frente a medios con distinta conductividad (véase **Figura 3.16B**, página 115), demostrándose que el ensayo era robusto entre 10 y 50 mS/cm, nunca llegamos a evaluar valores de conductividad tan elevados. En el caso del sulfato amónico se observó que a una concentración de 175 mg/mL en leche, producía una buena separación de la fracción proteica, siendo la conductividad del suero resultante de 150 mS/cm, inferior a la obtenida con cloruro potásico. Así pues, tras una

centrifugación previa, se prepararon curvas de calibrado utilizando el suero obtenido y diluido varias veces en PBSTCa y se compararon con la curva generada en tampón PBSTCa. Como se puede observar en la **Figura 4.5B**, el efecto matriz disminuyó considerablemente, pero no fue eliminado por completo. En este caso, aunque la disminución en la absorbancia máxima se había corregido, las curvas presentaban valores de IC₅₀ superiores al de la curva preparada en tampón.

Por último se estudió el efecto del tampón de Mc Ilvaine, consistente en 0.08M Na₂HPO₄, 0.06 M ácido cítrico y 0.01 M Na₂EDTA a pH 3.5. Como se puede observar en la **Figura 4.5C** en este caso tampoco logró eliminarse el efecto matriz, más bien al contrario, en este caso se observaba un inesperado incremento de la señal del ensayo, que además aumentaba con la dilución, por lo que cada vez era más diferente a la curva de referencia preparada en el tampón del ensayo. De la misma forma se realizaron pruebas de adición de diferentes disolventes orgánicos (acetato de etilo y tolueno) y tampoco se obtuvo una separación efectiva entre el suero y la fase proteica.

4.3.1.3. Utilización de leche certificada como referencia

Finalmente se decidió estudiar la posibilidad de preparar las curva de calibrado en la propia leche. Utilizando diferentes tipos de leche de diferentes marcas libres de QNs, suministradas por AESAN, se prepararon curvas en dichas muestras diluidas 10 veces en agua, con el fin de evaluar el efecto matriz a esa dilución para los distintos tipos de leche. Como muestra las **Figura 4.6A** y **Figura 4.6B** la variabilidad cuando se trata de leche entera o semidesnatada es mínima, mientras que se observa un ligero aumento de la absorbancia máxima para algunas marcas de leche desnatada.

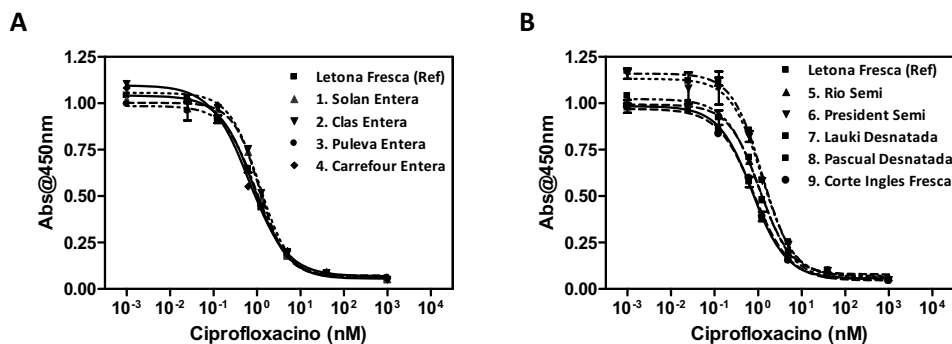


Figura 4.6. Comparativa entre curvas de calibración preparadas usando leche diluida 10 veces de diferentes tipos y marcas de leche. **A.** Diferentes marcas de leche entera. **B.** Diferentes marcas de leche desnatada y semidesnatada. Los datos corresponden a la media de al menos dos réplicas.

A la vista de todos los resultados anteriormente expuestos, se fijó como curva de referencia la generada utilizando leche Letona Fresca diluida 10 veces en agua (*Leche 1/10R*) para su posterior caracterización analítica mediante el estudio de parámetros tales como reproducibilidad, exactitud y precisión.

A su vez se realizó el estudio del efecto matriz para diluciones superiores a 10 mediante la preparación de curvas de calibrado utilizando leche diluida 10, 50, 75, 100 250 y 500 veces con agua. En estas condiciones, se pudo comprobar que existía un efecto matriz que aumentaba con la dilución (véase **Figura 4.7A**). Hasta el momento actual no hemos podido

encontrar una explicación para este hecho, pero una posible hipótesis podría estar relacionada con una variación en la estructura micelar de la leche y que ésta variara con la dilución. A si pues se realizó el mismo experimento, pero esta vez diluyendo la leche en *Leche 1/10R*, y como sepuede observar en la **Figura 4.7B** el efecto matriz era prácticamente inapreciable. Gracias a la colaboración mantenida con AESAN, que nos permitía tener acceso a leche de referencia (certificada como negativa en QNs) decidimos continuar nuestros estudios con este procedimiento, cabe recordar que alternativamente, el ensayo se podría realizar simplemente, utilizando PBSTCa como referencia y diluyendo las muestras con este tampón, puesto que tal como se ha demostrado anteriormente (véase **Figura 4.4,D**) el efecto matriz también queda completamente corregido utilizando esta estrategia.

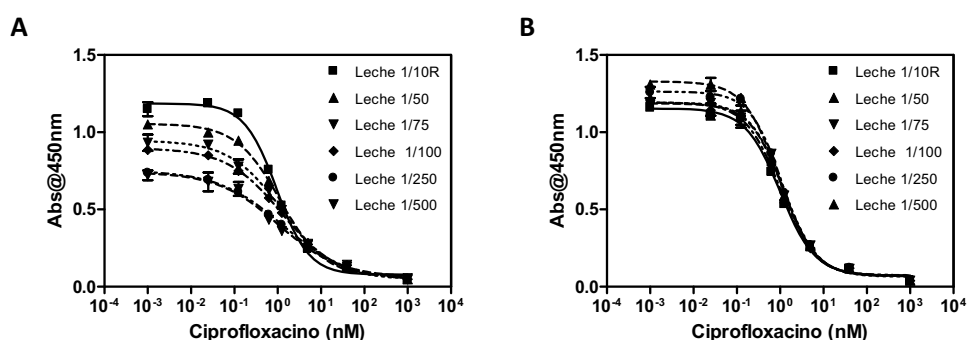


Figura 4.7. A. Efecto matriz de la leche sobre el ELISA indirecto para diluciones superiores a 50 veces diluyendo la leche con agua. B. Para minimizar este efecto se realizaron las diluciones de la leche con *Leche 1/10R*, observándose que este efecto quedaba minimizado.

4.3.1.4. Caracterización del método analítico para la detección de quinolonas en leche

4.3.1.4.1. Reproducibilidad, exactitud y precisión del método

En lo que se refiere a la *reproducibilidad*, se evaluó la variabilidad de los parámetros característicos de las curvas de calibrado generadas en *Leche 1/10R*. Así pues, se compararon la absorbancia máxima, la absorbancia mínima, la pendiente, la IC_{50} , el límite de detección, rango lineal de trabajo y la R^2 del ajuste con la ecuación logística de cuatro parámetros habitualmente empleada (véase **Fórmula 3.2**, página 97), de 18 curvas generadas en diferentes días y con al menos dos réplicas por curva y se calculó el coeficiente de variación (CV) para cada uno de dichos parámetros.

Tal y como se muestra en la **Tabla 4.1**, el coeficiente de variación es casi siempre inferior al 15 % excepto para los valores de absorbancia máxima y para el límite de detección. La variación en la absorbancia máxima no es un dato que sorprenda al tratarse de ensayos bioquímicos altamente dependientes de factores ambientales (temperatura de los tampones, del laboratorio, etc), es por este motivo que cada ensayo se calibra independientemente. La variación en la IC_{90} se encuentra relacionada con el hecho de que es justamente en los extremos de la curva sigmoideal donde tiene lugar la mayor variabilidad, por este motivo se suele utilizar el intervalo comprendido entre las IC_{80} y la IC_{20} para cuantificar. Aun así un coeficiente de variación del 18% en esta zona de la curva puede considerarse aceptable [224].

La detectabilidad del ensayo se mantiene por debajo del LMR para el CPFX a pesar de la dilución realizada, con una IC_{50} de $3,25 \pm 0,30 \mu\text{g/L}$ en leche ($0,325 \pm 0,030 \mu\text{g/L}$ en *Leche 1/10R*) y un LOD de $0,440 \pm 0,08 \mu\text{g/L}$ ($0,044 \pm 0,008 \mu\text{g/L}$ en *Leche 1/10R*).

Tabla 4.1. Parámetros del ensayo indirecto en *Leche 1/10R* y coeficiente de varianza para cada uno de ellos utilizando ciprofloxacino como analito^a.

	Media \pm Desv.estand.	%CV (n=18)
Abs _{max}	1,09 \pm 0,39	35,81
Abs _{min}	0,054 \pm 0,007	12,96
Abs _{max} /Abs _{min}	14,61 \pm 1,48	10,11
Pendiente	-1,15 \pm 0,08	7,14
IC ₅₀ ^b	0,33 \pm 0,03	9,37
LOD ^b	0,044 \pm 0,008	17,80
Rango lineal ^b	0,092 \pm 0,011 - 1,13 \pm 0,11	11,94, 9,64
R ²	0,997 \pm 0,002	0,15

^a Valores de IC_{50} y de desviación estándar correspondientes a la media de 18 ensayos realizados en 7 días diferentes con al menos dos réplicas para cada concentración. ^b expresado en $\mu\text{g/L}$.

A la hora de evaluar la *exactitud* del método, se prepararon siete muestras ciegas de leche fortificadas con CPFX a concentración conocida a niveles por encima y por debajo del LMR permitido por la UE. Dichas muestras fueron diluidas 10 veces en agua y posteriormente 1/50 y 1/500 con *Leche 1/10R* con el fin de obtener concentraciones dentro del rango lineal de la curva de calibrado. Una vez estas muestras fueron medidas con el ELISA indirecto, se procedió a confrontar las concentraciones obtenidas con las concentraciones a las que cada muestra había sido fortificada. Se obtuvo una elevada correlación, como demuestra el ajuste lineal, con una pendiente 0.965 (la correlación total corresponde a una pendiente de 1) y un R² de 0.997 para dicho ajuste (véase **Figura 4.8A**).

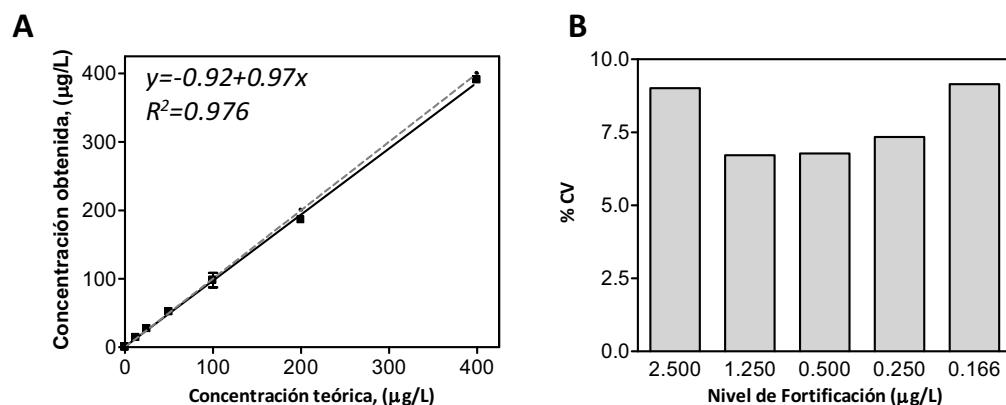


Figura 4.8. A. Correlación entre la concentración teórica de las muestras ciegas de ciprofloxacino y los valores de concentración obtenidos por ELISA en leche. La línea punteada corresponde a una correlación perfecta (pendiente=1). Cada punto corresponde a la media y la desviación estándar de 2 experimentos, realizados en 2 días diferentes, en los que se analizaban cada día 3 réplicas de cada muestra. **B.** Coeficiente de varianza obtenido a partir de la medición de las muestras fortificadas a diferentes niveles de concentración con el formato indirecto.

Con objeto de evaluar la *precisión* del método, se prepararon muestras fortificadas con CPFX a cinco niveles diferentes de concentración en *Leche 1/10R*, dentro del rango lineal de trabajo

de la curva de calibrado. Para cada nivel de concentración se prepararon siete muestras diferentes (un total de 35 muestras). Dichas muestras se analizaron por triplicado mediante ELISA y se evaluó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración para $n=7$. Como se puede observar en la **Figura 4.8B**, en ningún caso el coeficiente de variación fue superior al 10 %.

4.3.1.4.2. Especificidad del método

Para comprobar que el reconocimiento de los congéneres de la familia de las QNs no se veía alterado y la especificidad del anticuerpo se mantenía al realizar el ensayo en leche, se procedió a evaluar la reactividad cruzada de diferentes QNs. Para ello, se prepararon curvas de calibrado para cada una de ellas en *Leche 1/10R* y se midieron mediante el ELISA establecido. Como puede observar en la **Figura 4.9**, con todas las QNs es posible construir una curva de calibrado con un buen ajuste ($R^2 > 0.993$).

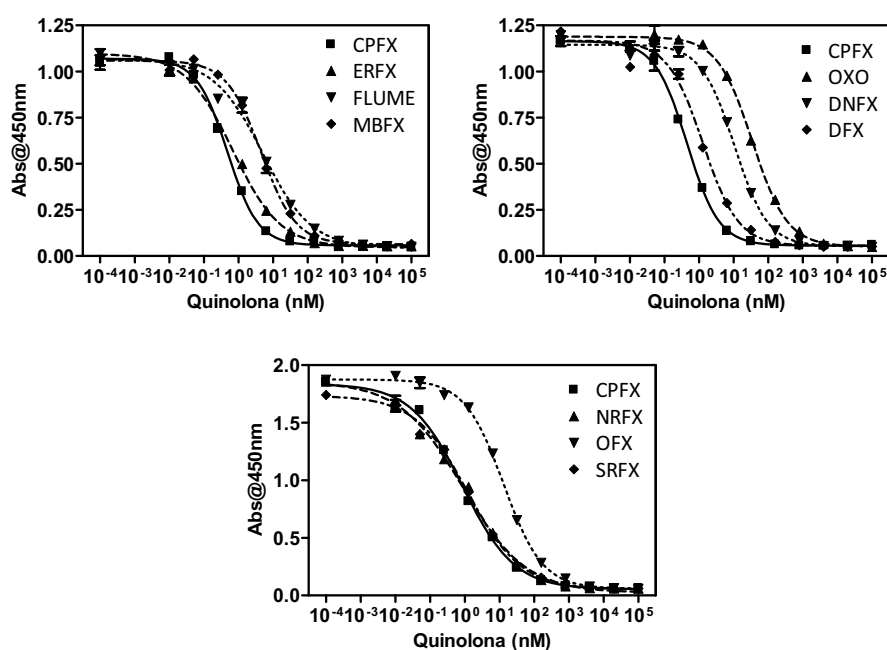


Figura 4.9. Curvas de calibrado preparadas en *Leche 1/10R* utilizando diferentes QNs.

La **Tabla 4.2** muestra los valores de IC_{50} y el porcentaje de reactividad cruzada respecto al CPFX en *Leche 1/10R* y en tampón PBSTCa. En general, el patrón de reactividad cruzada se mantiene, aunque los porcentajes de reactividad cruzada disminuyen ligeramente en leche. Esto es debido a que en general la IC_{50} disminuye o se mantiene constante cuando se realiza el ensayo en *Leche 1/10R* respecto a cuándo se realiza en PBSTCa excepto para el OFX, siendo esta disminución mayor en el caso del CPFX, lo que hace que los porcentajes de reactividad cruzada disminuyan para el resto, ya que se calculan en base al CPFX.

Tabla 4.2. Valores de IC₅₀ y reactividad cruzada de compuestos de la familia de las QNs utilizando el formato indirecto en *Leche 1/10R* y en tampón PBSTCa.

Compuesto	Leche 1/10R		PBSTCa	
	IC ₅₀ ^a	% RC ^b	IC ₅₀ ^a	% RC ^b
Ciprofloxacino	0.33	100	0.77	100
Enrofloxacin	0.50	71	0.65	127
Danofloxacino	7.45	5	7.31	11
Difloxacino	1.03	40	0.91	101
Marbofloxacino	3.29	11	4,30	19
Flumequina	2.41	11	3.91	15
Ácido Oxolínico	19.40	1	23,53	3
Norfloxacino	0.30	104	0.78	94
Sarafloxacino	0.55	69	0.96	93
Ofloxacino	5.36	7	1.84	45

Las curvas preparadas para cada uno de los congéneres de QN se midieron en ELISA. Cada concentración se midió en la microplaca por duplicado. ^a expresado en µg/L. El valor ha sido extraído como resultado del ajuste con la ecuación de 4 parámetros. ^b calculado utilizando IC₅₀ expresado en nM utilizando la fórmula: %RC = $\frac{IC_{50} \text{ ciprofloxacino}}{IC_{50} \text{ quinolona}} \times 100$

4.3.1.5. Establecimiento de un protocolo semicuantitativo de identificación de quinolonas

Debido a que el reconocimiento de los congéneres de la familia de las QNs era diferente, se plantearon una serie de experimentos con el objetivo de establecer un protocolo de análisis semicuantitativo en leche, mediante el cual se minimizase la obtención de falsos negativos y a su vez se obtuviese información acerca del tipo de QN responsable de la contaminación de la muestra. A su vez, los valores de LMRs son diferentes para cada una de ellas, estando algunas de ellas prohibidas en leche (OXO y el DFX) y para otras no existe legislación respecto a su contenido en dicha matriz (NRFx, SRFx y OFx).

A la hora de establecer dicho formato semicuantitativo de análisis, en lugar de preparar una curva en la cual interpolar los valores de absorbancia de las muestras, se incluyeron una serie de blancos y muestras control de diferentes QNs a una concentración correspondiente a su LMR (CTR-LMR), para comparar las muestras a analizar (desconocidas) con dichos controles. En el caso de las QNs prohibidas o sin legislar, y con el fin de no perder detectabilidad, se establecieron los controles a una concentración 10 veces superior a la IC₅₀ (10xIC₅₀, CTR-10xIC₅₀), para que al diluir la leche 10 veces la concentración resultante coincidiese con la IC₅₀.

Otro factor a tener en cuenta era el factor de dilución a aplicar a la muestra, ya que los valores de IC₅₀ estaban muy por debajo de los LMRs. En este sentido, fue necesario estimar las diluciones máxima y mínima permitidas para que los controles de cada QN estuviesen dentro del intervalo de cuantificación del ELISA una vez diluida la muestra. Por ello para cada QN se obtuvo el cociente entre la concentración de su control (CTR-LMR y CTR-10xIC₅₀) y la correspondiente IC₂₀ e IC₈₀ de las curvas generadas en el experimento de reactividad cruzada, estimando de esta manera la dilución máxima y mínima permitidas respectivamente (véase **Tabla 4.3**).

Capítulo 4

Tabla 4.3. IC₅₀ y LMR de cada QN empleada en el estudio, concentración fijada para las muestras control, diluciones máxima y mínima permitidas para que la concentración de la muestra control entre en el rango de trabajo tras ser diluida, dilución escogida para utilizar en el ensayo y concentración del control una vez diluido.

Compuesto	CPFX	ERFX	DFX	NRFX	SRFX	MBFX	FLU	OFX	DNFX	OXO
Grupo de reconocimiento	I	I	I	I	I	II	II	III	III	III
IC ₅₀ ^a	0,33	0,50	1,03	0,30	0,55	3,29	2,41	5,36	7,45	19,40
LMR ^a	100	100	P	NL	NL	75	50	NL	30	P
Concentración del control sin diluir ^a	100	100	10	5	5	75	50	50	30	50
IC ₈₀ ^a	0.05	0.03	0.08	0.01	0.04	0.30	0.11	0.70	0.62	1.68
Dilución máxima	1/2655	1/3607	1/125	1/428	1/122	1/247	1/457	1/71	1/49	1/30
IC ₂₀ ^a	2.08	2.13	2.56	3.45	5.52	8.46	11.23	27.54	16.67	45.50
Dilución mínima	1/48	1/47	1/4	1/1.5	1/1	1/9	1/4	1/2	1/2	1/1
Dilución elegida	1/500	1/500	1/10	1/10	1/10	1/50	1/50	1/10	1/10	1/10
Concentración del control diluido ^a	0.2	0.2	1	0.5	0.5	1.5	1	5	3	5

LMR: Limite máximo de residuo, **P:** Prohibido en leche, **NL:** No legislado en leche. ^a expresado en µg/L.

Para simplificar al máximo el procedimiento, y teniendo en cuenta las diluciones máxima y mínima permitidas anteriormente calculadas, se estableció que las muestras deberían diluirse a tres niveles (1/10, 1/50 y 1/500), asegurando de esta forma que por lo menos una de estas diluciones entraría en el rango de trabajo del ELISA. De esta manera, en base a los valores de la IC₅₀ obtenidos en los experimentos de reactividad cruzada en leche, a los MRLs de cada una de ellas en dicha matriz y fundamentalmente al factor de dilución al que había que someter al control establecido, se definieron tres grupos de QNs. En el Grupo I se encontrarían todas aquellas QNs reconocidas con valores de IC₅₀ ≤ 1 µg/L, con MRL establecido en leche y cuyo control habría que diluir 500 veces (el CPFX y el ERFX). En el Grupo II estarían aquellas QNs que eran reconocidas en el ELISA con valores de IC₅₀ en torno a 3 µg/L, con MRL establecido en leche y cuyo control habría que diluir 50 veces (la FLUME y el MBFX). Finalmente en el Grupo III estarían aquellas QNs menos reconocidas, con valores de IC₅₀ > 5 µg/L (el OXO, el DNFX y el OFX) y aquellas que aunque tuviesen una IC₅₀ cercana a 1 µg/L estuviesen prohibidas (DFX) o no hubiese legislación al respecto (NRFX y SRFX) en leche (véase **Tabla 4.3**).

En este sentido, el procesado de muestra consistió en diluir 10 veces en agua los controles, los blancos y las muestras, para posteriormente diluir las disoluciones resultantes 5 y 50 veces en Leche 1/10R (dilución final 50 y 500, respectivamente) para su ensayo mediante ELISA. De esta manera la dilución que sitúe la muestra en el rango de trabajo ELISA proporciona información, tanto sobre nivel de concentración como respecto del grupo al cual pertenecen las QNs que están contaminando la muestra.

Así pues, si el resultado de medir la muestra de leche por ELISA fuera positivo y tan solo se pudiera cuantificar con la dilución 1/500, caben dos posibilidades, que la muestra se encuentra contaminada con una QN del grupo I a una concentración cercana al LMR, o bien con una QN del grupo II o III, pero en este caso a una concentración elevada. Si la muestra se

podiera cuantificar con la dilución 1/50, esto apuntaría a que se tratara de QNs del grupo II, a niveles cercanos al LMR, o bien por QNs del grupo I a concentración baja o QNs del grupo III a concentración elevada. En el caso de que sea la dilución 1/10 la que entre en rango, correspondería a QNs del grupo III a concentraciones cercanas al LMR o del grupo I o II a concentraciones elevadas. La **Figura 4.10** representa el esquema del procedimiento y las diferentes posibilidades de interpretación de los resultados obtenidos.

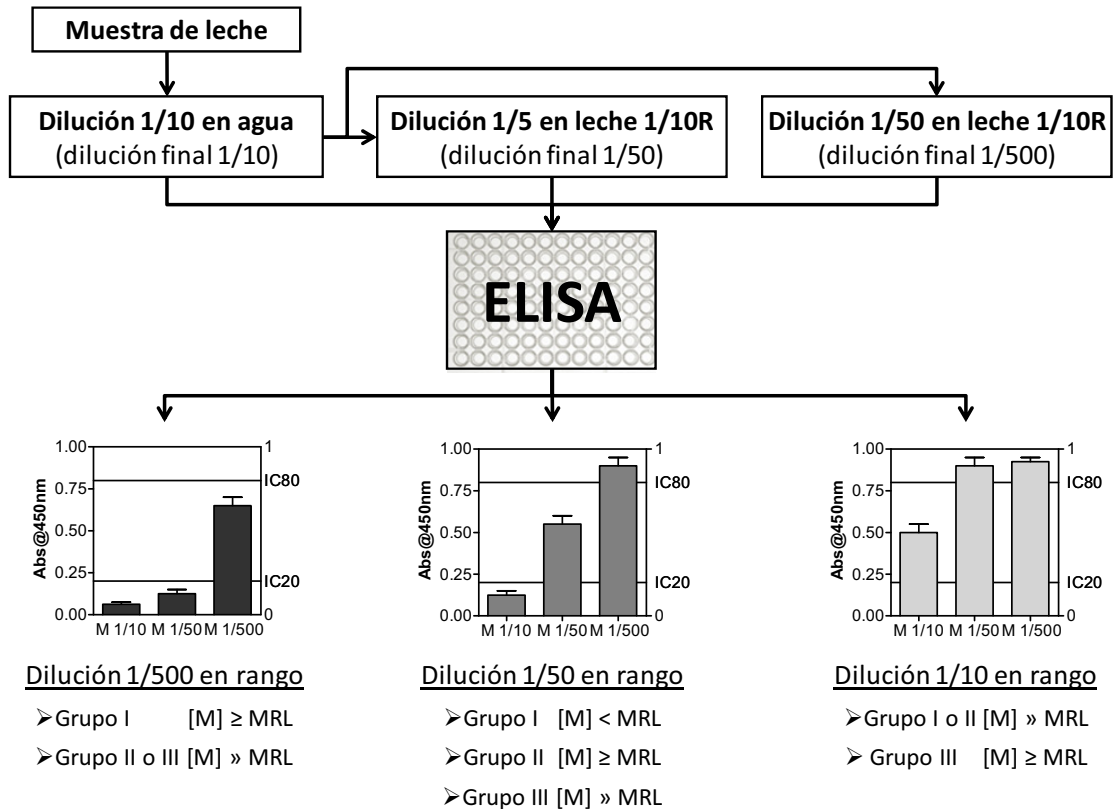


Figura 4.10. Esquema del procedimiento de análisis semicuantitativo de QNs en leche y las diferentes posibilidades de interpretación de los resultados. [M], concentración en leche.

En base a la hipótesis planteada, y con el fin de comprobar si de esta manera podíamos establecer un protocolo semicuantitativo en el que de alguna manera se pudiera también tener una información aproximada sobre que QNs podrían estar contaminando la muestra, se realizó un experimento piloto. Para ello una persona ajena al proyecto preparó 8 muestras ciegas fortificadas con diferentes QNs a distintos niveles de concentración. Estas muestras se diluyeron tal como se ha propuesto anteriormente y se midieron en una microplaca de ELISA en la que también estarían los controles CTR-10xIC₅₀ y CTR-LMR de las correspondientes QNs.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.11**, donde las líneas sólidas acotan el rango de trabajo del ensayo (IC₂₀ e IC₈₀) y las líneas punteadas muestran los valores de absorbancia de los controles para cada una de las QNs ensayadas.

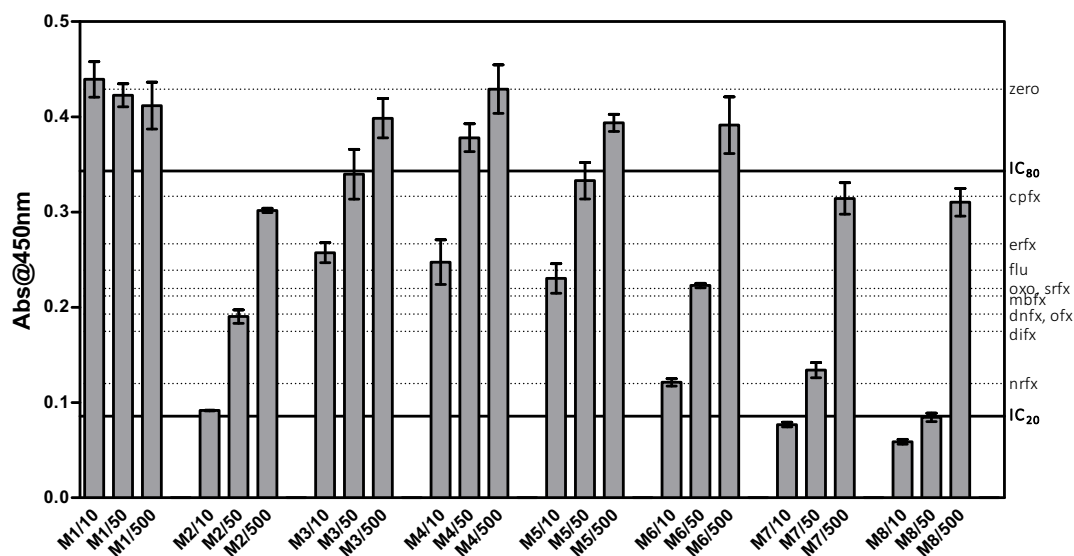


Figura 4.11. Análisis de las muestras ciegas preparadas en el grupo Nb4D. Cada barra corresponde a una dilución de la muestra (ej.: M1/10 corresponde a la muestra M1 diluida 10 veces). Las líneas sólidas indican el rango lineal de trabajo. Las líneas punteadas indican la señal proporcionada por los diferentes controles a concentración de LMR o 10xIC₅₀. Los datos corresponden a la media de tres réplicas.

En la **Tabla 4.4** se exponen las concentraciones a las que se habían fortificado las muestras y también los resultados obtenidos. Así las diluciones que proporcionaron resultados dentro del intervalo de cuantificación del ELISA permitían predecir a qué grupo pertenecería la QN que contaminaba la muestra.

Tabla 4.4. Muestras ciegas fortificadas con diferentes QNs. Valores de concentración y diluciones en rango.

Muestra	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Quinolona	---	MBFX	OXO	DFX	DNFX	FLU	ERFX	CPFX
Concentración ^a	---	112.5	33	2.5	19.8	75	66	100
Diluciones en rango	---	1/50, 1/500	1/10	1/10	1/10	1/10, 1/50	1/50	1/500

^a expresado en µg/L.

La muestra M1 se consideró negativa, ya que para ninguna dilución los valores de absorbancia entraron dentro del rango de trabajo, siendo superiores al valor de la IC₈₀. Las muestras M2, M7 y M8 se estimaron positivas, y debido a que la dilución 1/500 entró en rango se consideró que cabía la posibilidad de que la QN en cuestión perteneciese al grupo I a una concentración cercana al LMR (M7: ERFX 0.7xLMR; M8: CPFX a 1xLMR) o una QN del grupo II a una concentración superior al LMR (M2: MBFX a 1.5xLMR). Para las muestras M3 y M4, solamente la dilución 1/10 entró en rango, lo que a priori indica que eran muestras pertenecientes al grupo III (M3: OXO a 33 µg/L) o una QN de los grupos I o II a concentraciones bajas (M4: DFX a 2.5 µg/L). En el caso de las muestras M5 y M6 las diluciones 1/10 y 1/50 entraron en rango, indicando la presencia de QNs del grupo II (M6: FLUME a 1.5xLMR) o del grupo III (M5: DNFX a 0.7xLMR) en la muestra.

Considerando que los resultados habían sido satisfactorios se procedió a analizar otra serie de muestras fortificadas suministradas por Nestlé (Lausanne, Switzerland) en el marco del

proyecto GOODFOOD (G20, G21, G22, G23, G24 y G25). En la **Figura 4.12** se muestran los resultados obtenidos.

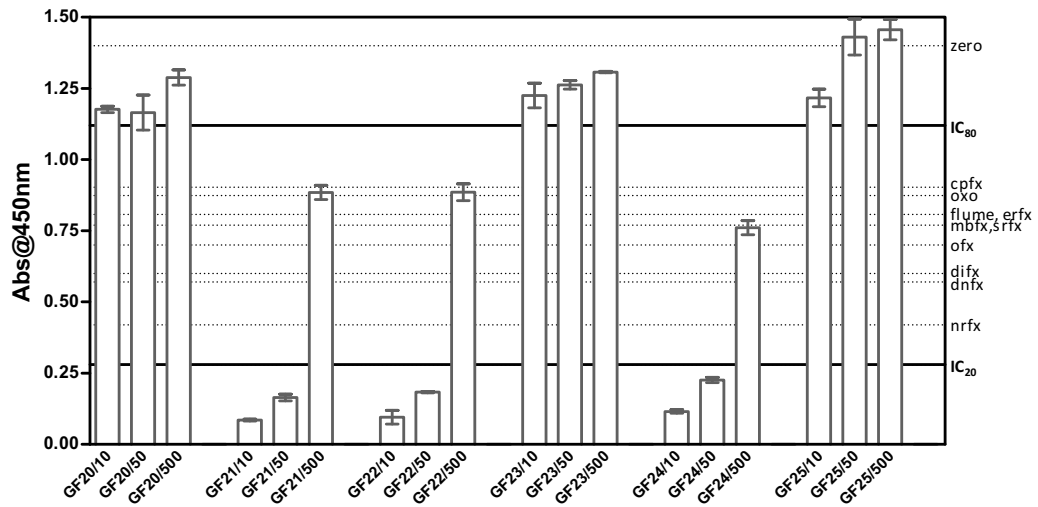


Figura 4.12. Análisis de las muestras ciegas preparadas por Nestlé. Cada barra corresponde a una dilución de la muestra (ej.: GF20/10 corresponde a la muestra GF20 diluida 10 veces). Las líneas sólidas indican el rango lineal de trabajo. Las líneas punteadas indican los diferentes controles a concentración de LMR o $10 \times IC_{50}$. Los datos corresponden a la media de tres réplicas.

En la **Tabla 4.5** vienen indicados el antibiótico causante de la contaminación y los valores de concentración para cada muestra, así como las diluciones que entraron en rango.

Las muestras G20, G23 y G25 fueron consideradas libres de QN, ya que ninguna de las diluciones entró dentro del rango de trabajo, presentando absorbancias superiores a la IC_{80} . En el caso de las muestras G21, G22 y G24 se consideraron positivas, ya que la dilución 1/500 entro en rango. En este caso se barajó la posibilidad de que dichas muestras hubiesen sido fortificadas con QNs del grupo I a valores cercanos al LMR o con QNs del grupo II o III a concentraciones elevadas.

Tabla 4.5. Muestras ciegas suministradas por Nestlé con diferentes antibióticos incluyendo QNs. Valores de concentración y diluciones en rango.

Muestra	GF20	GF21	GF22	GF23	GF24	GF25
Quinolona	---	CPFX	NRFX	---	ERFX	---
Concentración ^a		100	100		100	
Otros Antibióticos	---	---	SMZ, PENG	SPY	CEF	AMP
Concentración ^a			100, 4	100	50	4
Diluciones en rango	---	1/500	1/500	---	1/500	---

AMP(ampicilina), CEF(cefazolina), PENG(penicilina G), SMZ(sulfametazina), SPY(sulfapiridina). ^a expresado en $\mu\text{g/L}$.

A pesar de la presencia de otros antibióticos de familias diferentes a las QNs (muestras GF22, GF23, GF24 y GF25) los resultados concuerdan con el contenido real de las muestras, demostrando de esta manera la elevada selectividad del método desarrollado para la detección de QNs. Por otro lado, para los dos tipos de muestras (preparadas en Nb4D y en Nestlé) se identificaron las muestras libres de QN, no obteniéndose ningún falso positivo, característica muy importante a cumplir para el caso de técnicas aplicadas al rastreo masivo de muestras.

La principal limitación del método desarrollado consiste en la incapacidad de discriminar cual es la QN responsable de la contaminación, factor por otro lado intrínseco de las técnicas inmunoquímicas. De igual manera, la determinación de la conformidad de la muestra queda en suspenso hasta su análisis mediante técnicas de referencia, ya que en ELISA la misma señal puede ser generada por una QN de elevado reconocimiento a niveles inferiores al LMR, que por una QN de medio o bajo reconocimiento a concentraciones por encima de su correspondiente LMR. En cualquier caso, la presencia de QN es detectada, no generando falsos negativos, factor también muy importante a cumplir para el caso de técnicas aplicadas al rastreo masivo de muestras.

4.3.2. FORMATO DIRECTO

4.3.2.1. Efecto matriz provocado por la leche

Tal y como se realizó para el formato indirecto, también se evaluó el efecto matriz de la leche en el formato directo. En este caso y debido a la experiencia obtenida durante el desarrollo del formato indirecto, se diluyó la leche varias veces en PBSTCa y se prepararon las curvas en dichas diluciones y en el tampón de referencia. En la **Figura 4.13A** se puede observar que para este formato el efecto matriz es significativamente menor que para el caso del formato indirecto. En este caso consiste en una disminución de la absorbancia máxima para diluciones inferiores a 1/5, igualándose las curvas con la correspondiente al tampón a diluciones superiores a 1/5. No se observan cambios drásticos en las pendientes ni en la IC₅₀. También se comprobó el efecto matriz a diluciones superiores a 1/25, debido a lo observado en el formato indirecto. En este caso no existe tal efecto como se puede observar en la **Figura 4.13B** lo que permite realizar todas las diluciones en tampón PBSTCa.

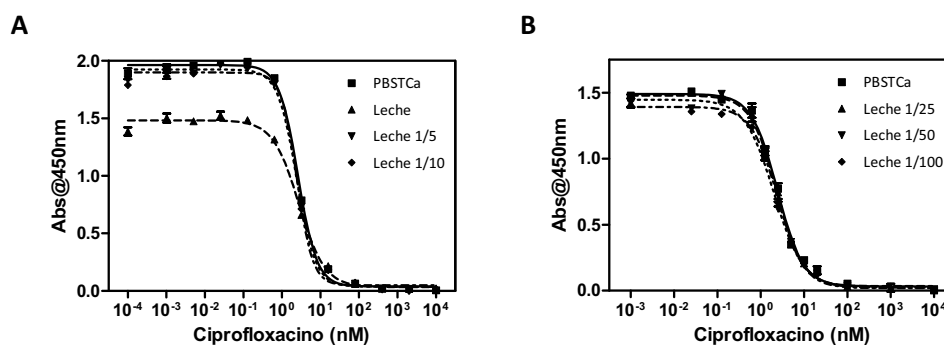


Figura 4.13. Efecto matriz de la leche sobre el ELISA directo para QNs. **A.** Diluciones de 1 a 10. **B.** Diluciones de 25 a 100.

Con el objetivo de comprobar que el efecto matriz observado era el mismo para leches de distinta procedencia, se prepararon curvas utilizando leche entera de diferentes marcas (suministradas por AESAN). En un primer experimento se diluyeron las leches 5 veces a la hora de construir la curva, y como se puede observar en la **Figura 4.14A**, si aparece un efecto matriz consistente en la disminución de la absorbancia máxima respecto al tampón PBSTCa.

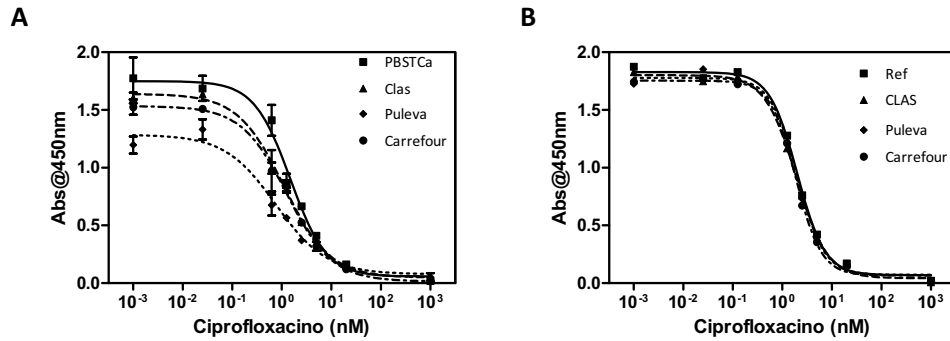


Figura 4.14. Comparativa entre curvas de calibración preparadas usando leche entera diluida de diferentes marcas. **A.** Leche diluida 5 veces. **B.** Leche diluida 10 veces.

Se decidió realizar el mismo experimento pero esta vez utilizando las mismas muestras diluidas 10 veces en tampón para preparar las curvas. Como se puede observar en la **Figura 4.14B**, para esta dilución el efecto matriz queda totalmente eliminado, lo que permite realizar el mismo tratamiento de muestra que en el formato indirecto utilizando tampón PBSTCa para preparar la curva de referencia.

4.4. Publicación IV: Análisis semi-cuantitativo para el cribado de residuos de quinolona en leche basado en un ELISA indirecto genérico

A continuación se presenta el manuscrito de una publicación que recoge los principales resultados obtenidos en este capítulo y que ha sido sometida para su evaluación a la revista *Food Control* de la editorial Elsevier. En dicha publicación se presenta el trabajo realizado para implementar el ELISA para QNs desarrollado a la determinación de estos antibióticos en leche de vaca, utilizando un formato competitivo de tipo indirecto. El método utiliza un anticuerpo genérico para QNs que en combinación una proteína haptenizada (17-BSA) como antígeno de tapizado, es capaz de detectar hasta 10 QNs con una elevada detectabilidad. Una simple dilución de la muestra (leche entera bovina) es suficiente para reducir considerablemente el efecto matriz. El método inmunoquímico desarrollado es sencillo y rápido, y permite analizar en poco tiempo un gran número de muestras por debajo de los LMRs para todos los congéneres de la familia de QNs ensayados (ej.: LOD CPFX = 0.4 µg/Kg en leche). Se comprobaron la exactitud y fiabilidad del método analizando muestras fortificadas y muestras ciegas suministradas por Nestlé. Los resultados fueron satisfactorios, lo que demuestra el potencial del ELISA para el análisis de antibióticos en el campo de la seguridad alimentaria.

**Semi-Quantitative analysis for the Screening of Residues of Quinolone
Antibiotics in Milk based on a generic indirect ELISA**

Daniel G. Pinacho[§], Fatima Fernández[§], Francisco Sánchez-Baeza and M.-Pilar Marco*

*Nanobiotechnology for Diagnostics Group (Nb4D), IQAC-CSIC & CIBER de Bioingeniería,
Biotemateriales y Nanomedicina, c/ Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain*

[§] The first two authors contributed equally to this work.

*To whom correspondence should be sent:

M.-Pilar Marco

Phone: 93 4006171

FAX: 93 2045904

E-mail: pilar.marco@iqac.csic.es

ABSTRACT

Quinolones (QNs) have proven to be the one of the antimicrobial agents most successful economically and clinically. At present, this family of antibiotics is widely used in clinical and veterinary medicine. One of the main drawbacks of their widely use, is that has led to the development of bacterial resistance and residue apparition in edible products, such milk. In this paper, an immunochemical method is presented for the quantification of Ciprofloxacin in bovine milk samples. The method was also applied for the semi-quantitative detection of nine QNs in milk, most of them employed in veterinary medicine and regulated by the EU Council Regulation no. 470/2009 in animal edible tissues and milk [1]. QNs studied in this work include Ciprofloxacin (CPFX), Enrofloxacin (ERFX), Danofloxacin (DNFX), Marbofloxacin (MBFX), Difloxacin (DFX), Oxolinic acid (OXO), Flumequine (FLU), Ofloxacin (OFX), Norfloxacin (NRFX) and Sarafloxacin (SRFX). A very simple sample treatment, dilution, was applied to milk for its subsequent analysis by an indirect ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay); allowing to process a high number of samples in a short time, reaching a limit of detection (LOD) highly satisfactory, far below of MRLs in all cases (e.g. 0,4 µg Kg-1 for CPFX in whole milk). The accuracy and reliability of the method have been successfully demonstrated by analyzing spiked and blind samples, indicating the great potential of the immunoassay for the analysis of QN antibiotics in the food quality and safety control areas.

Keywords: Quinolones, Milk, ELISA, Food safety.

1 1 Introduction

QN antibiotics are employed in veterinary as well as human medicine for the treatment of several infections, urinary, pulmonary and digestive. The extensive use and misuse in veterinary field, for disease prevention and improvement of animal productivity, raises a potential hazard due to residues may persist in edible tissues or foodstuffs, such as milk or eggs. On the other hand, the development of bacterial resistance may be also favored [2], [3]. In this sense, QN resistance has multiple mechanism and significant clinical impact, since mutation can occur quickly during therapy and this factor limits the use of these drugs. Their continue overuse in clinical medicine and agricultural feed can promote gram-positive and gram-negative resistance and is likely to limit the effectiveness of the QNs in the near future [4].

Milk is one of the most controlled food products in the world, paying particular attention in the presence of antibiotics [5]. Residues of antibiotics in milk can interfere in milk processes by inhibition of fermentation processes and also are a serious risk for the consumer (toxicity, allergy, antibiotic resistance) [6]. In this regard, farmers and all other agents involved in dairy industry have strong financial incentives to prevent milk contamination with antibiotics [5]. The use of antibiotics in animal production is regulated and maximum residue levels (MRLs) of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin have been established for countries of the European Union [7]. Directive 96/23/CE establishes procedures for inspection, dictating the frequency and number of substances that have to be monitored. In this context, immunochemical techniques like ELISA can offer important advantages as screening methods owing to their simplicity, high-throughput capabilities, short time, low cost and a broad spectrum coverage [8], [9].

For a complex matrix like milk, the sample treatment is one of the essential difficulties in the development of a multiresidue analytical method, mainly when analytes with different chemical properties are implied, in this case: acidic and zwitterionic QNs. Also QNs are able to form chelates with metal ions such aluminum, copper or calcium [10],[11]. This is an interest topic in the particular case of analysis of QNs the milk, which has a high content of calcium and previous ELISA studies prove the influence of calcium in QNs immunoassay [12].

Non immunochemical methods for QNs analysis in milk usually require complicated sample treatments like chemical protein precipitation following by cleanup steps as SPE (solid phase extraction) (see Table 1) [2,13-17]. All these methods are based in liquid chromatography coupled to different detection systems, and although highly accurate, are time consuming, expensive, and

generally not suitable for use as screening methodologies. In contrast, ELISAs have proven to be equal or better in terms of detectability to detect QNs in the same matrix without need of matrix cleanup steps [6,18-20] (see Table 1). But in these examples, the drawback is that only one QN detection is reported. Recently, Fan et al. [21] and Suryoprabowo et al. [22] have developed immunoassays for generic detection of QNs in milk, and although the sensitivity reached is good, in both cases they are not able to detect flumequine, one of the prescribed QNs for the treatment of infections in cattle and also regulated by UE in Milk. In this work multidetection of ten QNs in milk is proposed by the use of a broad specificity antibody previously generated in our research group [12]. The application of an indirect ELISA for CPFX quantification in milk samples is described, trying to simplify the sample treatment and reduce analysis time. Other parameters of the assay have been also studied. The method was applied to the semi-quantitative detection (positive-negative respect MRL level) of ten QNs (CPF_X, ERFX, FLU, MBFX, OXO, DNFX, DIFX, NRFX, OFX, SRF_X) basing in their antibody affinity and discriminating by high dilutions.

2 2 Material and methods

2.1 General methods and instruments

Polystyrene microtiter plates were purchased from Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK). Washing steps were developed on a SLY96 PW microplate washer (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). The shaking of the microtiter plates was realized by an agitator Titramax 1000, Heidolph (Germany). Absorbances were read at a single wavelength mode of 450 nm on a spectrophotometer SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The Absorbance dates were analyzed using the software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices) and GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The pH and the conductivity of all buffers and solutions were measured with a pHmeter pH 540 GLP and a conductimeter LF 340, respectively (WTW, Weilheim, Germany).

2.2 Chemicals and immunochemicals

Unless otherwise indicated chemicals and biochemicals were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The immunoreagents used in this study (antiserum As171 and coating antigen 11-BSA) as well as the QN hapten 11 were described elsewhere [12]. Ciprofloxacin was kindly provided by UQUIFA S.A (Lliça de Vall, Spain). The other QNs used for cross reactivity studies were acquired from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Stock solutions of different QNs (0.01 M) were prepared in 0.05 M NaOH solution and stored at 4 °C for one month.

2.3 Buffers and solutions

Phosphate-buffered saline, (PBS) is 0.01 M phosphate buffer on a 0.8% saline solution, pH 7.5. PBST is PBS with 0.05% Tween 20. PBST2 is 0,02 M PBS with 0,1% tween20, pH 7,5. Coating buffer is 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. Citrate buffer is 0.04 M of sodium citrate, pH 5.5. The substrate solution for optical measurements contains 0.01% TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and 0.004% H₂O₂ in citrate buffer. CaCl_{2(aq)} is 0.02 M of CaCl₂. All buffer and solutions were prepared with ultrapure water (UPW, D11971 Barnstead).

2.4 Milk Samples

Different brands of whole and skimmed bovine milks were purchased from a local supermarket and used for development of ELISA application in milk. These samples were previously analyzed by HPLC by AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria. The HPLC analysis was negative for CPF_X, ERF_X and SRF_X. On the other hand, Nestlé, an outstanding nutrition company, supplied whole blind bovine milk samples with different spiked content in QN, which were analyzed by ELISA.

2.5 Indirect immunoassay general protocol

Microtiter plates were coated with 11-BSA in coating buffer ($0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100\mu\text{L/well}$) at room temperature (RT) for 4 hours and covered with adhesive plate sealers. After that, the plate was washed automatically with PBST (four times, $300 \mu\text{L/well}$) and CPFX standards, $1000-0,025 \text{ nM}$, were prepared in $\text{CaCl}_{2\text{aq}}$ and added to the microtiter plates ($50 \mu\text{L/well}$), simultaneously a dilution of As 171 (1/32000) prepared in PBST2 was added ($50 \mu\text{L/well}$). After 30 min of incubation time at RT, the plates were washed again as before and a solution of anti IgG-HRP (1/6000 in PBST) was added ($100 \mu\text{L/well}$) and incubated for 30 min more at RT. The plates were washed again, and the substrate solution was added ($100 \mu\text{L/well}$). Color development was stopped after 30 min at RT with $2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ($50 \mu\text{L/well}$), and the absorbances were read at 450 nm. The standard curves were fitted to a four parameter equation according to the following formula: $Y = [(A - B)/1 - (x/C)D] + B$, where A is the maximal absorbance, B is the minimum absorbance, C is the concentration producing 50% of the maximal absorbance, and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve.

2.6 Matrix effect studies

Various types of bovine milk were collected from the supermarket and used to assess performance of the indirect ELISA method. Samples and different dilutions in UPW were used to prepare standard curves of CPFX. The sigmoidal curves obtained were compared with the curve prepared in the assay buffer.

2.7 Reproducibility of the assay

Variability of curve parameters as Abs_{max} , Abs_{min} , slope, IC_{50} (concentration producing 50% of the Abs_{max}), limit of detection, LOD (concentration producing 90% of the Abs_{max}), dynamic range (concentration range producing 20-80% of the Abs_{max}) or R^2 were analyzed from 18 calibration curves using at least two-well replicates in several different days. Variability inter-plate, intra-plate and intra-days were calculated by mean the variation coefficient (CV) according to the following formula: $\%CV = 100 \times M/SD$, where M is the average value and SD is the standard deviation.

2.8 Accuracy of the assay

Seven whole milk samples were spiked at different levels (0xMRL (blank), 0,12xMRL, 0,25xMRL, 0,5xMRL, 1xMRL, 2xMRL and 4xMRL). Before the analysis by ELISA samples were diluted 10 times in UPW. The resulting solution was diluted 5 times in milk1/10 (final dilution 1/50) and the resulting solution 10 times in milk1/10 (final dilution 1/500). The absorbances generated by the three dilutions were interpolated in CPFX curve in reference milk1/10.

2.9 Precision of the assay

Five different levels of CPFEX (at concentrations producing 20, 35, 50, 65 and 80% of Abs_{max} approximately) were evaluated by spiking seven samples of milk 1/10 for each level and analyzed them by ELISA in triplicate. The coefficient of variation, %CV, for $n=7$ was determinate for each level ($\%CV = 100 \times M/SD$, where M is the average found concentration and SD is the standard deviation).

2.10 Cross reactivity determination

Stock solutions were prepared in NaOH (0.05 M) at a concentration of 0.01 mM for 10 different QNs. Standard solutions were prepared for each analyte in milk 1/10 (0.01 nM - 100000 nM) and measured with the ELISA. For all QNs it was possible to build a standard curve that fitted to the four-parameter equation mentioned above. The cross-reactivity values were calculated according to the equation: $(IC_{50} \text{ CPFEX}/IC_{50} \text{ tested compounds}) \times 100$.

2.11 Semi-quantitative analysis of spiked milk samples

Whole bovine milk was spiked individually to MRL level for all QNs to build controls for semiquantitative analysis. QNs without established MRL (NRFX, OFX and SRFX) or banned in milk (DFX and OXO) were spiked to a level approximate to $IC_{50} \times 10$. Before analysis, controls for CPFEX and ERFX were diluted 500 times in milk 1/10, for FLU and MBFX were diluted 50 times in milk 1/10 and finally for OXO, DNFX, DFX, NRFX, OFX and SRFX were diluted 10 times in UPW. Unknown spiked milk samples were diluted at three different levels (1/10, 1/50 and 1/500) in order to cover the possible ranges of concentration of analytes. Blanks were prepared by diluting milk 10 times in UPW. Controls, blanks and unknowns samples were run by ELISA in triplicate. The absorbances generated by the unknown samples were compared with the ones generated by controls to discriminate positive or negative samples respect to MRL.

Different blind samples were analyzed: samples only spiked with QNs prepared in our laboratory (Nb4D samples) and spiked samples supplied by Nestlé (Nestlé samples); the last ones contained other antibiotics as well as QNs.

3 Results and discussion

3.1 Development of CPFEX analysis in milk by ELISA

Matrix effect studies. Milk is a very complex matrix formed by thousands of compounds with high contents of protein, fat, carbohydrates and minerals [23] and can adversely affect

to the immunoreaction. Due to this fact, matrix effect of whole milk was evaluated by running in ELISA standard curves of CPFX prepared in milk and milk diluted several times in UPW and compared them with the one built in PBST buffer. Matrix effect observed in ELISA consists in a decrease of maximum absorbance for curves prepared in milk or milk diluted less than 5 times and more than 75 times (see Figure 1). For curves diluted between 10 and 50 times, an important parallelism was found respect to the curve generated in buffer (see Figure 1). Parameters as dynamic range, slope and IC_{50} were very similar but the assay in buffer was less reproducible between days, supplying curve parameters with bigger variability (data not shown), and as consequence, inaccuracy in the quantification of milk samples spiked with CPFX was found. Due to this, milk 1/10 was chosen as a reference for further experiments.

In order to ensure the reproducibility of the assay, nine different milks (different brands and different fatty content), were diluted 10 times in UPW and used to build calibration curves. Figure 2 shows that different brands of fresh and whole milk reached almost equivalent calibration curves, whereas milks skimmed and semi skimmed reached higher Abs_{max} , demonstrating that fatty content of milk slightly affect to the assay.

On the other hand and due to the high sensibility of the assay for CPFX, for analysis of real samples around MRLs high dilutions are required to reach the dynamic range of the ELISA. In these sense, matrix effect of milk at high dilutions was evaluated by preparing curves in milk diluted in milk1/10 reference and comparing with the curve generated in milk 1/10 reference. As it can be seen in Figure 3a the matrix effect is eliminated, allowing to measure samples diluted at least 500 times.

Features of the ELISA of CPFX in milk. The parameters of the indirect ELISA carried out in milk1/10 are summarized in Table 2. Under these conditions the *reproducibility of the assay* was studied running 18 curves in several different days. The variability of the values presents a %CV lower than 12% in all cases except for LOD and the values of maximal and minimal signal (Abs_{max} and Abs_{min}). The variability of Abs is characteristic of biochemical assays, that are highly dependent on ambient factors, for this reason it is necessary an internal calibration for each plate. The value of LOD is related with the fact that the extremes of the calibration curve is where greater variability is found, and a value of 18 % can be considered acceptable in this area of the curve [24]. The LOD accomplished by the assay for CPFX in milk1/10 was $0,044 \pm 0,008 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,440 \mu\text{g Kg}^{-1}$ in undiluted milk)

and IC_{50} was $0,325 \pm 0,030 \mu\text{g L}^{-1}$ ($3,25 \mu\text{g Kg}^{-1}$ in undiluted milk), both values are far below the actual MRLs in milk established by the European Union, ($100 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

The *accuracy* of the assay for CPFX was evaluated by analyzing in triplicate 6 milk samples spiked in a range from 0,125xMRL to 4xMRL. The results shown in Figure 3b correspond to the correlation found between the measured and the spiked concentration values. As can be observed, measure values matched very well the spiked values, with a slope of 0.971, very close to 1 (perfect correlation) and a coefficient of correlation (R^2) of 0.987, indicating the good accuracy for the analysis of CPFX content in milk samples. In order to verify the *precision* in the quantification of CPFX, seven samples of equal concentration were prepared at 5 different levels spread in the dynamic range of the immunoassay (35 samples in all). The %CV was not higher than 9% for any level tested.

The *specificity* of the assay was evaluated by preparing calibration curves of nine QNs different to CPFX in milk 1/10 and ran in the ELISA. Figure 4 shows the calibrations curves and the parameters are summarized in Table 3. As expected, all QNs were recognized on a different extent, since the As171 was produced with broad spectrum recognition purposes [12]. Five QNs reached a %CR higher or equal at 40%. It is worth noting that ERFX presents a %CR of 71%, because of CPFX is the metabolite of ERFX and the established MRL in milk ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) is the sum of ERFX and CPFX. According to %CR values, the QNs were classified in three groups: high, medium and low recognition. CPFX, ERFX, DIFX, NREFX and SRFX were considered of high recognition (%CR=40-104); FLU and MBFX are medium recognition QNs (%CR=11%); finally, OXO, DNFX and OFX are low (or minor) recognition QNs (%CR=1-7%).

3.2 Semi quantitative analysis spiked milk sample

Whole bovine milk samples were spiked individually with studied QNs (see section 2.11). The necessary dilutions to reach the dynamic range were determined from calibration curves of each QN. Table 4 summarized the possible (or allowed) dilutions for the analytes respect to their spiked level to reach the dynamic range of the assay. In order to use only three dilutions for the analysis of real samples, controls were grouped in dilutions of 1/10, 1/50 and 1/500, and were placed in the microplate as references in order to compare with real samples. Low dilution (1/10) was chosen for the controls of banned QNs (OXO, DFX) and QNs without established MRL (NREFX, OFX and SRFX), despite some of the last are high recognition QNs (NREFX and SRFX).

Eight spiked samples prepared in our laboratory were diluted 10, 50 and 500 times (see section 2.11) and analyzed by ELISA. The results are shown in Figure 5a; the controls are indicated by

horizontal dotted lines, and solid lines represent the dynamic range of the assay. Table 5 indicates the spiked concentration of QN and which dilution is in range. The dilution in dynamic range gives information of the sample content. Therefore, if dilution 1/500 is in range, probably the analyte belongs to a high recognition QN group (as CPFEX or ERFEX) at concentrations near MRL, or a medium or low affinity QN with a very elevated concentration. If dilution 1/50 is in range, the medium recognition QNs (as FLU or MBFX) are the more probable, or high recognition QNs at concentration below MRL or low recognition QNs at high concentration. If 1/10 is the dilution in range, this can indicate that low affinity QNs are present in the sample at values near MRL or high affinity QNs at very lower concentrations.

The sample A1 was predicted as blank because all dilutions were out of range. For samples A2, A7 and A8, dilution 1/500 was in the range, indicating the possibility that high recognition QNs at values equal or lower than MRL (ERFEX<MRL in A7 and CPFEX=MRL in A8), or medium recognition QNs with values higher than MRL (MBFX>MRL in A2) were present in the sample. Only dilution 1/10 was in range for samples A3 y A4, indicating the possibility of presence of low recognition QN (OXO in A3) or high recognition QN at low concentrations (DFX<5ppb in A2). For samples A5 and A6, the dilution 1/10 and 1/50 were in range, indicating the possible presence of low or medium recognition QNs (DNFX<MRL in A5 and FLU>MRL in A6).

Same methodology and criteria were applied for the analysis of six samples supplied by Nestlé (GF20, GF21, GF22, GF23, GF24, and GF25). In Figure 6b and Table 5 are shown the results and the real content. Samples GF20, GF23 and GF25 were predicted as “free of QNs or blanks” because any dilution was in the dynamic range. For the three samples suspected of QN (CPFEX in GF21, NRFEX GF22 and ERFEX GF24) the only dilution in range was the 1/500, indicating the presence of high recognition QNs. It should be noted the concordance of the controls with the dilution 1/500 of samples GF21 and GF24, due to the concentration in the control was the same than the spiked level of the samples. This fact demonstrates the accuracy of the analysis although the quantification is not the principal aim in this part of the work. Despite of the presence of other antibiotics in some samples (GF22, GF23, GF24 and GF25), the predicted result for these samples agrees with the real content. This fact demonstrates the selectivity of the method.

As summary, for Nb4D and Nestlé samples without QNs, all the samples were predicted as blanks, false positives were not found. The limitation of the method is the incapability of distinguish which is the QN present in the sample, but this is inherent in immunoassays. In any case the presence of QN is detected, which is a very important factor for a screening technique (not false negatives were found).

4 Conclusions

An indirect ELISA for CPFX analysis in whole bovine milk samples has been developed. A dilution 1/10 was applied to the milk to build the calibration curve. This method avoids the sample treatment and reduces analysis time. The immunoassay developed is robust (%CV of the curve parameters below than 17%), sensible (LOD = 44 ppt), exact (slope spiked-measured = 0,97) and precise (%CV of quantification <9%) and can be applied to different brands of whole and fresh milk. The ELISA developed in milk1/10 is able to detect other QNs than CPFX (ERFX, FLU, MBFX, OXO, DNFX, DIFX, NRFX, OFX, SRFX), reaching values of cross reactivity from 40 to 104% for five analytes. This methodology was applied to the semi-quantitative detection (positive-negative respect MRL level) of 10 QNs by comparing the obtained signals with controls at know concentration. Applying only three dilutions for each sample (1/10, 1/50 and 1/500), it is possible to detect the presence of any QN; with the only drawback of disability to distinguish which QN are present in the sample. Blind samples with different QNs were analyzed, predicting results in agreement with the real values.

5 Acknowledgements

This work has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation in the frame of the Panoptes and Detecta projects (AGL2005-07700-C06-01 and DEP2007-73224-C03-01). The Nb4D group (formerly Applied Molecular Receptors group, AMRg) is a consolidated research group (Grup de Recerca) of the Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (expedient : 2014 SGR 1484). CIBER-BBN is an initiative funded by the Spanish National Plan for Scientific and Technical Research and Innovation 2013-2016, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions are financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund. The Custom Antibody Service (CABS) is acknowledged for the assistance and support on immunoreagent characterization. Fátima Fernández had a FPI fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation and D.G. Pinacho had a fellowship from Fundación EROSKI.

Figure legends

Figure 1. a) Standard curves obtained from the milk matrix effect studies using the indirect immunoassay (see section 2.5). The curves were built in buffer and a) milk and milk diluted 2, 5 and 10 times and b) milk diluted 25, 50, 75 and 100 times. The data correspond to the average of two well replicates.

Figure 2. Intermilk comparison. Different calibration curves of milk1/10 were built using different milk brands. In the a) graph are compared whole milks with the fresh milk (reference). In the b) graph skimmed and semi skimmed milks are compared with the fresh milk (reference). The data correspond to the average of two well replicates.

Figure 3. a) Matrix effect of milk for high dilutions. Calibration curves of the dilution of a bovine whole milk (CLAS brand) from 10 to 500 times using reference milk 1/10 as solvent for these dilutions. The data correspond to the average of two well replicates. b) Accuracy of the quantification of CPFX spiked milk samples. Five samples were spiked from 0,12xMRL to 4xMRL. The dotted line correspond to a perfect correlation between spiked and measured concentration (slope = 1). The data correspond to the average of three well replicates.

Figure 4. Cross reactivity determination of QNs in milk. Calibration curves for ELISA protocol in milk/10 with other QNs as analyte. The range 100000-0.01 nM was employed for the calibration. In table 3 are summarized the features of these curves. The data correspond to the average of two well replicates.

Figure 5. Results of the analysis of blind samples. The different controls are indicated by horizontal dotted lines and labeled at right of the picture. Solid lines represent the dynamic range of the assay. The data correspond to the average of three well replicates. a) Results for analysis of Nb4D samples. b) Results for analysis of Nestlé samples. In table 5 is indicated the real content of QN and the dilutions in range.

FIGURES

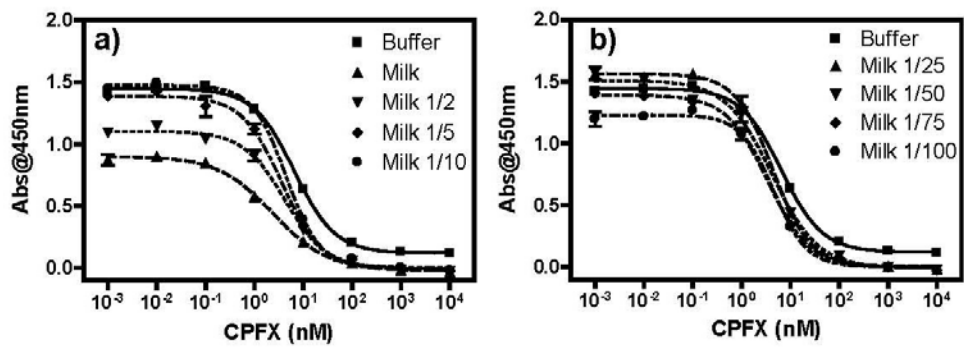


Figure 1

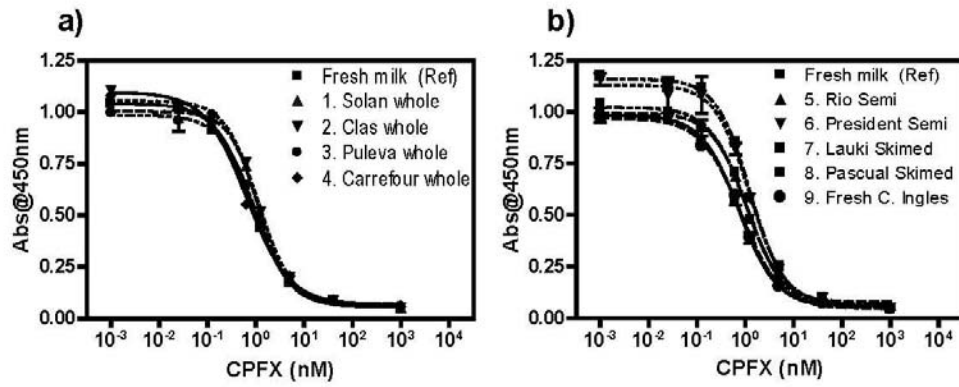


Figure 2

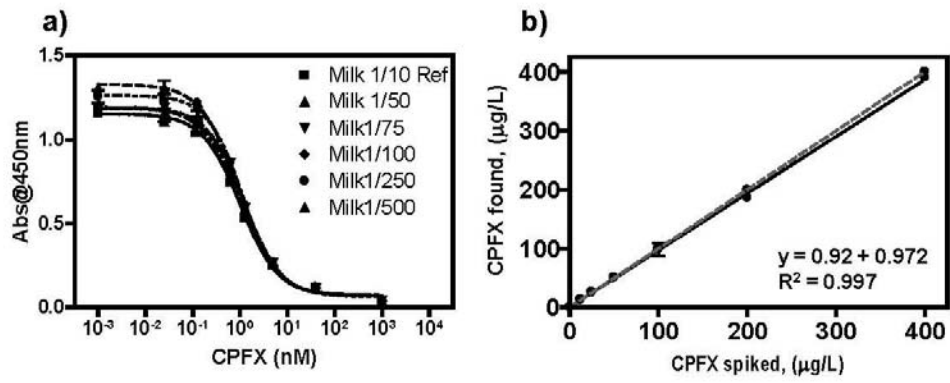


Figure 3

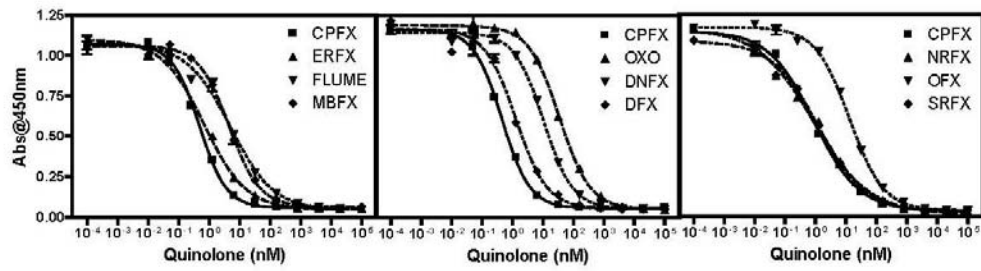


Figure 4

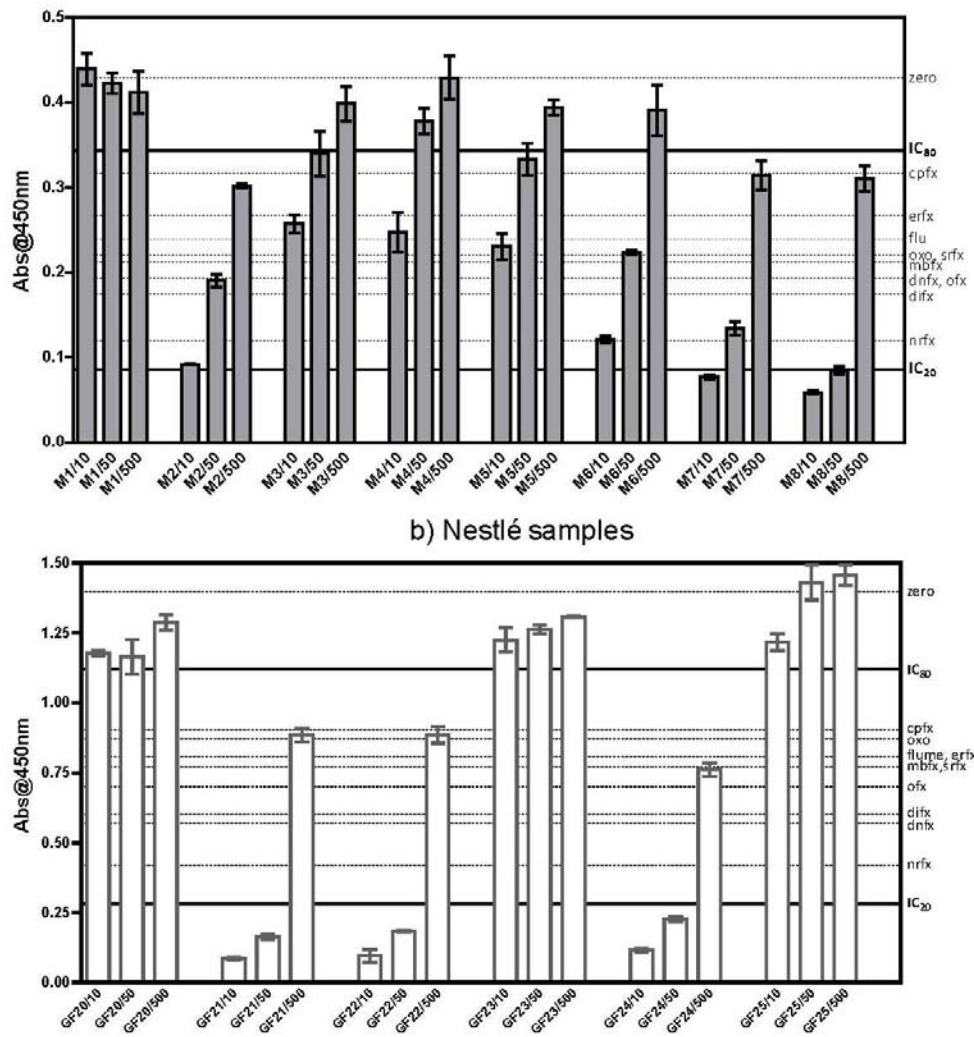


Figure 5

TABLES

Table 1. Sample treatment and sensibility for analysis methods of QNs in milk

	Analytes	Determination technique	Milk treatment	LOD/ppb	REF	
No immunochemical methods	DNFX, SRFX, DIFX, CPFX, ERFX, OXO, MBFX, FLU	LC-Fluorescence detection	-Protein Precipitation (CCl ₃ COOH) -Centrifugation -Postcolumn Derivatization	54-119 CCβ>MRLs	[15]	
	SRFX, CPFX, ERFX, OXO, FLU	LC-Fluorescence detection	-Homogenization -Protein precipitation (HPO ₃) -Centrifugation -Filtration	116-124 CCβ>MRLs	[14]	
	OXO	Phosphorimetric sensor	-Protein precipitation (ZnSO ₄ + K ₄ [Fe(CN) ₆]) -Filtration	10	[13]	
	DNFX, SRFX, DIFX, CPFX, ERFX, OXO, MBFX, FLU	LC-MS/MS	-Protein precipitation (CCl ₃ COOH) -Centrifugation -LLE -SPE	42-120 CCβ>MRLs	[17]	
	DNFX, SRFX, DIFX, LMFx, CPFx, ERFx, OXO, MBFX, FLU	Capillary Electrophoresis - MS/MS	-Protein precipitation (NH ₃) -Centrifugation -SPE	6 –24	[2]	
	NRFx, CPFx, OFLx, ERFx, RUFx	LC-MS/MS	-SPE	0,5 (LOQ)	[16]	
Immunochemical methods	Others	ERFX	Immuno chromatography assay (mAb)	Dilution (1/2) in buffer	10	[19]
	ELISA	ERFX	Indirect competitive ELISA (mAb)	Dilution (1/10) in buffer	1	[19]
		GTFX	Indirect competitive ELISA	-Centrifugation -Fat elimination -Dilution	0,05	[20]
		FLU	Indirect competitive ELISA	None	12,5	[6]
		GTFX	Chemiluminiscent-ELISA	Dilution 1/10	0,001 in buffer	[1]
		NRFx, ENOX, CPFx, PEFx, ERFx, LMFx, SRFX, AMFx and OFx	Indirect competitive ELISA	Extraction and dilution 1/10	IC ₅₀ : 2,7-24,1	[21]
		CPFx, ERFx, NRFx, NDFx, DNFX, PEFx, LMFx, ENOX and SRFX	Indirect competitive ELISA	Dilution 1/10	IC ₅₀ : 0,57-17,7	[22]

AMF (Amifloxacin), CPFx (Ciprofloxacin), DIFx (Difloxacin), DNFX (Danofloxacin), ECD (Electron Capture Detection), ENOX (Enoxacin), ERFx (Enrofloxacin), FLU (Flumequine), GTFx (Gatifloxacin), LC (Liquid Chromatography), LLE (Liquid-Liquid Extraction), LMFx (Lomefloxacin), mAb (monoclonal Antibody), MBFX (Marbofloxacin), MS/MS (tandem Masses Spectrometry), NDFx (Nadifloxacin), NAL (Nalidixic Acid), NRFx (Norfloxacin), OFx (Ofloxacin), OXO (Oxolicinic Acid), PEFx (Perfloxacin), RUFx (Rufloxacin), SPE (Solid Phase Extraction), SRFX (Sarafloxacin).

Table 2. Features of the indirect competitive ELISA in milk 1/10 using CPFX as analyte. (n=18 calibration curves, assays performed in several different days)

	Average ± Standard Deviation	%CV (n=18)
Abs_{max}	1,089 ± 0,390	35,81
Abs_{min}	0,054 ± 0,007	12,96
Abs_{max}/ Abs_{min}	14,61 ± 1,477	10,11
Slope	-1,145 ± 0,082	7,14
IC50 (µg L⁻¹)	0,325 ± 0,030	9,37
LOD (µg L⁻¹)	0,044 ± 0,008	17,80
Dynamic Range (µg L⁻¹)	0,092 ± 0,011 to 1,13 ± 0,109	11,94, 9,64
R²	0,997 ± 0,002	0,15

%CV: Coefficient of variation

Table 3. Cross reactivity. Parameters of the calibration curves in milk 1/10 for different QNs.

QN in milk1/10	CPFX	ERFX	FLU	MBFX	OXO	DNFX	DIFX	NRFX	OFX	SRFX
slope	-1,145	-0,744	-0,726	-1,018	-1,055	-1,109	-1,042	-0,939	-1,528	-1,116
R2	0,997	0,997	0,994	0,996	0,997	0,997	0,991	0,995	0,999	0,998
IC50 (nM)	0,981	1,384	9,226	9,069	74,262	20,859	2,583	0,944	14,819	1,418
IC50 (µg L⁻¹)	0,325	0,497	2,410	3,286	19,399	7,454	1,031	0,301	5,355	0,546
%CR	100	71	11	11	1	5	40	104	7	69
Recognition group	high	high	medium	medium	low	low	high	high	low	high

ELISA para la determinación de quinolonas en leche

Table 4. Control samples, their allowed dilutions in working range of the assay and the chosen dilution to use as control in the plate.

	QN	CPFX	ERFX	FLU	MBFX	OXO	DNFX	DIFX	NRFX	OFX	SRFX
[QN] spiked ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100	100	50	75	50	30	10	5	50	5	
MRL ($\mu\text{g L}^{-1}$ or $\mu\text{g kg}^{-1}$)	100	100	50	75	BN	30	BN	UD	UD	UD	
[QN]/IC ₅₀	624	408	42	46	6	9	11	23	11	10	
Max dilution	1/2655	1/3607	1/457	1/247	1/30	1/49	1/65	1/428	1/71	1/122	
Min dilution	1/146	1/47	1/4	1/9	1/1	1/2	1/2	1/1	1/2	1/1	
Chosen dilution	1/500	1/500	1/50	1/50	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10

BN: banned, MRL: Maximum residue level, UD: undetermined.

Table 5. Blind milk samples. Spiked concentration and dilutions in dynamic range.

Sample	AMRg samples								Nestlé Samples					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	GF20	GF21	GF22	GF23	GF24	GF25
QN	-	MBFX	OXO	DFX	DNFX	FLU	ERFX	CPFX	-	CPFX	NRFX	-	ERFX	-
[QN] spiked ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0	112,5 (1.5xMR L)	33	2,5	19,8 (0.7xMR L)	75 (1.5xMR L)	66 (0.7xMR L)	100 (1xMRL)	0	100 (1xMRL)	100	0	100 (1xMRL)	0
Other antibiotics ($\mu\text{g L}^{-1}$)												SMZ (100)	SPY (100)	CEF (50)
Dilutions in range	-	1/50 1/500	1/10	1/10	1/10	1/10 1/50	1/50	1/500	-	1/500	1/500	-	1/500	-

AMP(ampicillin), CEF(cefazollin), PENG(penicillin G), SMZ(sulfamethazine), SPY(sulfapyridine).

LITERATURE

1. EC, Regulation (ec) no 470/2009 of the european parliament and of the council of 6 may 2009 laying down community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing council regulation (eec) no 2377/90 and amending directive 2001/82/ec of the european parliament and of the council and regulation (ec) no 726/2004 of the european parliament and of the council (text with eea relevance). Comission, E., Ed. Official Journal of the European Union: (16 June 2009); Vol. L 152, pp 11-22.
2. Lara, F.F., Multiresidue method for the determination of quinolone antibiotics in bovine raw milk by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2006**, *78*, 7665-7673.
3. Nunnery, J.; Angulo, F.J.; Tollefson, L., Public health and policy. *Preventive Veterinary Medicine* **2006**, *73*, 191-195.
4. Catherine M. Oliphant, P.D., Quinolones, a comprehensive review. *American Family Physician* **2002**, *65*.
5. Neubert, H.J., Measuring antibiotics in milk. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 7908-7908.
6. Van Coillie, E.F., Development of an indirect competitive elisa for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. *Journal of agricultural and food chemistry* **2004**, *52*, 4975-4978.
7. ECC/2377/90, Ecc/2377/90, community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **1990**.
8. Adrian, J.; Pinacho, D.G.; Granier, B.; Diserens, J.M.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.P., A multianalyte elisa for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and beta-lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 1703-1712.
9. Adrian, J.; Pasche, S.; Pinacho, D.G.; Font, H.; Diserens, J.M.; Sanchez-Baeza, F.; Granier, B.; Voirin, G.; Marco, M.P., Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone, beta-lactam and tetracycline antibiotics in milk. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 769-777.
10. Lomaestro, B., Absorption interactions with fluoroquinolones - 1995 update. *Drug safety* **1995**, *12*, 314-333.
11. Ming, L.J., Structure and function of "metalloantibiotics". *Medicinal Research Reviews* **2003**, *23*, 697-762.
12. Pinacho, D.G.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M.P., Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 4527-4534.
13. Capitan-Vallvey, L.F., Determination of oxolinic acid in cow's milk and human urine by means of a single-use phosphorimetric sensor. *Talanta* **2003**, *60*, 247-255.
14. Ho, C.D., Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *Journal of chromatography* **2004**, *1061*, 123-131.

15. Rodríguez-Díaz, R.C., Determination of fluoroquinolones in milk samples by postcolumn derivatization liquid chromatography with luminescence detection. *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, *54*, 9670-9676.
 16. Tang, Q.F.; Yang, T.T.; Tan, X.M.; Luo, J.B., Simultaneous determination of fluoroquinolone antibiotic residues in milk sample by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 4535-4539.
 17. Van Hoop, N., Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *529*, 265-272.
 18. Ding, K.; Zhao, C.H.; Cao, Z.Z.; Liu, Z.Q.; Liu, J.T.; Zhan, J.H.; Ma, C.; Xi, R.M., Chemiluminescent detection of gatifloxacin residue in milk. *Analytical Letters* **2009**, *42*, 505-518.
 19. Watanabe, H., Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. *The Analyst* **2002**, *127*, 98-103.
 20. Zhao, C., Preparation of anti-gatifloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of gatifloxacin residue in milk. *Journal of agricultural and food chemistry* **2007**, *55*, 6879-6884.
 21. Fan, G.-y.; Yang, R.-s.; Jiang, J.-q.; Chang, X.-y.; Chen, J.-j.; Qi, Y.-h.; Wu, S.-x.; Yang, X.-f., Development of a class-specific polyclonal antibody-based indirect competitive elisa for detecting fluoroquinolone residues in milk. *Journal of Zhejiang University-Science B* **2012**, *13*, 545-554.
 22. Suryoprabowo, S.; Liu, L.; Peng, J.; Kuang, H.; Xu, C., Development of a broad specific monoclonal antibody for fluoroquinolone analysis. *Food Anal. Methods* **2014**, 1-6.
 23. Jensen, R.G.; Blanc, B.; Patton, S., Particulate constituents in human and bovine milks. In *Handbook of milk composition*, Jensen, R.G., Ed. Academic Press: San Diego, 1995; pp 50-62.
 24. Karen L. Cox; Viswanath Devanarayan; Aidas Kriauciunas; al., e., Immunoassay methods. 2012 may 1. [updated in 2014 dec 24]
- In *Assay Guidance Manual [Internet]*, Sittampalam GS, C.N., Nelson H, et al., Ed. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Available from: <http://www.ncbi.nih.gov/books/NBK92434/>.

4.5. Aportaciones más relevantes

Las aportaciones más relevantes de esta tesis doctoral en lo referido al objetivo abordado en este capítulo son las siguientes:

- El efecto matriz que ejerce la leche sobre el ELISA puede ser minimizado tan solo diluyendo la muestra al menos 10 veces, sin necesidad de tratamientos adicionales que complicarían el análisis. Se comprobó a su vez que los parámetros del ensayo a esa dilución no eran dependientes del contenido graso de la leche o de la marca comercial, pudiendo aplicarse esta metodología al análisis de muestras de leche de vaca, en general.
- La especificidad del ensayo en leche se mantiene para el formato indirecto, siendo el método desarrollado capaz de detectar 10 QNs en dicha matriz por debajo de los LMRs establecidos por la UE, a pesar de diluir la muestra 10 veces. De la misma forma se comprobó que el ensayo desarrollado es reproducible ($CV < 15\%$ para la mayoría de los parámetros), exacto (pendiente fortificado/medido 0.97) y preciso ($CV < 10\%$ para diferentes niveles de concentración), evidenciándose de esta manera el elevado potencial del ensayo para su aplicación al análisis de QNs en leche.
- Mediante el establecimiento de un formato semi-cuantitativo se identificaron claramente las muestras libres de QN de las que estaban contaminadas de 14 muestras fortificadas con QNs y otros antibióticos. A pesar de este hecho y debido al diferente nivel de reconocimiento y LMRs para cada QN, no fue posible discriminar de que QN se trataba y por ende si la muestra está por encima o por debajo de su LMR.

Se ha conseguido poner a punto herramientas analíticas de cribado de antibióticos de tipo QN en leche. El ELISA desarrollado presenta la ventaja de permitir el procesado de un gran número de muestras en poco tiempo. La metodología analítica desarrollada es simple, apenas es necesario un tratamiento de muestra y permite el análisis de residuos de QNs en menos de 2 h, alcanzando una detectabilidad inferior a los MRLs establecidos por la UE, a pesar de diluir la muestra 10 veces. En relación a los métodos inmunoquímicos reportados en la literatura para el cribado de residuos de QNs, este es el único ensayo que siendo de naturaleza genérica para este tipo de antibióticos, permite su determinación en leche sin necesidad de realizar ningún tratamiento previo de la muestras en un tiempo inferior a 2 h, siendo además capaz de detectar a todos los congéneres de la familia regulados por la UE.

Capítulo 5

Desarrollo de un inmunosensor amperométrico
basado en partículas magnéticas para la
detección de quinolonas en leche de vaca

En el siguiente capítulo se describe el desarrollo de un magneto inmunosensor amperométrico para la detección de QNs en leche. Dicho inmunosensor está basado en el uso de partículas magnéticas biomodificadas con los inmunoreactivos desarrollados en el **Capítulo 3**. La estructura del capítulo consiste en una introducción sobre los biosensores y su clasificación y sobre el uso de partículas magnéticas en técnicas de separación. Posteriormente se discuten los resultados obtenidos, en este apartado se incluye una publicación que contiene los principales resultados obtenidos durante desarrollo y la caracterización del inmunosensor amperométrico. El capítulo finaliza con con las principales aportaciones de esta tesis doctoral en lo referente al desarrollo y la caracterización de dicho inmunosensor amperométrico.

5.1 Introducción

5.1.1. BIOSENSORES

La IUPAC define el término biosensor como “un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, sistemas inmunoquímicos, tejidos, orgánulos o células enteras para detectar compuestos químicos generalmente por medio de señales eléctricas, térmicas u ópticas” [217]. Por lo tanto, un biosensor consiste en un dispositivo analítico que incorpora un elemento de reconocimiento de origen biológico (receptor), íntimamente asociado o integrado a un transductor. Como resultado de la interacción específica entre el analito y dicho elemento biológico, se produce una variación de las propiedades físico-químicas registradas por el transductor, generando de esta forma una señal cuantificable que puede ser ampliada y procesada (véase **Figura 5.1**). Dicha señal debe ser proporcional a la concentración de un analito específico o un grupo relacionado de compuestos a analizar.



Figura 5.1. Componentes de un biosensor.

En las últimas décadas los biosensores han despertado un gran interés tanto a nivel científico como industrial, comercial e incluso social, y se han realizado numerosos esfuerzos para integrar elementos de reconocimiento específicos y componentes electrónicos. En este sentido, el biosensor “ideal” debería responder *in situ* y en tiempo real a la presencia de uno o varios analitos presentes en una muestra de un modo directo y selectivo [225]. Desde el punto de vista analítico, los biosensores son una alternativa prometedora a los métodos de análisis tradicionales, debido a propiedades tales como su elevada detectabilidad y especificidad, corto tiempo de análisis, posibilidad de integración en sistemas portátiles, facilidad de automatización, capacidad de trabajo a tiempo real, versatilidad y bajo coste.

Estas características permiten la resolución de los problemas asociados a muestras poco estables o alteraciones durante el transporte y/o almacenamiento, ya que pueden aplicarse en la determinación *in situ* de un gran número de especies.

La mayor parte de los biosensores desarrollados se han aplicado al campo del diagnóstico clínico [226], pero el avance de la biotecnología y la nanotecnología ha permitido extender su utilización a otros sectores como el farmacéutico, el agroalimentario, el de la seguridad alimentaria, la defensa, la vigilancia ambiental o también de procesos industriales, etc [227]. A pesar de que el campo de los biosensores ha experimentado un gran avance en los últimos años, la comercialización final esta tecnología está por detrás de la productividad científica, siendo lenta su salida al mercado en la mayoría de los casos [227].

5.1.1.1. Clasificación de los Biosensores

Los biosensores se clasifican en base a dos criterios principalmente, la naturaleza del elemento biológico de reconocimiento (receptor) y el sistema de transducción empleado. A este respecto, la gran cantidad de sistemas biológicos y elementos de transducción disponibles permite un elevado número de combinaciones posibles. Generalmente, la elección del elemento de reconocimiento viene determinada por la sustancia a analizar y el tipo de muestra en la cual se ha de realizar el análisis. Por otra parte, el sistema transductor normalmente viene definido por el elemento biológico elegido previamente.

En lo que respecta al elemento de reconocimiento y por tanto a la naturaleza del proceso bioquímico, los biosensores se pueden agrupar en dos grandes categorías, los **biosensores catalíticos** y los **biosensores de afinidad** (véase **Figura 5.2**). Los primeros se basan en el uso de catalizadores biológicos que median una reacción química en la que intervienen uno o varios sustratos, generando a su vez uno o varios productos. En los segundos se produce una interacción específica entre el elemento de reconocimiento y el compuesto a analizar sin que ocurra una transformación del mismo.

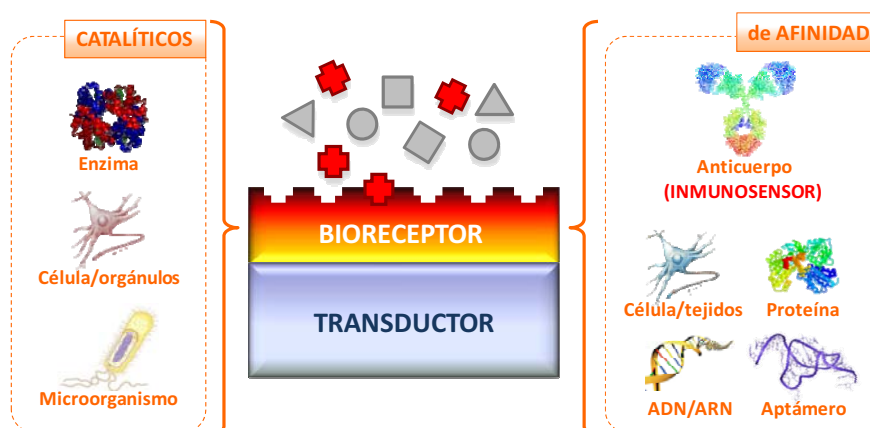


Figura 5.2. Clasificación de los biosensores según el tipo de receptor.

Los **biosensores catalíticos** emplean sistemas que contienen enzimas, bien aisladas o incorporadas a orgánulos celulares, células completas o tejidos [228]. Se basan en la reacción química catalizada por dichas enzimas, midiendo tanto la desaparición de sustratos o cofactores, como la aparición de nuevos productos de reacción. También se pueden monitorizar indirectamente compuestos que interfieren en dicha reacción, inhibiendo de

manera selectiva la actividad de la enzima en cuestión. Al actuar como catalizadores no se consumen durante el proceso, por lo que generalmente pueden ser reutilizadas. El ejemplo más ilustrativo de este tipo de biosensores es el medidor portátil de glucosa, empleado a nivel mundial por enfermos de diabetes y que ha sido comercializado por un gran número de compañías. Se trata de un biosensor amperométrico que registra la corriente generada durante la oxidación de la glucosa mediada por la glucosa oxidasa.

Los **biosensores de afinidad** se basan en la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento sin la mediación de ningún sistema catalítico. Dicha interacción consiste en el establecimiento de un equilibrio que permite la formación del complejo analito-receptor, que puede determinarse bien de forma directa mediante el cambio de las propiedades físico-químicas del transductor, o bien de forma indirecta utilizando marcajes de diferente tipo (enzimático, fluorescente, etc.). Como receptores para este tipo de biosensores se ha descrito la utilización de *proteínas receptoras*, *ácidos nucleicos*, *aptámeros*, *MIPs*, *anticuerpos* e incluso *células completas* y *microorganismos*. En el caso de *receptores proteicos* (aislados, en membranas o en orgánulos celulares) se han utilizado para monitorizar sustancias que influyen o bloquean el flujo de iones a través de los canales proteicos, como por ejemplo el ántrax [229] o herbicidas [230]. En cuanto a los *ácidos nucleicos*, se utilizan principalmente para la detección de material genético (ADN) mediante la hibridación a sus correspondientes hebras complementarias [231, 232], aunque también se ha descrito su utilización como elementos de inmovilización selectiva a la superficie del transductor [233]. Respecto a *aptámeros* y *MIPs*, en principio se pueden aplicar a la detección de una gran variedad de moléculas, aunque su principal inconveniente consiste en que presentan constantes de afinidad bajas [234, 235].

Los sensores que emplean *anticuerpos* como elementos de reconocimiento se denominan **inmunosensores**, y monitorizan la formación del complejo antígeno anticuerpo. Al igual que para el resto de técnicas inmunoquímicas, el análisis de moléculas de bajo peso molecular requiere trabajar en condiciones de competencia. Dependiendo del sistema de transducción empleado, los inmunosensores pueden detectar el complejo antígeno-anticuerpo directamente, o requerir de un marcaje de antígenos o anticuerpos para monitorizar la formación de dicho complejo. Por lo general, la detectabilidad y la selectividad vienen determinadas por los inmunoreactivos utilizados y no por la configuración de ensayo. A parte de presentar una elevada detectabilidad y especificidad, una de las principales ventajas de los inmunosensores es su versatilidad, ya que debido a la homogeneidad estructural de los anticuerpos, una vez desarrollada la plataforma sensora esta puede ser aplicada a la determinación de diferentes sustancias utilizando distintos anticuerpos, permitiendo la estandarización de los procesos de fabricación y almacenamiento. Información más ampliada sobre los principios de transducción, métodos, y ejemplos relacionados con los inmunosensores se puede encontrar en la reciente revisión publicada por *Holford et al.* [236].

En cuanto al sistema de transducción, los biosensores se pueden clasificar en *ópticos*, *piezoeléctricos*, *térmicos* o *electroquímicos* (véase **Figura 5.3**). Como ya se ha mencionado anteriormente, la elección del sistema de transducción viene condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que es este el que determina la variación de las propiedades físico-químicas producidas durante la interacción con el analito.

Los *biosensores ópticos* miden los cambios producidos en las propiedades de la luz (absorción, índice de refracción, fluorescencia o dispersión de la luz) como consecuencia de la interacción entre el analito y el receptor, y pueden aplicarse tanto receptores catalíticos como de afinidad. Destacan los basados en el plasmón superficial y de onda evanescente. Los primeros explotan la variación de la reflectividad de una superficie metálica (generalmente de oro) en la que permanece inmovilizado el receptor. Cuando incide un rayo de luz a un determinado ángulo (de resonancia) sobre esta superficie tiene lugar el fenómeno de la resonancia de plasmón superficial, siendo posible detectar todas las interacciones que generen un cambio en el índice de refracción en la interfase con dicha superficie. Respecto a los de onda evanescente, se basan en guías de onda que transmiten la luz mediante múltiples reflexiones internas en condiciones de reflexión total, creando un campo evanescente capaz de penetrar a determinada distancia desde la superficie de la guía de ondas modificada con el receptor [153, 237]. Esto permite la detección de cualquier interacción molecular que provoque una absorción de energía que conduzca a la atenuación en la luz reflejada por la guía de ondas. Una variante de este tipo de transductores son los que utilizan marcadores fluorescentes y reciben el nombre de transductores de reflexión interna total de fluorescencia (TIRF).

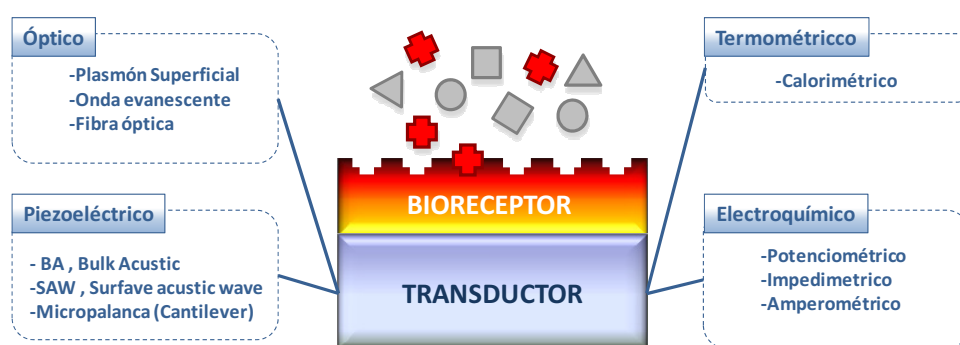


Figura 5.3. Clasificación de los biosensores según el tipo de transductor.

Los *biosensores piezoeléctricos* son capaces de registrar el cambio infinitesimal de masa que produce la interacción entre el analito y el receptor utilizando materiales piezoeléctricos. Dichos materiales entran en resonancia mediante la aplicación de un campo eléctrico alterno externo, estando determinada la frecuencia de oscilación mecánica por la masa del material. Los receptores más utilizados para este tipo de biosensores son los de afinidad, y entre ellos destacan los anticuerpos. Se pueden dividir en dos tipos, los que utilizan ondas acústicas másicas (Bulk Acoustic Wave, BAW) conocidos como microbalanzas de cristal de cuarzo [238] y los que emplean ondas acústicas superficiales (Surface Acoustic Wave, SAW) [239]. La principal diferencia entre ellos radica en que en los primeros la resonancia tiene lugar en toda la masa del cristal y en los segundos solamente en su superficie. Estos biosensores presentan la ventaja de la detección directa a tiempo real, aunque la detectabilidad suele ser baja y presentan interferencias cuando se emplean en medio líquido. Dentro de este grupo también se engloban los basados en micropalanca (cantilevers), en los cuales se mide la variación nanométrica en la deflexión de una micropalanca o el desplazamiento de su frecuencia de resonancia al interaccionar el analito con el elemento de reconocimiento [240].

Los *biosensores termométricos* están basados en la medida del calor liberado durante una reacción, generalmente enzimática, por un termistor de alta sensibilidad [241]. Las enzimas

son los elementos de reconocimiento más utilizados en este tipo de biosensores, aunque a veces se utilizan células, orgánulos o tejidos cuando no es posible aislar la enzima activa o la respuesta viene generada a una reacción enzimática en cascada. La configuración habitual consiste en una columna donde permanece inmovilizada una enzima a través de la que pasa la disolución problema, registrándose la variación de temperatura con la presencia de analito. A menudo es necesaria la adición de una columna de referencia inerte para establecer mediciones diferenciales que compensen los efectos no específicos. También se han desarrollado trabajos empleando MIPs, aprovechando el efecto en la entalpia al establecerse la interacción del analito con su plantilla [242], y ELISAs termométricos utilizando la producción de calor de la enzima de marcaje [243].

Los *biosensores electroquímicos* transforman la señal producida en la superficie del electrodo por la interacción entre el analito y el receptor en una señal eléctrica cuantificable. Dependiendo de la señal obtenida se dividen en potenciométricos (diferencia de potencial), impedimétricos (impedancia) y amperométricos (intensidad de corriente) [244]. Junto con los ópticos son los biosensores más empleados ya que son fáciles de utilizar y fabricar, rápidos y fiables. Los biosensores potenciométricos miden las alteraciones de potencial en la superficie del electrodo de trabajo frente a un electrodo de referencia, a intensidades de corriente cercanas al cero. Generalmente van asociados a enzimas cuya reacción con el sustrato provoca cambios en el pH [245]. Los impedimétricos miden los cambios producidos en el entorno inmediato del elemento de reconocimiento al interactuar con el analito de dos maneras, mediante la monitorización de la impedancia dentro del plano entre electrodos, normalmente interdigitados, o bien a través de la perturbación que ocurre en la interfase electrolito/electrodo [246].

En cuanto a los biosensores amperométricos, registran el flujo de corriente generada en un electrodo por una reacción electroquímica a potencial constante. La intensidad de corriente está relacionada linealmente con la concentración de la sustancia electroactiva que se oxida o reduce en la superficie del electrodo. Normalmente se trabaja en una configuración de tres electrodos y se emplean mediadores redox para evitar interferencias a la hora de aplicar sobrepotenciales. La elevada sensibilidad y rapidez de respuesta son las principales ventajas de este tipo de transductores, así como el hecho que las enzimas permiten una elevada amplificación del sistema de detección. En la actualidad la mayor parte de los biosensores comerciales se basan en esta configuración. Más en concreto, los inmunosensores amperométricos utilizan la mayoría de las diversas metodologías utilizadas en el inmunoensayo, teniendo una mayor aplicabilidad los formatos heterogéneos [247]. Este tipo de inmunosensor se ha empleado como sistema de detección en la presente tesis.

Al comienzo de esta tesis solo había descrito un biosensor basado en SPR para la detección de ERFX y CPFY en leche [248]. Dicho inmunosensor óptico utilizaba un anticuerpo policlonal específico para ERFX, presentando una buena detectabilidad (2 y 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).y se utilizó para la monitorización de vacas tratadas con ERFX para mastitis clínica. Posteriormente, en el año 2004, *Pellegrine et al.* [249] describieron un biosensor electroquímico para la detección de TCs y QNs en la leche se basándose en la tasa de producción de CO_2 relacionada con la inhibición del crecimiento microbiano de una bacteria específica (*Escherichia coli* ATCC 11303). La detectabilidad alcanzada fue de 25 $\mu\text{g kg}$, sin embargo el tiempo de análisis era de 3 h y no podían discernir el tipo de contaminante. *Haasnoot et al.* [144] desarrollaron en

2007 un inmunosensor tipo SPR para FLUME en el suero y músculo de pollo. En este caso, aunque el tiempo de análisis es corto (7.5 min) la detectabilidad alcanzada fue de 15 y 24 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. En el mismo año, *Marchesini et al.* [145], describieron un inmunosensor de tipo SPR para la detección en paralelo de 5 QNs y FLUME utilizando dos tipos de anticuerpos (genérico y específico) para posteriormente identificar las muestras positivas mediante LC-TOF-MS. Dicho inmunosensor fue probado en músculo de pollo con detectabilidades entre 2.7 y 5.9 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para las QNs ensayadas. En 2008, *Huet et al.* [146] describieron un inmunosensor tipo SPR utilizando anticuerpos de clase para QNs con muy buena detectabilidad (IC_{50} entre 0.6 y 68 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), aunque también en este caso no fue aplicado a leche, sino a pescado, huevo y músculo de pollo.

5.1.2. PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

En los últimos años, las partículas magnéticas (MPs, Magnetic Particles) han atraído gran interés en campos como el bioanálisis, la biomedicina, el análisis de productos alimentarios y medioambientales, tanto en lo que se refiere a su uso como elementos de detección (marcaje magnético) [250] como al desarrollo de técnicas de separación del material biológico de una matriz compleja [251]. Esto es debido en gran medida a propiedades tales como su versatilidad, elevada área superficial, estabilidad química y física, baja toxicidad y alta biocompatibilidad [251]. Su tamaño oscila desde nanómetros a unos pocos milímetros, siendo comparable al de células, proteínas u oligonucleótidos [252]. La principal ventaja en lo que respecta a su aplicación en técnicas de separación, consiste en la capacidad de separar la fase sólida de forma simple y rápida mediante la aplicación de un campo magnético externo [253], abriendo la posibilidad a la automatización del sistema.

Están formadas por un núcleo paramagnético o superparamagnético encapsulado en un polímero inerte que a su vez permite la inmovilización de biomoléculas (véase **Figura 5.4**). Dicho núcleo está formado generalmente por magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y permanece revestido por polímeros principalmente de agarosa, celulosa, sílice, silicona, vidrio poroso, mica o poliestireno [254]. Dicho revestimiento permite proteger y preservar la estabilidad del óxido de hierro por exposición al aire y a su vez añade una funcionalización adicional que permite el enlace de diferentes tipos de biomoléculas como anticuerpos [255] y oligonucleótidos [256]. Hoy en día existen un gran número de compañías que comercializan MPs activadas con grupos químicos reactivos que facilitan la unión de biomoléculas e incluso partículas ya modificadas con dichas biomoléculas, que permiten su utilización en diferentes tipos de bioensayos (véase **Figura 5.4**).

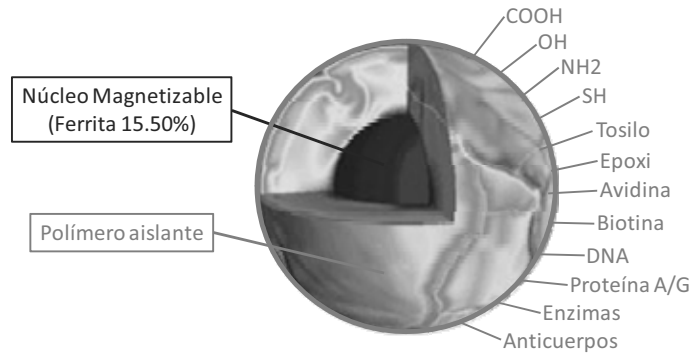


Figura 5.4. Representación esquemática de las MPs y las diferentes modificaciones disponibles comercialmente.

Desde un punto de vista analítico, las MPs modificadas presentan ventajas como la fácil manipulación, la buena dispersión de las partículas en la solución acuosa y escasa formación de agregados, lo que favorece la reacción entre el analito en solución y las biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie de las partículas, acortando de esta manera los tiempos de reacción. También permiten una fácil miniaturización del sistema cuando se utilizan dichas partículas como fase sólida móvil [257] y a su vez permiten la reducción de los volúmenes de reactivos necesarios y por lo tanto de residuos generados. Las reacciones con MPs se caracterizan por su elevada cinética y buena reproducibilidad, pero sin duda, sus características más importantes son la capacidad de concentración de la biomolécula, y la minimización del efecto matriz de la muestra, obteniéndose por lo general tiempos de análisis más cortos y límites de detección más bajos [251].

En consecuencia, las MPs constituyen una plataforma muy atractiva para el diseño de biosensores, de hecho varios biosensores electroquímicos basados en enzimas, en la hibridación de ácidos nucleicos e inmunosensores ya se han descrito en la literatura y citado en varias revisiones [252, 258-260].

Con base a estos antecedentes se plantearon los objetivos descritos en la siguiente sección (véase **Sección 5.2**).

5.2. Objetivos

El principal objetivo del trabajo expuesto en el presente capítulo consistió en el desarrollo de un inmunosensor electroquímico de tipo amperométrico, para la detección de antibióticos de tipo QN en leche.

En la configuración elegida de inmunosensor, uno de los inmunoreactivos es inmovilizado sobre partículas con propiedades magnéticas, trascurriendo en solución la reacción inmunoquímica con el inmunoreactivo complementario marcado enzimáticamente. Después de los correspondientes lavados utilizando un imán para eliminar el exceso de reactivos, las partículas se capturan con un magneto-electrodo, que a su vez hace las veces de electrodo de trabajo a la hora de medir la corriente generada por la enzima unida a los inmunoreactivos (véase **Figura 5.5**).

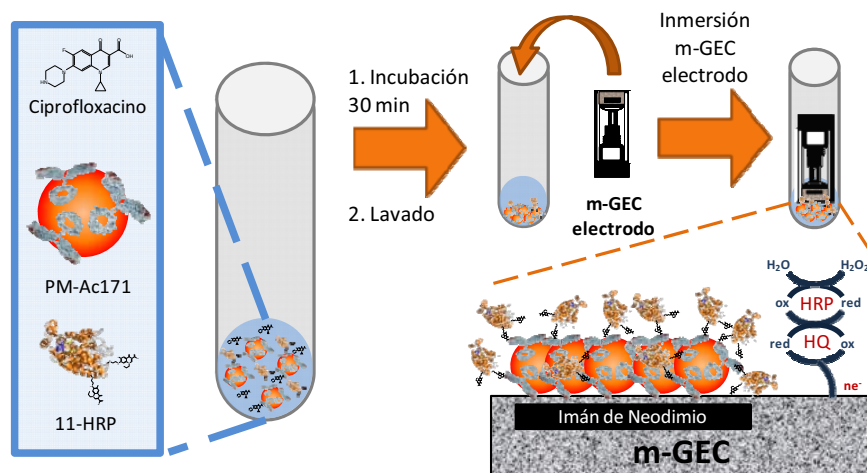


Figura 5.5. Esquema de formato inmunosensor elegido.

Con el fin de lograr este objetivo, fue necesario abordar los siguientes objetivos concretos:

- Inmovilización de los inmunoreactivos sobre la superficie de las MPs y caracterización de las mismas.
- Marcaje enzimático y caracterización de los inmunoreactivos necesarios para el desarrollo del inmunosensor.
- Estudio del efecto matriz de leche procedente de ganado vacuno.
- Desarrollo de inmunosensores con transducción amperométrica.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. BIOMODIFICACIÓN DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Debido a la experiencia previa del grupo, se escogieron las partículas “Dynabeads M-280 Tosylactivated”, cuya superficie está modificada con grupos tosilo susceptibles de reaccionar con grupos nucleófilos. Este tipo de partículas presentaron los mejores resultados en cuanto a rendimiento de biomodificación, relación señal ruido y estabilidad durante el desarrollo de este tipo de inmunosensores para la detección de pesticidas [261]. La caracterización de las MPs modificadas se llevó a cabo mediante experimentos de magneto ELISA (M-ELISA) tal y como se describe en la sección experimental de la **publicación V (Sección 5.4)**.

En un primer momento se decidió implementar el formato indirecto, y para ello se modificaron este tipo de MPs con el antígeno de tapizado **17-BSA** y el propio hapteno **17**, aprovechando la disponibilidad de grupos amino en su estructura. En el caso de las MPs modificadas con el hapteno directamente, la señal observada en los experimentos bidimensionales de M-ELISA no fue suficiente para el desarrollo del posterior inmunosensor, observándose a su vez un elevado ruido de fondo, por lo que se descartó esta estrategia. Para el caso de las partículas modificadas con el bioconjugado **17-BSA**, se realizó un experimento variando los equivalentes de antígeno de tapizado respecto a los de grupos tosilo presentes en las MPs. Se evaluó el rendimiento de la reacción de acoplamiento mediante la interpolación de la absorbancia a 280 nm del sobrenadante de la reacción, en una recta de calibrado generada con BSA, observándose que el rendimiento era superior al 80 % en todos los casos (véase **Tabla 5.1**).

Tabla 5.1. Rendimientos de biomodificación y parámetros del M-ELISA indirecto utilizando las MPs modificadas con diferentes cantidades de **17-BSA** y ciprofloxacino como analito^a.

Eq. 17-BSA:MP ^a	1:1	1:5	1:10	1:15	1:20
% Rendimiento	CA	95	91	86	82
Abs _{max}	0.72	1.08	1.19	1.35	1.55
Abs _{min}	0.39	0.37	0.46	0.50	0.49
IC ₅₀ ^a	3.05	4.12	3.53	2.51	1.50
R ²	0.945	0.992	0.984	0.981	0.993

^aEquivalentes de grupos tosilo de la partícula respecto a los de 17-BSA ^b expresado en µg/L.

También se caracterizó la capacidad de reconocimiento del CPFX por dichas partículas mediante ensayos de M-ELISA en formato competitivo indirecto, encontrándose que los mejores parámetros en cuanto a IC₅₀ y absorbancia máxima se obtenían con las partículas con menor relación antígeno:partícula (véase **Tabla 5.1**), aunque siguiendo esa misma tendencia también se observó un aumento en el ruido de fondo. Este hecho puede ser atribuido a que cuando la cantidad de antígeno es similar al número de grupos tosilo de las MPs, cabe la posibilidad de formación de multicapas de antígeno por adsorciones de tipo inespecífico resultado de la interacción proteína-proteína. Dichas multicapas pueden ir siendo eliminadas durante el transcurso del M-ELISA, disminuyendo de esta manera la absorbancia máxima y aumentando la IC₅₀. Del mismo modo, cuando el antígeno está en defecto respecto de los grupos tosilo de las MPs el recubrimiento de las mismas no es completo, quedando parte de la partícula accesible para la adsorción inespecífica generando un aumento de la absorbancia mínima.

Aún a pesar del elevado ruido de fondo, se decidió continuar con la implementación del immunesensor utilizando las MPs con la relación 1:20, ya que cabía la posibilidad de usar agentes de bloqueo que disminuyeran este efecto. Durante el desarrollo experimental posterior se observó una pérdida significativa de partículas durante los procesos de lavado, que era mayor en el segundo de ellos (después de la adición de la antiIgG-HRP), advirtiéndose a su vez la aglomeración de dichas partículas y obteniéndose ensayos poco reproducibles tanto en la configuración de M-ELISA como de lectura amperométrica.

En este contexto, la realización de una búsqueda literaria dirigida a encontrar una explicación y/o una posible solución a estos efectos, nos reveló que existían precedentes en los que el ruido de fondo de los ensayos era elevado cuando se realizaban en formato indirecto (con anticuerpo secundario) sobre partículas magnéticas. Así pues, *Laube et al.* observaron un efecto similar durante el desarrollo de un immunesensor amperométrico para gliadina, un constituyente de la proteína de gluten de cereales, responsable de la intolerancia a la generada en la enfermedad celíaca [262]. Dicho immunesensor también estaba basado en partículas magnéticas biofuncionalizadas, y anticuerpos comerciales para gliadina, generando la señal con un anticuerpo secundario. En estas condiciones (formato competitivo indirecto) los autores observaron que el M-ELISA presentaba un ruido de fondo de casi la mitad de la señal máxima. Cuando emplearon anticuerpos contra gliadina unidos directamente a HRP (formato directo, con antígeno inmovilizado), observaron el ruido de fondo disminuía apreciablemente. En base a estos precedentes se decidió proceder al marcaje enzimático del anticuerpo específico para QNs utilizando HRP, con el fin de disminuir el ruido de fondo,

además de eliminar el segundo lavado y acortar de esta manera el tiempo de análisis a la mitad (véase **Sección 5.3.2**), al trabajar en formato directo con el AT unido a las PMs (AT-PM).

5.3.2. DESARROLLO DE UN MAGNETO ELISA DIRECTO CON EL ANTÍGENO INMOVILIZADO A LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (ATM-ELISA)

5.3.2.1 Marcaje enzimático del anticuerpo específico para QNs

Para el marcaje enzimático del anticuerpo **Ac171**, se emplearon dos metodologías. En una primera aproximación se oxidaron los azúcares presentes en la estructura del anticuerpo utilizando peryodato sódico, con el fin de generar grupos aldehído susceptibles de reaccionar con los grupos amino de la HRP formando grupos imina, que posteriormente serían reducidos con ayuda de NaBH_3CN [263]. El anticuerpo marcado de esta forma exhibió un alto grado de absorción inespecífica a la microplaca cuando fue caracterizado mediante ELISA, razón por la cual se se procedió a preparar el anticuerpo marcado mediante otra metodología, con el fin de mejorar las características funcionales del bioconjugado.

Empleando un enfoque diferente, se utilizó cloruro cianúrico como brazo espaciador, aprovechando la diferencia de reactividad de sus átomos de cloro [182], tal como ya se ha descrito en el capítulo 3 (véase **Figura 3.13**, página 111) para la preparación del trazador enzimático **17-HRP**. A si pues, las aminas de la HRP reaccionaron a temperatura ambiente con el cloro más reactivo del cloruro cianúrico y tras la purificación de la enzima modificada mediante diálisis, las aminas del **Ac171** reaccionaron con el siguiente cloro en reactividad, esta vez a 37 °C. Finalmente se procedió a la precipitación del anticuerpo con sulfato amónico, para eliminar el exceso de enzima, y posteriormente se purificó mediante diálisis con el fin de eliminar las sales, obteniéndose el **Ac171-HRP** con un 47 % de rendimiento. El rendimiento de la bioconjugación fue moderado debido principalmente al elevado número de etapas de purificación involucradas en el proceso.

5.3.2.2. Desarrollo del ATM-ELISA

En una primera instancia se caracterizó el **Ac171-HRP** mediante ELISA competitivo, utilizando microplacas tapizadas con **17-BSA** (AT-ELISA). Los resultados mostraron que era posible obtener una muy buena detectabilidad para el CPFV (véase **Figura 5.6A** y **Tabla 5.2**) con una IC_{50} de 0,837 $\mu\text{g/L}$ y un LOD de 0,060 $\mu\text{g/L}$, similares a los obtenidos con el ELISA indirecto de dos etapas (IC_{50} = 0,35 $\mu\text{g/L}$, LOD = 0,040 $\mu\text{g/L}$, véase **Figura 3.19**, página 120), lo que demuestra que no se produjo una pérdida de actividad del anticuerpo después del marcaje enzimático. Además, el ruido de fondo era mínimo, lo que resultaba prometedor de cara a proseguir con el desarrollo del magneto inmunosensor.

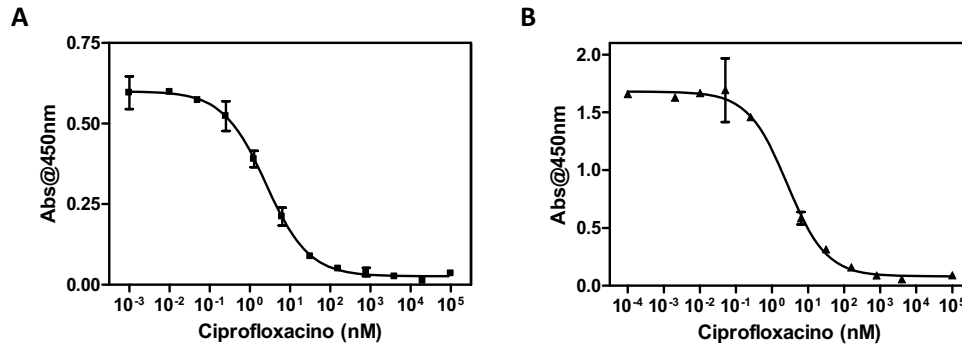


Figura 5.6. Curvas de calibrado obtenidas utilizando el anticuerpo marcado **Ac171-HRP** en diferentes formatos. **A.** AT-ELISA y **B.** ATM-ELISA.

A continuación se procedió a desarrollar el ATM-ELISA utilizando las **MP-17-BSA** (relación 1:20), seleccionadas anteriormente, el **Ac171-HRP** y CFX como analito. En este caso, los valores de IC_{50} y LOD fueron prácticamente idénticos a los obtenidos en la configuración AT-ELISA en microplaca, lo que indicaba que las propiedades de los inmunoreactivos no se ven alteradas por el hecho de immobilizarlas en las partículas. Al mismo tiempo estos estudios revelan que la detectabilidad obtenida por los inmunoreactivos desarrollados es independiente de la configuración del inmunoensayo empleado (véase **Figura 5.6B** y **Tabla 5.2**). Un aspecto también relevante fue observar que en ATM-ELISA el ruido de fondo era prácticamente inexistente, al contrario de lo que sucedía en el formato indirecto, lo que está en consonancia con los resultados también reportados por *Laube et al.* [262], lo cual indica que la señal inespecífica era fundamentalmente debida a la interacción del anticuerpo secundario con las partículas magnéticas.

Tabla 5.2. Comparativa de los parámetros de los ELISAs directos utilizando el **Ac171** y **17-BSA** inmovilizado en las diferentes superficies (microplaca y partícula magnética)

	AT-ELISA (17-BSA/Ac171HRP)	ATM-ELISA (MP-17-BSA/Ac171HRP)
Amax	0.600	1.679
Amin	0.026	0.081
IC_{50}^a	0.84 ± 0.39	0.88 ± 0.42
Pendiente	-0.808	0.799
Rango lineal ^a	0.16-2.20	0.15-5.47
LOD ^a	0.060	0.052
R^2	0.985	0.984

^a expresado en $\mu\text{g/L}$.

5.3.3. DESARROLLO DE UN MAGNETO ELISA DIRECTO CON EL ANTÍCUERPO INMOVILIZADO A LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (AcM-ELISA).

En paralelo se decidió también intentar implementar el formato directo con el anticuerpo unido a las MP (**MP-Ac171**), ya que tal como se ha mostrado en el capítulo anterior el formato de microplaca funcionó muy bien observándose un menor efecto matriz provocado por la leche. De esta manera se modificaron MPs con el anticuerpo **Ac171**, para lo cual fue necesaria una purificación previa del antisuero **As171**. Dicha purificación se llevó a cabo en dos etapas, primero mediante la precipitación del anticuerpo utilizando sulfato amónico

[264] seguido de una purificación del anticuerpo así obtenido por cromatografía de afinidad, utilizando en este caso una columna de sefarosa modificada con proteína A. Utilizando el **Ac171** purificado de esta manera se obtuvieron las partículas **MP-Ac171** con un rendimiento de la reacción de acoplamiento superior al 90 %.

Se procedió a la caracterización de las **MP-Ac171** mediante AcM-ELISA, utilizando **17-HRP** como trazador enzimático. Como se puede observar en la **Figura 5.7** la curva obtenida presenta una elevada detectabilidad con buenos valores de IC_{50} y LOD, muy similares a los obtenidos utilizando el mismo formato en configuración de ELISA en microplaca (IC_{50} de 0.91 $\mu\text{g/L}$ y LOD de 0.20 $\mu\text{g/L}$, véase **Figura 3.21**, página122), lo que demuestra que el anticuerpo no pierde actividad tras su unión a las MPs. Además esta configuración tampoco presentaba ruido de fondo debido a adsorciones inespecíficas.

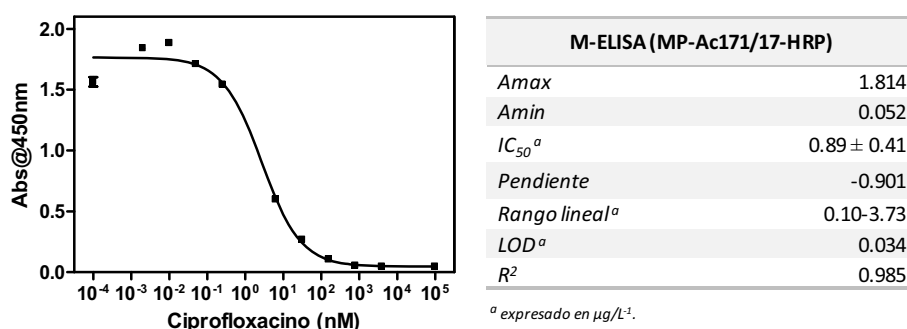


Figura 5.7. Curva de calibrado y parámetros del AcM-ELISA en formato directo utilizando las **MP-Ac171** y el trazador enzimático **17-HRP**.

A esta altura del trabajo de esta tesis doctoral, un aspecto que cabe remarcar es que los resultados obtenidos son muy similares en todos los formatos y configuraciones inmunoquímicas estudiadas, lo que pone de manifiesto que las prestaciones del anticuerpo y el hapteno de competición desarrollados en esta tesis son prácticamente independientes del formato de inmunoensayo empleado. A modo de resumen la **Tabla 5.3** muestra la comparación de los diferentes parámetros de todas las configuraciones y formatos de inmunoensayo probados con los inmunoreactivos para QNs desarrollados en esta tesis.

Tabla 5.3. Parámetros de las diferentes configuraciones y formatos inmunoquímicos de tipo óptico estudiados utilizando los inmunoreactivos para QNs desarrollados en esta tesis.

Formato ^a	Indirecto(AT)	Directo (Ac)	Directo (AT)	Directo (ATM)	Directo (AcM)
Soporte	Microplaca	Microplaca	Microplaca	MP	MP
Inmunoreactivos	As171	As171	17-BSA	MP-17-BSA	MP-Ac171
	17-BSA	17-HRP	Ac171HRP	Ac171-HRP	17-HRP
Amax	1.67	2.10±0.24	0.600	1.679	1.814
Amin	0.07	0.03±0.01	0.026	0.081	0.052
IC ₅₀ ^b	0.35±0.04	0.91 ± 0.19	0.84 ± 0.39	0.88 ± 0.42	0.89 ± 0.41
Pendiente	-1.08	-1.53	-0.808	-0.799	-0.901
Rango lineal ^a	0.091-1.429	0.36-2.35	0.16-2.20	0.15-5.47	0.10-3.7
LOD ^b	0.040	0.20	0.060	0.052	0.034
R ²	0.998	0.997	0.985	0.984	0.985

^a Las iniciales entre paréntesis indican el inmunoreactivo inmovilizado. ^b expresado en µg/L.

5.3.4. ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO Y EFECTO MATRIZ PROVOCADO POR LA LECHE

Llegados a este punto y como las prestaciones de cada uno de los formatos desarrollados (ATM-ELISA y AcM-ELISA) eran muy similares, se decidió continuar adelante con el AcM-ELISA para su implementación en un inmunsensor amperométrico, ya la obtención de los inmunoreactivos marcados necesarios requería de un menor esfuerzo, tanto en términos de tiempo como de coste.

En una primera instancia se realizaron experimentos para evaluar la especificidad, con la finalidad de comprobar que el patrón de reconocimiento de la familia de QNs se mantenía al introducir las MPs en el ensayo. Para ello se prepararon curvas de calibrado para las QNs reguladas por la UE en PBSTCa y se ensayaron empleando el AcM-ELISA. Todas las QNs fueron reconocidas y en todos los casos el ajuste de las curvas de calibrado fue bueno ($R^2 \geq 0.985$). Como se puede observar en la **Tabla 5.4**, los valores de IC₅₀ son inferiores a 12.5 µg/L y todas las QNs son reconocidas en más de un 10 % respecto al CPF. Si se compara con los formatos de ELISA desarrollados previamente (véase **Tabla 3.4** para el formato indirecto y **Tabla 3.5** para el formato directo, en páginas 118 Y 122 respectivamente), en general se observa que en el AcM-ELISA hay un ligero aumento de los valores de IC₅₀ (excepto para el OXO) pero manteniéndose en todos los casos por debajo del LMR. Estos resultados apuntan a que en este formato se conserva el patrón de reconocimiento genérico de los inmunoreactivos desarrollados.

Tabla 5.4. Valores de IC₅₀ y porcentaje de reactividad cruzada de QNs utilizando el M-ELISA desarrollado con los inmunoreactivos **17-HRP** y **MP-Ac171**, y LMR permitidos en leche.

Compuesto	IC ₅₀ ^a	% RC ^b	LMR (en leche) ^a
Ciprofloxacino	1.31	100	100
Enrofloxacin	2.04	66	100
Danofloxacin	12.5	11	30
Difloxacin	2.34	70	P
Marbofloxacino	8.93	16	75
Flumequina	4.82	22	50
Ácido Oxolínico	4.30	24	P

LMR: Límite máximo de residuo, **P:** Prohibido en leche, ^a expresado en µg/L. ^b calculado utilizando IC₅₀ expresado en nM utilizando la fórmula: $\%RC = \frac{IC_{50} \text{ ciprofloxacino}}{IC_{50} \text{ quinolona}} \times 100$.

Seguidamente se hicieron una serie de estudios dirigidos a valorar el efecto matriz provocado por la leche. Como se ha descrito en los capítulos anteriores esto se evaluó mediante la preparación de curvas de calibrado CFX en leche y leche diluida varias veces en tampón PBSTCa, que serían posteriormente medidas en el AcM-ELISA desarrollado. Como se puede observar en la **Figura 5.8** en este caso no se observa ningún efecto matriz, obteniéndose curvas prácticamente idénticas, incluso al utilizar leche sin diluir.

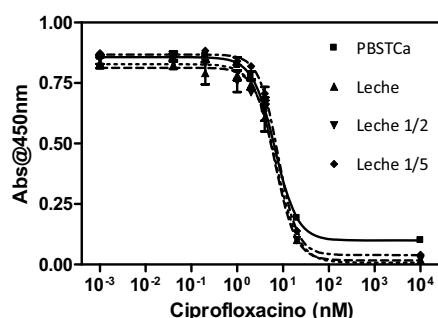


Figura 5.8. Efecto matriz ejercido por la leche sobre el AcM-ELISA directo para QNs. Resultados obtenidos como resultado de medir las curvas de calibración de ciprofloxacino, preparadas en leche y diluidas con PSTCa. Los puntos corresponden a la media de la respuesta de cada uno de los estándares en dos pocillos.

Este hecho evidencia las ventajas del uso de MPs en el ensayo y abre la posibilidad de analizar directamente muestras de leche entera con el formato AcM-ELISA directo, sin necesidad de ningún tipo de pretratamiento de la muestra, lo que permite mantener una muy buena detectabilidad.

5.3.5. MAGNETO INMUNOSENSOR AMPEROMÉTRICO

Finalmente se procedió a la implementación de este ensayo en un sensor de tipo amperométrico. Tal como se ha explicado en la sección de objetivos de este capítulo (**Sección 5.2**), en esta configuración la señal obtenida consiste en la corriente eléctrica generada a potencial fijo. La inmunoreacción transcurre en solución bajo agitación, al igual que en AcM-ELISA. Tras 30 minutos en contacto con el resto de reactivos (analito y trazador enzimático **17-HRP**), las **MP-Ac171** son lavadas con ayuda de una gradilla magnética para eliminar el

exceso de reactivos, y posteriormente son capturadas por un electrodo compuesto de grafito y resina epoxi con un imán en su interior (véase **Figura 5.5**). Dicho electrodo actúa a su vez como electrodo de trabajo en una configuración de tres electrodos (referencia, auxiliar y trabajo) a la hora de medir la corriente eléctrica generada por el sistema. Los detalles experimentales vienen descritos en la sección experimental de la **publicación V (Sección 5.4)**.

Así pues mediante experimentos bidimensionales se ajustaron las concentraciones óptimas de **MP-Ac171** y el trazador enzimático **17-HRP** para obtener una intensidad de corriente de entre 7 y 10 μA en ausencia de analito. De esta manera se preparó una curva de calibrado de CIPFX en PBSTCa y se midió la respuesta generada utilizando este sistema. Como se puede observar en la **Figura 5.9**, la detectabilidad del ensayo se mantiene respecto al AcM-ELISA en términos de IC_{50} y LOD, aunque la pendiente obtenida fue inferior (para comparación véase tabla 5.3).

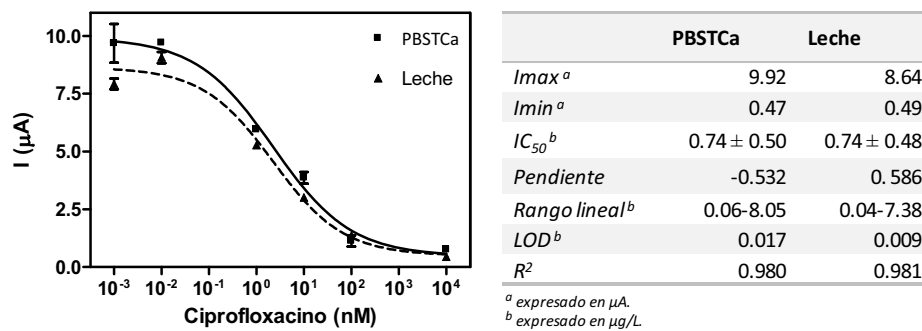


Figura 5.9. Curvas de calibrado obtenidas con el inmunesensor amperométrico utilizando las **MP-Ac171** y el trazador enzimático **17-HRP**. La gráfica muestra los resultados en leche y en tampón. Los patrones se prepararon en leche sin diluir, y fueron directamente medidos con el magnetoimmunesensor, sin ninguna otra preparación de muestra. Cada concentración fue medida por duplicado con el mismo electrodo. La tabla muestra los parámetros de la curva de ajuste obtenida en cada caso.

Con el objetivo de evaluar el efecto matriz de la leche, se realizó el mismo experimento preparando la curva de calibrado en leche directamente. Como se muestra en la **Figura 5.9**, dicho efecto es mínimo, al igual que ocurría en el AcM-ELISA. Este resultado pone de manifiesto la posibilidad de analizar muestras de leche directamente utilizando el presente inmunesensor, con una IC_{50} y LOD por debajo de los LMRs fijados por la UE.

El inmunesensor descrito en este capítulo constituye una alternativa a los anteriores métodos inmunoquímicos reportados en los anteriores capítulos. Mientras que las técnicas ELISA y M-ELISA son excelentes instrumentos para el cribado simultáneo de muchas muestras, ya que permiten trabajar de forma paralela, el presente inmunesensor supone una opción para el caso de tener que realizar medidas puntuales de pocas muestras. Además su formato permite su uso como dispositivo de medida *in situ*, por lo que podría ser útil para la realización de medidas en granja o en otros puntos de recogida de leche. Se trata de un sistema rápido que permite realizar medidas de forma muy simple en tan solo 5 min tras la etapa de incubación.

5.4. Publicación V: Detección Electroquímica de Antibióticos de Tipo Fluoroquinolona Utilizando un Magneto Inmunosensor

La siguiente publicación presenta el desarrollo de un magneto inmunosensor amperométrico para la determinación de QNs en leche. El inmunosensor desarrollado está basado en el uso de partículas magnéticas biomodificadas con un anticuerpo con selectividad de clase para la familia de las QNs, un trazador enzimático y electrodo magnético compuesto de grafito y resina epoxi. Tras la reacción inmunoquímica, las partículas magnéticas son capturadas por el magneto electrodo que contiene un imán, que a su vez actúa como transductor durante la detección electroquímica. A pesar de la complejidad de la leche, el uso de partículas magnéticas permite la eliminación de las posibles interferencias causadas por los componentes de la matriz; de ahí que el inmunosensor desarrollado podría realizar mediciones cuantitativas directamente en muestras de leche, sin ningún tratamiento de muestra adicional o etapa de extracción. El inmunosensor desarrollado es capaz de detectar hasta siete QNs diferentes muy por debajo de los LMR definidos por el UE para la leche; por ejemplo, el CPFX es detectado directamente en la leche con una IC_{50} de 0,74 $\mu\text{g/L}$ y un LOD de 0,009 $\mu\text{g/L}$. La estrategia presentada es muy prometedora para un análisis *in situ* rápido, simple y rentable de QNs de en muestras complejas.

Article

Electrochemical Detection of Fluoroquinolone Antibiotics in Milk Using a Magneto Immunesensor

Daniel G. Pinacho ¹, Francisco Sánchez-Baeza ^{1,†}, María-Isabel Pividori ² and María-Pilar Marco ^{1,*}

¹ Nanobiotechnology for Diagnostics Group (Nb4D), IQAC-CSIC and CIBER de Bioingeniería, Biotomateriales y Nanomedicina, c/ Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain; E-Mails: daniel.gonzalez@iqac.csic.es (D.G.P.); francisco.sanchez@iqac.csic.es (F.S.-B.)

² Sensors & Biosensors Group, Autonomous University of Barcelona (UAB), 08013 Bellaterra, Barcelona, Spain; E-Mail: Isabel.Pividori@uab.cat

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: pilar.marco@iqac.csic.es; Tel.: +34-934-006-100; Fax: +34-932-045-904.

† This work is dedicated to the memory of Dr. Francisco Sánchez-Baeza.

Received: 24 May 2014; in revised form: 4 August 2014 / Accepted: 25 August 2014 /

Published: 28 August 2014

Abstract: An amperometric magneto-immunesensor (AMIS) for the detection of residues of fluoroquinolone antibiotics in milk samples is described for the first time. The immunesensor presented combines magnetic beads biomodified with an antibody with a broad recognition profile of fluoroquinolones, a haptenized enzyme and a magnetic graphite–epoxy composite (m-GEC) electrode. After the immunochemical reaction with specific enzyme tracer, the antibody biomodified magnetic beads are easily captured by an electrode made of graphite-epoxy composite containing a magnet, which also acts as transducer for the electrochemical detection. In spite of the complexity of milk, the use of magnetic beads allows elimination of potential interferences caused by the matrix components; hence the AMIS could perform quantitative measurements, directly in these samples, without any additional sample cleanup or extraction step. The immunesensor is able to detect up to seven different fluoroquinolones far below the MRLs defined by the UE for milk; for example ciprofloxacin is detected directly in milk with an IC_{50} of 0.74 $\mu\text{g/L}$ and a LOD of 0.009 $\mu\text{g/L}$. This strategy offers great promise for rapid, simple, cost-effective, and on-site analysis fluoroquinolones in complex samples.

Keywords: electrochemical immunosensor; fluoroquinolone antibiotics; antimicrobial residues; magnetic beads; food safety; milk

1. Introduction

In modern intensive farming systems, the introduction of veterinary pharmaceuticals, pesticides and complex animal feeds has been critical to enhance the productivity by increasing the density of animals in the farms. In this sense, antibiotics are used for therapy, prevention and control of diseases, as well as growth promoters. The use of antibiotics is a determinant factor in the selection of resistance in bacteria and the dosage of antimicrobials is closely related to the rate of antimicrobial resistance developed in bacteria [1–3]. Development of resistance in zoonotic bacteria constitutes a public health concern, primarily due to the increased risk of treatments failure of human diseases. Food animals and foodstuffs are traded worldwide, thus, the occurrence of antimicrobial resistance is a worldwide problem.

Fluoroquinolones (FQs) are synthetic antibiotics with a broad spectrum of antimicrobial activity that have been extensively used in veterinary medicine to treat or prevent bacterial infections in food-producing animals, aquaculture, and also pets. Several FQs are available for therapy of animals in many countries; however, the usage of these antibiotics differs greatly as regards animal species, indications, label indications, and geographic spread [4]. Because of the concerns regarding drug residues entering the food chain and contaminating environment, and consequently contributing to bacterial resistance development, maximum residue levels (MRLs) for the detection of FQ in several matrices from diverse animal species have been established by the European Commission (Council regulation 2377/90/EC [5] and council directive 96/23/EC [6]), as well as the requirements of the analytical methods that public health control and veterinary laboratories should use for this purpose (Commission decision 2002/657/EC [7]). In order to fulfill these requirements, and with the aim to protect the public health, official laboratories should be able to efficiently process a high number of samples at a low cost. The most employed analytical methods for the determination of FQs antibiotics in foods of animal origin are high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to fluorescence, mass spectrometric and ultraviolet detection [8–10]. These methods are considered as “gold standard” and they are used as routine in many laboratories. However, the expensive equipment required and the need for sample treatment limits their implementation in some settings. Although they are very suitable for confirmation, their use for screening purposes of large numbers of test samples become expensive. As a consequence, development of rapid, inexpensive and sensitive high sample throughput or on-site analytical strategies would be desirable.

Antibodies based assays can provide the necessary reliability, low cost of the analysis/sample, ease of use, selectivity, and detectability to analyze small organic molecules. Moreover, the use of magnetic beads improves performance of the immunochemical reaction, due to an increase in the surface area, as well as achieving faster assay kinetics. Despite this increased surface area, matrix effect can be minimized due to their properties, as well as the improved washing and separation steps [11,12]. On the other hand, electrochemical sensors have several advantages, such as their simplicity, portability, and low cost, giving them attractive sensing characteristics for their use as alternative

analytical methods, with accurate and fast responses without sample pre-treatment, opening up the possibility of direct on-site analysis with intuitive devices [13]. In this sense, electrochemical immunosensors combine the high sensitivity of the electrochemical transducers with the high selectivity of antibodies, thus, becoming powerful analytical tools for the detection of antibiotic residues [14,15]. Recently, Conzuelo *et al.* have been developed an immunosensor for the detection of tetracyclines antibiotics in milk using magnetic beads. In this case, they used a homemade magnet holder block to capture the magnetic beads onto a disposable commercial screen-printed electrodes, achieving good detectability in milk diluted two times in buffer [16].

In this paper an amperometric magneto-immunosensor (AMIS) based on the use of specific antibody biomodified magnetic beads, which can be captured by a magnetic graphite–epoxy composite (m-GEC) electrode is presented as a rapid, sensitive, simple, inexpensive, and user-friendly analytical method for the detection of fluoroquinolone antibiotics in milk. The device uses an enzyme tracer to generate electrochemical species and shows a broad selectivity profile for this antibiotic family. Fluoroquinolone residues can be directly detected in milk samples, without the need of previous cleanup or purification steps.

2. Experimental Section

2.1. Materials and Instruments

Amperometric measurements were performed with a VersaSTAT 3 potentiostat (Princeton Applied Research, TN, USA). A three-electrode setup was used comprising a XM120 8 mm platinum plate auxiliary electrode (Radiometer Analytical SAS, France), double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 M KCl as the external reference solution and a working electrode (magnetic graphite–epoxy composite (m-GEC)). The m-GEC was prepared using graphite powder with a particle size of 50 μm (BDH, UK) and Epo-Tek H77 (epoxy resin from Epoxy Technology, USA). Tosylactivated magnetic beads (Dynabeads® M-280 Tosylactivated) were purchased from Invitrogen Dynal AS (Oslo, Norway). Polystyrene microtiter plates were purchased from Nunc (Maxisorb, Roskilde, DK). Washing steps in ELISA were carried out using a SLT 96PW microplate washer (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). The electrochemical measurements performed were analyzed using VersaStudio software (Princeton Applied Research, TN, USA). To perform the optical measurements a SpectramaxPlus microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) was used. The calibration curves were fitted to a four-parameter logistic equation using the Graph Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The magnetic separation during the washing steps was performed using a magnetic separator Dynal MPC-S (Dynal Biotech ASA, Norway) or 96-Well Plate Separation Rack (Cortex Biochem, CA, USA). The pH and conductivity of all buffers and solutions were measured with a pH meter pH 540 GLP and a conductimeter LF 340, respectively (WTW, Weilheim, Germany).

2.2. Chemicals and Immunochemicals

The immunoreagents used in this study (Ab171 and 11-BSA), as well as the fluoroquinolone hapten 11 were produced as previously described [17]. Ab171 was used as a pure IgG fraction of the

corresponding antisera (As171) and it was obtained by ammonium sulfate precipitation [18] followed by affinity chromatography purification (HiTrap Protein A HP, 1 mL, Amersham Biosciences, UK). Horseradish peroxidase (HRP) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (St. Louis, MI, USA). Ciprofloxacin was kindly provided by UQUIFA S.A (Lliça de Vall, Spain). The other fluoroquinolones used for crossreactivity studies were acquired from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). All the other chemical reagents used for the preparation of the bioconjugates, the biomodification of magnetic beads and the purification of the antibodies were of the highest available grade and were purchased from Fluka-Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) or Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions of different fluoroquinolones (0.01 M) were prepared in 0.05 M NaOH solution and stored at 4 °C for one month.

2.3. Buffers and Solutions

Phosphate-buffered saline (PBS) is 0.01 M phosphate buffer on a 0.8% saline solution, and the pH is 7.5. PBST is PBS with 0.05% Tween 20. PBST_{Ca} is PBST with 1 mM calcium chloride. Coating buffer is 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. Citrate buffer is a 0.04 M solution of sodium citrate, pH 5.5. The substrate solution for optical measurements contains 0.01% TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and 0.004% H₂O₂ in citrate buffer. For electrochemical measurements, PBS_E (0.1 M phosphate buffer, with 0.1 M KCl, pH 7) was used. During biomodification of the magnetic beads, PBS containing 0.1% (w/v) BSA (PBS_{BSA}), and 0.2 M tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), pH 8.5 containing 0.1% (w/v) BSA (Tris_{BSA}) were used. All buffer solutions were prepared with ultrapure water (UPW, D11971 Barnstead).

2.4. Construction of Magneto Graphite–Epoxy Composite (m-GEC) Electrodes

The magnetic graphite–epoxy composite (m-GEC) electrodes were constructed following the protocol previously reported for electrochemical immunosensing [19–21]. Briefly, epoxy resin and graphite powder were hand-mixed in a 1:4 (w/w) ratio. Then, a cylindrical PVC sleeve body (6 mm i.d.), with a copper plate as electrical contact, was filled with the resulting paste and a small neodymium magnet (3 mm i.d.) was placed into the center of this electrode. After that, tightly packed the GEC paste in the electrode body gap, the m-GEC electrodes were cured at 40 °C for 1 week to obtain a rigid composite. Before each measurement, the electrode surface was renewed by a simple polishing procedure, wetted with UPW, and then thoroughly smoothed with abrasive paper.

2.5. Preparation of the Enzyme Labeled Immunoreagents

HRP was covalently coupled to Ab171 and fluoroquinolone hapten 11 through a two steps procedure, previously described by Abuknesha [22], with modifications.

Step 1: Activation of HRP. A solution of HRP (9 mg, 0.225 μmol) in coating buffer (1.8 mL) was added to cyanuric chloride (900 μg, 4.9 μmol) and the mixture was stirred during two hours at room temperature (RT). Afterwards, the mixture was dialyzed (4 × 0.5 mM PBS and 1 × UPW) and finally freeze-dried to obtain 8.02 mg of HRP_{CC} (89% of yield).

Step 2: Bioconjugation. A solution of Ab171 (1.8 mg, 0.012 μmol) in coating buffer (250 μL) and a solution of hapten 11 (0.6 mg, 1.95 μmol) in DMF (60 μL) were added to a two solutions of HRP_{CC} (3 mg, 0.07 μmol) in coating buffer (500 and 690 μL respectively) and the mixtures were stirred for 4 h at 37 °C. After that, the mixture of the enzyme labeled antibody was purified by 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation [18] and the precipitate was restored with PBS, pH 7.5. Finally, the solutions of enzyme labeled antibody and enzyme tracer were dialyzed (4×0.5 mM PBS and $1 \times$ UPW) and freeze-dried to obtain 1.23 mg of Ab171-HRP (53% of yield) and 2.11 mg of 11-HRP (70% of yield). All immunoreagents were stored at -80 °C and unless otherwise indicated, working aliquots were stored at 4 °C in PBS at 1 mg/mL.

2.6. Preparation of the Biomodified Magnetic Beads

The 11-BSA bioconjugate and the previously purified Ab171 were covalently coupled to MB-Tosyl magnetic beads to obtain the corresponding modified magnetic beads 11-BSA-MB and Ab171-MB. According to the manufacturer specifications, covalently biomodified magnetic beads can be stored at 4 °C for a minimum of three months without a loss of activity. A volume of 350 μL (30 mg/mL, 0.1–0.2 mmol/g) of tosyl-modified magnetic beads (10.5 mg), were washed twice with 1 mL of coating buffer, avoiding foaming. After that, the magnetic beads were suspended in coating buffer (850 μL) and a solution of either 11-BSA or Ab171 (1 mg/mL, 150 μL) was then added. The magnetic beads were incubated 48 h at RT with a slow orbital rotation in order to avoid bead sedimentation. The modified beads were then washed twice in PBS_{BSA} for 5 min at 4 °C and with Tris_{BSA} for 24 h at RT with slow orbital rotation and washed again with PBS_{BSA} for 5 min at 4 °C. Finally, the magnetic beads were resuspended in PBS_{BSA} to reach a 15 mg/mL stock solution and were stored at 4 °C. The yield of the coupling was evaluated by means of a UV test ($\delta = 280$ nm), in which the protein concentration in the supernatant was analyzed before and after the bioreaction. The biomodification yield, calculated as described above, was $82.5 \pm 1\%$ for 11-BSA-MB and $92 \pm 2\%$ for Ab171-MB.

2.7. ELISA and *m(magneto)*-ELISA Protocol

ELISA. Two different competitive formats were assessed in this study, coating antigen format (CA_f) comprising the immunoreagents Ab171-HRP and 11-BSA and enzyme tracer format (ET_f) comprising the reagents 11-HRP and As171.

Microtiter plates were coated with 11-BSA (0.5 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{L/well}$) and As171 (8000 times diluted, 100 $\mu\text{L/well}$) for CA_f and ET_f, respectively, both of them in coating buffer at RT for 4 h and covered with adhesive plate sealers. Then, the plates were washed with PBST (four times, 300 $\mu\text{L/well}$) and ciprofloxacin standard solutions (from 0.01 nM to 10,000 nM, in PBST_{Ca}, 50 $\mu\text{L/well}$) were added to the microtiter plates, followed by the addition of Ab171-HRP (0.25 $\mu\text{g/mL}$ in PBST_{Ca}, 50 $\mu\text{L/well}$) and 11-HRP (0.25 $\mu\text{g/mL}$ in PBST_{Ca}, 50 $\mu\text{L/well}$) for CA_f and ET_f respectively. After 30 min, the plates were washed again, and the substrate solution was added (100 $\mu\text{L/well}$). Color development was stopped after 30 min at RT with 2 M H₂SO₄ (50 $\mu\text{L/well}$), and the absorbances were read at 450 nm.

m-ELISA. Two different competitive formats were assessed in this study, magneto coating antigen format (m-CA_f) comprising the immunoreagents Ab171-HRP and 11-BSA-MB and magneto enzyme tracer format (m-ET_f) comprising the reagents 11-HRP and Ab171-MB.

Ciprofloxacin standard solutions in PBST_{Ca} (50 µL, from 0.01 to 10,000 nM) were mixed with a suspension of the biomodified magnetic beads (50 µL, 0.3 mg/mL of 11-BSA-MB for m-CA_f and 0.125 mg/mL of Ab171-MB for m-ET_f) followed by the addition of the enzyme labeled immunoreagent solutions (50 µL, 0.5 µg/mL of Ab171-HRP for m-CA_f and 0.25 µg/mL of 11-HRP for m-ET_f). The competitive immunological reaction was allowed to proceed for 30 min at RT vigorously shaking. The magnetic beads were then washed with PBST (150 µL, three times) and the substrate solution (100 µL) was added and incubated again for 30 min at RT. The enzymatic reaction was stopped by adding 2 M H₂SO₄ (50 µL). Finally, the supernatants were removed from the magnetic beads and then added to a different plate for measuring the absorbance at 450 nm.

In both cases (ELISA and m-ELISA), the standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula $y = (A - B) / [1 + (X/C)^D] + B$, where A is the maximal signal, B the minimum signal, C the concentration producing 50% of the maximal signal, and D is the slope at the inflection point of the sigmoid curve. LOD values were obtained as 90% of A value, the maximal signal.

2.8. Specificity Studies

Stock solutions of different fluoroquinolone antibiotics were prepared in 0.05 M NaOH at a concentration of 0.01 M. Standard solutions were prepared for each analyte in PBST_{Ca} (from 0.01 nM to 10,000 nM) and measured using the ELISA and m-ELISA, as described above. For all fluoroquinolones it was possible to build standard curves that fitted to the four-parameter equation mentioned above. The cross-reactivity values were calculated according to the equation: $(IC_{50} \text{ Ciprofloxacin} / IC_{50} \text{ tested compounds}) \times 100$.

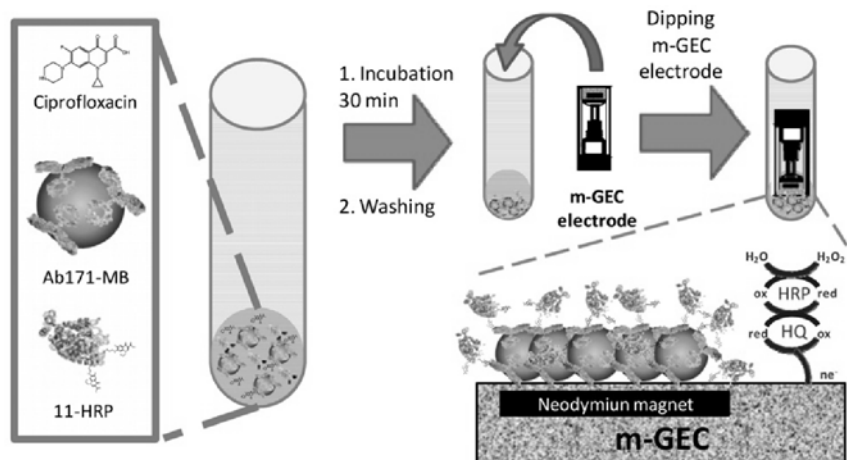
2.9. Amperometric Magneto Immunosensor (AMIS) Procedure

For electrochemical readout (AMIS), only the magneto enzyme tracer format (m-ET_f), comprising the reagents 11-HRP and Ab171-MB, was assessed. A schematic representation of the whole procedure is shown in Figure 1. All the steps were performed in 5 mL polypropylene tubes, and all the referred quantities in this protocol are the amount added per tube. After the incubation or washing steps, the magnetic beads were separated from the supernatant using a magnetic separation rack until the beads migrated to the sides of the tube and the liquid was clear (approximately 1 min).

Ciprofloxacin standard solutions (50 µL, from 0.01 to 10,000 nM in PBST_{Ca}) were placed in the polypropylene tubes and mixed with the Ab171-MB suspension (50 µL, 0.25 mg/mL in PBST_{Ca}) and the solution of 11-HRP (50 µL, 0.5 µg/mL in PBST_{Ca}), in this specific order, and incubated for 30 min at RT with gentle stirring. Afterwards, the magnetic beads were washed with PBST (3 × 300 µL), resuspended in PBST (160 µL) and captured by dipping the m-GEC electrode into the solution in the tubes just before the amperometric measurement in order to prevent undesired desorption of the protein complexes (see Figure 1). The magnetic beads-modified m-GEC was used as a working electrode to determine the amperometric signal by dipping the three-electrode setup in 20 mL of PBS_E. The electrochemical signal was recorded after the addition of the mediator (hydroquinone, HQ);

1.81 mM) and the enzyme substrate (hydrogen peroxide, 1.11 mM). The response was determined by polarizing the working electrode surface (m-GEC) at -0.150 V. As well as for ELISA and m-ELISA, the standard curve was fitted to a four-parameter logistic equation according to the formula (see above).

Figure 1. Scheme of the AMIS procedure for fluoroquinolones. Firstly, ciprofloxacin standards, Ab171-MB suspension and 11-HRP solution were mixed and incubated for 30 min with gentle stirring. After three washing steps using PBST buffer, performed with the aid of a magnetic rack, the modified magnetic beads are captured by the m-GEC. Then, the electrode is transported to the electrochemical cell using a three-electrode setup for the amperometric measurement.



2.10. Milk Matrix Effect

Bovine whole milk samples testing free of fluoroquinolones were provided by the Agencia Española para la Seguridad Alimentaria (AESAs; Spanish Agency for Food Security). Different dilutions of whole bovine milk were employed for generate ciprofloxacin standard curves. The curves obtained using ELISA, m-ELISA and AMIS procedures were compared with the curve prepared in PBST_{Ca} buffer in order to evaluate the matrix effect.

3. Results and Discussion

The AIMS presented here, is based on the use of an enzyme tracer, magnetic beads modified with antifuoroquinolone antibodies, and graphite–epoxy composite electrodes containing a magnet inside (m-GEC electrodes). The samples or standards of fluoroquinolones are mixed with the immunoreagents listed above, and after incubation, the immunocomplexes linked to the magnetic beads are separated from the free fraction of the enzyme tracer with the support of a magnetic rack and later on captured with the m-GEC (see Figure 1). The amperometric signal is determined by using the magnetic beads-modified m-GEC electrode as a working electrode in a three-electrode setup, recording the current intensity produced by the enzymatic reaction catalyzed by the HRP of the immunocomplex. The amperometric signal is related to the amount of enzyme tracer bound to the magnetic beads

captured by the electrode that is inversely proportional to the amount of analyte present in the sample. The enzyme oxidizes the substrate (H_2O_2 to H_2O) at the same time that hydroquinone (HQ) is oxidized to quinone (Q), and subsequently reduced again by the electrode applied potential (see Figure 1).

3.1. Preparation and Characterization of Enzyme Labeled Immunoreagents

Recently, our group has developed generic antibodies against fluoroquinolones and an indirect competitive ELISA assay able to detect, at least, the most important fluoroquinolones used in the veterinary field with values of IC_{50} and LOD below the MRLs established by the UE for several tissues [17]. This ELISA format comprises a competition step between the coating antigen and the analyte for the antibody, and also implies a second step using a secondary anti-antibody labeled with an enzyme for the generation of the final signal. With the aim to avoid this second step, halving the analysis time, two new enzyme labeled immunoreagents were prepared and evaluated by ELISA. The first one was prepared by direct coupling of HRP to the antifuoroquinolone antibody (Ab171) and the second one by coupling the same enzyme to the fluoroquinolone hapten (11) that showed the best performance in the ELISA previously developed.

For the preparation of the labeled specific antibody, two methodologies were employed. In a first approach the sugars of the antibodies were oxidized by sodium periodate, in order to obtain aldehyde functionalities able to react with the amines of the HRP [23]. In this case the enzyme labelled antibody obtained showed a high degree of non-specific absorption when it was characterized by ELISA assay (data don't show), for this reason this strategy was discarded. In a second approach, cyanuric chloride was employed as crosslinker using the different reactivity of the chlorine atoms [22]. The most reactive chlorine moiety of the linker reacted, on a first step, with the amines of the HRP at RT. After purification of the activated HRP, the second reactive chlorine of the crosslinker was reacted with the amines of the lys residues of the antibody at 37 °C. In this case an enzyme labeled antibody (Ab171-HRP) showing very good performance in ELISA assay was obtained (see Figure 2 and Table 1). Thus, in the same way, an enzyme tracer (11-HRP) was prepared by the reaction of the amine group of the fluoroquinolone hapten 11 with the chlorine atom of the activated HRP a 37 °C. Both bioconjugates were tested by ELISA using distinct formats (CA_f , coating antigen and ET_f , enzyme tracer formats) The CA_f ELISA assay, performed using plates coated with the competitor 11-BSA and Ab171-HRP in solution (see experimental Section 2.7), showed a very good detectability for ciprofloxacin with an IC_{50} of 0.84 $\mu\text{g/L}$ and a LOD of 0.06 $\mu\text{g/L}$. The enzyme tracer was evaluated using an ET_f ELISA, using plates coated with the antifuoroquinolones antisera (As171) without previous purification (see experimental Section 2.7). Again, a very good detectability was accomplished (see Figure 2 and Table 1), reaching an IC_{50} of 0.86 $\mu\text{g/L}$ and a LOD of 0.09 $\mu\text{g/L}$ for ciprofloxacin.

The yield of the bioconjugation for 11-HRP (63%) was higher than for the Ab171-HRP (47%), maybe due to a minor purification steps involved during the process. Both ELISA formats show a very close detectability in terms of IC_{50} and LOD for ciprofloxacin, and similar to the previous ELISA developed ($\text{IC}_{50} = 0.35 \mu\text{g/L}$, $\text{LOD} = 0.04 \mu\text{g/L}$), demonstrating that there was no loss of activity after labeling of the specific antibody. On the other hand, the similarity found between both formats indicates that the assay is not dependent on the format.

Figure 2. ELISA calibration curves of the different ELISA formats using the immunoreagents produced (a) CA_r in blue; (b) TE_r in red. Each point was the average of at least three-well replicates, and the assays were run on two different days.

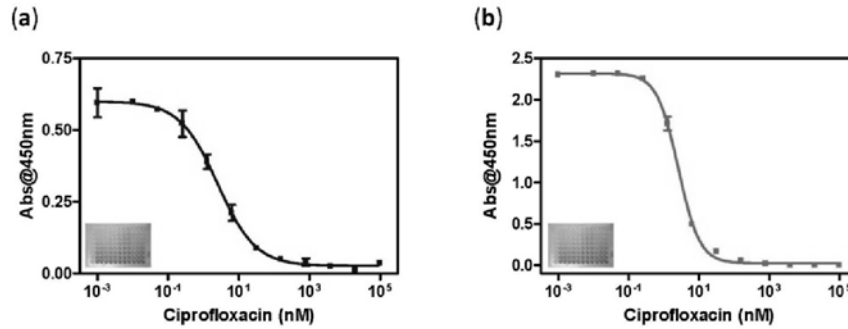


Table 1. Features of the different ELISA formats using the immunoreagents produced.

	CA _r (11-BSA/Ab171-HCH)	TE _r (As171/11-HCH)
A _{max}	0.600	2.318
A _{min}	0.026	0.023
IC ₅₀ (μg/L)	0.84 ± 0.39	0.86 ± 0.34
Slope	-0.808	-1.436
Dynamic range (μg/L)	0.16–2.20	0.33–2.35
LOD (μg/L)	0.060	0.086
R ²	0.9854	0.9945

3.2. Preparation and Characterization of Biomodified Magnetic Beads

The main advantages of the use of magnetic beads in electrochemical immunosensors are their easy manipulation, the increase in the surface area, faster assay kinetics, improved washing and separation steps, the possibility of renewing the surface of the electrode and perspectives for system automation and miniaturization [11,12]. In this sense, two types of biomodified magnetic beads were prepared using tosyl-activated magnetic beads, ones by covalent binding of the Ab171 and others by covalent binding of the coating antigen 11-BSA. The biomodified magnetic beads were characterized by m-ELISA and both types of beads show a very good performance in m-ELISA, keeping the detectability that the same immunoreagents showed in ELISA (see Figure 3 and Table 2).

The yield of the biomodification was checked by testing the protein content from the supernatant before and after the bioconjugation using UV at 280 nm, by interpolation the value of supernatant into a calibration line built using the corresponding protein (Rabbit IgG and BSA). In both cases was higher than 80%.

As in the case of ELISA, the m-ELISA parameters found were similar for both formats. Since production of 11-HRP was more cost and time effective, the TE_r was selected to continue with the development of the AIMS, using the Ab171-MB.

Figure 3. m-ELISA calibration curves of the different ELISA formats using the immunoreagents produced and the biomodified magnetic beads. (a) CA_f, in blue; (b) TE_f, in red. Each point was the average of at least three-well replicates, and the assays were run on two different days.

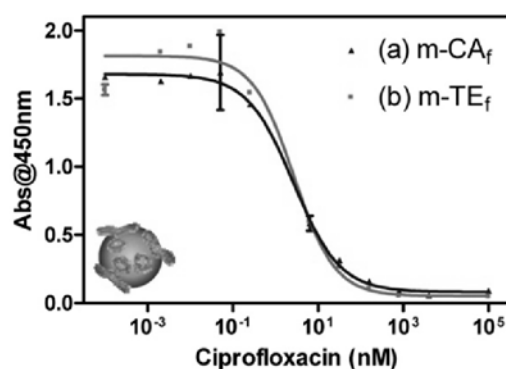


Table 2. Features of the different m-ELISA formats using the immunoreagents produced and the biomodified magnetic beads.

	m-CA _f (11-BSA-MB/Ab171-HCH)	m-TE _f (Ab171-MB/11-HCH)
Amax	1.679	1.814
Amin	0.081	0.052
IC ₅₀ (μg/L)	0.88 ± 0.42	0.89 ± 0.41
Slope	-0.799	-0.901
Dynamic range (μg/L)	0.15–5.47	0.10–3.73
LOD (μg/L)	0.052	0.034
R ²	0.984	0.985

Table 3. Values of IC₅₀ and cross-reactivity percentage of related fluoroquinolone compounds in the ELISA and m-ELISA.

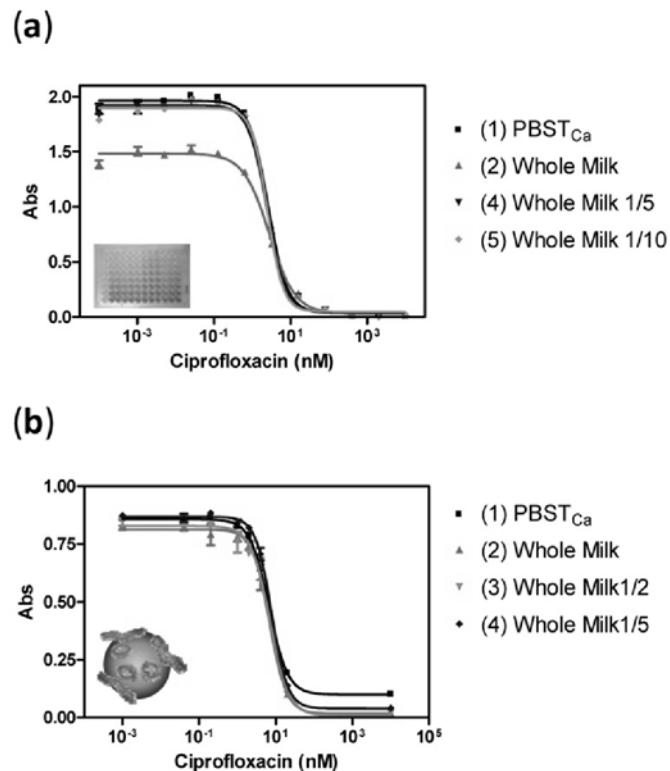
	ELISA		m-ELISA		MRL [24]
	IC ₅₀ [μg/L]	%CR	IC ₅₀ [μg/L]	%CR	In Milk [μg/L]
Ciprofloxacin	0.93	100	1.31	100	100
Enrofloxacin	1.23	82	2.04	66	100
Danofloxacin	7.34	14	12.5	11	30
Difloxacin	1.42	86	2.34	70	Banned
Marbofloxacin	2.56	41	8.93	16	75
Flumequine	1.94	39	4.82	22	50
Oxolinic Acid	7.01	11	4.30	24	Banned

3.3. Specificity Assay

In order to prove that the generic pattern of fluoroquinolone recognition was maintained in the magneto amperometric immunosensor, the specificity of the new immunoreagents was tested using the TE_f. Calibration curves for fluoroquinolones regulated by the UE were built in PBST_{Ca} buffer and were

run using ELISA and m-ELISA. For both assays, the standard curves for all fluoroquinolones were fitted to the four-parameter equation mentioned above with very good correlation coefficients (≥ 0.985). Table 3 shows the values of IC_{50} , cross reactivity percentage, with respect to the ciprofloxacin and the MRLs values, fixed by UE for milk. Detectability were very similar for both assays and close to the indirect ELISA previously reported [17], with a slight increase of IC_{50} for m-ELISA respect to the microplate-based ELISA except for the oxolinic acid. In all cases the IC_{50} values were lower than $10 \mu\text{g/L}$ and seven fluoroquinolones congeners were recognized at concentrations below to the MRLs established by the UE in milk.

Figure 4. Milk matrix effect using (a) ELISA and (b) m-ELISA for the TE_f . Curves were built in (1) $PBST_{Ca}$ buffer, (2) Whole milk, (3) Whole milk diluted two times in $PBST_{Ca}$ buffer, (4) Whole milk diluted five times in $PBST_{Ca}$ buffer and (5) Whole milk diluted 10 times in $PBST_{Ca}$ buffer. Each point was the average of at least three-well replicates, and the assays were run on two different days.



3.4. Milk Matrix Effect

The term matrix effect is defined as the combined effect of all components of the sample other than the analyte on the measurement of the quantity [25]. Milk is a complex matrix composed by thousands of compounds, including high contents of fat, protein, carbohydrates, and minerals [26], which can

affect the antibody recognition event. For this reason, the matrix effect was evaluated in whole milk free of fluoroquinolones by preparing standard curves of ciprofloxacin in milk, and milk diluted several times in PBST_{Ca} buffer, and running them in ELISA and m-ELISA. The calibration curves obtained under such conditions were compared to that built in just PBST_{Ca} buffer.

In ELISA assay, the matrix effect observed consisted in a decrease of the 25% of the maximum absorbance when the calibration curve was built directly in whole milk, while the calibration curves built in milk diluted more than five times in buffer were parallel to the one built in buffer (see Figure 4). Despite the decrease in maximum absorbance, the IC₅₀ remains constant with values of 0.87 µg/L for buffer and 0.92 µg/L for milk. Regarding m-ELISA assay, no matrix effect was observed, even in raw milk without any dilution. The calibration curves showed a perfect parallelism to the buffer curve (see Figure 4). The fact that the matrix effect was fully eliminated in m-ELISA reveals the advantages of using magnetic particles in the assay and suggests the possibility of directly analyzing whole milk samples with m-ELISA format without any kind of sample pretreatment, allowing us to keep a very good detectability.

3.5. Amperometric Magneto Immunosensor

Electrochemical readout for the implementation of the AMIS was addressed once the reagents (enzyme tracer and modified magnetic beads) were fully characterized by ELISA and m-ELISA. From two-dimensional experiments, optimum concentrations of Ab171-MB (0.25 mg/mL) and 11-HRP (0.5 µg/mL) were adjusted to obtain a final current of 7–10 µA after 30 min of immunochemical reaction in absence of analyte. Standard solutions of ciprofloxacin (from 0.01 to 10,000 nM in PBST_{Ca} buffer) were mixed with the biomodified magnetic beads Ab171-MB and 11-HRP (see experimental Section 2.9), incubated for 30 min and, captured with the m-GEC. Measurement of the immunocomplexes formed was performed in the electrochemical cell. The detectability of the AMIS in buffer, in term of its IC₅₀ recorded was 0.74 µg/L, while the LOD, in term of the IC₈₀, was 0.02 µg/L (see Table 4). The same experiment was performed preparing the same standard solutions in undiluted whole milk to check if the matrix affected the electrochemical readout, obtaining an IC₅₀ of 0.74 µg/L, while the LOD was 0.009 µg/L (see Table 4), which indicated that the results obtained by the m-ELISA could be reproduced also with the immunosensor. Figure 5 shows the curves generated, in buffer and in milk, demonstrating the absence of significant non specific interferences caused by the milk in the AMIS, as in the case of m-ELISA. Both calibration curves, the one prepared in buffer and the one prepared in milk are almost identical, opening the possibility to prepare the calibration curves in buffer. Moreover, since the LOD is much below of the MRL values established by the EC, the milk will have to be diluted with buffer in order to use the present immunosensor for screening purposes, reducing even more the probability to produce non specific interferences in the assay.

Comparing the parameters obtained in m-ELISA and in AMIS, IC₅₀ and LOD are quite similar, only the slope of the curve is lower in the case of AMIS. Thus, we can conclude that using the AMIS developed it is possible to analyze directly fluoroquinolone residues milk samples without any sample treatment.

Figure 5. Calibration curves for ciprofloxacin with electrochemical readout using AMIS. (a) In PBST_{Ca} in red (b) In whole milk in green. Each point was the average of at least three-well replicates, and the assays were run on two different days.

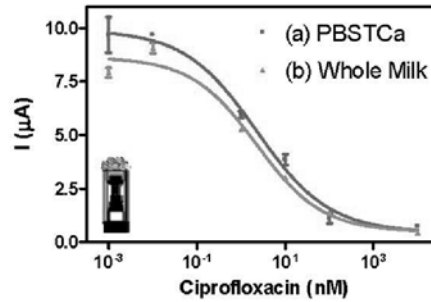


Table 4. Features of the amperometric magneto-immunosensor (AMIS) in PBST_{Ca} buffer and whole milk samples using ciprofloxacin as standard.

	PBST _{Ca}	Whole Milk
I _{max} (µA)	9.916	8.641
I _{min} (µA)	0.472	0.492
IC ₅₀ (µg/L)	0.74 ± 0.50	0.74 ± 0.48
Slope	-0.532	-0.586
Dynamic range (µg/L)	0.063–8.05	0.043–7.38
LOD (µg/L)	0.017	0.009
R ²	0.980	0.981

On the other hand, several samples can be simultaneously processed with the aid of magnetic racks. In this work, up to 24 samples have been measured at the same time in 4.5 h.

4. Conclusions

An electrochemical magneto-immunosensor for the detection of fluoroquinolone antibiotics in milk has been developed. Time of the analysis has been decreased at half by the use of two new enzyme labeled immunoreagents, prepared by covalent binding of antibody and hapten for fluoroquinolones to the enzyme HRP using cyanuric chloride as crosslinker. In addition, magnetic beads have been biofunctionalized using fluoroquinolone specific antibodies and antigen bioconjugates. All immunoreagents, including magnetic beads, have been characterized by ELISA and m-ELISA using two formats, ET_F and CA_F. The parameters extracted from this characterization indicate that detectability is not dependent on the format or type of assay. Studies of selectivity indicate that the immunoreagents developed are able to detect a significant number of the fluoroquinolone congeners regulated by UE with values of IC₅₀ below 10 µg/L. The use of magnetic beads completely eliminates the matrix effect caused by milk due to improvement washing steps and better kinetic profile during the immunochemical reaction. Samples of milk can be directly analyzed without any sample treatment or dilution using AMIS approach and also using m-ELISA for high-throughput screening purposes,

both of them with excellent detection limits (LOD for ciprofloxacin 0.009 µg/L for AMIS and 0.034 µg/L for m-ELISA). The simplicity of the electrochemical magneto immunosensor presented here makes it suitable for rapid and cheap semiquantitative and quantitative on-site analysis of fluoroquinolones in milk by nonqualified personnel.

Acknowledgments

This work has been supported by the Ministry of Science and Innovation (Spain) (Contract number AGL2008-05578-C05-01 and by the European Community (FP7-FOOD-2007-211326 and FP7-OCEAN-2013-1-614168). The Nb4D group is a consolidated Grup de Recerca de la Generalitat de Catalunya and has support from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació la Generalitat de Catalunya (expedient 2014 SGR 1484). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&I Plan 2008–2011, IniciativaIngenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions and is financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Foundation. DG had a fellowship from the Fundación EROSKI.

Author Contributions

Daniel G. Pinacho performed the experiments; Daniel G. Pinacho, Francisco Sánchez-Baeza and María-Pilar Marco, designed research, Daniel G. Pinacho analyzed data and wrote the paper. Francisco Sánchez-Baeza and María-Pilar Marco corrected the paper. María-Isabel Pividori designed and fabricated the Magneto Graphite–Epoxy Composite (m-GEC) Electrodes.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Barbosa, T.M.; Levy, S.B. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist. Updat.* **2000**, *3*, 303–311.
2. Sarmah, A.K.; Meyer, M.T.; Boxall, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **2006**, *65*, 725–759.
3. Ungemach, F.R.; Müller-Bahrdrdt, D.; Abraham, G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, *296*, 33–38.
4. *Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health*; WHO: Geneva, Switzerland, 2–5 June 1998; p. 11.
5. Council regulation (EEC) no 2377/90 of 26 June 1990. Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Communities* **1990**, *L224*, 1–8.

6. Council directive 96/23/ec of 29 April 1996. On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Communities* **1996**, *L125*, 10–32.
7. Commission 2002/657/EC. Commission decision of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Communities* **2002**, *L221*, 8–36.
8. Andreu, V.; Blasco, C.; Picó, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 534–556.
9. Hernandez-Arteseros, J.A.; Barbosa, J.; Compano, R.; Prat, M.D. Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A* **2002**, *945*, 1–24.
10. Saleh, G.A.; Askal, H.F.; Refaat, I.H.; Abdel-aal, F.A.M. Review on recent separation methods for determination of some fluoroquinolones. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2013**, *36*, 1401–1420.
11. Solé, S.; Merkoçi, A.; Alegret, S. New materials for electrochemical sensing III. Beads. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 102–110.
12. Xu, Y.; Wang, E. Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. *Electrochim. Acta* **2012**, *84*, 62–73.
13. Ronkainen, N.J.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747–1763.
14. Fowler, J.M.; Wong, D.K.Y.; Brian Halsall, H.; Heineman, W.R. Recent Developments in Electrochemical Immunoassays and Immunosensors. In *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*; Zhang, X., Ju, H., Wang, J., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2008; pp. 115–143.
15. Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *605*, 111–129.
16. Conzuelo, F.; Gamella, M.; Campuzano, S.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *737*, 29–36.
17. Pinacho, D.G.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M.P. Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4527–4534.
18. Manson, M.M. *Immunochemical Protocols*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 1992; p. 480.
19. Pividori, M.I.; Merkoçi, A.; Alegret, S. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 473–484.
20. Zacco, E.; Pividori, M.I.; Alegret, S.; Galve, R.; Marco, M.P. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1780–1788.
21. Zacco, E.; Adrian, J.; Galve, R.; Marco, M.P.; Alegret, S.; Pividori, M.I. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2184–2191.

22. Abuknesha, R.A.; Luk, C.Y.; Griffith, H.H.M.; Maragkou, A.; Iakovaki, D. Efficient labelling of antibodies with horseradish peroxidase using cyanuric chloride. *J. Immunol. Methods* **2005**, *306*, 211–217.
23. Jeanson, A.; Cloes, J.-M.; Bouchet, M.; Rentier, B. Comparison of conjugation procedures for the preparation of monoclonal antibody-enzyme conjugates. *J. Immunol. Methods* **1988**, *111*, 261–270.
24. Commission 37/2010. Commission regulation of 22 December 2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Communities* **2010**, *L15*, 1–71.
25. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. Available online: <http://goldbook.iupac.org> (accessed on 20 March 2014).
26. Jensen, R.G.; Blanc, B.; Patton, S. Particulate Constituents in Human and Bovine Milks. In *Handbook of Milk Composition*; Jensen, R.G., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1995; pp. 50–62.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

5.5. Aportaciones más relevantes.

Las aportaciones más relevantes de esta tesis doctoral en lo referido al objetivo abordado en este capítulo son las siguientes:

- Se han obtenido y caracterizado diferentes tipos de MPs biomodificadas con los inmunoreactivos desarrollados en esta tesis, no observándose en ningún caso una pérdida significativa de actividad de dichos inmunoreactivos. Así mismo el marcaje del anticuerpo específico para QNs con HRP ha permitido la práctica eliminación del ruido de fondo durante el desarrollo del ensayo basado en MP unidas a antígeno, hecho ya observado por otros grupos de investigación.
- Se han desarrollado dos nuevos formatos de M-ELISA, con características similares a los formatos de ELISA en microplaca, lo que demuestra la versatilidad de los inmunoreactivos obtenidos en esta tesis. A su vez el uso de MP abre la posibilidad de automatización del sistema.
- Se ha comprobado que el uso de partículas magnéticas contribuye a minimizar o incluso eliminar el efecto matriz provocado por la leche, lo que permite el análisis directo de muestras de leche contaminadas con QNs sin necesidad de ningún tratamiento de la muestra o la dilución de la misma.

Se ha desarrollado un inmunosensor amperométrico capaz de detectar directamente en leche las QNs legisladas por la UE con un LOD muy por debajo de los LMRs establecidos. Este inmunosensor permite realizar medidas puntuales de muestras de leche en muy poco tiempo (5 min tras la etapa de competencia) y de forma muy simple, ya que no requiere de ningún tratamiento de muestra, alcanzando límites de detección que están en el mismo orden de magnitud que los obtenidos por ELISA. La simplicidad del inmunosensor desarrollado lo convierte en una herramienta muy atractiva para el análisis rápido y barato sobre el terreno de QNs en leche por parte de personal no calificado. Respecto de la tecnología existente, esta es la primera vez que se describe un inmunosensor amperométrico para el análisis de QNs en muestras de leche, siendo a su vez el primer inmunosensor capaz de detectar a todos los miembros de esta familia de antibióticos regulados por la UE, por debajo de sus correspondientes MRLs directamente en leche, sin necesidad de realizar ningún tratamiento o dilución.

Capítulo 6

Conclusiones generales

El trabajo de investigación realizado durante esta tesis doctoral ha permitido obtener por primera vez inmunoreactivos de carácter genérico para la detección de QNs, y desarrollar una amplia batería de técnicas inmunoquímicas (ELISA en microplaca, magneto-ELISA inmunosensores), que en diferentes formatos, han permitido determinar estos residuos en leche de vaca, con una elevada detectabilidad, acorde con los requerimientos de la CE. Como consecuencia de esta investigación, se ha generado también una serie de conocimientos muy relevantes desde el punto de vista químico e inmunoquímico. A continuación se recogen las principales conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral:

- Se ha logrado obtener anticuerpos con selectividad de clase para la familia de antibióticos de tipo QN mediante el diseño racional del hapteno de inmunización que preserva todos los epítomos comunes de la familia así como sus propiedades físico-químicas, demostrándose de esta manera que el criterio químico apoyado por herramientas de modelización molecular son una excelente combinación a la hora de generar anticuerpos con selectividad dirigida.
- Debido a las propiedades intrínsecas de las QNs, como son el carácter zwitteriónico y la complejación de cationes, el inmunoensayo se ve afectado por el valor de pH la presencia de Ca^{+2} en el medio en el cual transcurre la inmunoreacción. La detectabilidad se muestra dependiente del primer parámetro en función del pK_a de la QN en cuestión, abriendo la posibilidad de modulación de la selectividad del inmunoensayo mediante la variación del pH. A su vez la adición de Ca^{+2} al medio de competencia produce una disminución generalizada de la IC_{50} , así como una disminución de las diferencias de reconocimiento de los diferentes congéneres de la familia. Ambos efectos ponen de manifiesto la gran contribución del sistema β -cetoácido en el fenómeno de reconocimiento de los anticuerpos obtenidos, demostrando que el diseño de haptenos ha sido efectivo, ya que dicho sistema está presente en todas las QNs.
- Aun a pesar de que la leche ejerce cierto efecto matriz sobre los ELISAs desarrollados, en ambos casos dicho efecto es minimizado diluyendo la muestra al menos 10 veces, no dependiendo dicho efecto del contenido graso de la leche o de la marca comercial a esa dilución, pudiendo aplicarse esta metodología al análisis de leche de vaca en general. A su vez el inmunoensayo es reproducible, exacto y preciso, manteniendo la especificidad en leche, siendo el método desarrollado capaz de detectar 10 QNs en dicha matriz por debajo de los LMRs establecidos por la UE, a pesar de diluir la muestra 10 veces, poniendo en evidencia el elevado potencial del ensayo para su aplicación al análisis de QNs en leche.
- El ELISA desarrollado puede constituir una herramienta excelente para el cribado de residuos de QN en leche bovina, ya que a través del establecimiento de un formato semicuantitativo, fue posible identificar de forma clara las muestras libres de QN de las que estaban contaminadas de 14 muestras fortificadas con QNs y otros antibióticos, no observándose ningún falso negativo. A pesar de este hecho y debido al diferente patrón de reconocimiento y LMRs para cada QN, no fue posible discriminar de que QN se trataba y por ende si la muestra está por encima o por debajo de su LMR.

- Se han desarrollado diversas configuraciones inmunoquímicas de análisis (ELISA en microplaca, magneto-ELISA e inmunosensor amperométrico) en diversos formatos (directo-AT, directo-Ac, indirecto) de QNs en leche bovina. Este hecho, añadido a la elevada similitud de los valores de IC_{50} y LOD en todas las configuraciones y formatos inmunoquímicos desarrollados, pone de manifiesto que las prestaciones del anticuerpo y el hapteno de competición desarrollados en esta tesis son prácticamente independientes del tipo de inmunoensayo empleado. La flexibilidad de las diferentes configuraciones desarrolladas permite además ofrecer diferentes soluciones en función de los requerimientos, como por ejemplo el cribado simultáneo de un gran número de muestras mediante ELISA o M-ELISA y el análisis puntual de pocas muestras *in situ* mediante el inmunosensor.

Finalmente, cabe señalar que los inmunoreactivos generados como consecuencia de esta investigación, han sido objeto de protección mediante una patente internacional (WO/2012/069683A1), que actualmente se encuentra implementada en Europa (EP2644596A4), Estados Unidos (US20130273581) y China (CN 103328448A). Dicha patente a su vez ha sido licenciada y se encuentra en fase de explotación por parte de una compañía de base biotecnológica, con sede en Bélgica, e intereses en el ámbito del diagnóstico agroalimentario.

ANEXO II. ELECTROGENERACIÓN DE PELÍCULAS
POLIMÉRICAS FUNCIONALIZADAS CON ANÁLOGOS DE
FLUOROQUINOLONA

Publicación VI: Electrogeneración de películas poliméricas funcionalizadas con análogos de fluoroquinolona para el desarrollo de inmunosensor para antibióticos

EN la etapa final de la tesis y en el marco de proyecto ELISHA, se realizó una estancia predoctoral en el Laboratorio de Electroquímica Orgánica Fotoquímica y Redox de la Universidad Joseph Fourier de Grenoble (ICMG) liderado por el Dr. Serge Cosnier. El objetivo de la estancia consistió en el desarrollo de un inmunosensor impedimétrico para QNs, basado en la electrogeneración de películas poliméricas de polipirrol funcionalizadas con análogos de QN. Para ello previamente fue necesaria la síntesis de dos derivados de QN en los que se incluyó un grupo pirrol a través de la posición 7 (FQ-Py1 y FQ-Py2), para su posterior electropolimerización mediante electrólisis a potencial controlado. Debido a problemas de solubilidad de estos monómeros en los disolventes apropiados para la correcta electropolimerización, se optó por modificar los electrodos mediante la electropolimerización de monómeros de pirrol funcionalizados con esteres activos, para posterior reacción con el hapteno **17** de QN. Posteriormente se valoró la afinidad del As171 por el polímero así formado sobre el electrodo a través de espectroscopía de impedancia, así como la desorción del anticuerpo mediante la adición de CPF. A pesar de que los resultados no fueron satisfactorios, se recogieron en la siguiente publicación.



Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com

ScienceDirect

ITBM-RBM 29 (2008) 181–186

IRBM

<http://france.elsevier.com/direct/RBMRET/>

Original article

Electrogeneration of polymer films functionalized by fluoroquinolone models for the development of antibiotic immunosensor

Électrogénération de films polymères fonctionnalisés par des modèles de fluoroquinolone pour le développement d'immunocapteurs à antibiotique

D.-G. Pinachoa^b, K. Gorgy^b, S. Cosnier^{b,*},
M.-P. Marco^{a,*}, F.J. Sánchez-Baeza^a

^a Applied Molecular Receptors group (AMRg), CSIC, CIBER of Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, Jorge Girona, 18–26, 08034 Barcelona, Spain

^b UMR-5250, département de chimie moléculaire, ICMG FR-2607, CNRS université Joseph-Fourier, B.P. 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

Received 14 September 2007; accepted 11 November 2007

Available online 15 January 2008

Abstract

Fluoroquinolones are antibacterial agents, effective against Gram positive and Gram negative bacteria. With the aim of detecting fluoroquinolones rapidly and easily, fluoroquinolone models of ciprofloxacin functionalized by pyrrole or amino groups were synthesized. The electrochemical behavior of the pyrrole derivatives and their electropolymerization properties were investigated in organic media. In parallel, the amino derivative was chemically grafted onto an electropolymerized polypyrrole film. The resulting polymer has been incubated with anticiprofloxacin antibody, leading to the antibody immobilization by an immunoreaction with the ciprofloxacin model. The impedance behavior of the modified electrode was then examined towards the effect of ciprofloxacin.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Les fluoroquinolones sont des agents antibactériens, agissant contre les bactéries à Gram positif et négatif. Dans l'objectif de détecter les fluoroquinolones de façon rapide et facile, des fluoroquinolones, modèles de la ciprofloxacine et fonctionnalisées par un groupe pyrrole ou amine, ont été synthétisées. Le comportement électrochimique de ces dérivés pyrroliques et leurs propriétés d'électropolymérisation ont été examinées en milieu organique. Parallèlement à cette approche, le dérivé portant un reste amino a été greffé chimiquement sur un film de polypyrrole électropolymérisé. Le polymère qui en résulte a été incubé avec un anticorps dirigé contre la ciprofloxacine, conduisant ainsi à l'immobilisation de l'anticorps par immunoréaction avec le modèle de ciprofloxacine. Le comportement impédimétrique de l'électrode modifiée a ensuite été étudié en présence d'une solution de ciprofloxacine.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Antibiotic; Fluoroquinolone model; Modified electrode; Polypyrrole

Mots clés : Antibiotique ; Électrode modifiée ; Modèle de fluoroquinolone ; Polypyrrole

* Corresponding authors.

E-mail addresses: serge.cosnier@ujf-grenoble.fr (S. Cosnier), mppmqob@iqab.csic.es (M.-P. Marco).

1297-9562/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

doi:10.1016/j.rbmet.2007.11.006

1. Introduction

Quinolones [1] are chemical synthetic antibiotics, developed since the discovery of the first quinolone, nalidixic acid, indicated in urinary infections by Gram-negative bacteria.

Due to its low activity and rapid development of bacterial resistance, a new group of synthetic antibiotics for clinical use, fluoroquinolones, has been developed more recently by the addition of fluorine in carbon six (C6)-position to the original quinolone structure Fig. 1.

They are widely used because of excellent tissue penetration. The activity results from the inhibition of DNA-gyrase and DNA-topoisomerase-IV, enzyme that control DNA topology and are vital for chromosome function and replication [2]. It has been shown recently, to explain the activity of these antibiotics, that there is a strong interaction between fluoroquinolones and outer membrane protein [3].

Ciprofloxacin (Fig. 2A), 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(piperazinyl)quinolone-3-carboxylic acid, belongs to the fluoroquinolones and has a broad spectrum of activity against many pathogenic Gram negative and Gram positive bacteria, namely in a wide range of gastrointestinal, urinary, respiratory infections [4–6]. This new generation of quinolones is used by growth promoters in farmed animals like

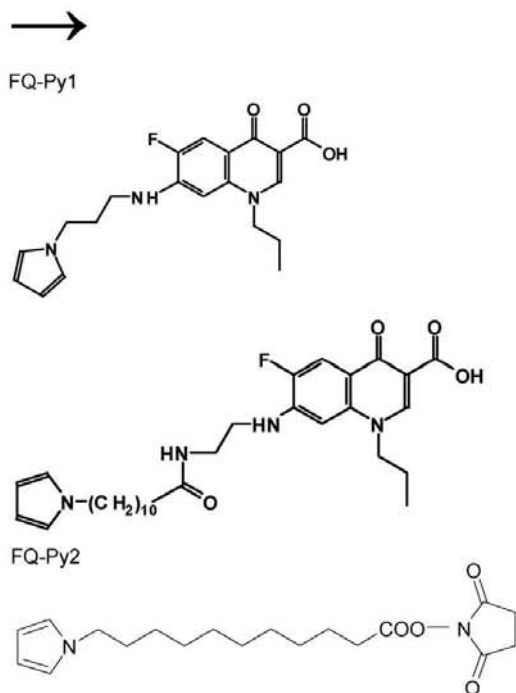


Fig. 1. Scheme of the electropolymerizable monomers structure **FQ-Py 1**: 7-(3-(1H-pyrrol-1-yl) propylamino)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinoline-carboxylic acid and **FQ-Py 2**: 7-(2-(11-(1H-pyrrol-1-yl) undecanamido)ethylamino)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinoline-carboxylic acid. Pyrole-NHS (pyrrole-*N*-hydroxysuccinimide).

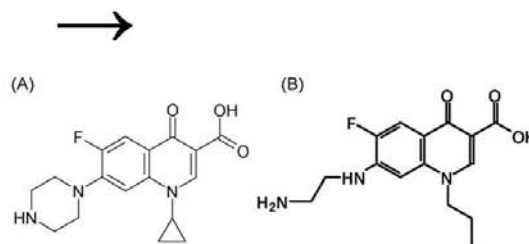


Fig. 2. Scheme of the ciprofloxacin (A) and of the ciprofloxacin model bearing an amino group (B).

fish, turkeys and pigs. Moreover, ciprofloxacin has been proved as effective drug in *Bacillus anthracis* infection treatment. As a result, research has essentially increased because of the bacteriological (anthrax) terrorists attack threats. As a matter of fact, there has been a continuous interest in the design of biosensors as faster and more economical tools for rapid and selective detection of ciprofloxacin. Therefore, due to the potential health and environmental damaging effects of these antibiotics, their monitoring in food and environment constitutes a major challenge. Since few years, different analytical techniques such as electrochemistry [7–10], spectrophotometric methods coupled or not with high-performance liquid chromatography [11–18], capillary electrophoresis [19,20] and surface plasmonic resonance [21] have been used for the detection and quantification of ciprofloxacin.

However, the centralized analytical systems, like spectrophotometric and chromatographic methods are expensive, time consuming and require trained personal that considerably limit their widespread use. An attractive alternative to these conventional analytical techniques consists in the design of biosensors due to their simple use in complex sample, their low cost and the possibility of fabricating fast-portable biosensors. Recently, the elaboration of immunosensors using impedance spectroscopy for the detection of fluoroquinolones has been reported [22,23]. The latter were based on the immobilisation of anticiprofloxacin antibody on an electrode surface, the immunoreaction with the antibiotic affecting the electrochemical properties of the interface. A combination of screen printed electrodes, coated with polyaniline and containing polyclonal antibody against ciprofloxacin was thus described. A linear correlation of the impedance change with the logarithmic of concentration is shown between 1 and 100 ng/mL [22]. A better detection limit of 10 pg/mL [23] was reported via the chemical grafting of the polyclonal antibody onto an electrogenerated film of polypyrrole-*N*-hydroxysuccinimide. However, these bioanalytical devices may suffer from poor operational and storage stabilities due to the fragility of the antibody structure. In particular, high temperatures or harsh chemical conditions may rapidly annihilate the recognition properties of the immobilized proteins. To counteract this problem the immobilisation of the antibody on the biosensor surface may be replaced by the immobilization of an antibiotic model (antigen), the detection of ciprofloxacin being performed by competitive immunoreaction between the anticiprofloxacin antibody, ciprofloxacin and the

antibiotic model. Among the conventional methods of electrode modification, the electropolymerization of functionalized films has been widely used. The introduction of appropriated functionalities through the chemical modification of the monomer can indeed provide polymer films with specific characteristics [24–29]. The main advantage of the electrochemical polymerization lies in the non-manual electrochemical addressing of polymers and hence, in the reproducibility of the polymer formation and the precision for the functionalization of conductive surfaces, whatever their size and geometry [30]. Moreover, the polymeric films are stable in aqueous and organic solvents.

With this aim in view, we report, here, the synthesis of fluoroquinolone models that mimic the structure of ciprofloxacin. These models are functionalized by pyrrole or amino groups, in order to be electrochemically polymerized or chemically grafted onto polypyrrole films. The electrochemical behavior of these compounds has been investigated in different organic medium and the resulting modified electrodes have been examined towards the effect of anticiprofloxacin antibody and ciprofloxacin.

2. Experimental section

2.1. Electrochemical part

Acetonitrile (CH₃CN) (Rathburn, HPLC grade) was used as received and stored under an argon atmosphere in a glove box. Dimethylformamide (DMF, analytical grade) was dried over Na₂SO₄ for at least one day. Tetrahydrofuran (THF, Riedel-de-Haën, analytical grade) was distilled under an argon atmosphere, over benzophenone and sodium and was stored in a glove box. Perchlorate lithium (LiClO₄, Fluka) was used as received while tetra-*N*-butylammonium perchlorate (TBAP, Fluka) was used as received and stored under an argon atmosphere in glove box.

All electrochemical experiments were performed using a Priceton applied research model 173 (PAR 173), equipped with a model 179 digital coulometer and a model 175 universal programmer, in conjunction with a Sefram TGM 164, X–Y/t recorder.

The impedance measurements were also obtained using Voltalab 40 impedance analyser (radiometer analytical SA, Villeurbanne, France). Impedance measurements were recorded between 100 kHz and 50 mHz with an ac amplitude of 10 mV peak to peak with five points per decade of frequencies. The typical biosensor impedance responses were recorded at equilibrium potential.

The electrochemical characterization of the monomers, their electrochemical polymerization and the characterization of the resulting modified electrodes were carried out using a conventional three-electrode cell at room temperature under an argon atmosphere or in a glove box (O₂ < 10 ppm).

An Ag/10 mM Ag⁺ in CH₃CN + 0.1 M TBAP electrolyte electrode and a saturated-calomel electrode were used as reference electrode in organic and aqueous electrolyte, respectively. A platinum wire, placed in a separate compartment containing the supporting electrolyte, was used as a counter electrode. The working electrodes were glassy carbon or platinum disks (diam-

eter, respectively 3 mm or 5 mm). Both were systematically polished with 1 μm diamond paste (Mecaprex Press PM).

2.2. Synthesis part

2.2.1. Chemicals and biochemicals

Immunochemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Other chemical reagents were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee). The preparation of the polyclonal antibody noted As171 will be described elsewhere [34]

2.2.2. Buffers

PBS is 10 mM phosphate buffer, 0.8% saline solution and, unless otherwise indicated, the pH was 7.5. PBST is PBS with 0.05% Tween 20.

2.2.3. Chromatography

Thin-layer chromatography was performed on 0.25 mm pre-coated silica gel; 60 F254 aluminum sheets (Merck, Gibbstown, NJ) ¹H NMR spectra were obtained with a Varian Inova-500 (Varian Inc., Palo Alto, CA) spectrometer (500 MHz for ¹H).

7-(3(1H-pyrrol-1-yl) propylamino)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-3-quinoline-3-carboxylic acid. (FQ-Py 1) (Fig. 1).

A mixture of 6,7-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1-propylquinoline-3-carboxylic acid (67 mg, 0.25 mmol, 1 eq) and 3-(1H-pyrrol-1-yl) propan-1-amine (38 mg, 0.3 mmol, 1.2 eq) was dissolved in dry DMSO (1 ml) and heated at 110 °C under argon atmosphere. After 3.5 h, the starting products were not detected by thin layer chromatography (dichlorometane:methanol; 8:2) and the mixture was dried under vacuum. The residue was dissolved in dichlorometane washed with water and brine. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness to obtain the desired compound as a white solid (85 mg, 90%). ¹H NMR (TFA) δ (ppm): 9.37 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.25 (d, *J* = 6.54 Hz, 1H), 5.47 (m, 2H), 4.93 (t, *J* = 7.26 Hz, 2H), 4.81 (m, 2H), 3.95 (m, 2H), 2.84 (m, 2H), 2.40 (m, *J* = 7.43 Hz, *J* = 7.26 Hz, 2H), 1.37 (t, *J* = 7.43 Hz, 3H).

7-(2-(11-((1H-pyrrol-1-yl) undecanamido)ethylamino)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-3-quinoline-3-carboxylic acid. (FQ-Py 2) (Fig. 1).

A solution of 7-(2-aminoethylamino)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-3-quinoline-3-carboxylic acid (53 mg, 0.17 mmol, 1.2 eq), *N*-hydroxy-succinimyl 11-(1H-pyrrol-1-yl) undecanoate (50 mg, 0.14 mmol, 4 eq) in dry DMF (3 ml) was stirred for 3 h at 65 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was concentrated under vacuum to obtain a residue that was dissolved in ethyl acetate. The organic phase was then washed with water and brine, dried with MgSO₄, and evaporated to dryness to obtain the desired product as a yellow oil (53.4 mg, 70%). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8.6 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 7.26 Hz, 1H), 6.66 (m, 2H), 6.15 (m, 2H), 4.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.87 (m, 2H), 3.55 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 2.24 (m, 2H), 1.97 (m, *J* = 7.4 Hz, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.71–1.52 (m, 8H), 1.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

The monomer (pyrrole-NHS) was synthesized using the following process: a mixture of pyrrole-carboxylic acid (1175 mg,

4.67 mmol), *N*-hydroxysuccinimide (602.0 mg, 5.23 mmol) and DCC (1067 mg, 5.17 mmol) in dry THF (17 ml) was stirred at room temperature for 8 h under nitrogen flux. After evaporation of the organic solvent, the oil was dissolved in the minimal volume of CH_2Cl_2 and Et_2O was subsequently added. After filtration, the filtrate was evaporated to obtain the activated ester of pyrrole (1392 mg, 4.00 mmol) with a yield of 85%. ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz): δ ppm = 6.64 (2H, s, CH pyrrole); 6.12 (2H, s, CH pyrrole); 3.85 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, CH_2); 2.81 (4H, s, 2 CH_2 succinimide); 2.60 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_2), 1.73–1.28 (16H, m, 8 CH_2). MS (EI, 200 °C): m/z 348 (M^+).

2.3. Preparation of the modified electrodes

The electrode modified by poly(pyrrole-NHS) were obtained at controlled potential electrolysis ($E_{\text{applied}} = 0.8$ V versus Ag, $Q = 0.5$ mC for an electrode of 5 mm in diameter) in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1$ M TBAP. Then, 20 μL of the amino derivative of the ciprofloxacin model (5 mg/mL) in presence of two equivalents of triethylamine were spread on the surface of the modified electrode and kept 12 h at 4 °C. After rinsing the resulting electrode in DMF during 30 min, the surface was thoroughly rinsed with PBST and then dried under argon. Thereafter, 20 μL of polyclonal antibody (0.1 mg/mL in PBST) were deposited onto the modified electrode and incubated for 30 min at 4 °C. Then, the electrodes were kept under agitation during 30 min in PBS, in order to remove adsorbed polyclonal antibody that were not bound by specific immunoreaction with the polymerized ciprofloxacin model.

3. Results and discussion

The electrochemical behavior of FQ-Py1 in DMF + 0.1 M TBAP was investigated by cyclic voltammetry at a platinum electrode (Fig. 3). Upon oxidative scanning, the cyclic voltammogram displays an irreversible anodic peak at 1.07 V versus Ag/Ag^+ 10 mM. The peak is attributed to the oxidation of the pyrrole group. It should be noted that the observed oxidation potential is in accordance with the potential values already reported for the electro-oxidation of *N*-substituted pyrrole derivatives [31].

On the reverse scan, FQ-Py1 exhibits two successive reduction systems. The first one, an irreversible cathodic peak at 0.18 V, is attributed to the reduction of protons liberated during the pyrrole oxidation. It can be noticed that this reduction peak is not observed at a glassy carbon electrode corroborating, thus, its attribution to the reduction of protons. This irreversible peak is followed by a redox peak system at $E_{1/2} = -0.74$ V. The latter may be ascribed to the one-electron reduction of the fluoroquinolone group. Indeed, it has been previously reported that the electrochemical behavior of some fluoroquinolones, namely sparfloxacin lomefloxacin and ofloxacin, exhibits a reduction process at -1.45 , -1.46 and -1.2 V, respectively in 0.04 M acetate buffer solution (pH 4) [32,33]. The comparison of the current intensity between the irreversible anodic peak and the cathodic peak due to the reduction of the quinoid group indicates a ratio of 2:4. This result reflects the oxidation and polymerization of the pyrrole group that requires 2.33 electron per molecule.

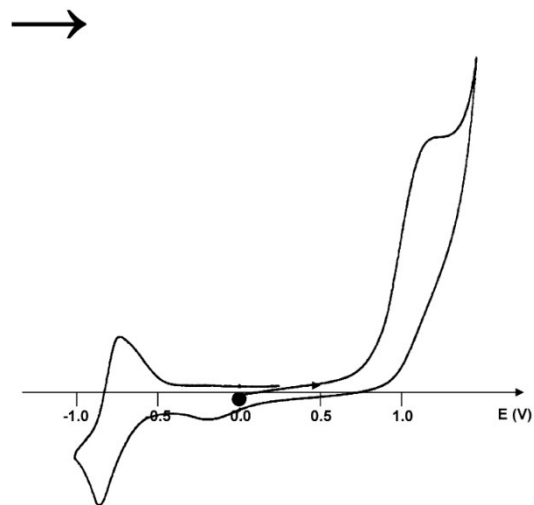


Fig. 3. Cyclic voltammogram recorded at a platinum electrode (5 mm diameter disk) of FQ-Py 1 (2 mM) in DMF + 0.1 M TBAP. Scan rate: 100 mV s^{-1} . Potential measured vs. Ag/Ag^+ 10 mM in $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAP}$ 0.1 M.

The electropolymerization of FQ-Py1 has been achieved electrolysis at different controlled potentials (0.75–0.95 V) or by scanning potential over the range 0.0–0.85 V. After transfer in CH_3CN free of monomer, the cyclic voltammogram of the resulting electrode shows, in the positive region, no reversible peak system characterizing the electroactivity of a deposited polypyrrole film. In addition, no redox couple at $E_{1/2} = -0.74$ V relative to the polymerized fluoroquinolone was observed. This seems to indicate that the electrogenerated film is very thin or the electropolymerization process only provides soluble oligomers.

The electrochemistry of FQ-Py2 has been checked in DMF + 0.1 M TBAP. The electrochemical behavior of this monomer is similar to that of FQ-Py1. In the positive region, the oxidation of the pyrrole group is observed at $E_{\text{pa}} = 1.16$ V while the reduction of the monomer in the negative region is recorded at $E_{1/2} = -0.76$ V (data not shown). However, as previously described for FQ-Py1, the electropolymerization process did not provide the formation of a thick polypyrrole film at the electrode surface but merely soluble oligomers.

Since the analytical performances of biosensors based on electropolymerized films are directly related to the quality of the deposited polymer and the reproducibility of its elaboration [25], another approach for the formation of polymers functionalized by fluoroquinolone models was investigated. The immobilization of the fluoroquinolone model was thus attempted by chemical grafting on an electropolymerized polypyrrole film *N*-substituted by *N*-hydroxysuccinimide groups. For this purpose an amino derivative of fluoroquinolone model was synthesized.

Fig. 4A shows the cyclic voltammogram of the monomer pyrrole-NHS (2 mM) in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1$ M TBAP. As expected, an anodic peak is observed at $E_{\text{pa}} = 0.90$ V corresponding to the irreversible oxidation of the pyrrole group [31]. The electrogen-

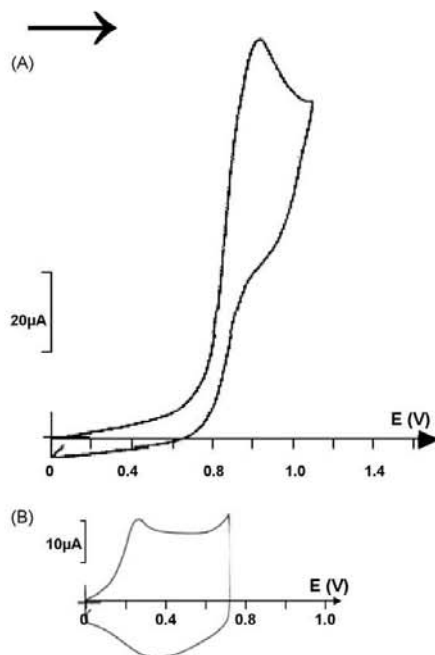


Fig. 4. Cyclic voltammograms recorded at a carbon electrode (3 mm diameter disk) of: (A) pyrrole-NHS (2 mM) in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\text{ M TBAP}$; (B) Poly(pyrrole-NHS) after electropolymerisation of pyrrole-NHS by potentiostatic method at 0.90 V, ($Q = 0.5\text{ mC}$) transferred in a solution free of monomer (in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\text{ M TBAP}$). Potential measured vs. Ag/Ag^+ 10 mM in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\text{ M TBAP}$. Scan rate: 100 mV s^{-1} .

eration of polypyrrole-NHS films was carried out by controlled potential electrolysis (0.5 mC) at 0.85 V in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\text{ M TBAP}$. Fig. 4 B shows the cyclic voltammogram of the resulting electrode transferred with thorough rinsing in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\text{ M TBAP}$ solution free of monomer. Upon oxidative scanning, a redox system is observed at $E_{1/2} = 0.22\text{ V}$ (Fig. 4B) indicating the formation of a poly(pyrrole-NHS) film on the electrode surface as a consequence of the oxidative polymerization of the pyrrole group. The current efficiency of the electropolymerization process was determined by dividing the charge recorded under the oxidation wave of the poly(pyrrole-NHS) by the charge passed during the controlled potential electrolysis (0.5 mC). It should be noted that each polymerized pyrrole group is oxidized by 0.33 electron while the electropolymerization process requires 2.33 electrons per monomer (two electrons for pyrrole group plus 0.33 electrons for the oxidation of the generated polymer backbone). The resulting electric yield (65%) is similar to those previously reported for elaboration of functionalized polypyrrole films [23]. The apparent surface coverage ($\Gamma = 7.42 \times 10^{-9}\text{ mol cm}^{-2}$) of electropolymerized pyrrole-NHS for an electrode surface of 0.196 cm^{-2} was determined from charge recorded under polypyrrole electroactivity.

One major advantage of the modification electrode surfaces by polymer coating is the possibility to investigate the electro-

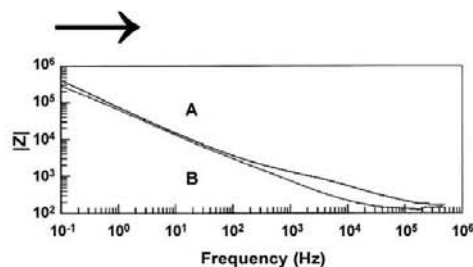


Fig. 5. Impedance spectra obtained for carbon electrode functionalized by electropolymerization of the pyrrole-NHS monomer ($Q = 0.5\text{ mC}$) at equilibrium potential in PBS (A) after the chemical grafting of the amino derivative of the ciprofloxacin model and after grafting of the polyclonal antibody and (B) after incubation in presence of ciprofloxacin (1 mg/mL) for 30 min.

chemical behavior of a polymerized compound in media that do not allow the solubilisation of this compound. Thus, the poly(pyrrole-NHS) electrode elaborated in CH_3CN was transferred in a DMF solution containing the amino derivative of the ciprofloxacin model (see Fig. 2B). After the reagentless formation of a chemical linkage between the polymer and the model, the electrode was thoroughly rinsed and transferred in PBS. Then, the modified electrode was incubated with $20\text{ }\mu\text{L}$ of a solution of polyclonal antibody freshly prepared (0.1 mg/mL) in order to immobilize the antibody by immunoreaction. As previously reported, the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was successfully used as a sensitive method to investigate the interface evolution. In particular, this method allows the detection of immunoreactions without labeling step [34]. EIS measurements were therefore performed to examine the effect of ciprofloxacin (the regular antigen) on the antibody-ciprofloxacin association. The impedance modulus of the modified electrode is thus drawn versus frequency (Fig. 5A). After an incubation with ciprofloxacin (1 mg/mL) for 30 min (Fig. 5B), changes in the low frequency range can be observed, especially around 10^3 Hz . The characteristic impedance decreases indicating the release of the antibody in solution. This phenomenon can be explained by the fact that the association constant of antibody-ciprofloxacin is stronger than antibody-antigen model resulting in the release of the antibody in solution. The preliminary results indicate that this concept is very convenient and suitable for the detection of ciprofloxacin and experiments are currently underway to know the limit detection of ciprofloxacin and to elaborate an equivalent circuit to explain the change.

4. Conclusion

In this paper, two new syntheses of electropolymerisable compounds mimicking the ciprofloxacin have been reported. Although only oligomers or thin films of antibiotic models were formed, copolymerization processes with an amphiphilic pyrrole could be adapted in order to get thicker and homogeneous films more suitable for the design of immunosensors. On the other hand, the chemical grafting of the ciprofloxacin model onto an electropolymerized polypyrrole film constitutes an easy and convenient approach for the development of impedimet-

ric immunosensor for the label free detection of ciprofloxacin antibiotic.

Acknowledgements

The author thanks the commission of the European Communities Research Directorate for their support under the ELISHA project, contrat No. NMP-A-CT-2003-505485-1.

References

- [1] Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:256–80.
- [2] Pestova E, Millichap JJ, Noskin GA, Peterson LR. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:583–90.
- [3] Neves P, Berkane E, Gameiro P, Winterhalter M, De Castro B. Interaction between quinolones antibiotics and bacterial outer membrane porin OmpF. *Biophys Chem* 2005;113:123–8.
- [4] Abadía AR, Aramayona JJ, Muñoz MJ, Pla-Delfina J, Bregante MA. Ciprofloxacin pharmacokinetics in dogs following oral administration. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 1995;42:505–11.
- [5] Yorke JC, Froc P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 2000;882:63–77.
- [6] Brown SA. Fluoroquinolones in animal health. *J Vet Pharmacol* 1996;19:1–14.
- [7] O'Dea P, Garcia AC, Miranda Ordieres AJ, Blanco PT, Smyth MR. Determination of ciprofloxacin by differential pulse polarography. *Electroanalysis* 1990;2:637–41.
- [8] Navalón A, Blanc R, Reyes L, Navas N, Vilchez JL. Determination of the antibacterial enrofloxacin by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry. *Anal Chim Acta* 2002;454:83–91.
- [9] Tomiero A, Ruiz-Díaz JJ, Salinas E, Marchevsky EJ, Sanz MI, Raba J. Enzymatic rotating biosensor for ciprofloxacin determination. *Talanta* 2006;69:691–9.
- [10] Tomiero A, Salinas E, Raba J, Silber JJ. Sensitive determination of ciprofloxacin and norfloxacin in biological fluids using an enzymatic rotating biosensor. *Biosens Bioelectron* 2006;22:109–15.
- [11] Idowu O, Peggins JO. Simple rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 2004;35:143–63.
- [12] Maya MT, Goncalves NJ, Silva NB, Morais JA. Simple high-performance liquid chromatographic assay for the determination of ciprofloxacin in human plasma with ultraviolet detection. *J Chromatogr Biomed Sci Appl B* 2001;755:305–9.
- [13] Kmetec V, Kozjek F, Veber M. Chromatographic and permeation analysis of ciprofloxacin metal complexes. *Int J Pharm* 1999;176:225–30.
- [14] Neckel U, Joukhadar C, Frossard M, Jäger W, Müller M, Mayer BX. Simultaneous determination of levofloxacin and ciprofloxacin in microdialysates and plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 2002;463:199–206.
- [15] Navalón A, Ballesteros, Blanc R, Vilchez JL. Determination of ciprofloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry. *Talanta* 2002;52:845–52.
- [16] Pascual-Reguera MI, Peréz Parra G, Molina Díaz A. A single spectroscopic flow-through sensing device for determination of ciprofloxacin. *J Pharm Biomed Anal* 2004;35:689–95.
- [17] Mostafa S, El-Sadek M, Alla EA. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and pefloxacin through charge transfer complex formation. *J Pharm Biomed Anal* 2002;27:133–42.
- [18] Nagaralli BS, Seetharamappa J, Melwanki MB. Sensitive spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin, ciprofloxacin and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2002;29:859–64.
- [19] Hernández M, Aguilar C, Borrull F, Calull M. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis – capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2002;772:163–72.
- [20] Fierens C, Hillaert S, Van den Bossche W. The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 2000;22:763–72.
- [21] Cao L, Lin H, Mirsky VM. Surface plasmon resonance biosensor for enrofloxacin based on deoxyribonucleic acid. *Anal Chim Acta* 2007;589:1–5.
- [22] Garifallou GZ, Tsekis G, Davis F, Higson SPJ, Millner PA, Pinacho DG, et al. Labelless immunosensor assay for fluoroquinolone antibiotics based upon an AC impedance protocol. *Anal Lett* 2007;40:1412–22.
- [23] Ionescu RE, Jaffrezic-Renault N, Bouffier L, Gondran C, Cosnier S, et al. Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic. *Biosens Bioelectron* 2007;23:549–55.
- [24] Cosnier S. Affinity biosensors based on electrogenerated films. *Electroanalysis* 2005;17:1701–15.
- [25] Cosnier S. Recent advances in biological sensors based on electrogenerated polymers: a review. *Anal Lett* 2007;40(7):1260–79.
- [26] Ionescu RE, Cosnier S, Herzog G, Gorgy K, Leshem B, et al. Amperometric immunosensor for the detection of anti-West Nile virus IgG using a photoactive copolymer. *Enzyme Microb Technol* 2007;40(3):403–8.
- [27] Herzog G, Gorgy K, Gulon T, Cosnier S. Electrogeneration and characterization of photoactivable films and their application for enzyme grafting. *Electrochem Commun* 2005;7(8):808–14.
- [28] Haddour N, Chauvin J, Gondran C, Cosnier S. Photoelectrochemical immunosensor for label-free detection and quantification of anti-cholera toxin antibody. *J Am Chem Soc* 2006;128(30):9693–8.
- [29] Cosnier S, Dawod M, Gorgy K, Da Silva S. Synthesis and electrochemical characterization of a new electropolymerizable hydrophilic viologen designed for enzyme wiring. *Microchim Acta* 2003;143(2–3):139–45.
- [30] Schuhmann W. Amperometric enzyme biosensors based on optimised electron-transfer pathways and non-manual immobilisation procedures. *Rev Mol Biotech* 2002;82:425–41.
- [31] Deronzier A, Moutet JC. Polypyrrole films containing metal complexes: syntheses and applications. *Coord Chem Rev* 1996;147:339–71.
- [32] Swati A, Jain NK, Pitre KS. Electrochemical analysis of sparfloxacin in pharmaceutical formulation and biochemical screening of its Co(II) complex. *J Pharm Biomed Anal* 2002;29(5):795–801.
- [33] Vilchez JL, Araujo L, Prieto A, Navalón A. Differential-pulse adsorptive stripping voltammetric determination of the antibacterial lomefloxacin. *J Pharm Biomed Anal* 2001;26(1):23–9.
- [34] Pejčić B, De Marco R. Impedance spectroscopy: over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochimica Acta* 2006;51:6217–29.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Harrison, P.T.C., Links between environment and health: possible future directions. *Sci. Total Environ.*, **2000**. 249(1-3): 103-105.
2. Kemper, N., Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.*, **2008**. 8(1): 1-13.
3. Catry, B., H. Laevens, L.A. Devriese, G. Opsomer, and A. Kruif, Antimicrobial resistance in livestock. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2003**. 26(2): 81-93.
4. Aarestrup, F.M., Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2005**. 96(4): 271-281.
5. RAE, Real Academia Española. *Diccionario de la lengua española*, **2010**. Vigésima segunda edición.
6. Davey, P.G., *Antimicrobial Chemotherapy*, in *Concise Oxford Textbook of Medicine*. 2000, Oxford University Press: Oxford. p. 1475.
7. McManus, P.S., Does a drop in the bucket make a splash? Assessing the impact of antibiotic use on plants. *Current Opinion in Microbiology*, **2014**. 19(0): 76-82.
8. Domagk, G., Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Angewandte Chemie*, **1935**. 48(42): 657-667.
9. Moreno-Bondi, M., Antibiotics in food and environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**. 395(4): 875-876.
10. Laxminarayan, R., A. Duse, C. Wattal, A.K.M. Zaidi, H.F.L. Wertheim, N. Sumpradit, E. Vlieghe, G.L. Hara, I.M. Gould, H. Goossens, C. Greko, A.D. So, M. Bigdeli, G. Tomson, W. Woodhouse, E. Ombaka, A.Q. Peralta, F.N. Qamar, F. Mir, S. Kariuki, Z.A. Bhutta, A. Coates, R. Bergstrom, G.D. Wright, E.D. Brown, and O. Cars, Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, **2013**. 13(12): 1057-1098.
11. Wise, R., Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2002**. 49(4): 585-586.
12. *Summary report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals in 2012*, in *Summary report*. 2014, FDA.
13. Van Boeckel, T.P., S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B.T. Grenfell, S.A. Levin, and R. Laxminarayan, Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, **2014**. 14(8): 742-750.
14. Leshner, G.Y., E.J. Froelich, M.D. Gruett, J.H. Bailey, and R.P. Brundage, 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J. Med. Pharm. Chem.*, **1962**. 5(5): 1063-1065.
15. O'Donnell, J.A. and S.P. Gelone, Fluoroquinolones. *Infectious disease clinics of North America*, **2000**. 14(2): 489-513.
16. Ball, P., Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2000**. 46(suppl 3): 17-24.
17. King, D.E., R. Malone, and S.H. Lilley, New classification and update on the quinolone antibiotics. *American Family Physician*, **2000**. 61(9): 2741-2748.
18. Oliphant, C.M. and G.M. Green, Quinolones: A comprehensive review. *American Family Physician*, **2002**. 65(3): 455-464.
19. The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Human Medicines Evaluation Unit. Public statement on Trovan/Trovan IV/Turvel/Turvel IV (trovafloxacin/alatrofloxacin). Serious, severe and unpredictable liver injuries. *EMEA*, **15 Jul 1999**. 15770:: 1-3.
20. Hooper, D., *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed, ed. B.J. Mandell GL, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's. 2000, Philadelphia: Churchill Livingstone.
21. Higgins, P.G., Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Current drug targets*, **2003**. 4(2): 181-190.
22. Mitscher, L.A., Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chemical Reviews*, **2005**. 105: 559-592.

Bibliografía

23. Andriole, V.T., *The Quinolones*. 1999, London: Ed. Academia Press, Limited.
24. Hooper, D.C., Clinical applications of quinolones. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression*, **1998**. 1400(1-3): 45-61.
25. Tillotson, G.S., Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.*, **1996**. 44(5): 320-324.
26. Parra-Ruiz, J. and J. Hernandez-Quero, Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of respiratory fluoroquinolones. Guideline to selection of the most appropriate fluoroquinolone. *Revista Espanola De Quimioterapia*, **2012**. 25(4): 245-251.
27. Paton, J.H. and D.S. Reeves, Fluoroquinolones Antibiotics - Microbiology, Pharmacokinetics and Clinical use. *Drugs*, **1988**. 36(2): 193-228.
28. Outman, W.R. and C.H. Nightingale, Metabolism and the fluoroquinolones. *Am J Med*, **1989**. 87(6C): 37S-42S.
29. Sorgel, F., Pharmacokinetics of gyrase inhibitors.1- Basic chemistry and gastrointestinal disposition. *The American journal of medicine*, **1993**. 94: 44-55.
30. Dembry, L.M., J.M. Farrington, and V.T. Andriole, Fluoroquinolone Antibiotics: Adverse Effects and Safety Profiles. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, **1999**. 8(9): 421-428.
31. Satoh, Y., A. Sugiyama, K. Chiba, K. Tamura, and K. Hashimoto, QT-Prolonging Effects of Sparfloxacin, a Fluoroquinolone Antibiotic, Assessed in the In Vivo Canine Model with Monophasic Action Potential Monitoring. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **2000**. 36(4): 510-515.
32. Lazarczyk, D., N. Goldstein, and S. Gordon, CASE REPORT: Trovafloxacin Hepatotoxicity. *Digestive Diseases and Sciences*, **2001**. 46(4): 925-926.
33. Jeffrey, A.M., L. Shao, S.Y. Brendler-Schwaab, G. Schlüter, and G.M. Williams, Photochemical mutagenicity of phototoxic and photochemically carcinogenic fluoroquinolones in comparison with the photostable moxifloxacin. *Archives of Toxicology*, **2000**. 74(9): 555-559.
34. Corpet, D.E., Mechanism of antimicrobial growth promoters used in animal feed. *Revue De Medecine Veterinaire*, **2000**. 151(2): 99-104.
35. Thomke, S. and K. Elwinger, Growth promotants in feeding pigs and poultry. II. Mode of action of antibiotic growth promotants. *Annales De Zootechnie*, **1998**. 47(3): 153-167.
36. Kemper, N., Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, **2008**. 8: 1-13.
37. Cohen, M., *Antibiotic use*. Antimicrobial Resistance: Issues and Options ed. P.F. Harrison, Lederberg, J. 1998, Washington, DC: Division of Health Sciences Policy. Institute of Medicine, National Academy Press.
38. Kiser, J.S., Perspective on use of antibiotics in animal feeds. *Journal of Animal Science*, **1976**. 42(4): 1058-1071.
39. *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*. "Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012", in *Fourth ESVAC report*:. 2014, EMEA (EMA/333921/2014).
40. Miranda, J.M., A. Mondragón, B.I. Vázquez, C.A. Fente, A. Cepeda, and C.M. Franco, Influence of farming methods on microbiological contamination and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates from beef. *Meat Science*, **2009**. 82(2): 284-288.
41. Tollefson, L. and B.E. Karp, Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **2004**. 34(11): 514-521.
42. Nunnery, J., F.J. Angulo, and L. Tollefson, Public health and policy. *Preventive Veterinary Medicine*, **2006**. 73(2-3): 191-195.
43. Walsh, E.M., P.L.H. McSweeney, and P.F. Fox, Use of antibiotics to inhibit non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, **1996**. 6(4): 425-431.

44. Chitescu, C., E. Oosterink, J. de Jong, and A. Stolker, Accurate mass screening of pharmaceuticals and fungicides in water by U-HPLC–Exactive Orbitrap MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**. 403(10): 2997-3011.
45. Negreira, N., M.L. de Alda, and D. Barcelo, Cytostatic drugs and metabolites in municipal and hospital wastewaters in Spain: Filtration, occurrence, and environmental risk. *The Science of the total environment*, **2014**. 497-498: 68-77.
46. Huerta, B., S. Rodriguez-Mozaz, and D. Barcelo, Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**. 404(9): 2611-2624.
47. Díaz-Cruz, M.S., M.a.J. López de Alda, and D. Barceló, Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2003**. 22(6): 340-351.
48. Díaz-Cruz, M.S. and D. Barceló, LC–MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2005**. 24(7): 645-657.
49. Richardson, S.D., Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, **2009**. 81(12): 4645-4677.
50. García-Galán, M.J., M. Silvia Díaz-Cruz, and D. Barceló, Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2009**. 28(6): 804-819.
51. Schmidt, A.S., M.S. Bruun, I. Dalsgaard, K. Pedersen, and J.L. Larsen, Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **2000**. 66(11): 4908-4915.
52. Ghosh, S. and T.M. LaPara, The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J*, **2007**. 1(3): 191-203.
53. WHO. *World Health Organization*. [cited 2014]; Available from: <http://www.who.int/en>.
54. EC. *European comision*. [cited 2014]; Available from: <http://www.ec.europa.eu>.
55. IFAH. *International Federation for Animal Health*. [cited 2014]; Available from: <http://www.ifahsec.org>.
56. EMEA. *European Medicines Agency*. [cited 2014]; Available from: <http://www.ema.europa.eu/ema/>.
57. FDA. *Food and Drug Administration*. [cited 2014]; Available from: <http://www.fda.gov>.
58. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. [cited 2014]; Available from: <http://www.cdc.gov>.
59. USEPA. *United States Environmental Protection Agency*. [cited 2014]; Available from: <http://www.epa.gov>.
60. EFSA. *European Food Safety Authority*. [cited 2014]; Available from: <http://www.efsa.europa.eu>.
61. Stolker, A.A.M. and U.A.T. Brinkman, Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals--a review. *J. Chromatogr. A*, **2005**. 1067(1-2): 15-53.
62. Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. *Official Journal of the European Union*, **15 March 2003**. L071: 17-18.
63. EC, *Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance)*, E. Comission, Editor. (18 October 2003), Official Journal of the European Union. p. 29-43.
64. EC, *European Commission, Council Regulation 2377/90/EC (Consolidated version of MRLs updated to 08.07.2008 obtained from EMEA)*, Official Journal of the European Union.

Bibliografía

65. EC, *Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council (Text with EEA relevance)*, E. Comission, Editor. (16 June 2009), Official Journal of the European Union. p. 11-22.
66. EC, *Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products* E. Comission, Editor. (6 November 2001), Official Journal of the European Union. p. 1-66.
67. EC, *Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency (Text with EEA relevance)*, E. Comission, Editor. (30 April 2004), Official Journal of the European Union. p. 1-32.
68. EC, *Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin*, E. Comission, Editor. (22 December 2010), Official Journal of the European Union. p. 1-72.
69. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Union*, **23 May 1996**. L125: 10-32.
70. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Union*, **17 August 2002**. L221: 8-36.
71. EC, *Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC*, E. Comission, Editor. (23 May 1996), Official Journal of the European Union. p. 10-32.
72. Caroli, S., M. Alessandrelli, G. Forte, S. D'Illo, M. Spagnoli, and R. Cresti, The handbook of analytical methods for trace elements as adopted by the national reference laboratories for residues. *Microchemical Journal*, **2000**. 67(1-3): 381-384.
73. Companyo, R., M. Granados, J. Guiteras, and M.D. Prat, Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**. 395(4): 877-891.
74. Varela, A.R., S. André, O.C. Nunes, and C.M. Manaia, Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system. *Water Research*, **2014**. 54(0): 327-336.
75. Singer, R.S. and J. Williams-Nguyen, Human health impacts of antibiotic use in agriculture: A push for improved causal inference. *Current Opinion in Microbiology*, **2014**. 19(0): 1-8.
76. da Costa, P.M., L. Loureiro, and A.J. Matos, Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *Int J Environ Res Public Health*, **2013**. 10(1): 278-94.
77. Samanidou, V. and S. Nisyriou, Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk. *J. Sep. Sci.*, **2008**. 31(11): 2068-2090.
78. Cháfer-Pericás, C., Á. Maquieira, and R. Puchades, Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2010**. 29(9): 1038-1049.
79. Belal, F., A.A. Al-Majed, and A.M. Al-Obaid, Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. *Talanta*, **1999**. 50(4): 765-786.

80. Andreu, V., C. Blasco, and Y. Picó, Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2007**. 26(6): 534-556.
81. Hernandez-Arteseros, J.A., J. Barbosa, R. Compano, and M.D. Prat, Analysis of quinolone residues in edible animal products. *Journal of Chromatography A*, **2002**. 945(1-2): 1-24.
82. Rodriguez-Diaz, R.C., Determination of fluoroquinolones in milk samples by postcolumn derivatization liquid chromatography with luminescence detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2006**. 54(26): 9670-9676.
83. Gratacos-Cubarsi, M., Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **2007**. 387(6): 1991-1998.
84. Prat, M.D., J. Benito, R. Compañó, J.A. Hernández-Arteseros, and M. Granados, Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, **2004**. 1041(1-2): 27-33.
85. Bogialli, S. and A. Di Corcia, Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **2009**. 395(4): 947-966.
86. Tang, Q.F., T.T. Yang, X.M. Tan, and J.B. Luo, Simultaneous Determination of Fluoroquinolone Antibiotic Residues in Milk Sample by Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 57(11): 4535-4539.
87. Pérez-Fernández, V., E. Domínguez-Vega, A.L. Crego, M.Á. García, and M.L. Marina, Recent advances in the analysis of antibiotics by CE and CEC. *Electrophoresis*, **2012**. 33(1): 127-146.
88. Barrón, D., E. Jiménez-Lozano, S. Bailac, and J. Barbosa, Simultaneous determination of flumequine and oxolinic acid in chicken tissues by solid phase extraction and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, **2003**. 477(1): 21-27.
89. Jiménez-Lozano, E., D. Roy, D. Barrón, and J. Barbosa, Effective sorbents for solid-phase extraction in the analysis of quinolones in animal tissues by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **2004**. 25(1): 65-73.
90. Hernández, M., F. Borrull, and M. Calull, Using nonaqueous capillary electrophoresis to analyze several quinolones in pig kidney samples. *Electrophoresis*, **2002**. 23(3): 506-511.
91. Sun, H., W. Zhao, and P. He, Effective Separation and Simultaneous Determination of Four Fluoroquinolones in Milk by CE with SPE. *Chromatographia*, **2008**. 68(5-6): 425-429.
92. Lara, F.J., A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, and J.M. Bosque-Sendra, In-line solid-phase extraction preconcentration in capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the multiresidue detection of quinolones in meat by pressurized liquid extraction. *Electrophoresis*, **2008**. 29(10): 2117-2125.
93. Wang, L., X. Wu, and Z. Xie, Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin by high performance capillary electrophoresis with end-column amperometric detection. *Journal of Separation Science*, **2005**. 28(11): 1143-1148.
94. Zhou, X., D. Xing, D. Zhu, Y. Tang, and L. Jia, Development and application of a capillary electrophoresis-electrochemiluminescent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk. *Talanta*, **2008**. 75(5): 1300-1306.
95. Horstkötter, C., E. Jiménez-Lozano, D. Barrón, J. Barbosa, and G. Blaschke, Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in chicken muscle by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, **2002**. 23(17): 3078-3083.
96. Juan-García, A., G. Font, and Y. Picó, Determination of quinolone residues in chicken and fish by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **2006**. 27(11): 2240-2249.

Bibliografía

97. Lara, F.J., A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, J.M. Bosque-Sendra, and L.E. García-Ayuso, Multiresidue Method for the Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Raw Milk by Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2006**. 78(22): 7665-7673.
98. Juan-García, A., G. Font, and Y. Picó, Simultaneous determination of different classes of antibiotics in fish and livestock by CE-MS. *Electrophoresis*, **2007**. 28(22): 4180-4191.
99. Chung, H.-H., J.-B. Lee, Y.-H. Chung, and K.-G. Lee, Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, **2009**. 113(1): 297-301.
100. Shakila, R.J., R. Saravanakumar, S.A.P. Vyla, and G. Jeyasekaran, An improved microbial assay for the detection of chloramphenicol residues in shrimp tissues. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **2007**. 8(4): 515-518.
101. Althaus, R.L., A. Torres, A. Montero, S. Balasch, and M.P. Molina, Detection Limits of Antimicrobials in Ewe Milk by Delvotest Photometric Measurements. *Journal of Dairy Science*, **2003**. 86(2): 457-463.
102. Kantiani, L., M. Farré, and D. Barceló, Analytical methodologies for the detection of β -lactam antibiotics in milk and feed samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2009**. 28(6): 729-744.
103. Pikkemaat, M., Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**. 395(4): 893-905.
104. Okerman, L., H. Noppe, V. Cornet, and L. De Zutter, Microbiological detection of 10 quinolone antibiotic residues and its application to artificially contaminated poultry samples. *Food Additives & Contaminants*, **2007**. 24(3): 252-257.
105. Okerman, L., S. Croubels, S. De Baere, J.V. Hoof, P. De Backer, and H. De Brabander, Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. *Food Additives & Contaminants*, **2001**. 18(5): 385-393.
106. Ashwin, H., S. Stead, M. Caldwell, M. Sharman, J. Stark, A. de Rijk, and B.J. Keely, A rapid microbial inhibition-based screening strategy for fluoroquinolone and quinolone residues in foods of animal origin. *Analytica Chimica Acta*, **2009**. 637(1–2): 241-246.
107. Sanz, D., L. Mata, S. Condón, M. Sanz, and P. Razquin, Performance of a New Microbial Test for Quinolone Residues in Muscle. *Food Analytical Methods*, **2011**. 4(2): 212-220.
108. Pikkemaat, M.G., P.P.J. Mulder, J.W.A. Elferink, A. De Cocq, M.W.F. Nielen, and H.J. Van Egmond, Improved microbial screening assay for the detection of quinolone residues in poultry and eggs. *Food Additives & Contaminants*, **2007**. 24(8): 842-850.
109. Althaus, R., M.I. Berruga, A. Montero, M. Roca, and M.P. Molina, Evaluation of a Microbiological Multi-Residue System on the detection of antibacterial substances in ewe milk. *Analytica Chimica Acta*, **2009**. 632(1): 156-162.
110. Estevez, M.C., H. Font, M. Nichkova, J.P. Salvador, B. Varela, F. Sanchez-Baeza, and M.P. Marco, *Immunochemical determination of pharmaceuticals and personal care products as emerging pollutants*, in *Emerging Organic Pollutants in Waste Waters and Sludge, Vol 2*, D. Barceló, Editor. 2005, Springer-Verlag: Berlin. p. 181-244.
111. Marco, M.-P., S. Gee, and B.D. Hammock, Immunochemical techniques for environmental analysis II. Antibody production and immunoassay development. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **1995**. 14(8): 415-425.
112. Berson, S.A. and R.S. Yalow, General principles of radioimmunoassay (Reprinted from *Clinica Chimica Acta*, vol 22, pg 51-69, 1968). *Clinica Chimica Acta*, **2006**. 369(2): 125-143.

113. Kaddar, N., N. Bendridi, C. Harthé, M.R. de Ravel, A.-L. Bienvenu, C.-Y. Cuilleron, E. Mappus, M. Pugeat, and H. Déchaud, Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, **2009**. 645(1-2): 1.
114. Adrian, J., H. Font, J.M. Diserens, F. SÃ¡nchez-Baeza, and M.P. Marco, Generation of broad specificity antibodies for sulfonamide antibiotics and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of milk samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 57(2): 385-394.
115. Brun, E.M., A. Hernandez-Albors, R. Ventura, R. Puchades, and A. Maquieira, Enzyme-linked immunosorbent assays for the synthetic steroid gestrinone. *Talanta*, **2010**. 82(4): 1581-1587.
116. Bacigalupo, M.A., G. Meroni, F. Secundo, and R. Lelli, Time-resolved fluoroimmunoassay for quantitative determination of ampicillin in cow milk samples with different fat contents. *Talanta*, **2008**. 77(1): 126-130.
117. Gasilova, N.V. and S.A. Eremin, Determination of Chloramphenicol in Milk by a Fluorescence Polarization Immunoassay. *Journal of Analytical Chemistry*, **2010**. 65(3): 255-259.
118. Mi, T., Z. Wang, S.A. Eremin, J. Shen, and S. Zhang, Simultaneous Determination of Multiple (Fluoro)quinolone Antibiotics in Food Samples by a One-Step Fluorescence Polarization Immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**. 61(39): 9347-9355.
119. Zhu, K., J. Li, Z. Wang, H. Jiang, R.C. Beier, F. Xu, J. Shen, and S. Ding, Simultaneous detection of multiple chemical residues in milk using broad-specificity antibodies in a hybrid immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**. 26(5): 2716-2719.
120. Xin, T.-B., H. Chen, Z. Lin, S.-X. Liang, and J.-M. Lin, A secondary antibody format chemiluminescence immunoassay for the determination of estradiol in human serum. *Talanta*, **2010**. 82(4): 1472.
121. Zhao, L., L. Sun, and X. Chu, Chemiluminescence immunoassay. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2009**. 28(4): 404.
122. Tao, X., M. Chen, H. Jiang, J. Shen, Z. Wang, X. Wang, X. Wu, and K. Wen, Chemiluminescence competitive indirect enzyme immunoassay for 20 fluoroquinolone residues in fish and shrimp based on a single-chain variable fragment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**. 405(23): 7477-7484.
123. Nikitin, P.I., P.M. Vetoshko, and T.I. Ksenevich, Magnetic immunoassays. *Sensor Letters*, **2007**. 5(1): 296-299.
124. Dittmer, W.U., P. de Kievit, M.W.J. Prins, J.L.M. Vissers, M.E.C. Mersch, and M.F.W.C. Martens, Sensitive and rapid immunoassay for parathyroid hormone using magnetic particle labels and magnetic actuation. *Journal of Immunological Methods*, **2008**. 338(1-2): 40-46.
125. Bucknall, S., J. Silverlight, N. Coldham, L. Thorne, and R. Jackman, Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products. *Food Additives and Contaminants*, **2003**. 20(3): 221-228.
126. Huet, A.C., C. Charlier, S.A. Tittlemier, G. Singh, S. Benrejeb, and P. Delahaut, Simultaneous determination of (Fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(8): 2822-2827.

Bibliografía

127. Wang, Z.H., Y. Zhu, S.Y. Ding, F.Y. He, R.C. Beier, J.C. Li, H.Y. Jiang, C.W. Feng, Y.P. Wan, S.X. Zhang, Z.P. Kai, X.L. Yang, and J.Z. Shen, Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds. *Analytical Chemistry*, **2007**. 79(12): 4471-4483.
128. Tittlemier, S.A., J.M. Gélinas, G. Dufresne, M. Haria, J. Querry, C. Cleroux, C. Ménard, P. Delahaut, G. Singh, N. Fischer-Durand, and S. Godefroy, Development of a Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Fluoroquinolone Residues in Shrimp. *Food Analytical Methods*, **2008**. 1: 28-35.
129. Kato, M., Y. Ihara, E. Nakata, M. Miyazawa, M. Sasaki, T. Kodaira, and H. Nakazawa, Development of enrofloxacin ELISA using a monoclonal antibody tolerating an organic solvent with broad cross-reactivity to other newquinolones. *Food and Agricultural Immunology*, **2007**. 18(3-4): 179-187.
130. Zhao, C., W. Liu, H. Ling, S. Lu, Y. Zhang, J. Liu, and R. Xi, Preparation of Anti-gatifloxacin Antibody and Development of an Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Gatifloxacin Residue in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**. 55(17): 6879-6884.
131. Cao, Z., S. Lu, J. Liu, J. Zhan, M. Meng, and R. Xi, Preparation of Anti-Lomefloxacin Antibody and Development of an Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Lomefloxacin Residue in Milk. *Analytical Letters*, **2011**. 44(6): 1100-1113.
132. Leivo, J., C. Chappuis, U. Lamminmäki, T. Lövgren, and M. Vehniäinen, Engineering of a broad-specificity antibody: Detection of eight fluoroquinolone antibiotics simultaneously. *Analytical Biochemistry*, **2011**. 409(1): 14-21.
133. Jiang, W., Z. Wang, R.C. Beier, H. Jiang, Y. Wu, and J. Shen, Simultaneous Determination of 13 Fluoroquinolone and 22 Sulfonamide Residues in Milk by a Dual-Colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Analytical Chemistry*, **2013**. 85(4): 1995-1999.
134. Fan, G.-y., R.-s. Yang, J.-q. Jiang, X.-y. Chang, J.-j. Chen, Y.-h. Qi, S.-x. Wu, and X.-f. Yang, Development of a class-specific polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for detecting fluoroquinolone residues in milk. *Journal of Zhejiang University-Science B*, **2012**. 13(7): 545-554.
135. Suryoprabowo, S., L. Liu, J. Peng, H. Kuang, and C. Xu, Development of a Broad Specific Monoclonal Antibody for Fluoroquinolone Analysis. *Food Analytical Methods*, **2014**: 1-6.
136. Cui, J., K. Zhang, Q. Huang, Y. Yu, and X. Peng, An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of norfloxacin in waters using a specific polyclonal antibody. *Analytica Chimica Acta*, **2011**. 688(1): 84-89.
137. Ngom, B., Y. Guo, X. Wang, and D. Bi, Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**. 397(3): 1113-1135.
138. Zhao, Y., G. Zhang, Q. Liu, M. Teng, J. Yang, and J. Wang, Development of a Lateral Flow Colloidal Gold Immunoassay Strip for the Rapid Detection of Enrofloxacin Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**. 56(24): 12138-12142.
139. Zhu, Y., L. Li, Z. Wang, Y. Chen, Z. Zhao, L. Zhu, X. Wu, Y. Wan, F. He, and J. Shen, Development of an Immunochromatography Strip for the Rapid Detection of 12 Fluoroquinolones in Chicken Muscle and Liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**. 56(14): 5469-5474.
140. Chen, X., H. Xu, W. Lai, Y. Chen, X. Yang, and Y. Xiong, A sensitive chromatographic strip test for the rapid detection of enrofloxacin in chicken muscle. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, **2012**. 29(3): 383-391.

141. Byzova, N.A., N.I. Smirnova, A.V. Zherdev, S.A. Eremin, I.A. Shanin, H.-T. Lei, Y. Sun, and B.B. Dzantiev, Rapid immunochromatographic assay for ofloxacin in animal original foodstuffs using native antisera labeled by colloidal gold. *Talanta*, **2014**. 119(0): 125-132.
142. Sheng, W., Y. Li, X. Xu, M. Yuan, and S. Wang, Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold-based immunochromatographic assay for several (fluoro)quinolones in milk. *Microchimica Acta*, **2011**. 173(3-4): 307-316.
143. Zhi, A.-m., B.-b. Li, Q.-t. Liu, X.-f. Hu, D. Zhao, Y.-z. Hou, R.-g. Deng, S.-J. Chai, and G.-p. Zhang, Development of a lateral-flow immunochromatographic test device for the rapid detection of difloxacin residues. *Food and Agricultural Immunology*, **2010**. 21(4): 335-345.
144. Haasnoot, W., H. Gerçek, G. Cazemier, and M.W.F. Nielen, Biosensor immunoassay for flumequine in broiler serum and muscle. *Analytica Chimica Acta*, **2007**. 586(1-2): 312-318.
145. Marchesini, G.R., W. Haasnoot, P. Delahaut, H. Gerçek, and M.W.F. Nielen, Dual biosensor immunoassay-directed identification of fluoroquinolones in chicken muscle by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2007**. 586(1-2): 259-268.
146. Huet, A.C., C. Charlier, G. Singh, S.B. Godefroy, J. Leivo, M. Vehniäinen, M.W.F. Nielen, S. Weigel, and P. Delahaut, Development of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for (fluoro)quinolones in egg, fish, and poultry meat. *Analytica Chimica Acta*, **2008**. 623(2): 195-203.
147. Wu, C.-C., C.-H. Lin, and W.-S. Wang, Development of an enrofloxacin immunosensor based on label-free electrochemical impedance spectroscopy. *Talanta*, **2009**. 79(1): 62-67.
148. Weigel, S., M.G. Pikkemaat, J.W.A. Elferink, P.P.J. Mulder, A.-C. Huet, P. Delahaut, S. Schittko, R. Flerus, and M. Nielen, Comparison of a fluoroquinolone surface plasmon resonance biosensor screening assay with established methods. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **2009**. 26(4): 441-452.
149. Huet, A.C., C. Charlier, S. Weigel, S.B. Godefroy, and P. Delahaut, Validation of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for screening (fluoro)quinolones in egg, fish and poultry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **2009**. 26(10): 1341-1347.
150. Fernández, F.t., D.G. Pinacho, F. Sánchez-Baeza, and M.P. Marco, Portable Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Detection of Fluoroquinolone Antibiotic Residues in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**. 59(9): 5036-5043.
151. Fernández, F., F. Sánchez-Baeza, and M.P. Marco, Nanogold probe enhanced Surface Plasmon Resonance immunosensor for improved detection of antibiotic residues. *Biosensors and Bioelectronics*, **2012**. 34(1): 151-158.
152. Fernández, F., K. Hegnerová, M. Piliarik, F. Sanchez-Baeza, J. Homola, and M.P. Marco, A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**. 26(4): 1231-1238.
153. Adrian, J., S. Pasche, D.G. Pinacho, H. Font, J.M. Diserens, F. Sanchez-Baeza, B. Granier, G. Voirin, and M.P. Marco, Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone, beta-lactam and tetracycline antibiotics in milk. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2009**. 28(6): 769-777.
154. Tsekenis, G., G.Z. Garifallou, F. Davis, P.A. Millner, D.G. Pinacho, F. Sanchez-Baeza, M.P. Marco, T.D. Gibson, and S.P.J. Higson, Detection of Fluoroquinolone Antibiotics in Milk via a Labelless Immunoassay Based upon an Alternating Current Impedance Protocol. *Analytical Chemistry*, **2008**. 80(23): 9233-9239.

Bibliografía

155. Pinacho, D., F. Sánchez-Baeza, M.-I. Pividori, and M.-P. Marco, Electrochemical Detection of Fluoroquinolone Antibiotics in Milk Using a Magneto Immunosensor. *Sensors*, **2014**. *14*(9): 15965-15980.
156. Holtzapple, C.K., S.A. Buckley, and L.H. Stanker, Development of antibodies against the fluoroquinolone sarafloxacin and molecular modeling studies of cross-reactive compounds. *Food and Agricultural Immunology*, **1997**. *9*(1): 13-26.
157. Duan, J.H. and Z.H. Yuan, Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**. *49*(3): 1087-1089.
158. Watanabe, H., A. Satake, Y. Kido, and A. Tsuji, Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. *Analyst*, **2002**. *127*(1): 98-103.
159. Hammer, P. and W. Heeschen, Antibody-Capture Immunoassay for the Detection of Enrofloxacin in Raw-Milk. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, **1995**. *50*(9): 513-514.
160. Lee, N.A. and I.R. Kennedy, Environmental Monitoring of Pesticides by Immunoanalytical Techniques: Validation, Current Status, and Future Perspectives. *J. AOAC Int.*, **2001**. *84*(5): 1393-1406.
161. Oubiña, A., B. Ballesteros, P. Bou, R. Galve, J. Gascón, F. Iglesias, N. Sanvicens, and M.-P. Marco, *Immunoassays for environmental analysis*, in *Sample Handling and trace analysis of pollutants. Techniques, applications and quality assurance*, D. Barceló, Editor. 2000, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. p. 289-340.
162. Salvador, J.P., F. Sanchez-Baeza, and M.P. Marco, Preparation of antibodies for the designer steroid tetrahydrogestrinone and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for human urine analysis. *Analytical Chemistry*, **2007**. *79*(10): 3734-3740.
163. Goodrow, M.H. and B.D. Hammock, Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAs for environmentally deleterious small molecules. *Analytica Chimica Acta*, **1998**. *376*(1): 83-91.
164. Lee, N., D.P. McAdam, and J.H. Skerritt, Development of Immunoassays for Type II Synthetic Pyrethroids. 1. Hapten Design and Application to Heterologous and Homologous Assays. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**. *46*(2): 520-534.
165. Kramer, P.M., M.-P. Marco, and B.D. Hammock, Development of a Selective Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 1-Naphthol-the Major Metabolite of Carbaryl (1-Naphthyl N-Methylcarbamate). *J. Agric. Food Chem.*, **1994**. *42*(4): 934-943.
166. Marco, M.P., B.D. Hammock, and M.J. Kurth, Hapten design and development of an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) for the detection of the mercapturic acid conjugates of naphthalene. *J. Org. Chem.*, **1993**. *58*(26): 7548-7556.
167. Niemi, M.H., K. Takkinen, L.K. Amundsen, H. Soderlund, J. Rouvinen, and M. Hoyhtya, The testosterone binding mechanism of an antibody derived from a naive human scFv library. *J Mol Recognit*, **2011**. *24*(2): 209-19.
168. Ballesteros, B., D. Barcelo, F. Sanchez-Baeza, F. Camps, and M.-P. Marco, Influence of the Hapten Design on the Development of a Competitive ELISA for the Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1051 at Trace Levels. *Anal. Chem.*, **1998**. *70*(19): 4004-4014.
169. Galve, R., F. Camps, F. Sanchez-Baeza, and M.P. Marco, Development of an Immunochemical Technique for the Analysis of Trichlorophenols Using Theoretical Models. *Anal. Chem.*, **2000**. *72*(10): 2237-2246.
170. Manclús, J.J. and A. Montoya, Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol. 1. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**. *44*(11): 3703-3709.

171. Rassaie, M.J., G.L. Kumari, P.N. Rao, T.G. Shrivastav, and H.P. Pandey, Influence of different combinations of antibodies and penicillinase-labeled testosterone derivatives on sensitivity and specificity of immunoassays. *Steroids*, **1992**. 57(3): 112-118.
172. Salvador, J.P., F. Sánchez-Baeza, and M.P. Marco, Simultaneous immunochemical detection of stanozolol and the main human metabolite, 3'-hydroxy-stanozolol, in urine and serum samples. *Anal. Biochem.*, **2008**. 376(2): 221-228.
173. Wang, Z., J. Zhang, S. Zhang, and J. Shen, Heterologous structure of coating antigen on sensitivity of ELISA for sulfamethazine: evidence from molecular similarity analysis. *Food and Agricultural Immunology*, **2011**. 22(2): 115-124.
174. Galve, R., F. Sanchez-Baeza, F. Camps, and M.P. Marco, Indirect competitive immunoassay for trichlorophenol determination: Rational evaluation of the competitor heterology effect. *Anal. Chim. Acta*, **2002**. 452(2): 191-206.
175. Danna L. Ross and C.M. Riley, Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. *International Journal of Pharmaceutics*, **1990**. 63: 237-250.
176. Drakopoulos, A.I. and P.C. Ioannou, Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution. *Analytica Chimica Acta*, **1997**. 354(1-3): 197-204.
177. Jimenez-Lozano, E., I. Marques, D. Barron, J.L. Beltran, and J. Barbosa, Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Analytica Chimica Acta*, **2002**. 464(1): 37-45.
178. Lode, H., G. Höffken, M. Boeckk, N. Deppermann, K. Borner, and P. Koeppe, Quinolone pharmacokinetics and metabolism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1990**. 26(suppl B): 41-49.
179. Estévez, M.C., R. Galve, F. Sánchez-Baeza, and M.P. Marco, Disulfide symmetric dimers as stable pre-hapten forms for bioconjugation: A strategy to prepare immunoreagents for the detection of sulfophenyl carboxylate residues in environmental samples. *Chemistry - A European Journal*, **2008**. 14(6): 1906-1917.
180. Ross, D.L. and C.M. Riley, Aqueous Solubilities of Some Variously Substituted Quinolone Antibacterials. *International Journal of Pharmaceutics*, **1990**. 63(3): 237-250.
181. Hampton, A., L.A. Slotin, and R.R. Chawla, Evidence for species-specific substrate-site-directed inactivation of rabbit adenylate kinase by N6-(6-iodoacetamido-n-hexyl)adenosine 5'-triphosphate. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1976**. 19(11): 1279-1283.
182. Abuknesha, R.A., C.Y. Luk, H.H.M. Griffith, A. Maragkou, and D. Iakovaki, Efficient labelling of antibodies with horseradish peroxidase using cyanuric chloride. *Journal of Immunological Methods*, **2005**. 306 211-217.
183. Mak, S.K., G. Shan, H.-J. Lee, T. Watanabe, D.W. Stoutamire, S.J. Gee, and B.D. Hammock, Development of a class selective immunoassay for the type II pyrethroid insecticides. *Analytica Chimica Acta*, **2005**. 534(1): 109-120.
184. Ramón-Azcón, J., R. Galve, F. SÁnchez-Baeza, and M.P. Marco, Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the linear alkylbenzene sulfonates and long-chain sulfophenyl carboxylates using antibodies generated by pseudoheterologous immunization. *Analytical Chemistry*, **2006**. 78(1): 71-81.
185. Kim, H.-J., K.C. Ahn, S.J. Ma, S.J. Gee, and B.D. Hammock, Development of Sensitive Immunoassays for the Detection of the Glucuronide Conjugate of 3-Phenoxybenzyl Alcohol, a Putative Human Urinary Biomarker for Pyrethroid Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**. 55(10): 3750-3757.
186. Turel, I., The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**. 232(1-2): 27-47.

187. Serafin, A. and A. Stańczak, The complexes of metal ions with fluoroquinolones. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, **2009**. 35(2): 81-95.
188. Cao, L., D. Kong, J. Sui, T. Jiang, Z. Li, L. Ma, and H. Lin, Broad-Specific Antibodies for a Generic Immunoassay of Quinolone: Development of a Molecular Model for Selection of Haptens Based on Molecular Field-Overlapping. *Analytical Chemistry*, **2009**. 81(9): 3246-3251.
189. Zhang, L., J.Q. Jiang, G.L. Li, Z.L. Wang, X.F. Yang, J.Y. Ma, H.T. Zhang, H.G. Huang, and X.Y. Liu, Development and optimization of a monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for detecting fluoroquinolone residue in milk. *Journal of Food Agriculture & Environment*, **2011**. 9(2): 113-120.
190. Liu, Y.Z., G.X. Zhao, J. Liu, H.C. Zhang, P. Wang, and J.P. Wang, Synthesis of novel haptens against ciprofloxacin and production of generic monoclonal antibodies for immunoscreening of fluoroquinolones in meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2013**. 93(6): 1370-1377.
191. Liu, Y.Z., G.X. Zhao, P. Wang, J. Liu, H.C. Zhang, and J.P. Wang, Production of the broad specific monoclonal antibody against sarafloxacin for rapid immunoscreening of 12 fluoroquinolones in meat. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **2013**. 48(2): 139-146.
192. Wen, K., G. Nolke, S. Schillberg, Z.H. Wang, S.X. Zhang, C.M. Wu, H.Y. Jiang, H. Meng, and J.Z. Shen, Improved fluoroquinolone detection in ELISA through engineering of a broad-specific single-chain variable fragment binding simultaneously to 20 fluoroquinolones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**. 403(9): 2771-2783.
193. Ebringer, L., M. Ferenčík, and J. Krajčovič, Beneficial health effects of milk and fermented dairy products — Review. *Folia Microbiologica*, **2008**. 53(5): 378-394.
194. Pereira, P.C., Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, **2014**. 30(6): 619-627.
195. Burgess, K., Milk and Dairy Products in Human Nutrition (2013), by E. Muehlhoff, A. Bennett and D. McMahon, PB - Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) , Rome. E-ISBN: 978-92-5-107864-8 (PDF). Available on web-site (publications-sales@fao.org). *International Journal of Dairy Technology*, **2014**. 67(2): 303-304.
196. Kanwar, J.R., Rupinder K. Kanwar, Xueying Sun, Vasu Punj, H. Matta, Somasundaram M. Morley, Andrew Parratt, M. Puri, and a.R. Sehgal, Molecular and Biotechnological Advances in Milk Proteins in Relation to Human Health. *Current Protein & Peptide Science*, **2009**. 10(4): 308-338.
197. Boye, J., R. Wijesinha-Bettoni, and B. Burlingame, Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Br J Nutr*, **2012**. 108 Suppl 2: S183-211.
198. Gill, H.S. and F. Guarner, Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, **2004**. 80(947): 516-526.
199. Santosa, S., E. Farnworth, and P.J.H. Jones, Probiotics and Their Potential Health Claims. *Nutrition Reviews*, **2006**. 64(6): 265-274.
200. Hemme, T., *Overview on milk prices and production costs world wide*, in *IFCN Dairy Report*. 2013, IFCN: Kiel.
201. *Dairy australia*. [cited 2014]; Available from: <http://www.dairyaustralia.com.au/Markets-and-statistics/Exports-and-trade/Dairy-Trade-Environment/Dairy-Production-and-Trade.aspx>.
202. FAO. *Food and Agricultural Organization of the United Nations*. [cited 2014]; Available from: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-and-milk-products/en/#.VAXAV60cTcu>.
203. Marshall, B.M. and S.B. Levy, Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, **2011**. 24(4): 718-733.

204. Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, and J. Waddell, Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2004**. 53(1): 28-52.
205. Kümmerer, K., Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, **2009**. 75(4): 417-434.
206. Kümmerer, K., Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*, **2009**. 75(4): 435-441.
207. Monteiro, S. and A.A. Boxall, *Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment*, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010, Springer New York. p. 53-154.
208. Tamine, A.Y. and a.R.R. K, eds. *Yoghurt: Science and Technology*. 3th ed. 1999, Woodhead Publishing and CRC Press LC.
209. Honanen-Buzalskil, T. and W. and Reybroeck, *Antimicrobials*, in *Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products*. 1997, International Dairy Federation: Brussels. p. 26-34.
210. Pérez, M.L.G., R. Romero-González, J.L.M. Vidal, and A.G. Frenich, Analysis of veterinary drug residues in cheese by ultra-high-performance LC coupled to triple quadrupole MS/MS. *Journal of Separation Science*, **2013**. 36(7): 1223-1230.
211. P. Molina, I. Berruga, and A. Molina., *La calidad de la leche de oveja.*, in *Ovinotecnia. Producción y economía en la especie ovina*. 2009, Prensas Universitarias de Zaragoza: Zaragoza. p. 355-367.
212. Hammer, P., H. Kirchhoff, and G. Hahn, Detection of streptomycins in raw milk by an antibody-capture immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, **1993**. 275(1–2): 313-316.
213. Van Coillie, E., J. De Block, and W. Reybroeck, Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**. 52(16): 4975-4978.
214. Kato, M., Y. Ihara, D. Kasai, and T. Kodaira, The development of release-competitive assay to detect residual quinolones in contaminated milk. *Food and Agricultural Immunology*, **2008**. 19: 241-246.
215. Cao, Z., M. Meng, S. Lu, and R. Xi, Development of an Indirect Chemiluminescent Competitive ELISA to Detect Danofloxacin Residues in Milk. *Analytical Letters*, **2011**. 44(6): 1077-1084.
216. Huang, B., Y. Yin, L. Lu, H. Ding, L. Wang, T. Yu, J.-j. Zhu, X.-d. Zheng, and Y.-z. Zhang, Preparation of high-affinity rabbit monoclonal antibodies for ciprofloxacin and development of an indirect competitive ELISA for residues in milk. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **2010**. 11(10): 812-818.
217. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, n.e.t.G.B.C.b.A.D.M.a.A.W.B.S.P., Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook <<http://dx.doi.org/10.1351/goldbook>>. .
218. Jensen, R.G., B. Blanc, and S. Patton, *Particulate Constituents in Human and Bovine Milks*, in *Handbook of Milk Composition*, R.G. Jensen, Editor. 1995, Academic Press: San Diego. p. 50-62.
219. Zhang, Y., Y. Jiang, and S. Wang, Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect Benzylpenicilloic Acid, a Degradation Product of Penicillin G in Adulterated Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**. 58(14): 8171-8175.
220. Wang, C., Z. Wang, W. Jiang, T. Mi, and J. Shen, A Monoclonal Antibody-Based ELISA for Multiresidue Determination of Avermectins in Milk. *Molecules*, **2012**. 17(6): 7401-7414.

Bibliografía

221. Kaur, R., K.L. Dikshit, and M. Raje, Optimization of Immunogold Labeling TEM: An ELISA-based Method for Evaluation of Blocking Agents for Quantitative Detection of Antigen. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **2002**. 50(6): 863-873.
222. Vogt Jr, R.V., D.L. Phillips, L. Omar Henderson, W. Whitfield, and F.W. Spierto, Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *Journal of Immunological Methods*, **1987**. 101(1): 43-50.
223. Rodríguez-Díaz, R.C., J.M. Fernández-Romero, M.P. Aguilar-Caballos, and A. Gómez-Hens, Determination of Fluoroquinolones in Milk Samples by Postcolumn Derivatization Liquid Chromatography with Luminescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(26): 9670-9676.
224. Karen L. Cox, Viswanath Devanarayan, Aidas Kriauciunas, and e. al., *Immunoassay Methods*. 2012 May 1. [Updated in 2014 Dec 24], in *Assay Guidance Manual [Internet]*, C.N. Sittampalam GS, Nelson H, et al., Editor, Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Available from: <http://www.ncbi.nih.gov/books/NBK92434/>.
225. Marco, M.P. and D. Barcelo, Environmental applications of analytical biosensors. *Measurement Science & Technology*, **1996**. 7(11): 1547-1562.
226. Haynes, S.N. and D.T. Yoshioka, Clinical Assessment Applications of Ambulatory Biosensors. *Psychol. Assess.*, **2007**. 19(1): 44-57.
227. Luong, J.H.T., K.B. Male, and J.D. Glennon, Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*, **2008**. 26(5): 492-500.
228. Ronkainen, N.J., H.B. Halsall, and W.R. Heineman, Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, **2010**. 39(5): 1747-1763.
229. Halverson, K.M., R.G. Panchal, T.L. Nguyen, R. Gussio, S.F. Little, M. Misakian, S. Bavari, and J.J. Kasianowicz, Anthrax biosensor, protective antigen ion channel asymmetric blockade. *Journal of Biological Chemistry*, **2005**. 280(40): 34056-34062.
230. Swainsbury, D.J.K., V.M. Friebe, R.N. Frese, and M.R. Jones, Evaluation of a biohybrid photoelectrochemical cell employing the purple bacterial reaction centre as a biosensor for herbicides. *Biosensors and Bioelectronics*, **2014**. 58(0): 172-178.
231. Hur, Y., J. Han, J. Seon, Y.E. Pak, and Y. Roh, Development of an SH-SAW sensor for the detection of DNA hybridization. *Sensors and Actuators a-Physical*, **2005**. 120(2): 462-467.
232. Dominguez, E., O. Rincon, and A. Narvaez, Electrochemical DNA sensors based on enzyme dendritic architectures: An approach for enhanced sensitivity. *Analytical Chemistry*, **2004**. 76(11): 3132-3138.
233. Tort, N., J.P. Salvador, A. Aviñó, R. Eritja, J. Comelles, E. Martínez, J. Samitier, and M.P. Marco, Synthesis of Steroid-Oligonucleotide Conjugates for a DNA Site-Encoded SPR Immunosensor. *Bioconjugate Chemistry*, **2012**. 23(11): 2183-2191.
234. Tombelli, S., A. Minunni, and A. Mascini, Analytical applications of aptamers. *Biosensors & Bioelectronics*, **2005**. 20(12): 2424-2434.
235. Piletsky, S.A. and A.P.F. Turner, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Electroanalysis*, **2002**. 14(5): 317-323.
236. Holford, T.R.J., F. Davis, and S.P.J. Higson, Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **2012**. 34(1): 12-24.
237. Long, F., M. He, H.C. Shi, and A.N. Zhu, Development of evanescent wave all-fiber immunosensor for environmental water analysis. *Biosensors & Bioelectronics*, **2008**. 23(7): 952-958.
238. Marx, K.A., Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules*, **2003**. 4(5): 1099-1120.
239. Voiculescu, I. and A.N. Nordin, Acoustic wave based MEMS devices for biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*, **2012**. 33(1): 1-9.

240. Ziegler, C., Cantilever-based biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**. 379(7-8): 946-959.
241. Yakovleva, M., S. Bhand, and B. Danielsson, The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review. *Analytica Chimica Acta*, **2013**. 766(0): 1-12.
242. Lettau, K., A. Warsinke, M. Katterle, B. Danielsson, and F.W. Scheller, A Bifunctional Molecularly Imprinted Polymer (MIP): Analysis of Binding and Catalysis by a Thermistor. *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**. 45(42): 6986-6990.
243. Birnbaum, S., L. Bülow, K. Hardy, B. Danielsson, and K. Mosbach, Automated thermometric enzyme immunoassay of human proinsulin produced by *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, **1986**. 158(1): 12-19.
244. Grieshaber, D., R. MacKenzie, J. Voros, and E. Reimhult, Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors*, **2008**. 8(3): 1400-1458.
245. Bobacka, J., A. Ivaska, and A. Lewenstam, Potentiometric Ion Sensors. *Chemical Reviews*, **2008**. 108(2): 329-351.
246. Katz, E. and I. Willner, Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis*, **2003**. 15(11): 913-947.
247. Luppá, P.B., L.J. Sokoll, and D.W. Chan, Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, **2001**. 314(1-2): 1-26.
248. Mellgren, C. and A. Sternesjö, Optical immunobiosensor assay for determining enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk. *Journal of Aoac International*, **1998**. 81(2): 394-397.
249. Pellegrini, G.E., G. Carpico, and E. Coni, Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk. *Analytica Chimica Acta*, **2004**. 520(1-2): 13-18.
250. Haun, J.B., T.-J. Yoon, H. Lee, and R. Weissleder, Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **2010**. 2(3): 291-304.
251. Kuramitz, H., Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**. 394(1): 61-69.
252. de Dios, A.S. and M.E. Díaz-García, Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. *Analytica Chimica Acta*, **2010**. 666(1-2): 1-22.
253. Solé, S., A. Merkoçi, and S. Alegret, New materials for electrochemical sensing III. Beads. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2001**. 20(2): 102-110.
254. Paleček, E. and M. Fojta, Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta*, **2007**. 74(3): 276-290.
255. Richardson, J., P. Hawkins, and R. Luxton, The use of coated paramagnetic particles as a physical label in a magneto-immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, **2001**. 16(9-12): 989-993.
256. Merkoçi, A., M. Aldavert, S. Marín, and S. Alegret, New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2005**. 24(4): 341-349.
257. Lim, C.T. and Y. Zhang, Bead-based microfluidic immunoassays: The next generation. *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**. 22(7): 1197-1204.
258. Hsing, I.M., Y. Xu, and W. Zhao, Micro- and Nano- Magnetic Particles for Applications in Biosensing. *Electroanalysis*, **2007**. 19(7-8): 755-768.
259. Andreescu, S., J. Njagi, C. Ispas, and M.T. Ravalli, JEM Spotlight: Applications of advanced nanomaterials for environmental monitoring. *Journal of Environmental Monitoring*, **2009**. 11(1): 27-40.
260. Aguilar-Arteaga, K., J.A. Rodriguez, and E. Barrado, Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*, **2010**. 674(2): 157-165.

Bibliografía

261. Zacco, E., M.I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, and M.P. Marco, Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues. *Analytical Chemistry*, **2006**. 78(6): 1780-1788.
262. Laube, T., S.V. Kergaravat, S.N. Fabiano, S.R. Hernández, S. Alegret, and M.I. Pividori, Magneto immunosensor for gliadin detection in gluten-free foodstuff: Towards food safety for celiac patients. *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**. 27(1): 46-52.
263. Jeanson, A., J.-M. Cloes, M. Bouchet, and B. Rentier, Comparison of conjugation procedures for the preparation of monoclonal antibody-enzyme conjugates. *Journal of Immunological Methods*, **1988**. 111(2): 261-270.
264. Manson, M.M., *Immunochemical Protocols*. Methods in molecular biology. Vol. 10. 1992, Totowa New Jersey: Humana Press. 480.