

EVALUACIÓN DE LAS PLATAFORMAS AWS-A20 RP Y AWS-F20 RP BASADAS EN SENSORES HFF-QCM PARA APLICACIONES DE SEGURIDAD ALIMENTARIA.

Inmaculada Sanjuán, Yolanda Jiménez¹, Isabel Escriche²

RESUMEN CASTELLANO

En este trabajo se evalúan las plataformas AWS-A20 RP y AWS-F20 RP basadas en tecnología de Microbalanza de Cuarzo de Alta frecuencia (High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance - HFFQCM) para aplicaciones de seguridad y calidad alimentaria en mieles. En particular se evalúa su aplicación para la detección de dos pesticidas que pueden estar presentes en miel (DDT y Clorpirifos). La tecnología HFF-QCM es una tecnología acústica de última generación que mantiene las ventajas de las técnicas acústicas tradicionales (bajo coste, detección directa en tiempo real y fácil manejo, entre otras) y resuelve uno de sus principales inconvenientes que es la mejora del límite de detección (LOD). En el presente estudio se incluye la primera parte experimental de dicha evaluación, consistente en la realización de curvas de calibración de los dos pesticidas en condiciones de laboratorio, es decir, sin utilizar muestras reales. Previamente a la obtención de la curva de calibración ha sido necesario obtener, para ambos pesticidas, curvas de dosis-respuesta, las cuales permiten determinar la concentración del conjugado hapteno-proteína (DDT: BSA-DDT5 inmovilizado de 10 µg/ml y Clorpirifos: BSA-PO inmovilizado de 10 µg/ml), así como la concentración limitante de anticuerpo monoclonal (DDT: LIB-DDT5.25 de 1 µg/ml y Clorpirifos: LIB-PO de 3 µg/ml). Aunque los valores obtenidos son preliminares, los resultados alcanzados son muy prometedores, ya que para el DDT se han conseguido valores del LOD del mismo orden al de otras técnicas ya existentes, con la ventaja de que con esta tecnología la detección es directa y los costes se pueden reducir de forma importante.

Palabras clave: sensores acústicos, seguridad alimentaria, HFF-QCM, DDT, Clorpirifos.

RESUM VALENCIÀ

En aquest treball s'avaluen les plataformes AWS-A20 RP i AWS-F20 RB les quals es basen en la tecnologia de Microbalança de Quars d'Alta freqüència (High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance- HFFQCM) per a

¹ Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería (Ci2B), UPV

² Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD), Departamento de Tecnología de Alimentos, UPV

les aplicacions de seguretat i qualitat alimentària en mels. En concret s'avalua la seua aplicació per a la detecció de dos pesticides que poden estar en la mel com són (DDT i Clorpirifos). La tecnologia HFF-QCM és una tecnologia acústica d'última generació que permet mantindre els avantatges de les tècniques acústiques tradicionals (baix cost, detecció directa en temps real i fàcil maneig, entre altres) i resol un dels principals inconvenients que és la millora del límit de detecció (LOD). En aquest treball s'inclou la primera part experimental d'aquesta avaluació, la qual ha suposat la realització de corbes de calibració dels dos pesticides en condicions de laboratori, es a dir, sense mostres reals. Abans de l'obtenció de la corba de calibració ha sigut necessari obtindre, per ambdós pesticides, corbes de dosi-resposta, les quals ens permeten determinar la concentració del conjugat hapteno-proteïna (DDT:BSA-DDT5 inmovilitzat de 10 µg/ml i Clorpirifos: LIB-PO de 3 µg/ml). Encara que els valors obtinguts són preliminars, els resultats són interessants, ja que per al DDT s'han obtingut valors del LOD del mateix ordre que en altres tècniques ja existents, amb l'avantatge que amb aquesta tecnologia la detecció és directa i els costos es poden reduir de manera important.

Paraules clau: sensors acústics, seguretat alimentària, HFF-QCM, DDT, Clorpirifos.

ABSTRACT

In this work the platforms AWS-A20 RP and AWS-F20 RP based in the High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance technology (HFFQCM) for food safety and food quality applications in honey are evaluated. In particular its application for the detection of two pesticides that can be present in honey (DDT and Clorpyrifos) is evaluated. The HFF-QCM technology is a last generation acoustic technology that keeps the advantages of the traditional acoustic techniques (low cost, direct detection in real time and easy operation, among others) and solves one of the main disadvantages that is the improvement of the limit of detection (LOD). In this work the first experimental part of this evaluation are included, which consist in the realization of calibration curves of the two pesticides under laboratory conditions, that is to say, without using real samples. Previously to the obtaining of the calibration curve it has been necessary to get, for both pesticides, the dose-response curves, which allow to determinate the conjugate hapten-protein concentration (DDT: BSA-DDT5 immobilized of 10 µg/ml and Clorpyrifos: BSA-PO immobilized of 10 µg/ml), as well as the monoclonal antibody limit concentration (DDT: LIB-DDT5.25 of 1 µg/ml y Clorpyrifos: LIB-PO of 3 µg/ml). Although the values obtained are preliminary, the results achieved are very promising, since values of the LOD for DDT has been achieved with the same order as others existing techniques, with the advantage that with this technology the detection is direct and the cost can be significantly reduced.

Key words: acoustic sensors, food safety, HFF-QCM, DDT, Clorpyrifos

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe cada vez un mayor interés por garantizar la seguridad y calidad de los alimentos para el consumo humano. En particular, la presencia de residuos químicos que puedan llegar al consumidor final en alimentos como la miel o el polen, se ha convertido en un problema de salud pública de interés para el sector apícola, las autoridades y la comunidad científica (Dorne et al., 2009; Larsen, 2006; Van Klaveren, 2009). En este sentido, un informe de la EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria) destaca el impacto de los plaguicidas en la salud de las abejas, y por lo tanto en la salud de los consumidores de miel y polen (EFSA Journal, 2012). El origen de dichos productos químicos reside principalmente en los tratamientos veterinarios empleados para tratar a las abejas (Edder et al., 2002) y en los tratamientos agrícolas con pesticidas a cultivos cercanos a colmenas (Krupke et al., 2012; Whitehorn et al., 2012; Van Engelsdorp y Meixner, 2010; Henry et al., 2012). Entre estos pesticidas, destacan el Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) y el Clorpirifos. El (DDT), o más exactamente 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, es un insecticida perteneciente a la familia de los Organoclorados que se caracteriza por su gran persistencia y se ha demostrado que aparece en la miel (Pérez, 2012). El Clorpirifos, o más exactamente, 0,0-dietilfosforotioato de 0-3,5,6- tricloro-2-piridilo, es un insecticida perteneciente a la familia de los Organofosforados que es capaz de dañar a las abejas y que también aparece en la miel (Morales, 2004).

Esta situación ha provocado la aparición de un conjunto de directivas y reglamentos (establecidos principalmente desde la Unión Europea) que tratan entre otras cosas de establecer los límites máximos de residuos (LMR's) de sustancias activas en los alimentos a consecuencia del uso de productos veterinarios y fitosanitarios en la producción primaria (Reglamento (UE) N° 396/2005, Reglamento (UE) N° 37/2010, Reglamento (CE) N° 470/2009). Cabe destacar el anexo III parte B del CE N° 369/2005, el cual regula los LMR's de pesticidas en mieles, siendo en concreto para el DDT de 0,05 mg/kg.

Se considera pues un reto de nuestra sociedad contribuir a la resolución de esta situación con diversas líneas de acción, por ejemplo, aportando soluciones tecnológicas que faciliten y abaraten la detección de la presencia de dichos residuos químicos en sustancias como la miel. En la actualidad existen diversas técnicas, como son el análisis por cromatografía líquida a alta presión (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography), el ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) o el SPR (Surface Plasmon Resonance) que permiten la detección de residuos químicos, como pesticidas y antibióticos, pero presentan algunos inconvenientes que deben ser resueltos. Las técnicas basadas en HPLC, permiten la detección multianalito y proporcionan el menor límite de detección (LOD), pero son costosas y requieren demasiado tiempo y personal altamente cualificado (Mauriz et al., 2007). Las técnicas ELISA, aunque de menor coste, no permiten la detección directa de la sustancia diana en tiempo real. Por último, las basadas en SPR tienen el problema del coste y la limitación de la detección multianalito. Ante esta situación, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas de medida y/o complementarias que: 1) sean sensibles y selectivas, 2) permitan una detección directa y en tiempo real, 3) sean de fácil

uso y no requieran de personal altamente cualificado, 4) sean fiables, y 5) sean de bajo coste económico (tanto desde el punto de vista del equipo como del proceso de preparación de la muestra). Estos retos pueden conseguirse de la mano de los inmunosensores piezoeléctricos. Éstos se basan en la interacción específica de un antígeno con un anticuerpo, siendo capaces de detectar específicamente de esta manera un analito diana de una muestra compleja.

Los dos elementos clave de un inmunosensor son el transductor y las sustancias biológicas antígeno-anticuerpo desarrolladas específicamente para detectar una sustancia. El transductor debe ser previamente funcionalizado mediante la inmovilización en su superficie de alguno de los dos agentes biológicos, el anticuerpo o el antígeno (March et al., 2009). Los inmunosensores son una buena elección a la hora de realizar análisis para el control de contaminantes orgánicos en alimentos, fundamentalmente por dos motivos (March et al., 2009; Rocha et al., 2009; Fung y Wong, 2001; Zhou et al., 2002): 1) son altamente selectivos, debido a las interacciones inmunológicas (antígeno-anticuerpo) y 2) son altamente sensibles gracias al transductor empleado (March et al., 2009).

Dentro de los inmunosensores piezoeléctricos el de uso más extendido, es el que utiliza como transductor un cristal de cuarzo. Este inmunosensor también es conocido como QCM (Quartz Crystal Microbalance - Microbalanza de Cristal de Cuarzo) y es el que se ha empleado en este Trabajo. La técnica QCM se basa en el cambio de la frecuencia de resonancia de un resonador piezoeléctrico (sensor de cuarzo o transductor de cuarzo) debido a un cambio en la masa depositada sobre su superficie. El sensor, previamente funcionalizado mediante la inmovilización del anticuerpo o del antígeno, se pone en contacto con la muestra que contiene la sustancia a detectar. La presencia de dicha sustancia en la muestra a analizar, desencadena una reacción inmunoquímica en la superficie del transductor que provoca un cambio en la masa adherida a su superficie. Dicho cambio en la inercia del sistema provoca un cambio en la frecuencia de resonancia del transductor, magnitud que puede medirse y cuantificarse mediante la instrumentación electrónica adecuada.

Cuando el cambio producido en la masa del material depositado sobre el sensor es pequeño (situación que se dará en la aplicación presentada en este trabajo), la relación entre dicho cambio en la masa superficial y el cambio en su frecuencia de resonancia viene dado por la ecuación de Sauerbrey (Sauerbrey, 1959):

$$\Delta f = -\frac{C_f \Delta m}{A} \quad (1)$$

donde el cambio de frecuencia medido (Δf) es directamente proporcional al incremento que se ha producido en la densidad superficial de masa del sensor ($\Delta m/A$) siendo A la superficie de sensor expuesta. La constante de proporcionalidad, C_f , sólo depende de propiedades intrínsecas del sensor. Este régimen de trabajo es conocido como régimen gravimétrico, y para asegurar que se está trabajando en él (y que por tanto la ecuación de Sauerbrey es aplicable) es necesario monitorear un segundo parámetro (ΔR). Teóricamente,

en régimen gravimétrico ΔR debe permanecer invariable, en la práctica, es suficiente comprobar que su variación está contenida dentro de unos márgenes predefinidos según la aplicación.

Uno de los retos a conseguir con esta tecnología es la mejora del LOD, el cual, de forma genérica viene definido por la siguiente ecuación (Arnau et al., 2013):

$$LOD = \frac{3N}{S} \quad (2)$$

donde N es el ruido, el cual incluye tanto el ruido del sistema electrónico de medida como otros originados por cambios en la temperatura o por el sistema de fluídica, entre otros; y S es la señal proporcionada por el sensor, que en este caso corresponde al incremento de frecuencia de resonancia medido.

La ecuación (2) pone de manifiesto que el LOD se puede mejorar, bien aumentando la señal obtenida del sensor, o bien reduciendo el ruido en la medida. La reducción del ruido se consigue empleando sistemas de caracterización de bajo ruido como las plataformas A20 y F20. Respecto al aumento de la señal se consigue empleando sensores HFF QCM (High Fundamental Frequency QCM), estos sensores tienen constantes C_f (ver ecuación (1)) dos órdenes de magnitud superiores a los sensores QCM tradicionales (Arnau et al., 2009; Montagut et al., 2011). De este modo, a partir de la ecuación (1), se concluye que ante la misma variación de masa, un sensor con una constante C_f mayor proporcionará un incremento de frecuencia mayor, mejorando con ello el LOD.

El presente estudio está enmarcado en el proyecto AGL2013-48646-R financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y titulado “Diseño de una plataforma basada en matrices de sensores de cuarzo de alta resolución para HTS (high-through-put-screening) de residuos en mieles” (convocatoria Retos de la Sociedad). Este trabajo apoya a la primera actividad propuesta en el mismo, que tiene como principal objetivo la evaluación de la tecnología de sensores HFF-QCM, para la detección del DDT y Clorpirifos en miel. Se hará uso de las plataformas AWS-A20 RP y AWS-F20 RP para evaluar dicha tecnología a través del cálculo de los parámetros de sensibilidad y límite de detección mediante curvas de calibrado.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Reactivos químicos e inmunoreactivos

La albúmina de suero bovino (BSA) fue adquirida de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El PBS-Tween (PBST: PBS conteniendo 0.005% de Tween 20) fue suministrado por Fluka-Aldrich Chemie (Buchs, Suiza).

Respecto a los inmunoreactivos, los anticuerpos monoclonales (MAb), los haptenos conjugados y los estándares de pesticidas (DDT y Clorpirifos) fueron proporcionados por el Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería (Ci2B) de la UPV. En particular, para el pesticida Clorpirifos el anticuerpo monoclonal fue LIB-PO y el hapteno conjugado fue BSA-PO (Manclús et al., 1996); para el pesticida DDT el anticuerpo monoclonal fue LIB-DDT5.25 y el hapteno conjugado fue el BSA-DDT5 (Abad et al., 1997).

Se seleccionaron estos pesticidas porque su presencia en la miel es frecuente y porque se disponía de inmunoreactivos de muy buena calidad desarrollados por el Ci2B para ambos pesticidas.

2.2 Sensores HFF-QCM funcionalizados

Los sensores HFF-QCM (ver Figura 1) fueron proporcionados por AWSensors (Valencia, España, www.awsensors.com). Se trata de cristales de cuarzo de corte AT con una frecuencia de 100 MHz. Tienen un perfil cuadrado con un área total de unos 36 mm² y un “comido” en la parte central del sensor, donde el espesor del cristal es de unas 17 μm (tecnología fabricación es inverted mesa). En esa zona central se depositan sendos electrodos de oro sobre cada una de las caras del cristal, estos electrodos permiten la excitación del cristal para provocar su vibración, al mismo tiempo que sirven de soporte para realizar su funcionalización. Durante el proceso de funcionalización el inmunoreactivo adecuado se une covalentemente a la superficie del electrodo de oro. En este Trabajo de Máster, los cristales fueron proporcionados ya funcionalizados por el Ci2B de la UPV, todo el proceso de funcionalización se realizó en una sola cara del cristal siguiendo el protocolo previamente descrito en la referencia March et al., 2014.

El espesor extremadamente delgado de estos sensores hace que sea necesario montarlos sobre un soporte de Poly-Phenilen Sulfide (PPS). El soporte dispone de un agujero cónico que deja accesible la superficie activa del electrodo del oro donde tendrá lugar la reacción inmunológica.

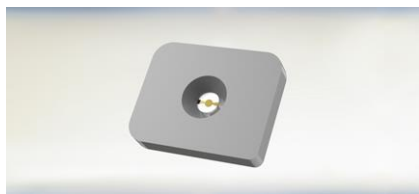


FIGURA 1. Sensor HFF-QCM.

2.3 Montaje del sensor en la celda de flujo

Los sensores HFF-QCM descritos en el apéndice anterior se montan sobre una celda de flujo (ver figura 2), la cual permite conectar el sensor con el equipo de medida (plataforma AWS A20 RP). Además, la celda también permite que pueda pasarse un flujo de líquido controlado por la superficie activa del sensor, es decir, sólo una cara del cristal (la funcionalizada) es la que se pone en contacto con los diferentes medios líquidos.

La parte inferior de la celda está fabricada en aluminio, siendo en ella donde se colocan los sensores (ver Figura 2), y la parte superior en polimetil metacrilato (PMMA). La parte superior incorpora dos racores para conectar las tuberías por las que se hacen llegar los medios líquidos a la superficie activa del sensor. Estas dos partes, superior e inferior, se unen entre sí mediante dos tornillos. El sellado se consigue mediante dos O-rings de vitón (ver Figura 2) cada uno de ellos colocado en la parte superior e inferior de la celda. El volumen interno de la celda es de 2.56 μl . Estos volúmenes son extremadamente bajos en comparación con otras soluciones comerciales existentes, lo cual es ventajoso porque permite ahorrar muestra.

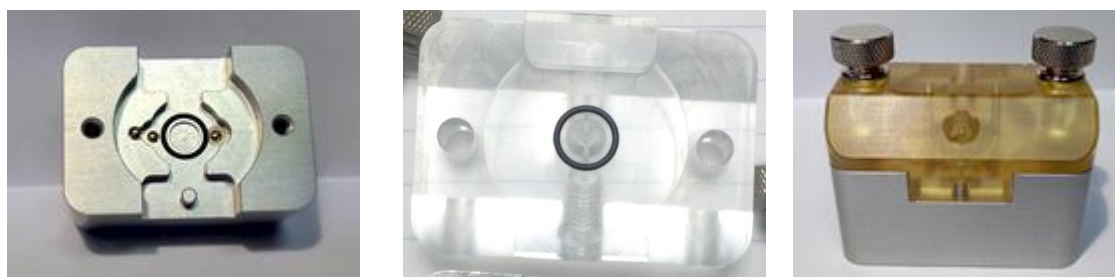


FIGURA 2. Detalle de la celda desmontada (parte inferior a la izquierda y superior en el medio) y a la derecha la celda HFF-QCM montada para experimentos en flujo.

2.4 Plataforma de medida

La plataforma AWS A20 RP (ver Figura 3) es una plataforma de medida universal de sensores acústicos diseñada específicamente para aplicaciones biológicas. Dispone de entre 1 y 4 canales de medida y permite 4 modos de operación dependiendo de la aplicación. Integra un sistema de termostarización de la temperatura que permite minimizar el ruido de la medida. En los experimentos realizados se trabajó a una temperatura constante de 25°C. El sistema de caracterización del sensor que implementa está basado en un método patentado consistente en la medida del cambio de fase de la respuesta del sensor cuando éste es excitado a una frecuencia fija (Montagut et al., 2011). El equipo proporciona medidas de: 1) la temperatura a la que se realiza el experimento, 2) de los cambios en la frecuencia, a partir de los cuales pueden cuantificarse los cambios en la propiedades de las capas adheridas al sensor, y 3) de los cambios en ΔR , a partir de los cuales puede comprobarse que durante todo el experimento se mantiene el régimen gravimétrico de trabajo. La plataforma AWS A20 RP se comercializa completamente integrada con la plataforma AWS F20 RP (ver Figura 3) que es un sistema de flujo

basado en un sistema de bombeo por jeringa (Hamilton Bonaduz, GR, Switzerland).



FIGURA 3. Imagen de la plataforma AWS A20 RP (parte de arriba) y de la plataforma AWS F20 RP (parte de abajo) juntas.

Ambas plataformas pueden controlarse simultáneamente mediante un software específico (AWS Software) que permite pasar flujos a una velocidad constante y programable (ver Figura 4). El Software de control también permite la programación de la secuencia de inyecciones que debe hacerse sobre la superficie activa del sensor. Un sistema de bombas y válvulas que lleva incorporada la plataforma AWS F20 permite pasar diferentes líquidos en instantes y a intervalos controlados de forma automática. Las tuberías utilizadas en el sistema de flujo fueron de teflón con un diámetro interno de 0,25 mm y un diámetro externo de 1,60 mm.

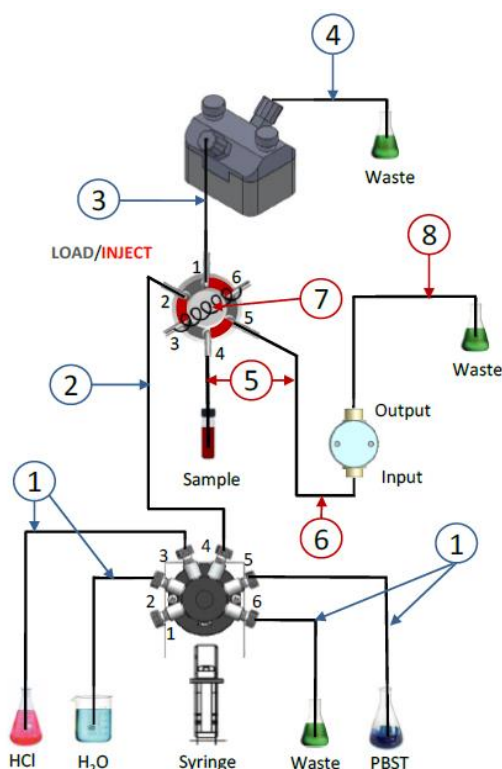


FIGURA 4. Figura del sistema de flujo empleado en el equipo.

2.5 Formato del inmunoensayo

Dependiendo de cuál sea la molécula inmovilizada sobre la superficie activa del sensor (anticuerpo o antígeno), resultan dos tipos de inmunoensayos diferentes: conjugado inmovilizado o anticuerpo inmovilizado. Dado el bajo peso molecular y el pequeño tamaño de los dos compuestos a evaluar en este trabajo, se han abordado los inmunoensayos con formato de conjugado inmovilizado y de tipo competitivo (ver Figura 5). En este tipo de inmunoensayos, se establece una competición entre el analito en disolución y el conjugado inmovilizado por unirse al anticuerpo que se encuentra en la disolución en una concentración limitante. El formato de conjugado inmovilizado también permite mejorar la reusabilidad del sensor regenerando su superficie, ya que el conjugado soporta más ciclos de regeneración que el anticuerpo.

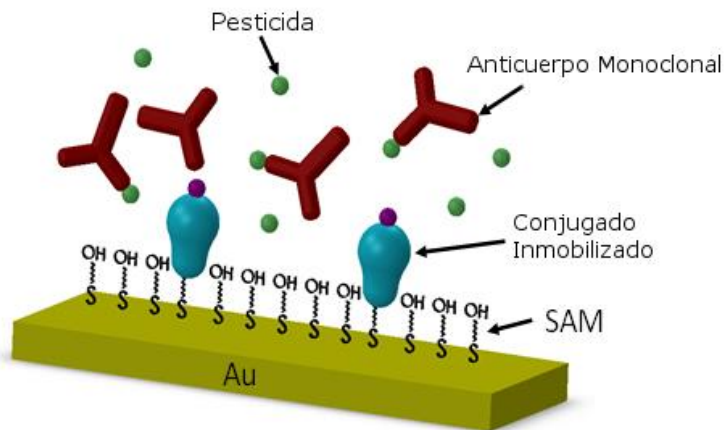


FIGURA 5. Formato de ensayo de conjugado inmovilizado y de tipo competitivo.

En un ensayo competitivo, una cantidad fija del anticuerpo monoclonal se incuba durante 50 minutos con la muestra de la que se quiere cuantificar la concentración del pesticida que contiene. Cuando la muestra contiene analito, el anticuerpo se une a él durante el proceso de incubación, cuanto mayor sea la concentración del analito menor cantidad de anticuerpo quedará “libre” en la disolución. Cuando la muestra previamente incubada se pone en contacto con el sensor, sólo se unirá a la capa de antígeno inmovilizado el anticuerpo que quede libre tras la incubación. De este modo, durante el proceso de incubación el analito inhibe la unión del anticuerpo al respectivo conjugado inmovilizado, por lo que concentraciones de analito altas generarán una respuesta baja del sensor, mientras que concentraciones bajas del analito dejarán mucho anticuerpo “libre” en la solución pre-incubada, que se unirá al conjugado inmovilizado en el sensor generando una respuesta mayor.

En este formato de inmunoensayo, previamente a la obtención de la curva de calibración del sensor, es necesario obtener las curvas de dosis-respuesta a partir de las cuales se obtiene la concentración limitante de anticuerpo en la competición entre el conjugado y el analito (DDT o Clorpirifos), y la concentración del conjugado inmovilizado sobre la superficie del sensor.

2.6 Procedimiento de obtención de los patrones

Una vez establecidas ambas concentraciones se está en disposición de obtener la curva de calibración. Para ello, se prepararon soluciones estándares de DDT y Clorpirifos en un rango de 10^{-3} a 2.0×10^3 $\mu\text{g/L}$. Partiendo de una solución de stock a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ en 1,4-dioxano seco (almacenada a -20 °C en viales oscuros), se realizaron disoluciones seriadas en PBS-Tween. En primer lugar se prepararon patrones intermedios en 1,4-dioxano. Para ello se realizó una dilución seriada, con factor 5 (se diluye 5 veces), a partir de 1000 ppm, cogiendo 20 μl de "stock" patrón y mezclándolo (agitándolo en el vórtex) con 80 μl de dioxano y. A continuación, 20 μl de esta mezcla se pasaron a otro vial con otros 80 μl de dioxano, y así sucesivamente hasta conseguir los 9 viales necesarios. De esta manera, las concentraciones de los patrones intermedios fueron 1000, 200, 40, 8, 1'6, 0'32, 0'064, 0'0128, 0'0025 y 0'0005 ppm ($\mu\text{g/ml}$) (ver Figura 6).

Posteriormente, cada uno de los patrones intermedios se diluyó 1/500 en tampón de trabajo (PBS-Tween), mezclando 2,5 μl de cada tubo patrón intermedio correspondiente con 1,25 ml de tampón de trabajo (PBS Tween), resultando las siguientes concentraciones: 2000, 400, 80, 16, 3'2, 0'64, 0'128, 0'025, 0'005 y 0'001 ppb ($\mu\text{g/l}$). Estas concentraciones quedaron reducidas a la mitad cuando el patrón se mezcló en volúmenes iguales (1,25 ml) con la concentración fija del anticuerpo monoclonal correspondiente (LIB-DDT5.25 con una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ para DDT, y LIB-PO con una concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$ para Clorpirifos). De este modo, las concentraciones finales empleadas en la curva de calibración fueron de: 1000, 200, 40, 8, 1'6, 0'32, 0'064, 0'0128, 0'0025 y 0'0005 ppb ($\mu\text{g/l}$) (ver Figura 6).

Respecto a la concentración de 1,4-dioxano que queda en la muestra, se estima que estaba alrededor de un 0,2%, cifra perfectamente tolerable para los inmunoensayos.

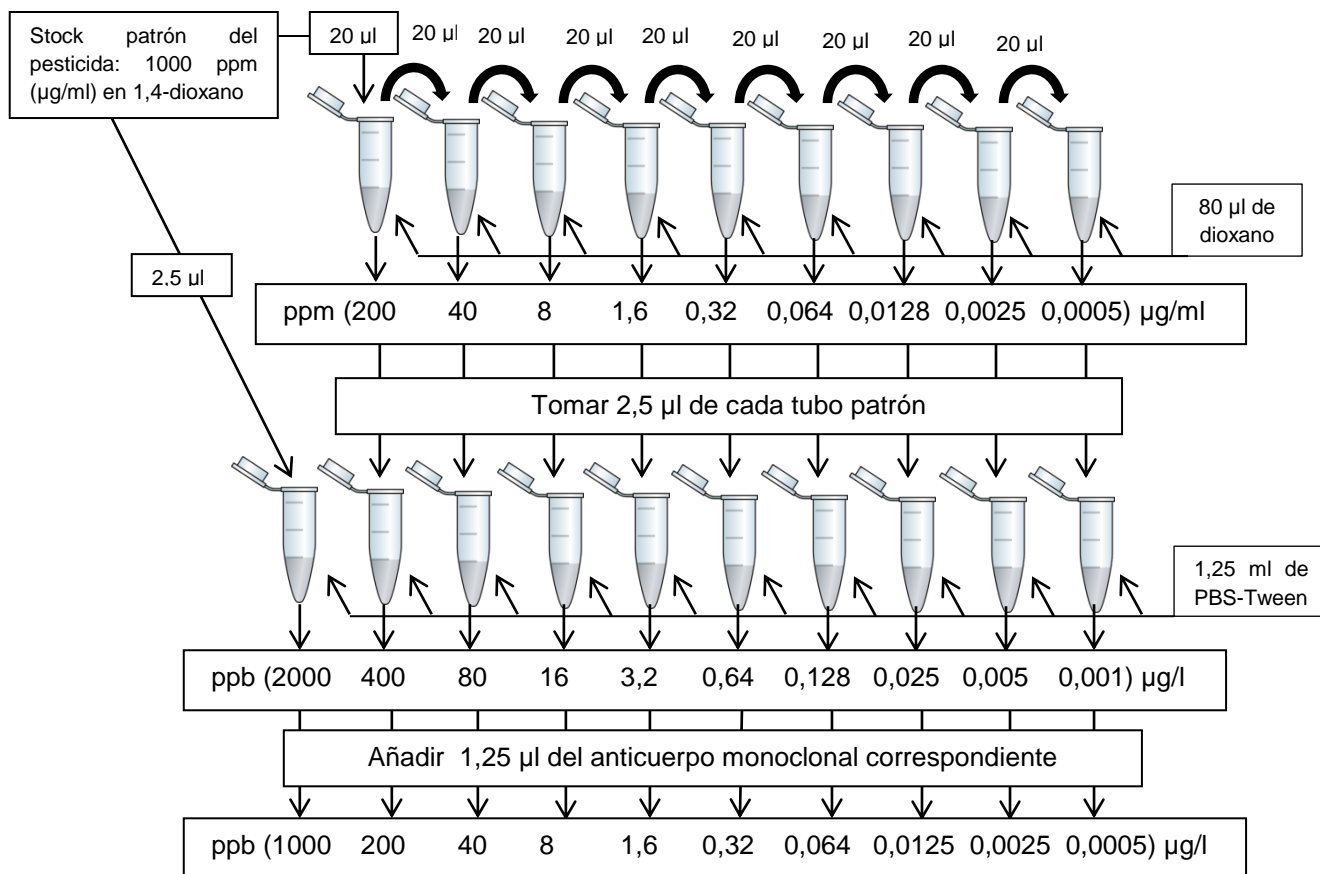


FIGURA 6. Esquema de la preparación de la muestra a inyectar para realizar la curva de calibración.

2.7. Procedimiento de obtención de la curva de calibración

Las curvas de calibración entregan información sobre la respuesta relativa que proporciona el sensor para diferentes patrones estándar de varias concentraciones del analito. De estas curvas se obtienen los parámetros de sensibilidad, LOD y rango de trabajo (Working Range–WR). Para la obtención de las curvas se representaron los cambios en la señal entregada por el sensor frente a las diferentes concentraciones de los patrones estándar empleados. Posteriormente, se realizó el ajuste de los puntos experimentales a la curva sigmoideal que se muestra en la siguiente ecuación (ver Figura 7):

$$y = y_0 + \left(\frac{A - y_0}{1 + \left(\frac{x}{x_0} \right)^B} \right) \quad (3)$$

Donde y es la variación de señal proporcionada por el sensor para cada concentración x del analito, y_0 es la asíntota inferior de la curva, A es la asíntota superior de la curva (la cual corresponde a la máxima señal proporcionada por el sensor, es decir, la correspondiente a la ausencia de analito), x_0 es la concentración de analito correspondiente al 50% de inhibición (I50), y B es la pendiente de la curva sigmoideal en el punto de inflexión.

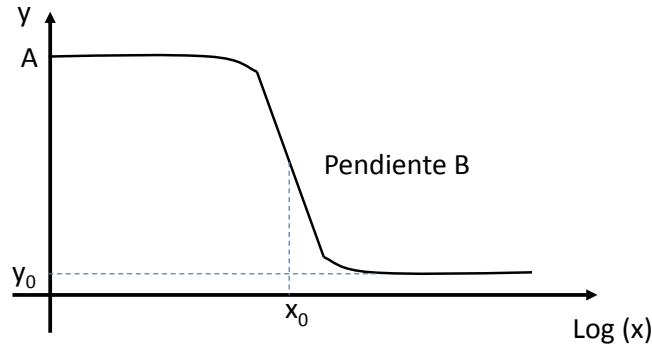


FIGURA 7. Gráfica de la curva sigmoideal según los parámetros de la Ecuación (3).

Estas curvas habitualmente se normalizan, de modo que en el eje de ordenadas se muestran porcentajes relativos de la variación de la señal registrada respecto del valor máximo de la señal entregada por el sensor en ausencia de analito.

A partir de la curva de calibración, el LOD se calcula como la concentración de analito que proporciona el 90% de la máxima señal (I_{90}). La sensibilidad se estima generalmente como la concentración del analito que proporciona el 50% de la señal máxima (I_{50}), y el WR a partir de las concentraciones de analito que producen señales entre el 80 y el 20% de la señal máxima (I_{80-20}) (Rocha, 2013).

2.8. Protocolo del inmunoensayo

La primera vez que se utiliza un cristal recién inmovilizado, se realiza un tratamiento previo con la finalidad de bloquear la adsorción no específica de MAb en aquellas zonas de la superficie del oro en las que no hay conjugado inmovilizado. Para ello se inyecta durante 15 minutos a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, en modo de flujo continuo, el tampón bloqueante PBS conteniendo 0.5% de BSA. Durante la inyección del tampón bloqueante, se registraron variaciones muy bajas de la señal del sensor. Una vez bloqueados los huecos se siguió el siguiente procedimiento de ensayo:

- 1) Inyección durante 10 minutos de flujo de tampón de trabajo PBS Tween para estabilizar la señal de la línea base.
- 2) Inyección de 250 μL de la muestra durante 15 minutos (previamente incubada durante 50 minutos). Cada concentración de la muestra se inyectó por triplicado.
- 3) Una vez finalizado el reconocimiento antígeno-anticuerpo, se regeneró el sensor inyectándole, durante 5 minutos, una solución 0.1 M de HCL, la cual "rompe" la unión entre el anticuerpo y el antígeno inmovilizado sobre el sensor, dejándolo preparado para realizar una nueva inyección de la muestra.
- 4) Flujo de tampón de trabajo durante 3 minutos.

Cada 4 inyecciones consecutivas de muestra, se inyecta “un blanco”, es decir, PBS-Tween sin analito, de este modo se verifica el buen funcionamiento del sensor comprobando que la señal que entrega es la máxima (ausencia de analito). Durante todo el proceso se registraron los cambios en la frecuencia y resistencia del sensor funcionalizado. En los pasos (1) y (2) la velocidad de flujo fue de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para los pasos (3) y (4) se aumentó a 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. Un ciclo completo de ensayo, incluyendo la regeneración, dura en torno a 33 minutos (ver Figura 8). Al final de los experimentos de cada día los cristales se limpiaban con agua bidestilada, se dejaban secar al aire y se almacenaban a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$.

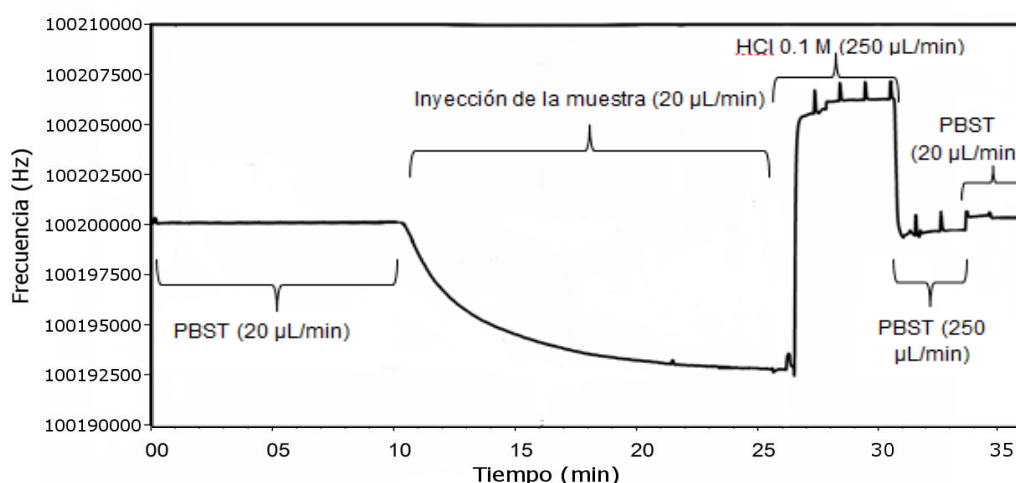


FIGURA 8. Representación de un ciclo completo de ensayo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto para los inmunosensores de DDT como para los de Clorpirifos se realizaron experimentos para obtener las curvas Dosis-Respuesta y las curvas de calibración. Para ello se utilizaron los materiales y métodos anteriormente descritos.

3.1 Inmunosensor de DDT

3.1.1. Experimento de la curva Dosis-Respuesta para DDT

La finalidad de este experimento es la determinación de la concentración del conjugado hapteno-proteína BSA-DDT5 inmovilizado y la concentración limitante de anticuerpo monoclonal LIB-DDT5.25. Para ello, se usaron un total de 6 sensores inmovilizados con concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA-DDT5 (2 sensores duplicados para cada concentración). Con cada sensor se registraron las señales proporcionadas para diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal LIB-DDT5.25: 0,3, 1, 3, 10, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para no

tener que limpiar el loop de teflón que contiene la muestra después de cada inyección del anticuerpo, se optó por realizar los ensayos de concentraciones más bajas a las más altas. En caso de optar por realizar los ensayos partiendo de concentraciones más altas a más bajas es necesario realizar una limpieza del loop que contiene la muestra haciendo pasar por él 3 ml de PBS-Tween durante unos minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9. En ella se ha representado la variación de la señal entregada por el equipo (Tensión de fase en Voltios) en función de la concentración del anticuerpo LIB-DDT5.25 para los seis sensores inmovilizados. Como era de esperar, a medida que aumenta la concentración del anticuerpo monoclonal LIB-DDT5.25, más cantidad de éste se une al conjugado BSA-DDT5 inmovilizado en el sensor. Esto se traduce en un aumento de la señal proporcionada hasta un valor limitante, en el cual la señal entregada tiende a estabilizarse, alcanzando una asíntota que determina la máxima señal entregada por el sensor. Otro resultado importante que también se deriva de estas gráficas es la gran variabilidad de respuestas obtenidas para cristales inmovilizados con la misma concentración del conjugado, estos errores pueden ser debidos al proceso manual de inmovilización, por ello, como futura línea de este trabajo se propone la realización automática del proceso mediante el sistema de fluidica proporcionado por la plataforma F20.

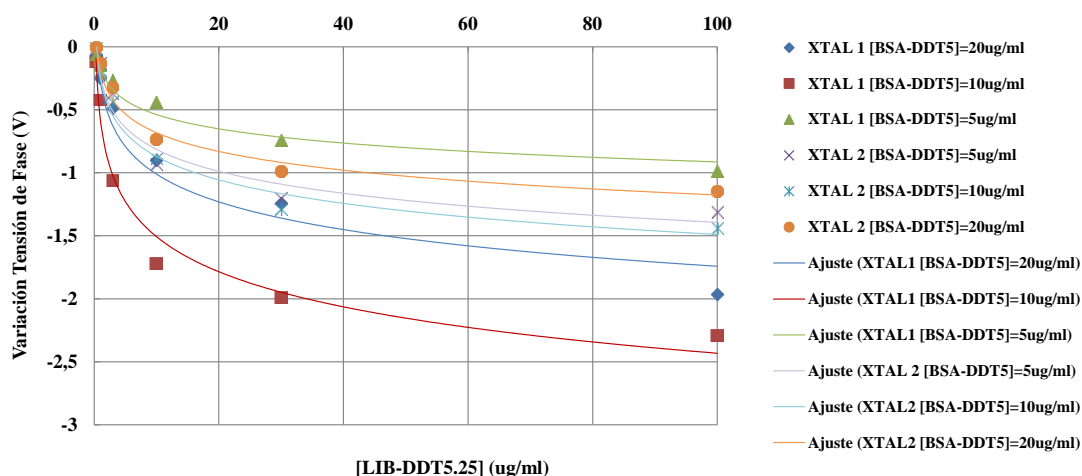


FIGURA 9. Resultados de la variación de señal entregada por los 6 sensores para la detección del DDT en función de la concentración de anticuerpo y para diferentes concentraciones del conjugado hapteno-proteína inmovilizado.

Para la concentración del conjugado hapteno-proteína se seleccionó la más baja que proporciona una señal lo suficientemente alta como para distinguirla del ruido del sistema electrónico. Además, cuanto más baja sea la concentración hapteno-proteína más atractivo comercialmente será el sensor, ya que hay una reducción del coste considerable. Siguiendo este criterio, la concentración elegida del conjugado hapteno-proteína BSA-DDT5 inmovilizado fue la de 10 $\mu\text{g/ml}$ del sensor 1.

En relación a la concentración limitante de anticuerpo monoclonal LIB-DDT5.25, para garantizar un inmunoensayo competitivo exitoso, se debe seleccionar una concentración de anticuerpo monoclonal que proporcione

menos del 60% del valor máximo obtenido. Por lo tanto, debe seleccionarse una concentración de anticuerpo monoclonal LIB-DDT5.25 inferior a 10 µg/ml. De entre todas las posibles, se eligió una concentración de 1 µg/ml para obtener señales razonables con una pérdida mínima de anticuerpo monoclonal.

3.1.2. Experimento de la curva de calibración preliminar del DDT

Este experimento se realizó para una concentración del conjugado BSA-DDT5 inmobilizado de 10 µg/ml, y una concentración limitante de anticuerpo monoclonal LIB-DDT5.25 de 1 µg/ml.

En la Figura 10 se muestra la curva de calibración obtenida, la cual debe ser considerada como preliminar. Para obtener una curva definitiva es necesario ensayar 4 medidas por cada concentración del analito, y obtener su media y desviación. Dichas condiciones no pudieron realizarse en este trabajo por falta de tiempo. Como se esperaba, por tratarse de un ensayo competitivo, a menor concentración de analito (DDT), mayor es señal detectada por el equipo.

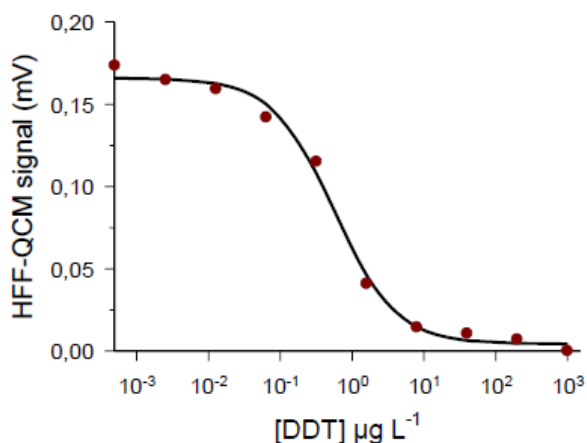


FIGURA 10. Curva de calibración preliminar obtenida para el DDT.

La curva permite hacer una estimación de los parámetros analíticos de este inmunosensor, los cuales se resumen en la Tabla 1:

TABLA 1. Valores de los parámetros analíticos del inmunosensor HFF-QCM del DDT.

Parámetros analíticos (µg/L)	Inmunosensor HFF-QCM del DDT
I50	0.62
LOD	0.08
WR	0.16-2.37

3.2 Inmunosensor de Clorpirifos 100 MHz HFF-QCM

3.2.1. Experimento de la curva Dosis-Respuesta para Clorpirifos

La finalidad de este experimento es la determinación de la concentración del conjugado hapteno-proteína BSA-PO inmovilizado y la concentración limitante del anticupero monoclonal LIB-PO. Para ello se usaron un total de 8 sensores inmovilizados con concentraciones de 5, 10, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de BSA-PO (2 sensores duplicados para cada concentración). Con cada sensor se registraron las señales proporcionadas para diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal LIB-PO: 0,3, 1, 3, 10, 30 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Al igual que en el experimento del DDT, se optó por realizar los ensayos de concentraciones más bajas a las más altas, evitándose así la limpieza del loop que contiene la muestra.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11. En ella se ha representado la variación de la señal entregada por el equipo (Tensión de fase en Voltios) en función de la concentración del anticuerpo LIB-PO para los 8 sensores inmovilizados. Los resultados son análogos a los obtenidos con el DDT. De nuevo se observa la variabilidad obtenida con sensores inmovilizados con la misma concentración de BSA-PO. Siguiendo los mismos criterios expuestos para el DDT, se seleccionó una concentración del conjugado BSA-PO de 10 $\mu\text{g/ml}$ y una concentración limitante de anticuerpo de 3 $\mu\text{g/ml}$.

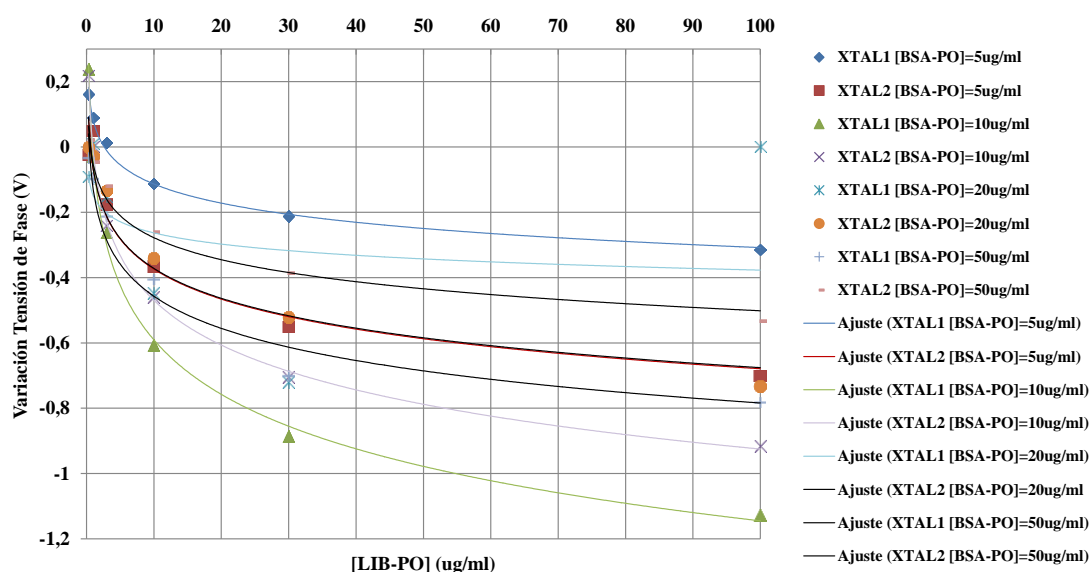


FIGURA 11. Resultados de la variación de señal entregada por los 6 sensores para la detección del Clorpirifos en función de la concentración de anticuerpo y para diferentes concentraciones del conjugado hapteno-proteína inmovilizado.

Aunque inicialmente estaba prevista la realización de las dos curvas de calibración (una para cada pesticida), las pruebas experimentales se extendieron más de lo previsto y sólo se ha alcanzado a la obtención de una curva preliminar para el DDT y a establecer las concentraciones a emplear en

la curva de calibración del Clorpirifos. Por esta razón no se incluye la curva de calibración para Clorpirifos.

3.3 Comparación con ELISA e inmunosensores SPR

En la Tabla II se muestra una comparativa de los resultados proporcionados por inmunoensayos para DDT realizados con diferentes tecnologías: Acústica de alta frecuencia (HFF-QCM), óptica (SPR) e inmunoquímica (ELISA). La sensibilidad (I_{50}), se mejora en un orden de magnitud respecto a SPR y se iguala respecto a ELISA. El LOD obtenido para HFF-QCM es del mismo orden de magnitud que SPR y un orden de magnitud mejor que ELISA. Por último, el WR es del mismo orden que ELISA, y un orden de magnitud inferior a SPR.

TABLA 2. Comparativa entre los resultados obtenidos entre la técnica ELISA, los inmunosensores SPR y los inmunosensores HFF-QCM para DDT.

Parámetro analítico ($\mu\text{g/L}$)	Inmunosensor HFF-QCM	ELISA ¹	Inmunosensor SPR ¹⁸
I_{50}	0.62	0.74	1.06
LOD	0.08	0.15	0.03
WR	0.16-2.37	0.22-2.47	0.11-10.07

La comparativa muestra que los valores obtenidos igualan o mejoran a los obtenidos con otras técnicas que se emplean actualmente (SPR y ELISA), con la ventaja de que la técnica aquí evaluada podría reducir de forma considerable el coste en relación a las técnicas SPR y el tiempo de ensayo en relación a las ELISA.

4. CONCLUSIONES

El trabajo de validación experimental realizado en este trabajo para la tecnología HFF-QCM, demuestra que se trata de una tecnología prometedora que proporciona LODs equivalentes a otras tecnologías ya existentes (SPR y ELISA) en menos tiempo y de forma más económica. La tecnología propuesta no pretende ser un sustituto de las técnicas HPLC, que hoy por hoy siguen siendo las que más sensibilidad proporcionan, sino más bien una técnica complementaria que permita descartar partidas contaminadas evitando de este modo su envío a los laboratorios de HPLC.

Como futuras líneas de este trabajo se proponen: 1) La obtención de una curva de calibración definitiva para DDT que confirme la obtenida en este trabajo; 2) la comparación de los resultados obtenidos con la técnica de HPLC; 3) la obtención de la curva de calibración para Clorpirifos; y 4) el testeo del equipo con muestras reales.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación del presente trabajo en el marco del proyecto AGL2013-48646-R de la convocatoria “Retos de la sociedad”.

Personalmente, yo también agradezco el apoyo proporcionado por la empresa AWSensors SL, en concreto a mi cotutora Yolanda Jiménez Jiménez, y a todos los participantes en este proyecto como son mi tutora Isabel Escriche Roberto, Ángel Montoya, Mario Visquert, Maria del Sol Juan y Lara. Y también a mi familia por su constante apoyo.

6. REFERENCIAS

- [1] Abad, A.; Manclús, J.J.; Mojarrad, F.; Mercader, J.V.; Miranda, M.A.; Primo, J.; Guardiola, V.; Montoya, A. 1997. Hapten synthesis and production of monoclonal antibodies to DDT and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (9), 3694-3702.
- [2] Arnau, A. et al. Acoustic sensors in analytical and biophysical studies, 29-30 August 2013, IMBB-FORTH, Heraklion, Crete.
- [3] Arnau, A.; Montagut, Y.; García, J. V.; Jimenez, Y. 2009. A different point of view on the sensitivity of quartz crystal microbalance sensors. *Measurement Science Technology*, 20 124004 (11pp.).
- [4] Blasco, C.; Vazquez-Roig, P.; Onghena, M.; Masia A.; Picó, Y. 2011. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4892– 4901.
- [5] Dorne, J.L.C.M.; Bordajandi, L.R.; Amzal, B.; Ferrari, P.; Verger P. 2009. Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food. *Trends in Analytical Chemistry*, Volume 28, Issue 6, Pages 695-707.
- [6] Edder P, Ortelli D, Corvi C. 2002. Survey of antibiotics residues in honey on the Swiss market. Poster presented at the 4th International Symposium on Veterinary Hormones and Drug Residue Analysis; Jun 4–7; Antwerp, Belgium. Dirección URL: http://ge.ch/dares/SilverpeasWebFileServer/reference_15.pdf?ComponentId=kmelia704&SourceFile=1271862252467.pdf&MimeType=application/pdf&Directory=Attachment/Images/; [Consulta: 15 Julio 2015].
- [7] EFSA Journal 2012a; 10(6):2752 Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe.
- [8] EFSA Journal 2012b; 10(5):2668. Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR).
- [9] Fung, YS. y Wong, YY.. 2001. Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect *Salmonella* in aqueous solution. *Analytical Chemistry*, 73: 5302-5309.
- [10] Henry, M.; Beguin, M.; Requier, F.; Rollin, O.; Odoux, J.F.; Aupinel, P.; Aptel, J.; Tchamitchian, S.; Decourtye, A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*: 1-4.

- [11] Hung, V.N.; Abe, T.; Minh, P.N.; Esashi, M. 2002. Miniaturized, highly sensitive single channel quartz-crystal microbalance. *Applied Physics Letters*. 81, 5069–5071
- [12] Krupke, CH.; Hunt, G.J.; Eitzer, B.D.; Andino, G.; Given, K. 2012. Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS ONE* 7(1): e29268. doi:10.1371/journal.pone.0029268.
- [13] Kumar, M.; Blasco, C.; Picó, Y. 2010. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4018–4040.
- [14] Larsen, J. C. 2006. Risk assessment of chemicals in European traditional. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 17, Issue 9, Pages 471-481.
- [15] Manclús, J.J.; Primo, J.; Montoya, A. 1996. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Insecticide Chlorpyrifos. 1. Monoclonal Antibody Production and Immunoassay Design. *J. Agr. Food Chem.*, 44 (12), 4052-4062.
- [16] March, C.; García, J.V.; Sánchez, A.; Arnau, A.; Jiménez, Y.; García, P.; Manclús J.J.; Montoya, A. 2014. High-frequency phase shift measurement greatly enhances the Sensitivity of QCM immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 65: 1-8.
- [17] March, C.; Manclús, J.J.; Jiménez, Y.; Arnau, A.; Montoya, A. 2009. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*. 78, 827–833.
- [18] Mauriz, E.; Calle, A.; Manclús, J.J.; Montoya, A.; Hildebrandt, A.; Barceló, D.; Lechuga, L.M. 2007. Optical immunosensor for fast and sensitive detection of DDT and related compounds in river water samples. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1410–1418.
- [19] Mauriz, E.; Calle, A.; Manclús, J.J.; Montoya, A.; Lechuga, L.M. 2007. Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387:1449–1458.
- [20] Montagut, Y.; García, J.V.; Jiménez, Y.; March, C.; Montoya, A.; Arnau, A. 2011. QCM Technology in Biosensors, in *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, Edited by: Pier Andrea Serra, Intech Open Access Publisher, ISBN.: 978-953-307-155-8, 26pp.
- [21] Montagut, Y.J.; García, J.V.; Jiménez, Y.; March, C.; Montoya, A.; Arnau, A. 2011. Validation of a Phase-Mass Characterization Concept and Interface for Acoustic Biosensors. *Sensors*, 11,4702–4720.
- [22] Rissato, S. R.; Galhiane, M. S.; Almeida M. V.; Gerenutti, M.A.; Benhard, M. 2007. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, Volume 101, Issue 4, Pages 1719-1726.
- [23] Rocha, M.I. 2013. Analysis, implementation and validation of a Love mode surface acoustic wave device for its application as sensor of biological processes in liquid media. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- [24] Rocha, M.I.; March, C.; Montoya, A.; Arnau, A. 2009. Surface Generated Acoustic Wave Biosensors for the Detection of Pathogens: A Review. *Sensors* 9(7), 5740-5769.
- [25] Sauerbrey, G. 1959. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* 155, 206-222.
- [26] VanEngelsdorp, D. y Meixner, M. D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, Volume 103, Pages S80-S95.

[27] Van Klaveren, J D. y Boon Polly, E. 2009. Probabilistic risk assessment of dietary exposure to single and multiple pesticide residues or contaminants: Summary of the work performed within the SAFE FOODS project. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 47, Issue 12, Pages 2879-2882.

[28] Whitehorn, P.R.; O'Connor, S.; Wackers, F.L.; Goulson, D. 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen reproduction. *Science*: 1-3.

[29] Wilczynska A. y Przybylowski, P. 2007. Residues of Organochlorine Pesticides in Polish Honeys. *Apiacta* 42, 16-24.

[30] X. D. Zhou, L. J.; Liu, M.; Hu, L.; Wang, J. Hu. 2002. Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27 1-2 , 341 345.