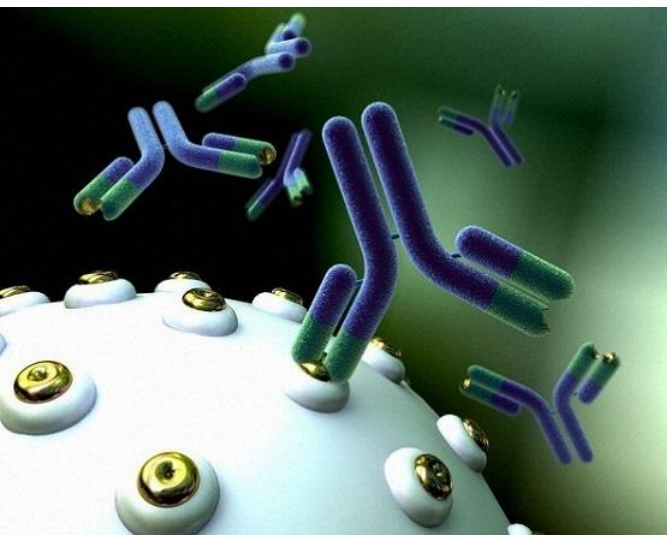




UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO



Aplicación y validación de la tecnología de inmunosensores piezoeléctricos de alta frecuencia (HFF-QCM) para la detección de pesticidas y antibióticos en miel

Valencia, mayo de 2020

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Lourdes Cervera Chiner

Dirigida por:
**Isabel Escriche Roberto
Yolanda Jiménez Jiménez
Ángel Montoya Baidés**



UNIVERSITAT
POLITÀCNICA
DE VALÈNCIA



Aplicación y validación de la tecnología de inmunosensores piezoeléctricos de alta frecuencia (HFF- QCM) para la detección de pesticidas y antibióticos en miel

Programa de Doctorado en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Lourdes Cervera Chiner

Dirigida por:

Isabel Escriche Roberto

Instituto Universitario de
Ingeniería de Alimentos para el
Desarrollo

Universitat Politècnica de
Valencia

Yolanda Jiménez Jiménez

Grupo de Biosensores
Centro de Investigación e
Innovación en Bioingeniería

Universitat Politècnica de
Valencia

Ángel Montoya Baidés

Grupo de Inmunotecnología
Centro de Investigación e
Innovación en Bioingeniería

Universitat Politècnica de
Valencia

Valencia, mayo de 2020



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Dra. Isabel Escriche Roberto, Catedrática de Universidad, perteneciente al Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de València e Investigadora del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la misma Universidad.

Dra. Yolanda Jiménez Jiménez, profesora titular de universidad e investigadora perteneciente al Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería de la Universitat Politècnica de València.

Dr. Ángel Montoya Baidés, profesor titular de universidad e investigador perteneciente al Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería de la Universitat Politècnica de València.

Hacen constar que:

La memoria titulada “Aplicación y validación de la tecnología de inmunosensores piezoeléctricos de alta frecuencia (HFF-QCM) para la detección de pesticidas y antibióticos en miel” que presenta D^a Lourdes Cervera Chiner para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València, ha sido realizada en el Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD) y en el Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería (Ci2B) bajo su dirección y que reúne las condiciones para ser defendida por su autora.

Valencia, 29 de mayo de 2020

Fdo. Isabel Escriche Roberto Fdo. Yolanda Jiménez Jiménez Fdo. Ángel Montoya Baidés

A mis padres

Agradecimientos

Con esta tesis culmino una etapa formativa de mi vida. El doctorado ha sido una experiencia muy enriquecedora, que me ha permitido crecer tanto a nivel académico como personal, desarrollando habilidades muy valiosas para mi futura vida profesional.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora Isabel por haberme ofrecido la oportunidad de realizar el doctorado con ella, es una gran mujer con una personalidad fuerte, gran seguridad profesional, mucho dinamismo y muy emprendedora. Le agradezco haberme admitido en su grupo de investigación y haberme puesto en contacto con mis otros directores: Yolanda y Ángel, de los que también estoy muy agradecida por todo lo que he aprendido de ellos y por haber puesto a mi disposición sus equipos, laboratorios y todo el material para realizar esta tesis. Quiero agradecer, en especial, a Yolanda por haberme permitido investigar en el interesante mundo de los biosensores, quiero darle las gracias por todo el tiempo que me ha dedicado y su constante supervisión. Cabe destacar su talento al haber sido capaz de transferir la investigación meramente académica a la aplicación práctica en la industria. Le agradezco su enorme prudencia y sus reflexiones meditadas. A Ángel quiero agradecerle todo lo que me ha enseñado acerca del apasionante mundo de la inmunotecnología y todo el tiempo que me ha dedicado, siendo admirable la meticulosidad con la que analiza los resultados y el gran rigor que aplica a la investigación.

Entre todos hemos conseguido formar un magnífico equipo de investigación. Muchas gracias a los tres por vuestra atención y por todo lo que me habéis enseñado a nivel académico y personal durante estos años.

Así mismo quiero agradecer a la Generalitat Valenciana y al Fondo Social Europeo por haberme proporcionado la financiación económica mediante el contrato "*Ayudas para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral*" (**ACIF/2016/132**), ya que sin este contrato la realización de esta tesis no habría sido posible. Además, quiero agradecer de nuevo a la Generalitat Valenciana y al Fondo Social Europeo por el apoyo financiero para llevar a cabo una estancia predoctoral en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León (ICTAL), España (**BEFPI/2018/021**).

Y no menos importante es el agradecimiento al Ministerio Español de Economía y Competitividad, que mediante Fondos FEDER ha financiado esta investigación a través del proyecto titulado: "*Diseño de una plataforma basada en matrices de sensores de cuarzo de alta resolución para HTS (High-Throughput Screening) de residuos en mieles*" (PQHTS-HONEY, **AGL 2013-48646-R**).

A continuación, quería agradecer a Carmen March por haber estado en los inicios de mi tesis transmitiéndome su experiencia y conocimientos en el manejo de la tecnología QCM y explicándome con todo detalle los protocolos, manejo del equipo, dándome sus consejos, trucos, etc. Le agradezco toda su atención y ayuda, también agradezco los momentos compartidos en el Ci2B y que me amenizara la estancia en el laboratorio con su humor y sus anécdotas. Muchas gracias a todo el equipo de inmunotecnología del Ci2b: Juanjo Manclús, M^aJosé Lianes, y M^aJosé Moreno. Muchas gracias también a toda la gente que conocí en el Ci2b: a los doctorandos (Jordi, Alejandro, Mayte y Sara), investigadores, profesores, etc, con los que compartí la primera etapa de mi doctorado. Quiero hacer una mención especial a David

Fernández Benavides por ser una persona realmente inspiradora y motivadora y le agradezco que me permitiera colaborar en su investigación de biosensores cerámicos piezoeléctricos.

Y no debo olvidar agradecer a todo el equipo de la empresa AWSensors por su ayuda cuando fui a la empresa, por su apoyo técnico cuando surgieron problemas con el equipo y por todo su asesoramiento: Román, José Vicente, María García, Maribel, María Calero, Pablo, etc.

También estoy muy agradecida a Elba por el magnífico trato que me dio en mi estancia en León, por ser tan atenta y por transmitirme tantas enseñanzas y experiencia sobre la técnica SPR, gracias a ella adquirí una visión más global del mundo de los biosensores. Muchas gracias también a toda la gente maravillosa que trabajaba en el ICTAL: Javi, Eugenia, Cristina, Camino, etc.

Además, quiero dar las gracias a Marisol por proporcionarme las muestras de miel y los equipos de cromatografía. Gracias a Lara por haber sido mi compañera de laboratorio desde los inicios, por su alegría y buen rollo que trasmite. También quiero dar las gracias a las profesoras Eva García, Ana Fuentes y al técnico Alberto Yuste por su ayuda en mi experiencia como docente de prácticas. Gracias a las compañeras del IUAD que conocí haciendo mi trabajo fin de carrera y que me reencontré haciendo el doctorado: Susana Rubio y Cristina Burca, sois geniales. Gracias a Bogdan, quien por su forma de trabajar e investigar también fue fuente de inspiración y motivación para mí. A todos los doctorandos que trabajan en el IUIAD: Sara, Ever, Miguel Ángel, Lady, Eva, Diego, Ramón, etc. con los que he compartido mi última etapa del doctorado.

A los técnicos del IUIAD: Milagros, Mario, Virginia, Carolina y Jesús y a todo el personal del IUIAD.

Por último y, no me menos importante, quiero dar las gracias a mi familia, a mis padres quienes inculcaron en mí buenos valores de trabajo, esfuerzo y superación y que con su ejemplo me motivaron a realizar este doctorado. Gracias también por su constante apoyo durante todo este camino que no ha sido fácil, por estar ahí siempre escuchándome y animándome. También quiero agradecer al resto de la familia a mi hermana, a mis tías M^{re} José y Elvira por estar siempre ahí preocupándose por mí y animándome. En especial les dedico esta tesis a las personas que partieron de este mundo durante la realización de esta tesis: mis abuelas Mercedes y Elvira. Y a mi prima Sara, quien nos dejó a la temprana edad de 22 años.

También quiero dar las gracias a mi novio Fran por su apoyo, ayuda y paciencia tras las interminables horas de experimental, y por sus enseñanzas a lo largo de mi vida académica. También darles las gracias a sus padres: Mila, por haber sido de gran apoyo, siempre dispuesta a escuchar y por todos sus consejos. Y a Paco, quien nos dejó en 2016.

Además, quiero dar las gracias a mis amigos de agrónomos: Amparo, Carla, Alfredo, Natibel, Belén, Helena, etc, por estar ahí siempre. Y a los amigos más recientes: Cristian, Cristina, Nacho, Teresa, Lina, María, etc.

Cabe mencionar que a veces de lo malo surge algo bueno y es que la redacción y corrección de esta tesis se realizó en pleno confinamiento por el COVID-19. Así, que en cierto modo de esta situación tan dramática se ha podido sacar algo positivo.

En definitiva, muchas gracias a todos aquellos que han hecho posible la realización de esta tesis.

Resumen

Esta tesis doctoral se enmarca en uno de los retos demandados por la sociedad relativo a la seguridad y calidad alimentaria, establecido en los actuales planes estatales y europeos de investigación científica, técnica y de innovación. En particular, la investigación realizada en esta tesis doctoral, contribuye a la validación de una técnica de análisis novedosa para la detección de pesticidas y antibióticos de interés en la miel. Esta técnica está basada en el uso combinado de la tecnología de sensores acústicos de alta resolución (*High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance* – HFF-QCM) funcionalizados con anticuerpos monoclonales, como elemento de reconocimiento biológico, para la detección de dos pesticidas (carbaril y DDT) y un antibiótico (sulfatiazol), en la matriz alimentaria miel. La metodología desarrollada se presenta como una técnica de análisis, alternativa y/o complementaria a las ya existentes, que resuelve algunos inconvenientes de las mismas; con la ventaja de requerir bajo consumo de muestra, ser fiable, simple, de bajo coste y de fácil manejo, por lo que no necesita de personal altamente cualificado. Además, es una técnica rápida que proporciona los resultados en pocos minutos, y está basada en instrumentación portátil, lo que facilita su implantación en la línea de trabajo.

Los límites de detección alcanzados en miel por los inmunosensores HFF-QCM para carbaril, DDT y sulfatiazol fueron: 7, 24 y 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Por su parte, los límites de cuantificación para los mismos analitos fueron: 17, 52 y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Los valores obtenidos con esta nueva tecnología son del mismo orden de magnitud que las técnicas de referencia actuales (cromatografía, SPR y ELISA), y confirman que cumple con los LMRs establecidos en el marco normativo actual.

Respecto a la validación de esta nueva tecnología, el inmunosensor HFF-QCM desarrollado para la detección de sulfatiazol cumplió los requisitos de precisión y exactitud establecidos por la guía SANCO 12571/2013 para concentraciones de sulfatiazol en miel iguales o superiores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los inmunosensores HFF-QCM desarrollados para la detección de carbaril y DDT se aproximaron a los criterios de validación recomendados por la guía SANCO 12571/2013.

Los resultados obtenidos con la técnica propuesta para el análisis de mieles reales han sido corroborados mediante cromatografía. En este sentido, ninguna de las muestras de miel reales analizadas mediante cromatografía y HFF-QCM reveló la presencia de pesticidas o de antibióticos en la miel, lo que confirma la fiabilidad de la técnica para la detección de estos contaminantes.

Los hallazgos obtenidos en esta tesis son prometedores y establecen un punto de partida para futuros desarrollos encaminados a lograr la detección simultánea de varios analitos en un único análisis y muestra. Esto podría lograrse con un array de sensores HFF-QCM.

En definitiva, la investigación realizada pone de manifiesto que los inmunosensores basados en la tecnología HFF-QCM son una alternativa seria a las técnicas actuales, para la cuantificación *in situ* de pesticidas y antibióticos en la industria de envasado de la miel.

Resum

Aquesta tesi doctoral s'emmarca en un dels reptes demandats per la societat relatiu a la seguretat i qualitat alimentària, establert en els actuals plans estatals i europeus d'investigació científica, tècnica i d'innovació. En particular, la investigació realitzada en aquesta tesi doctoral, contribuïx a la validació d'una tècnica d'anàlisi nova per a la detecció de pesticides i antibiòtics d'interés en la mel. Esta tècnica està basada en l'ús combinat de la tecnologia de sensors acústics d'alta resolució (*High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance* - HFF-QCM) funcionalitzats amb anticossos monoclonals, com a element de reconeixement biològic, per a la detecció de dos pesticides (carbaril i DDT) i un antibiòtic (sulfatiazol), en la matriu alimentària mel. La metodologia desenvolupada es presenta com una tècnica d'anàlisi, alternativa y/o complementària a les ja existents, que resol alguns inconvenients de les mateixes; amb l'avantatge de requerir baix consum de mostra, ser fiable, simple, de baix cost i de fàcil maneig, per la qual cosa no necessita de personal altament qualificat. A més, és una tècnica ràpida que proporciona els resultats en pocs minuts, i està basada en instrumentació portàtil, la qual cosa facilita la seua implantació en la línia de treball

Els límits de detecció aconseguits en mel pels immunosensors HFF-QCM per a carbaril, DDT i sulfatiazol van ser: 7, 24 i 0.10 µg/kg, respectivament. Per la seua banda, els límits de quantificació per als mateixos analits van ser: 17, 52 i 2 µg/kg, respectivament. Els valors obtinguts amb aquesta nova tecnologia són del mateix orde de magnitud que les tècniques de referència actuals (cromatografia, SPR i ELISA), i confirmen que complix amb els LMRs establerts en el marc normatiu actual.

Respecte a la validació d'esta nova tecnologia, l'immunosensor HFF-QCM desenvolupat per a la detecció de sulfatiazol va complir els requisits de precisió i exactitud establerts per la guia SANCO 12571/2013 per a concentracions de sulfatiazol en mel iguals o superiors a 10 µg/kg. Els immunosensors HFF-QCM desenvolupats per a la detecció de carbaril i DDT es van aproximar als criteris de validació recomanats per la guia SANCO 12571/2013.

Els resultats obtinguts amb la tècnica proposta per a l'anàlisi de mels reals han sigut corroborats per mitjà de cromatografia. En aquest sentit, cap de les mostres de mel reals analitzades per mitjà de cromatografia i HFF-QCM va revelar la presència de pesticides o d'antibiòtics en la mel, la qual cosa confirma la fiabilitat de la tècnica per a la detecció d'estos contaminants.

Les troballes obtinguts en aquesta tesi són prometedors i estableixen un punt de partida per a futurs desenvolupaments encaminats a aconseguir la detecció simultània de diversos analits en un únic anàlisi i mostra. Açò podria aconseguir-se amb una matriu de sensors HFF-QCM.

En definitiva, la investigació realitzada posa de manifest que els immunosensors basats en la tecnologia HFF-QCM són una alternativa seriosa a les tècniques actuals, per a la quantificació *in situ* de pesticides i antibiòtics en la indústria d'envasament de la mel.

Abstract

This thesis is part of one of the challenges demanded by society regarding food safety and quality, established in the current state and European plans for scientific, technical and innovation research. In particular, the research carried out in this doctoral thesis contributes to the validation of a novel analysis technique for the detection of pesticides and antibiotics of interest in honey. This technique is based on the combined use of high resolution acoustic sensor technology (High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance - HFF-QCM) functionalized with monoclonal antibodies, as a biological recognition element, for the detection of two pesticides (carbaryl and DDT) and an antibiotic (sulfathiazole), in the honey food matrix. The developed methodology is presented as an analysis technique, alternative and / or complementary to those that already exist, which solves some of their drawbacks; with the advantage of requiring low sample consumption, being reliable, simple, low cost and easy to use, so it does not require highly qualified personnel. In addition, it is a fast technique that provides results in a few minutes, and is based on portable instrumentation, which facilitates its implementation in the industry.

The detection limits reached in honey by the HFF-QCM immunosensors for carbaryl, DDT and sulfathiazole were: 7, 24 and 0.10 $\mu\text{g} / \text{kg}$, respectively. On the other hand, the quantification limits for the same analytes were: 17, 52 and 2 $\mu\text{g} / \text{kg}$, respectively. The values obtained with this new technology are of the same order of magnitude as the current reference techniques (chromatography, SPR and ELISA), and confirm that it meets the MRLs established in the current regulatory framework.

Regarding the validation of this new technology, the HFF-QCM immunosensor developed for the detection of sulfathiazole meet the precision and accuracy requirements established by the SANCO 12571/2013 guideline for concentrations of sulfathiazole in honey equal to or greater than 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$. The HFF-QCM immunosensors developed for the detection of carbaryl and DDT approached the validation criteria recommended by the SANCO guide 12571/2013.

The results obtained with the proposed technique for the analysis of real honeys have been verified by chromatography. In this sense, none of the real honey samples analyzed by chromatography and HFF-QCM revealed the presence of pesticides or antibiotics in honey, confirming the reliability of this technique for the detection of these contaminants.

The findings obtained in this thesis are promising and establish a starting point for future developments aimed at achieving the simultaneous detection of several analytes in a single analysis and sample. This could be accomplished with an array of HFF-QCM sensors.

Ultimately, the research carried out shows that immunosensors based on HFF-QCM technology are a serious alternative to current techniques for in situ quantification of pesticides and antibiotics in honey packaging industry.

Prefacio

La presente tesis doctoral se ha centrado en la aplicación y validación de la tecnología de inmunosensores basados en microbalanza de cuarzo de alta frecuencia (HFF-QCM), para la detección de pesticidas y antibióticos en miel.

La tesis se ha estructurado en distintos capítulos. En el capítulo 1 se presenta una introducción, en la que, en primer lugar, se expone el contexto de la investigación desarrollada y los grupos de investigación que han intervenido en su dirección, así como la financiación que ha permitido su realización (proyectos, contratos y becas).

Dado el carácter multidisciplinar de esta tesis, la introducción se ha dividido en tres grandes bloques. *En el primero* se expone la miel y su marco legal, a continuación, se hace un breve repaso de la presencia y riesgos de los pesticidas y antibióticos para la salud. Seguidamente, se explican las vías de exposición de los pesticidas y antibióticos para las abejas y, por ende, su presencia en la miel. En siguiente lugar, se exponen las diferentes técnicas existentes para la detección de pesticidas y antibióticos en miel, identificando sus ventajas y desventajas. De los inconvenientes de las técnicas tradicionales surge la necesidad de proponer técnicas alternativas de detección de contaminantes en la miel. En el *segundo bloque* de la introducción se exponen los biosensores como tecnología alternativa a las actuales y se describen los tipos que existen. Se dedica especial atención a los inmunosensores, ya que de este tipo de biosensor versa la presente tesis. Se describen los fundamentos teóricos y los pasos necesarios para desarrollar un inmunosensor. El *tercer bloque* de la introducción trata sobre el marco teórico relacionado con los transductores acústicos basados en cristales piezoeléctricos de cuarzo. Se explican los fundamentos físicos en los que se basan este tipo de sensores y se describe el equipo de medición que se ha empleado en esta tesis. A continuación, se examina el estado del arte de los inmunosensores empleados para la detección de pesticidas y antibióticos en miel.

En el capítulo 2 se define el objetivo general de esta tesis y los objetivos específicos. En el capítulo 3 se presenta el plan de trabajo en el que se detallan las etapas y tareas necesarias para alcanzar dichos objetivos.

El capítulo 4 incluye los resultados de la tesis, está estructurado en capítulos correspondientes a tres artículos publicados en revistas del área de tecnología de alimentos, relativos al desarrollo y validación de inmunosensores HFF-QCM para la detección de pesticidas y antibióticos en miel. En primer lugar, se presentan dos artículos referentes a la detección de los pesticidas carbaril y DDT en miel mediante inmunosensores HFF-QCM. El tercer artículo se refiere al desarrollo de

un inmunosensor HFF-QCMD para la detección del antibiótico sulfatiazol en miel y la validación del método siguiendo los criterios de la SANCO, así como la comparación con la técnica cromatográfica LC-MS de referencia.

En los capítulos 5 y 6, se presentan las conclusiones de la tesis y la producción científica resultante, respectivamente. Finalmente, en el capítulo 7 se plantean las líneas de investigación futuras, estableciéndose los retos que deben afrontarse para continuar esta investigación, destacándose especialmente el reto de la detección simultánea de varios analitos, mediante un array de inmunosensores HFF-QCM.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	3
1.1.- Contexto de la investigación	3
1.2.- La miel y marco legal.....	4
1.3.- Presencia y riesgos de contaminantes químicos	6
1.3.1.- Pesticidas.....	6
1.3.2.- Antibióticos	14
1.4.- Técnicas analíticas de referencia empleadas en el análisis de residuos en miel	19
1.4.1.- Técnicas cromatográficas	19
1.4.2.- Técnicas de cribado (screening)	29
1.5.- Validación de métodos analíticos	32
1.6.- Biosensores	33
1.7.- Aspectos bioquímicos de los inmunosensores	36
1.7.1.- Formatos de inmunoensayo.....	37
1.7.2.- Pasos para el desarrollo del inmunosensor.....	41
1.8.- Transductores acústicos basados en cristales piezoeléctricos de cuarzo.....	51
1.8.1.- Fundamentos físicos de los transductores piezoeléctricos basados en cristales de cuarzo	51
1.8.2.- Celdas de soporte del sensor y equipos de caracterización	56
1.8.3.- Ventajas y desventajas de los inmunosensores piezoeléctricos basados en tecnología HFF-QCM	63
1.9.- Estado del arte de biosensores para la detección de pesticidas y antibióticos.....	65
1.10.- Motivación de la tesis	69
1.11.- Referencias Bibliográficas	70
2. Objetivos	101
2.1.- Objetivo General	101
2.2.- Objetivos Específicos.....	101
3. Plan de trabajo	105
4. Resultados	109
4.1.- High fundamental frequency quartz crystal microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey.....	111
4.2.- Detection of ddt and carbaryl pesticides in honey by means of immunosensors based on high fundamental frequency quartz crystal microbalance (HFF-QCM).....	131
4.3.-High fundamental frequency quartz crystal microbalance (hff-qcmd) immunosensor for detection of sulfathiazole in honey.....	143
5. Conclusiones	165

5.1.- Conclusiones específicas	165
5.2.- Conclusiones Generales	168
6. Producción científica y actividades formativas	171
7. Líneas futuras	177

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alertas alimentarias anuales a nivel europeo debidas a la presencia de antibióticos en miel, expresado en valores absolutos (Elaboración propia, datos obtenidos de RASFF, 2020).	17
Figura 2. Porcentaje relativo de los principales antibióticos detectados en la miel a nivel europeo desde 2002 hasta 2019 (Elaboración propia, datos obtenidos de RASFF, 2020).....	18
Figura 3. Proporción de las diferentes sulfamidas detectadas en alertas alimentarias en miel en la Unión Europea en el periodo de 2002 a 2019. (Elaboración propia, datos obtenidos de RASFF, 2020).	18
Figura 4. Esquema general de un biosensor.	34
Figura 5. Diferentes tipos de biosensores de acuerdo con el transductor empleado y con el bioreceptor empleado.	35
Figura 6. Formatos de inmovilización en inmunoensayos sobre soporte sólido.	38
Figura 7. Principio de detección del inmunoensayo competitivo con hapteno conjugado inmovilizado.	40
Figura 8. Preparación del hapteno conjugado a partir de analitos de bajo peso molecular.	42
Figura 9. Generación de respuesta inmune en el ratón para la producción de anticuerpos.	43
Figura 10. Producción de anticuerpos monoclonales.	45
Figura 11. Procedimiento genérico de inmovilización covalente de haptenos conjugados al sensor mediante monocapas autoensambladas mixtas (mSAM).	47
Figura 12. Celda de inmovilización (AWSensors S.L.). A) Celda de inmovilización desmontada con el sensor HFF-QCM en la base. B) Celda de inmovilización montada con el sensor HFF-QCM en su interior.	48
Figura 13. Curva de calibración estándar y sus parámetros analíticos.	50
Figura 14. Representación de la ecuación empírica de Sauerbrey.	53
Figura 15. A) Sensores de baja frecuencia (5 y 10MHz). B) Sensor HFF-QCM de alta frecuencia (100 MHz).	55
Figura 16. Tecnología <i>Inverted Mesa</i>	56
Figura 17. A) Sensor HFF-QCM montado sobre marco de PPS. B) Sensor HFF-QCM montado sobre soporte de PCB.	56
Figura 18. Celda de fluídica AWSensors. A) Celda de fluídica desmontada con un sensor HFF-QCM colocado en la parte inferior. B) Celda de fluídica montada con el sensor HFF-QCM en su interior. C) Celda de fluídica insertada en el equipo de medida y con el sistema de flujo conectado.	57
Figura 19. Plataforma de medida de sensores acústicos, integrada por el sistema de caracterización electrónica AWS A20 (bloque superior) y el sistema de microfluídica AWS F20 (bloque inferior).	58
Figura 20. Sistema de fluídica AWS F20.	59
Figura 21. Software AWS Suit 2.5.0 version (AWSensors) permite el control de la fluídica y registra en tiempo real las variaciones de frecuencia y disipación del sensor.	60
Figura 22. Captura de pantalla del software AWS Suite con la herramienta de barrido del sensor, modo “Sweep”. Espectro de un sensor de 100 MHz en aire.	61
Figura 23. Representación de los espectros en aire (frecuencia frente a conductancia, G) de un lote de sensores HFF-QCM.	62
Figura 24. Representación de los espectros en aire (frecuencia frente a susceptancia, B) de un lote de sensores HFF-QCM.	62

Figura 25. Registro real obtenido con el equipo de medida. Registro de la frecuencia (panel de arriba) y disipación (panel de abajo) de un sensor HFF-QCM en un ciclo completo de ensayo con anticuerpo.	63
Figura 26. Fundamento de los inmunosensores SPR.	64
Figura 27. HFF-QCM Immunoassay cycle.	120
Figura 28. HFF-QCM carbaryl calibration curves in PBS and in honey diluted 1/200 in PBS. Each point it the average of 4 determinations. Vertical bars represent standard deviation.	121
Figura 29. HFF-QCM immunosensor response of five independent honey samples spiked with carbaryl at 50 µg/kg. Continuous and dashed arrows mark the injection of honey samples and regeneration steps, respectively. The upper panel shows the temperature during the assays.	123
Figura 30. Comparison of HFF-QCM and LC-MS/MS in the analysis of fortified honey samples.	125
Figura 31. Calibration standard curves of the HFF-QCM immunosensors for carbaryl and DDT. Curves were performed in PBS-diluted honey: 1/200 for carbaryl and 1/140 for DDT. Each point is the mean ± SD of three replicates.	137
Figura 32. HFF-QCM immunosensor response: Two replicates of non-spiked honey (reference signal), followed by three replicates of honey spiked with 200 µg kg ⁻¹ DDT and a new reference, non-spiked honey sample. The blue line shows the frequency variation during the assays. Arrows indicate the injection of honey samples and the horizontal brackets (lower part) indicate the regeneration step.	139
Figura 33. Sensorgram of HFF-QCMD response to the biorecognition events of different sulfathiazole concentrations in diluted honey during the performance of inhibition competitive assays.	153
Figura 34. HFF-QCMD sulfathiazole calibration curves in PBS and in honey diluted 1/140 in PBS. Each point is the average of four determinations. Vertical bars represent standard deviation.	153

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Notificaciones registradas por la presencia de pesticidas en miel (RASFF, 2020).	11
Tabla 2. Métodos de extracción de pesticidas y antibióticos en miel para cromatografía (Albero-Romano, 2009).	27
Tabla 3. Modo de cálculo para la obtención de los parámetros analíticos de la curva de calibración a partir de los parámetros matemáticos.	51
Tabla 4. Ejemplos de inmunosensores piezoeléctricos para la detección de pesticidas.	67
Tabla 5. Inmunosensores piezoeléctricos para la detección de antibióticos.	68
Table 6. Analytical parameters obtained for the HFF-QCM standard curves of carbaryl in PBS and in 1/200 diluted honey.	122
Table 7. Analysis of carbaryl spiked honey samples. Comparison of HFF-QCM technology with LC-MS/MS.	124
Table 8. Analytical parameters obtained for the HFF-QCM immunosensor of carbaryl and DDT in standard assays and in real honey samples.	138
Table 9. Analysis of spiked honey samples (carbaril and DDT) by means of the HFF-QCM immunosensors.	140
Table 10. Frequency signal shifts (Δf) obtained with the HFF-QCMD sensor in the checkerboard titration of several concentrations of the immobilized SA2-BSA conjugate and monoclonal anti-sulfonamide antibody 6C11. Each value is expressed as the average and the standard deviation of three measurements.	152
Table 11. Mathematical parameters of logistic equation.	154
Table 12. Analytical parameters obtained for the HFF-QCMD standard curves of sulfathiazole in PBS and in 1/140 diluted honey.	155
Table 13. Comparison of LODs reported by different techniques for sulfathiazole detection in honey.	156
Table 14. Comparison of HFF-QCMD immunosensor and LC-MS/MS for the analysis of sulfathiazole-spiked honey samples (n=5).	157

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1	50
Ecuación 2	52
Ecuación 3	54
Equation 4	117
Equation 5	149

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición

AED: Detector de emisión atómica

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AFB: *American Foulbrood* (Loque americana)

B: Susceptancia

BSA: *Bovine serum albumin* (Albúmina de suero bovino)

CCPR: Comité sobre Residuos de Plaguicidas

Ci2B: Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería

CLIA: *Chemiluminescent Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas quimioluminiscente)

COPs: Compuestos orgánicos persistentes

CV: Coeficiente de variación

DAD: Array de diodos

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

ECD: Detector de captura de electrones

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

EDC: Carboxi-diimida

EFB: *European Foulbrood* (Loque europea)

EFSA: *European Food Safety Authority*

EFTA: *European Free Trade Association* (Asociación Europea de Comercio Libre)

EI: Electron impact ionization (Ionización por impacto de electrones)

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima)

EMA: *European Medicines Agency* (Agencia Europea de Medicamentos)

EPO: Ente Promotor Observador

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FID: Detector de ionización de llama

FLD: Detector espectrofluorométrico

FPD: Detector fotométrico de llama

G: Conductancia

GC-MS/MS: Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas en tándem

HFF-QCM: *High-Fundamental-Frequency Quartz Crystal Microbalance* (Microbalanza de Cristal de Cuarzo de Alta Frecuencia Fundamental)

HFF-QCMD: *High-Fundamental-Frequency Quartz Crystal Microbalance with dissipation* (Microbalanza de Cristal de Cuarzo de Alta Frecuencia Fundamental con Disipación)

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

HTS: *High-Throughput Screening* (Cribado de alto rendimiento)

ICA: Ensayo inmunocromatográfico colorimétrico-quimioluminiscente

ICH: *International Conference for Harmonization*

IUIAD: Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo

LC-MS/MS: Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem

LI: Límite inferior del rango de trabajo

LLE: Extracción líquido-líquido

LMR: Límite máximo de residuos

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de detección

LS: Límite superior del rango de trabajo

MAb: *Monoclonal antibody* (Anticuerpo monoclonal)

MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

MDA: *Minnesota Department of Agriculture*

MHDA: *16-mercaptohexadecanoic acid* (Ácido mercaptohexadecanoico)

MIPs: *Molecularly Imprinted Polymers* (Polímeros de huella molecular)

MRM: Métodos multiresiduos

MRPL: Límite mínimo de funcionamiento requerido

mSAM: *Self-assembled mixed monolayer* (Monocapa autoensamblada mixta)

MSPD: Extracción en fase sólida dispersiva

MUOH: 11-mercapto-1-undecanol

NHS: N-hidroxi-succinimida

NPD: Detector de nitrógeno fósforo

NPIC: *National Pesticides Information Center*

NZF: *New Zealand Formulary*

OMS: Organización mundial de la salud

OPCs: Pesticidas organoclorados

OPPs: Pesticidas organofosforados

PABA: Ácido p-aminobenzoico

PBS: Tampón fosfato

PBST: Tampón fosfato con tween

PCB: *Printed circuit board* (placa de circuito impreso)

PEEK: *Polyether Ether Ketone* (poliéter éter cetona)

PFPD: Detector de llama por pulsos

PMMA: Polimetil metacrilato

PPS: *Poly-Phenylene Sulphide* (Sulfuro de polifenileno)

QCM: *Quartz Crystal Microbalance* (Microbalanza de cristal de cuarzo)

QqQ: Triple cuadrupolo

QuEChERS: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

RASFF: *Rapid Alert System Feed and Food*

SAM: *Self-assembled monolayer* (Monocapa autoensamblada)

SBSE: Extracción mediante barra de agitación

SD: *Standard deviation* (Desviación estándar)

SDME: Microextracción de una gota

SE: Extracción con disolventes

SFE: Extracción con fluidos supercríticos

SPE: Extracción en fase sólida

SPE: Extracción en fase sólida

SPME: Microextracción en fase sólida

SPR: *Surface plasmon resonance* (Resonancia de plasmón superficial)

TCP: 3,5,6-Tricloro-2-piridinol

TLC: Cromatografía de capa fina

TSD: Detector termoiónico específico

UE: Unión Europea

USE: Extracción con disolventes asistida por ultrasonidos

WHO: *World Health Organization*

WR: Rango de trabajo

ΔD : Incremento de disipación

Δf : Incremento de frecuencia



1. Introducción

1. Introducción

1.1.- Contexto de la investigación

La presente tesis doctoral se encuentra enmarcada en uno de los retos prioritarios de los planes estatales y europeos actuales de investigación, relacionado con la seguridad y calidad alimentaria. Para garantizar la protección del consumidor es imprescindible el control de la presencia de residuos químicos, físicos y microbiológicos. En particular, el trabajo desarrollado es una aportación al control de los residuos de pesticidas y de antibióticos presentes en la miel.

Esta tesis doctoral ha sido financiada por el proyecto de investigación titulado “Diseño de una plataforma basada en matrices de sensores de cuarzo de alta resolución para HTS (High-Throughput Screening) de residuos en mieles” (PQHTS-HONEY, AGL 2013-48646-R) del Ministerio de Economía y competitividad de la Convocatoria de ayudas a Proyectos de I+D+i «RETOS INVESTIGACIÓN» PROGRAMA DE I+D+i ORIENTADA A LOS RETOS DE LA SOCIEDAD 2013. También ha sido financiada por la Generalitat Valenciana y el “Fondo Social Europeo” con la concesión a la doctoranda de la presente tesis de un contrato de investigación predoctoral de tres años de duración (ACIF/2016/132), y de una ayuda para la realización de una estancia predoctoral (BEFPI/2018/021) en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León (España).

El desarrollo de la investigación ha sido posible gracias a la colaboración de tres grupos de investigación:

- El grupo de LABMIEL (laboratorio de Control de Calidad de la miel y de los productos apícolas) del Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD). Este grupo, desde hace varios años, viene colaborando con empresas apícolas de la Comunidad Valenciana, las cuales trasladaron la necesidad de investigar en técnicas que permitan de forma rápida detectar la presencia de antibióticos y pesticidas en la miel. El grupo es experto en el uso de técnicas cromatográficas clásicas para la detección de estos residuos químicos en productos apícolas.
- El grupo del área de Biosensores del Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería (Ci2B). Este grupo ha desarrollado los sensores acústicos de alta resolución (HFF-QCM), las celdas que sirven de soporte al sensor y la instrumentación electrónica necesaria para realizar el análisis.
- El grupo del área de Inmunotecnología del Ci2B. Este grupo ha desarrollado los anticuerpos monoclonales necesarios para dotar al sensor de la selectividad necesaria

para la detección de un determinado compuesto diana. En particular, ha desarrollado los inmunoreactivos del biosensor para la detección de Carbaril y DDT. Los inmunoreactivos empleados para la detección del sulfatizol fueron adquiridos del grupo U2-ICTS-NANOBIOSIS; Nb4D group-IQAC-CSIC/CIBER-BBN, Custom Antibody Service, Barcelona, España.

1.2.- La miel y marco legal

La miel *“es la sustancia natural dulce producida por la abeja Apis mellifera a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman, combinan con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure”* (RD 1049/2003, 2003). La miel está compuesta esencialmente por diferentes azúcares, sobre todo fructosa y glucosa, y en menor proporción, por los disacáridos sacarosa y maltosa, así como de otros disacáridos y oligosacáridos como erlosa, turanosa, melecitosa, etc. Además, contiene otras sustancias, como ácidos orgánicos, enzimas, minerales y partículas sólidas derivadas de su recolección (García Pérez, 2003). Su contenido en agua está relacionado con factores como el clima, la humedad ambiental y edáfica, la flora, la zona geográfica, así como con las prácticas apícolas llevadas a cabo durante su obtención y comercialización. Puede ser fluida, espesa o cristalina, y su color puede oscilar entre un tono casi incoloro a pardo oscuro. La miel tiene un sabor y aroma característico de este alimento, aunque con ciertos matices derivados de su origen vegetal.

Los criterios de calidad recogidos en las diversas normativas se centran en tres conceptos: autenticidad, frescura y seguridad. Estos criterios están definidos tanto por el Codex Alimentarius (2001) como por la Comisión Europea (Directiva 2001/110/CE, 2001), con escasas diferencias entre ellos. En ambos casos se describen los parámetros de calidad de la miel, definiendo sus mínimos y máximos. En este sentido, la miel no debe ser sometida a un calentamiento que pueda inducir cambios esenciales en su composición o daños en su calidad. Además, no se permite que se le adicione ningún ingrediente, incluidos los aditivos alimentarios, ni ninguna otra sustancia (orgánica e inorgánica) ajena a ella, como por ejemplo adulterantes procedentes de sustancias vegetales (Directiva 2014/63/UE, 2014). En relación al contenido en agua, la legislación española exige que no sea superior al 20% en una miel madura, ya que si se supera este valor es susceptible de fermentar (Directiva 2014/63/UE, 2014; García Pérez, 2003). Al igual que cualquier otro alimento, la miel no debe contener microorganismos ni residuos químicos, como pesticidas o antibióticos, que puedan alterar la salud del consumidor. Con el fin

de proteger la salud de los consumidores, es necesario velar por que tales residuos no estén presentes en niveles que supongan un riesgo inaceptable.

El criterio establecido para considerar una sustancia como peligrosa para la salud pública se establece teniendo en cuenta los límites máximos de residuos (LMRs). Se trata de límites legales (establecidos en base a criterios toxicológicos) que representan la cantidad máxima permitida por la ley de una determinada sustancia (por ejemplo plaguicida, medicamento veterinario, etc.) presente en un producto alimentario, de origen vegetal o animal (AECOSAN, 2020). El daño que puede causar para la población la exposición a una determinada sustancia tóxica depende de su toxicidad, del tiempo de exposición y de la sensibilidad de la persona a dicha sustancia. Estos factores se deben tener en cuenta para evaluar el riesgo de un tóxico específico. Por ello, todos los LMRs se establecen sobre las conclusiones de informes de evaluación del riesgo elaborados en base a la metodología de análisis del riesgo. Con los conocimientos que actualmente se tienen, se puede afirmar que el cumplimiento de los LMRs garantiza que los residuos de las sustancias químicas correspondientes no producen efectos tóxicos en la población, ni a corto ni a largo plazo.

Las autoridades sanitarias han elaborado un conjunto de directivas y reglamentos, encaminados a armonizar las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y en sus productos (Directiva 96/23/CE, 1996). Esto ha llevado, por un lado, a establecer los LMRs de sustancias activas que pueden estar presentes en los alimentos como consecuencia del uso de productos fitosanitarios y veterinarios en la producción primaria (Directiva 96/23/CE, 1996; Decisión 2003/181/CE, 2003; Reglamento (EC) N° 396/2005, 2005; Reglamento (EU) N° 470/2009, 2009; Reglamento (EU) N° 37/2010, 2010, Real Decreto 1749/1998,1998); y por otro lado, a establecer planes de vigilancia. En este sentido, a nivel europeo, se ha establecido el sistema RASFF (*Rapid Alert System Feed and Food*) como una herramienta que proporciona a las autoridades información sobre alertas y rechazos en frontera, de alimentos por motivos de seguridad alimentaria dentro de la Unión Europea. Cada vez que un miembro de esta red detecta información relacionada con la existencia de un riesgo grave para la salud humana, ésta se notifica inmediatamente al RASFF. El RASFF permite que la información se comparta de forma eficaz entre sus miembros (las autoridades de seguridad alimentaria de los 28 países de la UE, la Comisión, el EFSA, el EFTA, Noruega, Liechtenstein, Islandia y Suiza) y proporciona un servicio 24/7 para asegurar que las notificaciones urgentes se envíen, se reciban y se contesten con eficacia (RASFF, 2020).

El RASFF proporciona informes en los que recopila todas las alertas alimentarias que se han producido a nivel europeo. En ellos se detalla el tipo de notificación que ha recibido el producto (alerta o rechazo en frontera), la fecha exacta de la notificación, el país notificante, el tipo de producto, la categoría del producto, el motivo de la alerta y la decisión sobre el riesgo. Los beneficios de la información que proporciona el RASFF son especialmente relevantes para los importadores y los consumidores, ya que garantiza a los consumidores la trazabilidad de los productos y proporciona información sobre los riesgos más frecuentes.

1.3.- Presencia y riesgos de contaminantes químicos

Los productos de la colmena pueden contener residuos químicos procedentes especialmente de las prácticas apícolas y de los tratamientos veterinarios que se realizan a las abejas. Además, puede haber causas externas que contribuyan a su presencia, debidas a tratamientos agrícolas en campos de cultivo, o bien a la contaminación ambiental (en parte por la presencia de compuestos orgánicos persistentes “COPs”). Aunque esta problemática afecta a todos los productos de la abeja (miel, cera, polen, propóleo y jalea real), la miel, por ser el producto de mayor volumen de consumo, es el más importante en lo que respecta al riesgo.

Algunos estudios confirman que la amplia contaminación medioambiental de las aguas y del suelo (Albero-Romano, 2009) influye decisivamente en las abejas melíferas y en las colmenas, por ello, la miel puede usarse como bioindicador para monitorear la contaminación ambiental por pesticidas de algunas zonas geográficas (Malhat *et al.*, 2015). También tienen especial relevancia los antibióticos, por su uso extensivo y por la generación de resistencias bacterianas.

En general, la exposición de la población a residuos de pesticidas y antibióticos a través de la ingesta de alimentos no es elevada, sin embargo, al ser constante y prolongada en el tiempo, es muy perjudicial para la salud. En los últimos años, la contaminación de los alimentos y del medio ambiente por estas sustancias está suscitando un gran interés y preocupación social debido a los posibles efectos adversos de una exposición prolongada (Bartual and Berenguer, 1998; Albero-Romano, 2009).

1.3.1.- Pesticidas

La revolución verde fue un fenómeno originado en los años 70 en el que se aplicaron conocimientos científicos y desarrollos tecnológicos, con el fin de crear condiciones más idóneas para la agricultura y la ganadería, a través de la modificación del medio ambiente. Ejemplos de este fenómeno son: el empleo de sistemas de riego en climas secos, el uso de fertilizantes para suelos de fertilidad baja, el uso de pesticidas para combatir las plagas y malas hierbas que invaden los cultivos, el empleo de maquinaria y mecanización en los campos y el uso de

medicamentos y vacunas para tratar las enfermedades del ganado. Todo ello, ha permitido aumentar el rendimiento en los sistemas agrícolas durante los últimos 150 años y multiplicar la capacidad de producción.

Las plagas y enfermedades de las plantas, además de ser responsables de la pérdida del 20-40% de la producción mundial de alimentos, tienen indirectamente una importante implicación en la calidad alimentaria. El comercio internacional y el cambio climático están creando nuevas condiciones favorables para la difusión de dichas plagas y enfermedades de los cultivos. Para combatirlas, en los últimos años se ha hecho un uso abusivo de productos fitosanitarios como los pesticidas (FAO, 2017).

La Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen el término *pesticida*, como *“cualquier sustancia o mezcla de ellas destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenaje, transporte, comercialización o procesado de los alimentos para el hombre o los animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. Este término incluye sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales”*.

Existen muchos tipos diferentes de pesticidas, y cada uno está destinado a ser efectivo contra una plaga, el término "-cida" proviene del latín y quiere decir "que mata." Se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, siendo el más utilizado el que se refiere a su acción específica: insecticidas, acaricidas, fungicidas, nematocidas, herbicidas, fitoreguladores, molusquicidas, rodenticidas, pesticidas específicos post-cosecha y simientes, protectores de maderas, fibras y derivados, desinfectantes y fumigantes en general y plaguicidas específicos varios.

Desde el punto de vista de su composición química, los pesticidas pueden clasificarse en diversos grupos, entre los que cabría mencionar: arsenicales (arsenito de sodio, herbicida o arseniato de plomo y cromo, preservante de la madera), carbamatos (carbaril, aldicarb, carbofuran, metiocarb), derivados de cumarina (warfarina, rodenticida), derivados de urea (novalurón, clorfluazurón), dinitrocompuestos (acetamiprid, imidacloprid), neonicotinoides (imidacloprid, clotianidina, acetamiprid, tiacloprid), organoclorados (DDT, clordano, lindano, metoxicloro,

aldrin, dieldrin), organofosforados (clorpirifos, malation, paration, acefato), organometálicos, piretroides (alletrin, deltametrina, permetrina), tiocarbamatos (tiodicarb) y triazinas (prometina).

Los beneficios de los pesticidas para combatir las plagas son evidentes. Sin embargo, cuando no se utilizan de forma adecuada, pueden llegar a constituir un problema serio para la salud de las personas y para el medio ambiente. Diferentes estudios han demostrado que, en la mayoría de los casos, los principales pesticidas detectados en miel son organoclorados, organofosforados y carbamatos (Blasco *et al.*, 2003; Rial-Otero *et al.*, 2007; Souza Tette *et al.*, 2016), precisamente las familias consideradas más tóxicas (Bartual & Berenguer, 1998). A pesar de esto, la situación no debe considerarse alarmante, ya que suelen encontrarse en concentraciones bajas, a nivel de traza, sin llegar a superar los LMRs europeos de aquellas sustancias para las que se han establecido.

Sin embargo, la presencia de estas sustancias aún a niveles bajos está influyendo decisivamente en el “síndrome de despoblamiento de la colmena”. Desde 1995 se viene observando un aumento considerable de la mortalidad de las abejas, hecho que preocupa considerablemente a la comunidad científica, debido al efecto beneficioso que éstas juegan en el medio ambiente por su papel en la polinización (Sánchez-Bayo & Goka, 2014). Diferentes estudios han relacionado directamente la presencia de pesticidas en el entorno apícola, con el aumento de la mortalidad de las abejas (Rial-Otero *et al.*, 2007; Sánchez-Bayo & Goka, 2014; Sanchez-Bayo & Goka, 2016) y con la contaminación de la colmena y la cera. Especial importancia presentan los productos de la colmena para consumo humano como el polen, propóleos y sobre todo la miel por su mayor volumen de producción. En este sentido, un informe de la EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria) ha puesto de manifiesto el impacto de los plaguicidas sobre la salud de las abejas, y sobre la de los consumidores de miel y polen (EFSA, 2012a,b)

Esta situación se refleja en las alertas alimentarias observadas a este respecto en la UE. Como ejemplo, destacar que en 2005 se produjeron 3 alertas alimentarias debido a la presencia del pesticida diclorobenceno en miel (RASFF, 2020). Entre 2006 y 2007, Reino Unido detectó este mismo pesticida en miel proveniente de Nueva Zelanda. Además, en 2016 se notificó en Italia la presencia del pesticida tau-fluvalinato en miel procedente de la República del Norte de Macedonia. En la **Tabla 1** se relacionan, a modo de ejemplo, las notificaciones (desde el año 2002 a 2019) que se han producido para la miel debidas a la presencia de pesticidas, el país de origen de la miel, el país dónde se notificó, el compuesto que fue detectado y las medidas que se tomaron de cada alerta (RASFF, 2020).

Las abejas melíferas recolectoras recorren extensas áreas en busca de néctar/melazas y polen. La ingestión de estas sustancias, presentes en los cultivos tratados con pesticidas, es una importante vía de exposición. Además, en ocasiones son directamente pulverizadas con pesticidas si en ese momento se está fumigando el campo, con consecuencias fatales debido a las altas concentraciones a las que se exponen en las gotas pulverizadas (Sanchez-Bayo & Goka, 2016). La tercera vía de exposición es a través de la ingestión del pesticida cuando beben en estanques y charcos de áreas agrícolas contaminadas (Samson-Robert *et al.*, 2014; Long & Krupke, 2016; Mcart *et al.*, 2017). Debido a esto, las abejas melíferas se han utilizado como bioindicadores de la contaminación en el medio ambiente, ya que ponen de manifiesto la presencia de residuos químicos en el medio ambiente (Malhat *et al.*, 2015; Silvina *et al.*, 2017).

Otra importante vía de exposición de las abejas a los pesticidas es a través de su uso en apicultura, es decir, sobre la propia colmena, como tratamiento veterinario para exterminar plagas como el ácaro *Varroa destructor*. Este ácaro es la causa más importante de pérdidas de colonias de abejas melíferas (Rosenkranz *et al.*, 2010; Barroso-Arévalo *et al.*, 2019). Es originario de Asia y se detectó por primera vez en España en 1985. La expansión de la varroosis fue muy rápida, originando graves pérdidas económicas y la pérdida, casi en su totalidad, de las colonias silvestres. Este ácaro vive como parásito externo en las abejas alimentándose de su hemolinfa y produce la llamada varroosis. Los daños que produce no sólo provienen de su acción expoliadora, sino también porque favorece la aparición generalizada de infecciones víricas y bacterianas, tanto en la cría como en las abejas adultas.

En la actualidad la supervivencia de las colonias de *Apis mellifera* recae en la mano de los apicultores, ya que, sin ayuda de los humanos, una colmena de abejas melíferas europeas infestada de ácaros muere por lo general en el transcurso de tres años (Bayer Research, 2020). En España y en el resto de la Unión Europea, la infestación por este ácaro tiene un carácter endémico, siendo la única enfermedad apícola que obliga a un tratamiento sistemático de las colonias de abejas para mantener las tasas de parasitación por debajo de umbrales dañinos. El MAPAMA, en colaboración con el sector apícola y con las comunidades autónomas, ha elaborado un documento práctico sobre esta enfermedad que incluye los métodos sostenibles para su control. El MAPAMA hace hincapié en la importancia del uso responsable de los medicamentos veterinarios contra la *Varroa* con el fin de optimizar sus efectos y proteger la salud de las colonias de abejas. La estrategia para mantener controlada la *Varroa destructor* no se limita exclusivamente a la aplicación de los tratamientos con pesticidas, sino que exige, además, de un adecuado manejo de las colonias. El único tratamiento permitido por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS, 2020) para el tratamiento de esta

enfermedad de la colmena, es la aplicación de los siguientes pesticidas: amitraz, cumafós, flumetrina y tau-fluvalinato (AEMPS, 2018).

Otro factor a considerar en la exposición a sustancias tóxicas por parte de las abejas, está relacionado con importantes pesticidas utilizados profusamente hace varias décadas, pero que por su carácter lipófilo persisten en la actualidad como contaminantes en el medio ambiente. Se trata de los denominados “compuestos orgánicos persistentes” (COPs), que permanecen y se acumulan en la cadena trófica con facilidad. Entre ellos ocupa un lugar destacado el DDT.

Tabla 1. Notificaciones registradas por la presencia de pesticidas en miel (RASFF, 2020)

Subject	Countries concerned	Notified by	Notification basis	Notification type	Product type	Date	Product Category
1,4-dichlorobenzene (48; 46; 17; 14; 32 µg/kg - ppb) in Greek forest honey from Greece	Cyprus (D), Greece (O)	Cyprus	official control on the market	alert	Food	01/03/2005	honey and royal jelly
1,4-dichlorobenzene (68 µg/kg - ppb) in honey from Greece	Cyprus (D), Greece (O)	Cyprus	official control on the market	alert	Food	11/03/2005	honey and royal jelly
1,4-dichlorobenzene (25 µg/kg - ppb) in honey from Greece	Cyprus (D), Greece (O)	Cyprus	official control on the market	alert	Food	11/03/2005	honey and royal jelly
1,4-dichlorobenzene (44 µg/kg - ppb) in honey from New Zealand	France, New Zealand (O), United Kingdom	United Kingdom	border control - consignment released	information	food	24/07/2006	honey and royal jelly
1,4-dichlorobenzene (0.018 mg/kg - ppm) in honey from New Zealand	New Zealand (O), United Kingdom	United Kingdom	border control - consignment released	information	food	04/09/2006	honey and royal jelly
1,4-dichlorobenzene (0.019 mg/kg - ppm) in honey from New Zealand	New Zealand (O), United Kingdom	United Kingdom	border control - consignment released	information	food	04/09/2006	honey and royal jelly
1,4-dichlorobenzene (0.011 mg/kg - ppm) in honey from New Zealand	New Zealand (O), United Kingdom	United Kingdom	border control - consignment released	information	food	27/09/2006	honey and royal jelly
1,4-dichlorobenzene (19 µg/kg - ppb) in manuka and jellybush blend honey from Australia	Australia (O), United Kingdom (D)	United Kingdom	official control on the market	information	food	29/01/2007	honey and royal jelly
allethrin (0.103 mg/kg - ppm) and unauthorised substance permethrin (0.043 mg/kg - ppm) in chestnut honey from Croatia	Croatia (O), Kosovo (D)	Croatia	monitoring of media	information for attention	food	10/10/2013	honey and royal jelly
tau-fluvalinate (24.8 mg/kg - ppm) and prohibited substance chloramphenicol (0.8 µg/kg - ppb) in raw propolis from the former Yugoslav Republic of Macedonia	Germany (D), Italy, Republic of North Macedonia (O)	Italy	border control - consignment released	information for follow-up	food	20/07/2016	honey and royal jelly

1.3.1.1. DDT en el sector apícola

El dicloro difenil tricloroetano, comúnmente conocido como DDT, es un pesticida organoclorado de amplio espectro, sintetizado por primera vez en 1874, que empezó a emplearse masivamente en 1942 por su gran eficacia en el control de insectos transmisores de enfermedades como el tifus y la malaria. Actúa por contacto directo, afectando al sistema nervioso de los insectos, interfiriendo en el intercambio de cationes en la transferencia del impulso nervioso. El resultado es la cesión de impulsos más o menos continuos, provocando una grave interrupción de las funciones del sistema nervioso del insecto tratado (de Fernícola, 1985). En los seres humanos, el DDT circula unido a los lípidos sanguíneos y posteriormente, se acumula en el tejido adiposo. La vía de eliminación más rápida en el caso de los humanos es a través de la leche materna. En el caso de los hombres y mujeres no lactantes, su eliminación se produce a través de la vía urinaria y es mucho más lenta. Se estima que, una vez suspendida la exposición al DDT de una persona, el 50% de la carga corporal de este compuesto tardaría de 6 a 10 años en eliminarse por vía urinaria, y 2 años a través de la leche materna (Torres-Sánchez & López-Carrillo, 2007).

Los beneficios de este pesticida para controlar epidemias y erradicar ciertas enfermedades endémicas son innegables. Sin embargo, su uso masivo y su elevada estabilidad química han desencadenado serios problemas ambientales y de salud. En 1962 se publicaron los primeros resultados de un estudio realizado en Estados Unidos sobre el impacto ocasionado por el uso de este pesticida en el medio ambiente y en la salud humana (Carson & Neill, 1962). El estudio demostraba la relación entre el cáncer y el uso agrícola del DDT y otros pesticidas, así como su repercusión en el medio ambiente y en las poblaciones de abejas. La publicación de estos resultados dio lugar al movimiento en favor de la conservación del medio ambiente, y originó en 1972 una gran protesta pública que motivó la prohibición del uso agrícola del DDT en Estados Unidos. Estudios posteriores verificaron que a corto plazo el DDT afecta principalmente al sistema nervioso periférico y central y al hígado. Además, a largo plazo es carcinogénico, puede deprimir el sistema inmunitario y actuar como disruptor endocrino, debido a que mimetiza o bloquea la actividad hormonal, produciendo problemas reproductivos (Rehana & Rao, 1992; Gladen & Rogan, 1995; Repetto & Baliga, 1996; Eskenazi *et al.*, 2009).

El gran problema del DDT reside en su elevada persistencia, que es debida especialmente a su carácter liposoluble y apolar (Blasco *et al.*, 2004). Por lo tanto, tras su aplicación, el efecto tóxico se conserva durante años (alto poder residual); por ejemplo, un campo tratado con DDT conserva, diez años después el 50% de la cantidad aplicada. Por ello, aunque su uso no está permitido desde hace años, hoy en día, aún se siguen detectando residuos de DDT y de sus

derivados en el medioambiente y en tejidos adiposos de humanos y animales, haciendo que su presencia represente un peligro para la salud pública. La principal vía de exposición de los seres humanos al DDT tiene lugar a través del consumo de alimentos contaminados. Al tratarse de una sustancia no soluble en agua, se puede encontrar también en alimentos con bajo contenido en agua, como puede ser la miel (Blasco *et al.*, 2004).

Por su alta persistencia, la presencia de DDT en miel se usa como indicador de la contaminación medioambiental. Un estudio realizado por Blasco *et al.* (2003) puso de manifiesto la presencia de DDT en el 20% de las muestras de miel analizadas procedentes de mercados locales de España y Portugal.

1.3.1.2. Carbaril en el sector apícola

A raíz del fenómeno mundial ocurrido con el DDT, la síntesis de pesticidas ha ido evolucionando hacia la obtención de otros menos persistentes que se degraden rápidamente y sean más específicos para minimizar sus efectos sobre el medio ambiente. Entre ellos, destacan los organofosforados y carbamatos, que han reemplazado casi por completo a los pesticidas organoclorados (Porrini *et al.*, 2002). Sin embargo, los carbamatos junto con los neocotinoides, aunque se degradan fácilmente se ha descubierto que son altamente tóxicos para las colonias de abejas (Reglamento (EU) N° 485/2013, 2013; MDA, 2020).

Los carbamatos son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico (NH_2COOH) (EcuRed, 2020). El carbaril (metilcarbamato de 1-naftilo) es uno de los principales representantes de la familia de los carbamatos. Se empezó a utilizar por primera vez en 1956 para el control de insectos masticadores, minadores y chupadores (Devine *et al.*, 2008).

Tanto los carbamatos como los organofosforados actúan inhibiendo la enzima colinesterasa, encargada de destruir la acetilcolina, neurotransmisor que asegura la comunicación entre dos neuronas. Al no destruirse la acetilcolina, se acumula en las sinapsis neuronales impidiendo la transmisión de mensajes nerviosos lo que acarrea la muerte del insecto. En humanos las principales vías de exposición son la respiratoria y la digestiva. Aunque ambos tipos de insecticidas provocan la inhibición de las enzimas colinestereasas, la diferencia es que la inhibición provocada por los carbamatos es reversible, por tanto, menos nociva y con una duración más corta que la producida por los insecticidas organofosforados, en los cuales esta inhibición es irreversible. Además, los carbamatos son eliminados espontáneamente por el organismo en las 48 h posteriores a la exposición (O'Malley & O'Malley, 2018).

La alta toxicidad del carbaril para las abejas es un hecho conocido desde los años 60 (Clinch, 1967), por ello, aunque su aplicación ha estado permitida durante muchos años, se

recomendaba no realizarla en época de floración. Desde el año 2007 (Decisión 2007/355/CE, 2007) el carbaril se encuentra excluido de la lista de sustancias activas autorizadas en Europa (Directiva 91/414/CEE, 1991), debido a sus efectos como disruptor endocrino sobre la salud (NPIC, 2020).

En un estudio publicado por Blasco *et al.* (2003) se puso de manifiesto la presencia de diferentes carbamatos en muestras de miel procedentes de mercados locales de España y Portugal, recogidas durante el año 2002, los carbamatos encontrados fueron: carbofurano en el 10% de las mieles analizadas, pirimicarb en el 4% y carbaryl en el 2%. Esta sustancia no está admitida en la Unión Europea, sin embargo, todavía sigue existiendo el riesgo de su presencia en productos de origen apícola debido a aplicaciones ilegales, o a las importaciones de estos productos de países con legislación menos restrictiva.

1.3.2. Antibióticos

Se entiende por antibiótico *“aquella sustancia que puede matar o inhibir el crecimiento de algunos grupos de microorganismos. Originalmente, los antibióticos procedían de fuentes naturales (por ejemplo, penicilina de mohos), pero en la actualidad la mayoría son semi-sintéticos y modificados con adiciones de componentes químicos artificiales (Institute of Medicine (US), 2010). El término "antimicrobiano" se utiliza también para referirse a cualquier agente (incluido un antibiótico) que se usa para matar o inhibir el crecimiento de microorganismos (bacterias, virus, hongos o parásitos). Este término se emplea en usos humanos, veterinarias o agrícolas (Institute of Medicine (US), 2010)”*

Los antibióticos se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios:

-Según el espectro de acción: Pueden ser de amplio espectro (activos sobre un gran número de especies y géneros diferentes de bacterias) o de espectro reducido (solo activos sobre un grupo reducido de especies) (Seija & Vignoli, 2006; Bado *et al.*, 2020).

-Según el modo de acción: Si actúan inhibiendo el crecimiento de gérmenes nocivos se denominan bacteriostáticos y, si los destruyen, bactericidas. Entre los bacteriostáticos cabría destacar: macrólidos (grupo eritromicina), tetraciclinas, cloramfenicol, clindamicina, lincomicina y sulfamidas, mientras que entre los bactericidas destacan: beta-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina), aminoglucósidos (grupo estreptomina), quinolonas (grupo norfloxacino) y polimixinas.

Las sulfonamidas fueron las primeras drogas eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas. Son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis del ácido fólico;

esto repercute sobre la síntesis nucleotídica, con la consiguiente inhibición del crecimiento bacteriano. Esta familia de antibióticos presenta una amplia gama de efectos adversos relacionados con hipersensibilidad (reacciones dermatológicas, erupción cutánea, prurito, urticaria, eritema nudoso, eritema multiforme, necrólisis epidérmica tóxica y dermatitis exfoliativa) (PubChem, 2020), además, poseen una toxicidad bastante elevada, por lo que su uso en humanos está limitado (NZF, 2012).

La presencia de antibióticos en productos alimentarios es considerada actualmente un serio problema de salud pública, debido a que puede producir alergias, alteraciones en la microbiota intestinal y provocar resistencias antimicrobianas (ECDC/EFSA/EMA, 2015; WHO, 2018). La resistencia a los antimicrobianos es una de las amenazas de salud pública mundial más graves en este siglo (Prestinaci *et al.*, 2015; WHO, 2018), debido a las altas tasas observadas para las bacterias que causan infecciones comunes. Esta resistencia provoca que las bacterias patógenas no respondan a los tratamientos médicos con antibióticos. Entre las bacterias patógenas resistentes a antibióticos destacan: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.* no tifoidea y *Mycobacterium tuberculosis* (Prestinaci *et al.*, 2015). El primer informe global de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la vigilancia de la resistencia antimicrobiana se publicó en abril de 2014 (WHO, 2014). Este informe recopiló por primera vez datos de redes de vigilancia nacionales e internacionales, mostrando el alcance de este fenómeno en muchas partes del mundo, y también la presencia de grandes brechas en la vigilancia existente (Prestinaci *et al.*, 2015).

El uso no controlado de antibióticos en el sector apícola es un riesgo para la salud pública, ya que puede generar resistencia en bacterias potencialmente patógenas (Tian *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017; Raymann *et al.*, 2017). La principal vía de exposición de las abejas a los antibióticos deriva de los tratamientos veterinarios realizados por los apicultores a las colmenas. En ocasiones, para evitar la muerte de las abejas cuando se ven afectadas por ciertas enfermedades bacterianas se realizan tratamientos de forma inadecuada o bien se utilizan sustancias prohibidas. Esto sucede, por ejemplo, cuando la colmena se ve afectada por ciertas enfermedades como la “Loque Americana y Europea”, causadas por los bacilos *Paenibacillus* y *Melissococcus plutonius*, que afectan a las larvas de abeja, provocando su muerte. Cuando se detecta la aparición de estas bacterias en la colmena, los apicultores deben quemarla obligatoriamente, pero en algunos casos, con la finalidad de evitar la pérdida de la colmena, emplean ilegalmente antibióticos, como sulfamidas y tetraciclinas, para combatir la enfermedad.

Otra vía de exposición de las abejas a los antibióticos proviene de los abrevaderos del ganado al que se le ha suministrado antibiótico disolviéndolo en el agua. El uso de antibióticos en el ganado vacuno, como en todas las demás especies, es indispensable para la lucha contra las infecciones bacterianas. Las enfermedades bacterianas más comunes, y que ocasionan un mayor uso de antibióticos en el ganado, son la mastitis en las vacas lecheras y el síndrome respiratorio en los terneros de cebo.

El informe anual RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*, 2019) recopila todas las alertas alimentarias producidas en la miel debido a la presencia de antibióticos a nivel europeo desde el año 2002 (**Figura 1**). Esta figura muestra el número de alertas alimentarias y detecciones en miel debido a estas sustancias. Se observa una tendencia decreciente en el número de casos, con un descenso especialmente acusado desde 2009. A partir de esa fecha, el número de alertas y detecciones ha sido notoriamente menor en comparación con años anteriores. Esto fue debido a que en 2009 se propuso el establecimiento de LMRs para los alimentos de origen animal (Reglamento (EU) N° 470/2009, 2009), y en 2010 se establecieron estos valores LMR (Reglamento (EU) N° 37/2010, 2010). Este documento establece que en la miel tiene que haber una ausencia total de antibióticos, sin fijar unos límites de seguridad (LMRs). En el caso de la miel solo se permite la presencia de los pesticidas amitraz y cumafós a concentraciones inferiores a sus respectivos LMR (100 y 200 µg/kg, respectivamente). Esto pone de manifiesto que la presencia de residuos químicos en los productos de la colmena que llegan al consumidor, es un problema de salud pública de enorme interés para las autoridades, el sector apícola y la comunidad científica (Larsen, 2006; Dorne *et al.*, 2009; van Klaveren & Boon, 2009).

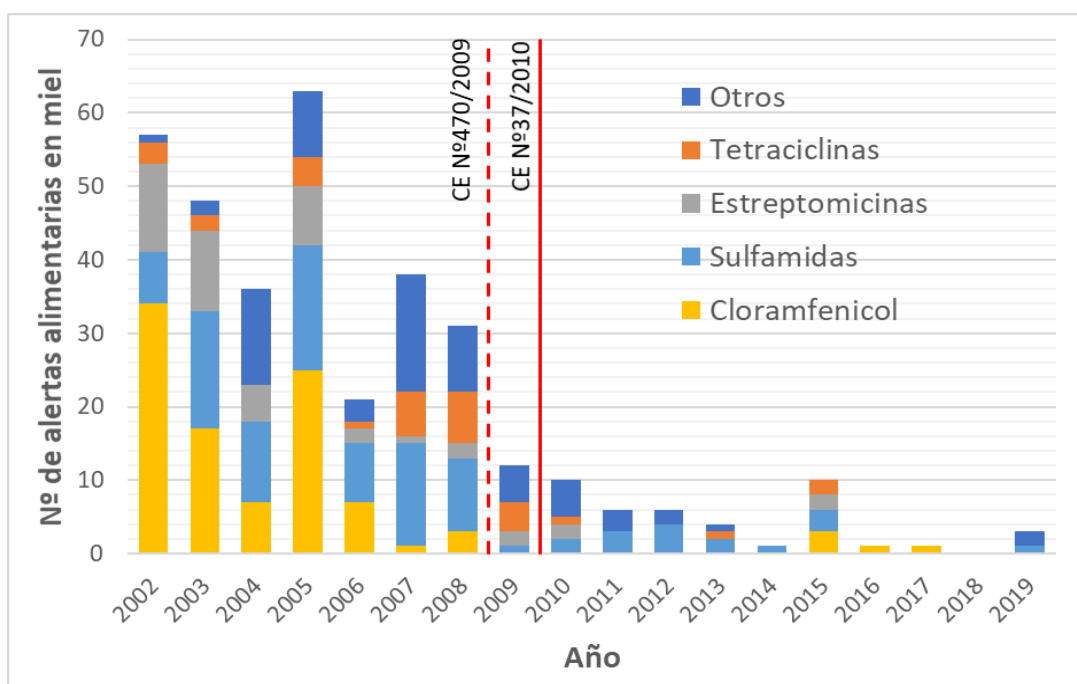


Figura 1. Alertas alimentarias anuales a nivel europeo debidas a la presencia de antibióticos en miel, expresado en valores absolutos (Elaboración propia, datos obtenidos de RASFF, 2020).

La **Figura 2** muestra las detecciones de antibióticos en la miel que han sido motivo de alertas alimentarias desde 2002 hasta 2019. En ella se representa el porcentaje relativo de los principales antibióticos detectados en la miel en Europa. Se puede observar que el mayor número de alertas ha sido debido a la presencia de cloranfenicol y sulfamidas. El cloranfenicol no se detectó entre 2009 y 2013; sin embargo, para sulfamidas se han producido alertas reiteradamente todos los años, excepto en el periodo de 2016 a 2018. Por lo tanto, las sulfamidas son, entre otros, los antibióticos más importantes a tener en cuenta en los controles analíticos de la miel. Entre ellas, ocupa un lugar destacado el sulfatiazol (**Figura 3**). En la página web del RASFF se puede consultar la información de cada una de las alertas producidas por antibióticos en miel: fecha exacta en la que se produjo la alerta, país de origen de la miel, país donde fue notificado, compuesto que fue detectado y medidas que se tomaron.

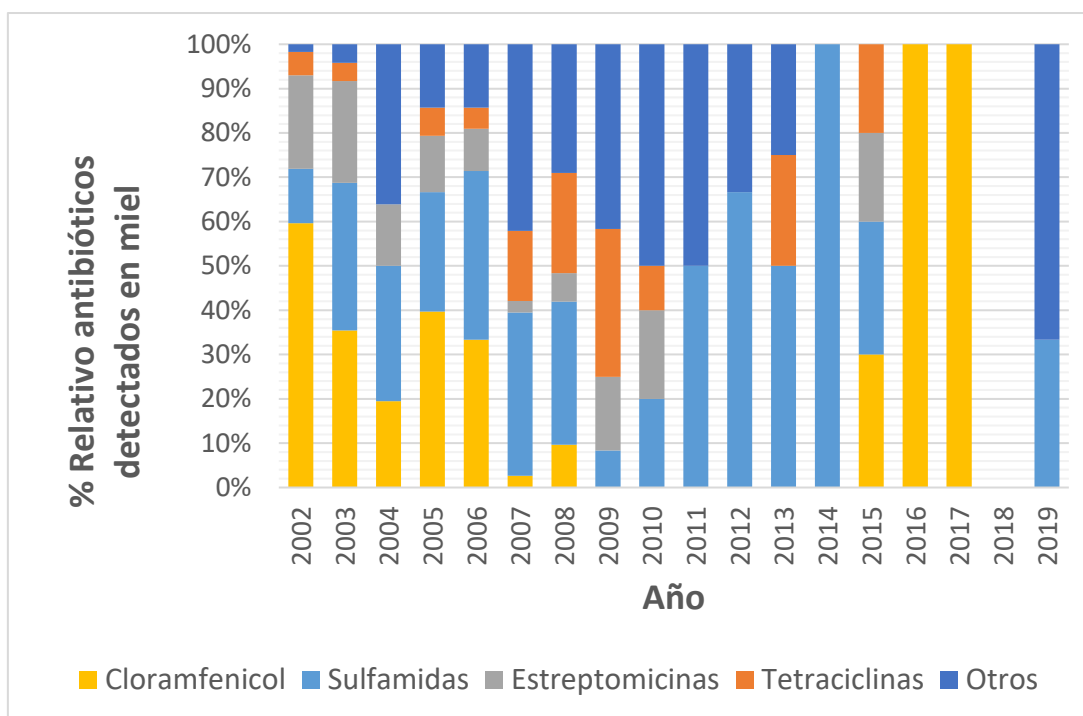


Figura 2. Porcentaje relativo de los principales antibióticos detectados en la miel a nivel europeo desde 2002 hasta 2019 (Elaboración propia, datos obtenidos de RASFF, 2020).

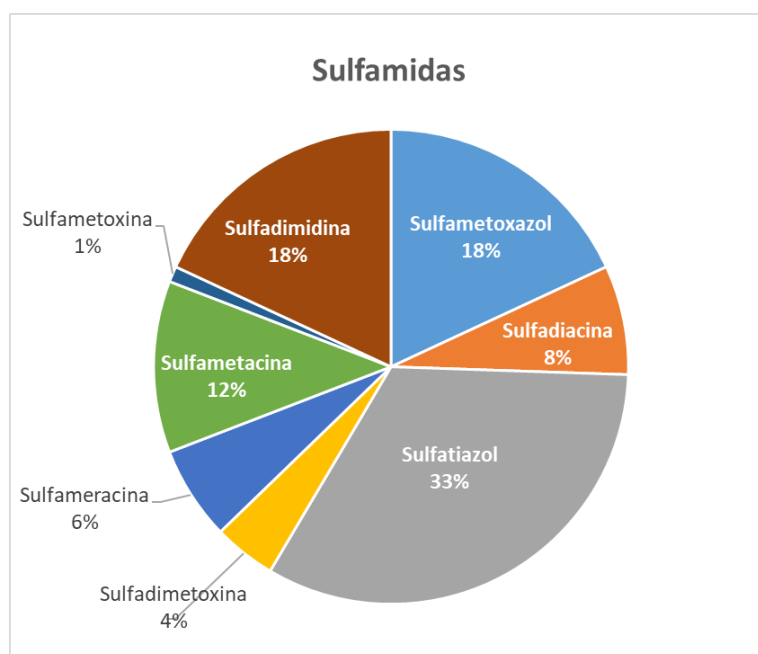


Figura 3. Proporción de las diferentes sulfamidas detectadas en alertas alimentarias en miel en la Unión Europea en el periodo de 2002 a 2019. (Elaboración propia, datos obtenidos de RASFF, 2020).

1.3.2.1. Sulfatiazol en el sector apícola

El sulfatiazol es el principal representante de las sulfonamidas, y el que más detecciones y alertas alimentarias ha producido en miel en la Unión Europea. Por ello, es uno de los compuestos que se analizan rutinariamente en el control de calidad de la miel en las empresas de envasado. Como anteriormente se ha comentado, su presencia en la miel se debe a que es utilizado de forma ilegal para combatir en las abejas la *Loque Americana y Europea* (Juan-Borrás *et al.*, 2015).

El sulfatiazol es un compuesto organosulfurado utilizado como antibiótico de acción rápida, ya que es efectivo contra una amplia gama de microorganismos patógenos gram positivos y gram negativos. Su mecanismo de acción se basa en ser un análogo estructural del ácido p-aminobenzoico (PABA) e inhibir de manera competitiva la enzima bacteriana (dihidropteroato sintetasa), la cual es responsable de la incorporación del PABA al ácido dihidrofólico. Ésta bloquea la síntesis de ácido dihidrofólico y disminuye la cantidad de ácido tetrahidrofólico metabólicamente activo, un cofactor en la síntesis de purinas, timidina y ADN. Las bacterias sensibles son aquellas que han de sintetizar ácido fólico. La acción del sulfatiazol es antagonizada por el PABA y sus derivados, así como por la presencia de pus o de detritos tisulares, que proporcionan los componentes necesarios para el crecimiento bacteriano.

Su uso como antimicrobiano fue muy extendido por vía oral o cutánea en humanos hasta que se descubrieron alternativas menos tóxicas y con menores efectos secundarios. Actualmente, está permitido como antimicrobiano veterinario solo en ganado (PubChem, 2020) y su uso sistémico en humanos ha sido prohibido en varios países. Esto es debido a la pérdida de efectividad bactericida, por lo que se ha sustituido por antibióticos de mayor eficacia y con menores efectos secundarios. Este antibiótico, al igual que otras sulfonamidas, produce una alta tasa de efectos adversos relacionados con una reacción de hipersensibilidad como toxicidad renal, dermatitis exfoliativa, eritema multiforme, agranulocitosis, anemia hemolítica o apástica y daño hepático (Greenwood, 2010)

1.4.- Técnicas analíticas de referencia empleadas en el análisis de residuos en miel

1.4.1. Técnicas cromatográficas

El mundo de la apicultura, como parte del sector alimentario, es consciente de la necesidad de controlar la presencia de residuos químicos en los productos de la colmena que comercializa. Con ello, darán confianza al consumidor y cumplirán los requisitos exigidos por la Administración.

En el caso del análisis de la miel, las técnicas cuantitativas clásicas empleadas para determinar la presencia de contaminantes veterinarios y pesticidas son las cromatográficas. Estas técnicas son las recomendadas actualmente por su alta sensibilidad y fiabilidad, aunque sus principales inconvenientes son que requieren de personal altamente cualificado, su coste es elevado y requieren un pre-tratamiento de la muestra, para extraer el analito (compuesto de interés) de la matriz miel, antes de su inyección en el equipo cromatográfico. Se trata de técnicas que sólo están disponibles en ciertos laboratorios centralizados, ya que todos los inconvenientes anteriormente mencionados limitan su uso en laboratorios de calidad de la propia industria de envasado de la miel.

Entre estas técnicas cromatográficas, las más utilizadas en la actualidad para la detección múltiple de residuos de pesticidas y antibióticos son la cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), y la cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC-MS) con ionización por impacto de electrones (EI). Dependiendo de la naturaleza del compuesto a analizar se empleará una técnica u otra (Alder *et al.*, 2006). Por ejemplo, en el caso de los pesticidas organoclorados, se obtienen mejores resultados mediante la cromatografía de gases (GC-MS) que con la cromatografía líquida. Para todas las demás familias de pesticidas, LC-MS/MS ofrece una mejor sensibilidad y rendimiento (Alder *et al.*, 2006). Lozano *et al.* (2019) reportaron la presencia de diferentes sustancias químicas, empleadas como tratamientos veterinarios en la colmena, en diferentes productos elaborados por la abeja, entre ellos, la miel. En sus estudios también reportaron las técnicas cromatográficas empleadas para su detección.

Los antibióticos de interés analítico en la miel se pueden agrupar principalmente en tres familias: sulfamidas, tetraciclinas y estreptomicinas. La técnica cromatográfica empleada por excelencia para su detección es LC-MS/MS (Kaufmann *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). La cromatografía de gases rara vez se utiliza para la determinación de antibióticos en miel, debido a la naturaleza polar, baja volatilidad y a la inestabilidad térmica de estos compuestos. Bargańska *et al.* (2011) reportaron información sobre los métodos de extracción de la muestra y las técnicas cromatográficas utilizadas para la determinación de diferentes antibióticos en miel. Con estas técnicas cromatográficas se pueden aplicar métodos multiresiduos (MRM) para la detección, identificación y cuantificación simultáneamente de un gran número de analitos.

La LC-MS/MS con el triple cuadrupolo (QqQ) es una técnica robusta que se emplea bastante en la determinación de pesticidas y antibióticos en la miel y en los productos de la colmena (Fernández-Alba & García-Reyes, 2008; Hrynko *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

1.4.1.1. Métodos de pretratamiento de la muestra

La determinación de residuos en productos de la colmena no es fácil. La miel es una matriz compleja que puede contener una gran variedad de pesticidas o de antibióticos en una misma muestra y en muy baja cantidad (Calatayud-Vernich, 2019). Estas bajas concentraciones requieren de procedimientos de extracción y concentración del analito eficaces junto con técnicas de determinación muy sensibles. La complejidad y diversidad de compuestos presentes en la miel hace que sea necesario optimizar la extracción para reducir lo más posible la co-extracción de compuestos de la matriz, así como diseñar una limpieza exhaustiva de la muestra. Las diferentes propiedades fisicoquímicas de los analitos que pueden estar presentes en las muestras se deben tener en cuenta, ya que pueden complicar la selectividad del proceso de extracción. Estos aspectos condicionan la metodología analítica que se utilizará y requieren un estudio en profundidad.

Por las razones anteriormente mencionadas, es necesario un pretratamiento de la muestra previo al análisis. Según la sensibilidad deseada o la naturaleza del analito, existen diferentes técnicas para realizar la extracción de pesticidas en miel. Las técnicas más comúnmente utilizadas para la extracción de pesticidas y antibióticos en miel son la extracción con disolventes (SE), debido a su fiabilidad y sencillez, y la extracción en fase sólida (SPE) (Albero-Romano, 2009). Además, en los últimos años, con el propósito de reducir la manipulación de la muestra y disminuir los residuos generados, se han desarrollado nuevos métodos de extracción (Rissato *et al.*, 2004; Rial-Otero *et al.*, 2007) que se describen a continuación:

Extracción líquido-líquido o con disolventes

La extracción líquido-líquido (LLE) o con disolventes (SE) consiste en diluir la miel en agua o en otro solvente polar para su homogenización. A continuación, se extraen los pesticidas o antibióticos con disolventes, según la polaridad del analito, y por último se limpia el extracto para evitar compuestos de alto peso molecular. En este método, el tipo de disolvente utilizado marca principalmente la eficiencia del proceso. Los disolventes orgánicos más utilizados son el acetato de acetilo, acetonitrilo y metanol (Kujawski & Namieśnik, 2011; Salami & Queiroz, 2013; Panseri *et al.*, 2014). La polaridad del disolvente utilizado tiene que tener un compromiso entre un porcentaje de recuperación aceptable y una buena selectividad (Rial-Otero *et al.*, 2007). Sin embargo, esta técnica emplea gran cantidad de muestra y grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos; además, es lenta en comparación a otras técnicas (Rial-Otero *et al.*, 2007). También tiene como inconvenientes la necesidad de aplicar múltiples pasos de manipulación de la muestra, lo que aumenta el riesgo de contaminación cruzada y la formación de emulsiones,

además requiere un filtrado final de la muestra (Anthemidis & Ioannou, 2009; Pena-Pereira *et al.*, 2009). A pesar de estas desventajas, se sigue usando para la extracción de plaguicidas en miel, dado que no requiere de material sofisticado y su coste es bajo (Blasco *et al.*, 2004; Pirard *et al.*, 2007; Souza Tette *et al.*, 2016).

La limpieza final del extracto se suele realizar en una columna de extracción en fase sólida (SPE) (Choudhary & Sharma, 2008; Debayle *et al.*, 2008). El adsorbente más común para la extracción en miel tras un pretratamiento LLE es el silicato de magnesio, aunque también se emplean otros como octadecilsilano, octilsilano, gel de sílice, polidimetilsiloxano, polidivinilbenceno, sílice monolítica, tierra de diatomeas y amina primaria secundaria (PSA) (Choudhary & Sharma, 2008; Yavuz *et al.*, 2010; Kujawski & Namieśnik, 2011; Panseri *et al.*, 2014; Rodríguez López *et al.*, 2014).

Extracción con disolventes asistida por ultrasonidos (USE)

Es una modificación de la extracción LLE, que consiste en emplear ultrasonidos para asegurar un buen contacto entre la muestra y el disolvente mediante vibración a frecuencias ultrasónicas. Esta técnica permite la extracción de pesticidas termolábiles (Albero-Romano, 2009). Sin embargo, también emplea gran cantidad de disolventes, requiere una cantidad de muestra elevada (2-30g) y de filtración posterior. Se ha demostrado que mejora la eficiencia y velocidad de extracción respecto a LLE para la extracción de pesticidas en miel (Rezić *et al.*, 2005).

Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Esta técnica utiliza las propiedades únicas de los fluidos en estado supercrítico para la extracción de pesticidas de muestras sólidas. Principalmente se utiliza CO₂, ya que es fácil de emplear y funciona bien con compuestos apolares o moderadamente polares (Rial-Otero *et al.*, 2007). Su eficiencia para la extracción de compuestos polares puede mejorarse añadiendo pequeñas cantidades de disolvente (Mitra & Brukh, 2003). La técnica SFE presenta una serie de ventajas respecto a otros métodos: rapidez, uso mínimo de disolventes, genera pocos residuos, baja peligrosidad y extracción muy selectiva (Rial-Otero *et al.*, 2007). Además, necesita pequeñas cantidades de muestra, ya que obtiene extractos muy concentrados y puros al vaporizarse el fluido supercrítico a presión atmosférica. Sin embargo, esta técnica tiene gran número de variables a optimizar para cada analito y muestra, por ello, no existen métodos universales que funcionen con todos los analitos y matrices (Albero-Romano, 2009). Además, su coste es bastante elevado y presenta dificultades para extraer analitos orgánicos polares. Por todos estos motivos, su implementación en laboratorios es complicada (Zougagh *et al.*, 2004). Aunque es un procedimiento que requiere de una alta tecnificación y presenta algunos inconvenientes que

han de tenerse en cuenta, ha demostrado tener una alta eficiencia para la extracción de pesticidas en miel (Atienza *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1995; Blasco *et al.*, 2003; Rissato *et al.*, 2004).

Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE) se basa en la retención de los analitos seleccionados por un material adsorbente seguido de su elución con disolventes apropiados (Pirard *et al.*, 2007). Combina la extracción y el proceso de limpieza en un solo paso proporcionando extractos limpios, que pueden ser analizados directamente por cromatografía de líquido o de gases (Amendola *et al.*, 2010). Este método tiene como ventajas la simplicidad, robustez, rapidez, alta sensibilidad y bajo consumo de disolventes, y permite la extracción de numerosos pesticidas o antibióticos de una misma muestra (Amendola *et al.*, 2010). Permite la extracción de compuestos volátiles y no volátiles (García-Chao *et al.*, 2010). Además, este método evita la formación de emulsiones. Algunas de las fases sólidas empleadas para la extracción de plaguicidas en miel son copolímeros de poli (divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona) (Debayle *et al.*, 2008), tierra de diatomeas (Amendola *et al.*, 2010), silicato de magnesio (García-Chao *et al.*, 2010) y cartuchos C18 (Bonzini *et al.*, 2011). Para la extracción de antibióticos existen en el mercado cartuchos comerciales específicos con un relleno determinado para la extracción de sulfamidas, tetraciclinas o estreptomicinas. Por todo ello, es una alternativa atractiva en el análisis de matrices complejas como la miel (Pirard *et al.*, 2007). Actualmente, es el método de extracción de antibióticos más utilizado en miel (Huq & Kallury, 2006; Juan-Borrás *et al.*, 2015; Moretti *et al.*, 2017). Los inconvenientes que presenta son: no permite manejar gran número de muestras, el material del cartucho puede generar interferencias y adsorber el analito (Albero-Romano, 2009).

Extracción en fase sólida dispersiva (MSPD)

Es una técnica alternativa a la extracción en fase sólida descrita en el apartado anterior, desarrollada por Steven Barker (Barker, 2000) con la finalidad de evitar los principales inconvenientes de la extracción con solventes (SE) y la extracción en fase sólida (SPE) de muestras sólidas o semisólidas (Silveira-Dórea & Gomes Lopes, 2004). Esta técnica tiene una eficacia similar a la extracción SE, pero requiere menos tiempo y disolvente. Además, evita los pasos previos de dilución de muestras sólidas y semisólidas necesarios en la extracción SPE. En esta técnica la muestra se mezcla con un adsorbente, generalmente florisil o C₁₈, y se transfiere a una columna. El adsorbente actúa como abrasivo para romper la estructura física de la muestra, absorber los compuestos de la matriz, actuar de soporte sólido para rellenar la

columna y permitir el fraccionamiento de la muestra (Rial-Otero *et al.*, 2007). Finalmente, la columna se eluye con un disolvente apropiado y el extracto puede ser analizado directamente. Se evita la formación de emulsiones y posee una alta sensibilidad. Los únicos inconvenientes que presenta es que no es adecuada para muestras secas y la cantidad de muestra está limitada. Esta técnica ha sido aplicada con éxito (recuperaciones de 60-113% y LOD = 15 µg/kg) para la extracción de piretroides, organoclorados (OPCs), organofosforados (OPPs) y acaricidas en miel (Albero *et al.*, 2001; Sánchez-Brunete *et al.*, 2002).

Extracción mediante barra de agitación (SBSE)

Es una técnica que se basa en principios similares al SPME pero con ligeras modificaciones. La muestra se agita con una barra de agitación recubierta de un adsorbente hasta que el analito alcanza el equilibrio entre el polímero y la fase acuosa. Los analitos son térmicamente desorbidos en el inyector de un cromatógrafo de gases o mediante un disolvente para su análisis por HPLC (Rial-Otero *et al.*, 2007). Las ventajas de este método son similares a las de SPME pero con mayores porcentajes de recuperación (Mitra & Brukh, 2003). Su principal desventaja es que la desorción no puede hacerse directamente en el inyector sin una unidad de desorción especial. Esta técnica se ha utilizado para el análisis de seis organofosforados en miel, observando una mayor sensibilidad y precisión que el SPME (Blasco *et al.*, 2004).

Microextracción en fase sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida (SPME, solid-phase microextraction) es una técnica desarrollada por Pawliszyn y colaboradores (Arthur & Pawliszyn, 1990; Arthur *et al.*, 1992; Louch *et al.*, 1992) que no utiliza disolventes para extraer los analitos. El método consiste en sumergir una fibra de sílice recubierta de un film polimérico dentro de la muestra (líquida o gaseosa). Los pesticidas son adsorbidos por la fase estacionaria debido a su mayor afinidad por ella, y después térmicamente desorbidos en el inyector de un cromatógrafo de gases (Rial-Otero *et al.*, 2007). La metodología SPME elimina los problemas asociados a SPE pero manteniendo las siguientes ventajas: prescinden totalmente disolventes, se reducen mucho los límites de detección y cuantificación, el tiempo de extracción es menor, proporciona buenos resultados para un amplio rango de concentraciones de analitos, no requiere retirar por completo el analito de la matriz líquida y puede ser fácilmente automatizado (Arthur & Pawliszyn, 1990; Fernández *et al.*, 2002). Su única desventaja es que tiene problemas de reproducibilidad. Esta técnica ha sido evaluada para la extracción de acaricidas, OCPs, OPPs y ONPs en miel (Jiménez *et al.*, 1998; Volante *et al.*, 2001; Blasco *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004).

Microextracción de una gota (SDME)

Esta técnica simultáneamente extrae y pre-concentra los analitos. Se emplea una microgota de disolvente orgánico inmiscible en agua suspendido en la punta de la aguja de una microjeringa. La microgota se sumerge en la muestra disuelta durante un periodo de tiempo (Jeannot & Cantwell, 1997; Tsiropoulos & Amvrazi, 2011). Los factores clave que deben ser optimizados para la extracción de pesticidas en miel son: la dilución de la muestra, el volumen, el pH, el contenido en NaCl, la velocidad de agitación de la disolución donante, el tiempo de extracción y la profundidad de la aguja. Este método se ha usado con éxito y se han obtenido buenos porcentajes de recuperación para los pesticidas: captan y fenarimol en miel (Tsiropoulos & Amvrazi, 2011). Su principal inconveniente es que es difícil de optimizar.

Extracción mediante QuEChERS

Actualmente es la técnica más empleada para el pretratamiento de miel a nivel internacional (Ciešlik *et al.*, 2011). *QuEChERS*, el acrónimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, fue desarrollado por Anastassiades *et al.* (2003). Es un tipo de extracción en fase sólida dispersiva que se diseñó para que fuera sencilla y pudiera ser aplicada en el máximo número de laboratorios (Prestes *et al.*, 2009). Su éxito radica en que el procedimiento de *QuEChERS* multiresiduo tiene un menor número de pasos y baja complejidad tecnológica, comparado con otros tipos de pretratamiento (Kolberg *et al.*, 2011). Este método está basado en el uso de sulfato de magnesio ($Mg SO_4$) y cloruro sódico (NaCl) para la extracción/separación de los analitos con una extracción en fase dispersiva (DSPE) para limpiar el extracto (Prestes *et al.*, 2009). Aunque el método es capaz de extraer numerosos pesticidas tanto polares como no polares, se ha observado que el porcentaje de recuperación de algunos de ellos puede mejorarse variando distintas condiciones de extracción, como el pH de la matriz (Anastassiades *et al.*, 2003; Lehotay *et al.*, 2005; Payá *et al.*, 2007). Por ello, se han realizado diferentes modificaciones en el método Quechers original, para adaptarlo al pesticida analizado y a las características de la muestra (Kamel, 2010; Proietto Galeano *et al.*, 2013). Para el caso de la miel, son comunes las modificaciones respecto al tipo de disolvente utilizado en la extracción (acetonitrilo, etil acetato, metanol o acetona) y la cantidad de muestra (0.5-10 g) (Sampaio *et al.*, 2012; Kujawski *et al.*, 2014). También se ha sustituido el adsorbente original por PSA para retener pesticidas que contengan grupos ácido carboxílicos, como en el caso del metabolito imidacloprid (ácido 6-cloronicotínico) (Kamel, 2010).

Calatayud-Vernich *et al.* (2016) compararon la técnica de extracción Quechers con las técnicas de extracción en fase sólida (SPE) y extracción con disolvente (SE) para la extracción de 52

pesticidas en miel y abejas. Estos autores demostraron que el procedimiento QuEChERS proporciona buenos resultados en recuperaciones y coeficientes de variación, similares a los procedimientos de extracción basados en disolventes y SPE. Además, presenta la ventaja de ser más económico y consumir menos tiempo que los otros procedimientos. Entre sus inconvenientes destacar que, en ocasiones, presenta baja selectividad en la extracción, posible formación de emulsiones y obtención de extractos poco concentrados.

En definitiva, existen numerosas técnicas de pretratamiento de la muestra para el análisis de pesticidas y antibióticos que se pueden aplicar a diferentes matrices alimentarias, incluida la miel. Cada una presenta distintas ventajas e inconvenientes que deben evaluarse en cada caso, según las necesidades, volumen de muestras a analizar o nivel de tecnificación del laboratorio. En la **Tabla 2** se muestra un resumen de todos los métodos de extracción de pesticidas en miel y las referencias bibliográficas de los trabajos en los que se han empleado.

Tabla 2. Métodos de extracción de pesticidas y antibióticos en miel para cromatografía (Albero-Romano, 2009).

Técnica de Extracción	Uso para extracción de pesticidas y antibióticos en miel	Ventajas	Inconvenientes
Extracción con disolventes (LLE)	-Blasco <i>et al.</i> , 2004; - Pirard <i>et al.</i> , 2007; - Souza Tette <i>et al.</i> , 2016	-No requiere de material sofisticado. -Bajo coste.	-Emplea gran cantidad de muestra. -Alto consumo de disolventes tóxicos. -Es lenta. -Aumenta el riesgo de contaminación cruzada por los múltiples pasos que implica. -Posible formación de emulsiones. -Requiere una filtración posterior.
Extracción con disolventes por ultrasonidos (USE)	-Rezić <i>et al.</i> , 2005	-Bajo coste. -Permite extracción de pesticidas termolábiles. -Rápida. -No depende de la matriz. -Extracción más eficiente que LLE.	-Alto consumo de disolventes. Requiere filtración posterior. -Cantidad de muestra elevada (2-30 g).
Fluidos supercríticos (SFE)	-Atienza <i>et al.</i> , 1993; - Jiménez, Atienza & Bernal, 1995 -Blasco <i>et al.</i> , 2003 -Rissato <i>et al.</i> , 2004	-Rápida. -Bajo consumo de disolventes. -Alta selectividad. -Necesita poca cantidad de muestra. -Automatizable. -Extracto concentrado y puro al terminar.	-Gran número de variables a optimizar -Alta tecnificación y elevado coste del equipo. -No adecuado para compuestos orgánicos polares.
En fase sólida (SPE)	-Debayle, Dessalces & Grenier-Loustalot, 2008 -Amendola, Pelosi & Dommarco, 2010 -García-Chao <i>et al.</i> , 2010 -Bonzini <i>et al.</i> , 2011 -Juan-Borrás <i>et al.</i> , 2015	-Simplicidad. -Robustez. -Rápida. -Alta sensibilidad. -Bajo consumo de disolventes. Permite la extracción de numerosos pesticidas de una muestra. -Extracción de compuestos volátiles y no volátiles. -No se forman emulsiones. -Gran variedad de adsorbentes.	-Bajo rendimiento en número de muestras. -El material del cartucho puede generar interferencias y adsorber el analito. -El empaquetado del adsorbente debe ser uniforme para evitar una eficiencia baja.
Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)	-Albero, Sánchez-Brunete & Tadeo, 2001 -Sánchez-Brunete <i>et al.</i> , 2002	-Más rápida que SE. -Menor consumo de disolventes que SE. -Evita pasos previos de dilución de muestras sólidas y semisólidas necesarios para SPE -No se forman emulsiones. -Alta sensibilidad.	-No es adecuada para muestras secas. -La cantidad de muestra está limitada.
Mediante barra de agitación (SBSE)	-Blasco <i>et al.</i> , 2004	-Ventajas similares a SPME pero con mayor % de recuperación, mayor sensibilidad y precisión.	-La desorción no se puede hacer directamente en el inyector sin una unidad de desorción especial.
Microextracción en fase sólida (SPME)	-Jiménez <i>et al.</i> , 1998 -Volante <i>et al.</i> , 2001 -Blasco <i>et al.</i> , 2004 -Yu, Wu & Xing, 2004	-Elimina todos los problemas asociados a SPE. -Extracción rápida. -Alta sensibilidad. -No consume disolventes. -Automatizable. -Bajo coste.	-Problemas de reproducibilidad.
Microextracción de una gota (SDME)	-Tsiropoulos & Amvrazi, 2011	-Bajo consumo de disolventes. -Bajo coste. -Cantidad de muestra baja.	-Difícil de optimizar. -Presencia de contaminantes.
QuEChERS	-Kamel, 2010 -Sampaio <i>et al.</i> , 2012 - Proietto Galeano <i>et al.</i> , 2013 -Kujawski <i>et al.</i> , 2014 -Calatayud-Vernich <i>et al.</i> , 2016	-Extracción rápida. -Bajo consumo de disolventes. -Bajo coste. -Poco requerimiento tecnológico. -Puede extraer gran número de pesticidas polares y apolares. -Pocos pasos.	-Poca selectividad en la extracción. -Posible formación de emulsiones. -Extracción manual. -Extractos poco concentrados.

1.4.1.2. Detectores empleados en las técnicas cromatográficas

Una vez preparado el extracto con los analitos objeto de interés, para su cuantificación, se debe emplear técnicas cromatográficas (de líquido o gases) que dispongan de detectores apropiados para alcanzar los límites de detección requeridos.

En el pasado, se han utilizado distintos detectores para la cuantificación de residuos en miel, tanto en cromatografía líquida como de gases. En cromatografía líquida se han utilizado diversos tipos como: de barrido (Li *et al.*, 2013), de matriz (*array*) de diodos (DAD) (Sampaio *et al.*, 2012; Vichapong *et al.*, 2015), espectrofluorométricos (FLD) (Amendola *et al.*, 2010), ultravioleta, (Jiménez *et al.*, 2000) o amperimétricos (Gomis *et al.*, 1994). En cromatografía de gases los detectores empleados para la detección de residuos en miel han sido: (1) el termoiónico específico (TSD) o de nitrógeno fósforo (NPD), que detecta el nitrógeno o el fósforo que contienen compuestos orgánicos (Sánchez-Brunete *et al.*, 2002; Farajzadeh *et al.*, 2014; Rodríguez López *et al.*, 2014), y se emplea para detectar compuestos orgánicos fosforados y nitrogenados; (2) el fotométrico de llama (FPD) (Jansson, 2000; Yu & Hu, 2009; Amendola *et al.*, 2010) y de llama por pulsos (PFPD), para la cuantificación de moléculas que contengan azufre o fósforo (Jansson, 2000); (3) el detector de captura de electrones (ECD) para el análisis de compuestos halogenados (Tsigouri *et al.*, 2001; Sánchez-Brunete *et al.*, 2002; Rissato *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2013; Malhat *et al.*, 2015); y por último, (4) los detectores de ionización de llama (FID) (Bernal *et al.*, 2000) y de emisión atómica (AED), que se basan en la ionización completa de la muestra dentro de un plasma de helio, y la identificación del analito mediante sus espectros de emisión atómica (Campillo *et al.*, 2012) para la detección de piretroides y compuestos organoestánicos.

Sin embargo, el sistema de detección que hoy se emplea mayoritariamente para cuantificar pesticidas y antibióticos en miel es la espectrometría de masas, ya sea de forma simple (MS) o en tándem (MS/MS), por su gran sensibilidad y selectividad, y por su capacidad para detectar de forma simultánea un amplio rango de pesticidas y antibióticos a muy bajas concentraciones (Kaufmann *et al.*, 2002; Jovanov *et al.*, 2013; Panseri *et al.*, 2014; Al Naggar *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Mousavi *et al.*, 2016; Bargańska *et al.*, 2018; Gawel *et al.*, 2019; Venu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

En definitiva, son indudables las ventajas que a día de hoy presentan las técnicas cromatográficas por su sensibilidad y selectividad. Con ellas se pueden alcanzar los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) requeridos en el análisis de miel. Además, permiten aplicar métodos multirresiduos (MRM) para la detección, identificación y cuantificación tanto

de pesticidas como de antibióticos (Debayle *et al.*, 2008). Sin embargo, presentan importantes inconvenientes, entre los que cabría mencionar el empleo de grandes cantidades de disolventes tóxicos (altamente contaminantes y perjudiciales para la salud y el medio ambiente), son técnicas de elevado coste económico, requieren personal altamente cualificado y un costoso pretratamiento de la muestra. Todos estos motivos dificultan la implantación de estos equipos en la industria de envasado de la miel, para realizar los controles de calidad rutinarios necesarios para su comercialización. Por ello, la tendencia actual se dirige hacia la búsqueda de métodos de análisis alternativos que minimicen los inconvenientes de las técnicas cromatográficas.

1.4.2. Técnicas de cribado (*screening*)

Para la detección de residuos en miel, además de las técnicas cromatográficas, existen diferentes métodos de cribado o *screening*. La Decisión de la Comisión 2002/657/EC (2002) los define como *“métodos utilizados para detectar la presencia de una sustancia, o tipo de sustancias, al nivel de interés. Estos métodos se utilizan para cribar grandes cantidades de muestras en busca de posibles resultados no conformes. Están diseñados específicamente para evitar resultados de falso conforme”*.

Estas técnicas de detección tienen la ventaja de ser útiles cuando hay que analizar un elevado volumen de muestras, ya que permiten hacer una criba para establecer la presencia o ausencia de residuos en las muestras, y así únicamente realizar análisis más complejos y minuciosos (como los cromatográficos) a las muestras que lo requieran. Su principal inconveniente es que no todas ellas alcanzan los límites de detección deseados.

Las técnicas de *screening* deben ser simples, rápidas, sensibles y de bajo coste. Cuando se requiera de una extracción previa, como es el caso de matrices complejas, ésta debe ser simple y rápida. El "nivel de interés" del analito a considerar será el límite legal, por ejemplo, LMR para sustancias autorizadas, o el límite mínimo de funcionamiento requerido (MRPL) para sustancias prohibidas.

Los métodos de *screening* pueden dividirse en microbiológicos y bioquímicos. Los microbiológicos, basados en la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos, son los métodos de *screening* más antiguos utilizados en la detección de residuos de antibióticos en alimentos. Estos métodos son simples y económicos, por ello fueron los primeros implementados para el control de residuos de antibióticos en alimentos (Gillet *et al.*, 1972; Bogaerts & Wolf, 1980; Bogaerts, Degroot & De Vos, 1982). Desde entonces, se han desarrollado distintos métodos bioquímicos basados en el reconocimiento de antígeno-anticuerpo para la detección de los

analitos. Debido a su naturaleza, estos métodos son más específicos que los microbiológicos. Los métodos bioquímicos de *screening* de uso más extendido son los siguientes:

-Inmunoensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): Se basa en un ensayo de inmunoabsorción ligado a un enzima. Es un método de determinación inmunológica, en el que la reacción entre el antígeno y el anticuerpo se detecta por medio de una reacción química producida por una enzima que va ligada al antígeno o al anticuerpo. La determinación se realiza mediante medición espectrofotométrica, o detección visual del cambio de color que se produce al añadir el sustrato cromogénico correspondiente. Los ensayos ELISA pueden utilizarse tanto para detectar la presencia de un analito en la muestra (cualitativo), como para medir la concentración a la que éste se encuentra (cuantitativo). En este último caso, es necesario generar una curva de calibración mediante la utilización de concentraciones conocidas de analito.

El ELISA ha sido ampliamente empleado en la determinación de hormonas, proteínas, medicamentos, pesticidas, etc. En concreto, en la miel se han desarrollado ELISAs para la determinación de insecticidas como el imidacloprid y el tiametoxam (Ma *et al.*, 2009), para la detección de antibióticos: sulfamidas y tetraciclinas (Pastor-Navarro *et al.*, 2007a,b), cloranfenicol (Scortichini *et al.*, 2005) y trimetoptim (Chen *et al.*, 2016). También se han desarrollado ELISAs para pesticidas como el carbaril (Marco *et al.*, 1993), así como, organofosforados y neocotinoídes (Hua *et al.*, 2013), pero en estos últimos casos no se han aplicado a la miel.

Los kits ELISA se utilizan en laboratorios, tanto de investigación como de diagnóstico, para la detección y cuantificación de distintos bioanalitos. Sin embargo, frente a la creciente necesidad de detectar analitos presentes en muy bajas concentraciones, estos ensayos presentan algunas limitaciones de sensibilidad, en este sentido, su límite de detección suele estar en torno a 0.5 µg/L. Además, la lectura debe hacerse en un corto periodo de tiempo desde la reacción enzima-sustrato para evitar problemas como de cambios de color no deseados o desuniones anticuerpo-antígeno (Abyntek Biopharma, 2018). Otro inconveniente reportado por algunos autores es que la fusión del enzima al anticuerpo puede dificultar la unión del anticuerpo al antígeno (Hawkins *et al.*, 2006).

- Inmunoensayos CLIA (Chemiluminiscent Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): En los últimos años, debido a su alta sensibilidad y especificidad, los ensayos CLIA han ganado terreno en campos como la investigación biomédica, el diagnóstico clínico, la seguridad alimentaria o el análisis farmacéutico. Los ensayos CLIA parten del mismo fundamento técnico que los ELISAs,

con la diferencia de que, en este caso, la enzima acoplada al anticuerpo de detección cataliza una reacción quimioluminiscente que resulta en la emisión de fotones produciendo luz en vez de un cambio de color visible. Por tanto, a diferencia del ELISA, en el CLIA se mide la emisión de luz, en lugar del cambio de color. En comparación con otros métodos analíticos, la luminometría proporciona resultados en 15 minutos, con una sensibilidad excepcionalmente alta (0.001 µg/L) y con un rango de detección amplio (Abyntek Biopharma, 2018). Esta técnica se ha aplicado a la determinación de antibióticos en miel, obteniendo un límite de detección muy bajo 0.7 ng/L (Tao *et al.*, 2014). Su mayor inconveniente es que precisa de equipamiento específico (lector de quimioluminiscencia), que tiene mayor coste económico que el empleado en un ELISA convencional.

-Test Charm: Se trata de unas tiras comerciales basadas en dispositivos de flujo lateral inmunocromatográficos, que combinan la separación rápida de sustancias mediante cromatografía con la detección de tipo inmunológica. En este caso, el fenómeno de biorreconocimiento se detecta mediante un cambio de color producido por una reacción química. Esta prueba se suele usar para detectar rápidamente la presencia de antibióticos en leche, y también se ha empleado para la detección de sulfamidas (Serra-Bonvehí & Lacalle-Gutiérrez, 2009) y cloranfenicol en miel (McMullen *et al.*, 2004). Como desventaja, destacar que este método está basado en una patente desarrollada por una única empresa, lo que puede dificultar su uso en condiciones no estándar. Además al tratarse de kits comerciales no se tiene el control de todo el proceso y no proporcionan tanta información, tienen menor versatilidad que la tecnología que se propone en esta tesis.

-Ensayo inmunocromatográfico colorimétrico-quimioluminiscente (ICA): Se trata de una técnica luminiscente para la detección de diferentes analitos como los pesticidas o antibióticos (Ouyang *et al.*, 2018). Este método se basa en tiras reactivas basadas en dispositivos de flujo lateral inmunocromatográficos en el que el fenómeno de biorreconocimiento se traduce en emisión de luz mediante una reacción química. Se suelen utilizar nanocompuestos de nitruro de carbono grafito / ferrita de bismuto (C_3N_4 / $BiFeO_3$) como catalizadores similares a la peroxidasa. Sus ventajas son su gran portabilidad, rapidez y multiplexado. Como inconveniente, destacar la complejidad de la síntesis de los nanocompuestos.

- Kit comercial Sulfasensor®: Es otra solución inmunocromatográfica de flujo lateral disponible en el mercado, desarrollado por Gaudin *et al.* (2012). Se trata de una técnica de *screening* para la detección de sulfonamidas en miel. La prueba es robusta, proporciona resultados en 90 minutos, permite el análisis de 40 muestras simultáneamente y es fácil de utilizar. La tasa de

falsos positivos es del 12.5%, los límites de detección alcanzados por este kit fueron de 25 µg/kg para sulfatiazol, sulfametazina, sulfamerazina y sulfapiridina, de 150 µg/kg para sulfaquinoxalina y 1000 µg/kg para sulfametoxazol y sulfametizol. El kit es aplicable a una amplia variedad de mieles (diferentes orígenes florales y geográficos, líquidos o sólidos). El inconveniente de esta técnica es que los límites de detección obtenidos son bastante elevados.

1.5. Validación de métodos analíticos

Los laboratorios analíticos que se dedican al análisis de residuos químicos tienen la obligación de validar los métodos analíticos antes de su aplicación. En este sentido, hay que realizar una serie de comprobaciones que aseguren que el método es científicamente correcto en las condiciones en las que va a ser aplicado. En el proceso de validación se deben comprobar sus características técnicas en cuanto a selectividad y especificidad, sensibilidad, linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), exactitud y precisión. El proceso para determinar la exactitud de los métodos se lleva a cabo con materiales de referencia certificados, si es posible, o con muestras enriquecidas artificialmente, en el caso de no disponer de los materiales de referencia adecuados. La precisión del método se calcula mediante el análisis repetido de una misma muestra.

Con respecto a la validación del método, existen diferentes guías: como la Directiva 2002/657/EC (2002), la guía SANCO (SANCO/12571/2013, 2013) actualizada en 2019 por el documento SANTE/12682/2019, la *International Conference for Harmonization* (ICH, 1996) y la guía *Eurachem* (Eurachem, 2014). Todas ellas presentan ligeras variaciones, sin embargo, tienen un objetivo común: establecer un sistema armonizado de aseguramiento de la calidad para asegurar la exactitud y la comparabilidad de los resultados analíticos.

La *Directiva 2002/657/EC*, relativa al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, establece una serie de requisitos para llevar a cabo la validación de métodos analíticos, tanto cualitativos como cuantitativos. En ella, se definen los criterios de funcionamiento y otros requisitos que son función de la técnica usada, para la detección y cuantificación. Para demostrar que el método analítico cumple los criterios de funcionamiento, la citada directiva establece los parámetros que hay que estudiar, e indica que la validación puede realizarse a través de un estudio interlaboratorios, o en el propio laboratorio mediante validación interna.

El Comité sobre Residuos de Plaguicidas (CCPR, 2013) de la Comisión del *Codex Alimentarius* (FAO y OMS), en relación al Programa conjunto sobre Residuos de Plaguicidas para su control en los alimentos, considera que la guía SANCO/12571/2013 ofrece una cobertura en

profundidad de la validación de métodos para residuos de plaguicidas. El documento “*Validación de métodos y procedimientos del control de la calidad para el análisis de residuos de plaguicidas en los alimentos y los piensos*” contiene directrices sobre criterios de rendimiento, incluyendo límites de recuperación y precisión. Este documento también abarca las exigencias y evaluaciones a aplicar a los datos obtenidos de los métodos de análisis.

Los requisitos que propone SANCO/12571/2013 para que un método analítico cumpla la validación son, entre otros, obtener porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas entre 80 y 120% y que el coeficiente de variación (CV) de las medidas sea inferior al 20%.

1.6.- Biosensores

El término "biosensor" comenzó a aparecer en la literatura científica a fines de la década de 1970 (D’Orazio, 2011). Un biosensor puede definirse como un dispositivo analítico formado por un componente biológico activo (receptor de reconocimiento biológico), ya sea un enzima, un anticuerpo, ADN, etc., que se inmoviliza en la superficie de un transductor electrónico, óptico u optoelectrónico, lo que permite la detección de analitos diana en mezclas complejas (Montoya *et al.*, 2008). Los biosensores ofrecen un gran potencial para detectar patógenos, moléculas y compuestos potencialmente dañinos, como pesticidas y antibióticos. Esto se debe a que realizan la detección de forma selectiva, fiable y con alta sensibilidad. En general son de fácil uso y, cuando son de pequeño tamaño en comparación con los equipos empleados en otras técnicas de análisis, tienen la característica de la portabilidad. Por último, permiten reducir el coste, tanto económico como temporal, permitiendo la detección del analito en tiempo real (Ricci *et al.*, 2007; Gaudin, 2017).

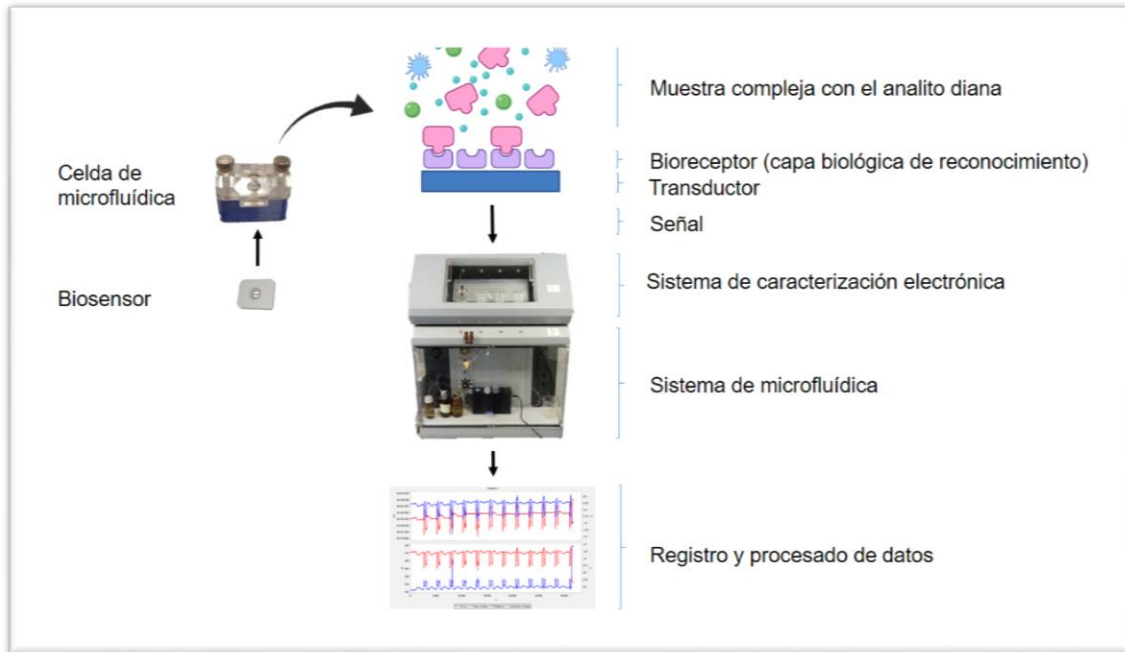


Figura 4. Esquema general de un biosensor.

En la **Figura 4** se muestra el esquema de un biosensor. La mezcla compleja en la que se desea detectar una determinada sustancia se pone en contacto con una interfaz bioquímica en la que se absorben o adhieren las especies a detectar. Dicha interfaz está inmovilizada sobre la superficie de un transductor (también denominado sensor) que transforma la magnitud resultante del evento de reconocimiento (absorción o adhesión) de la sustancia a detectar en una magnitud óptica o eléctrica que puede ser registrada, acondicionada y cuantificada por el sistema de caracterización. Finalmente, empleando el software adecuado, es posible procesar la señal y extraer información suficiente para determinar la presencia o no de la sustancia a detectar, e incluso su concentración. El resultado final es una curva de calibración que relaciona diferentes concentraciones del analito a detectar con señales eléctricas u ópticas entregadas por el transductor. El sistema de caracterización empleado juega un papel determinante en todo el proceso, ya que cuando las señales a registrar son de bajo nivel, es necesario que éste introduzca un nivel de ruido bajo para no enmascarar la señal entregada por el transductor. Por otro lado, las interacciones moleculares normalmente tienen lugar en su medio líquido natural, por lo que es necesario disponer de un sistema de microfluídica que permita dispensar los medios líquidos a analizar sobre la superficie del transductor. Para ello, es necesario disponer de un sistema de válvulas, bombas y tuberías, así como de celdas que sirvan de soporte del transductor.

Los biosensores pueden clasificarse en función del tipo de bioreceptor empleado, o de acuerdo con el tipo de transductor utilizado. Las sustancias biológicas activas pueden ser especies

moleculares orgánicas como: proteínas, enzimas, inmunoreactivos (anticuerpos y sus conjugados), aptámeros y ADN o también sustancias biológicas vivas como células o tejidos. Por otro lado, el bioreceptor también puede ser un sustrato sintético como polímeros de huella molecular (MIPs, *Molecularly Imprinted Polymers*). Los transductores pueden ser electroquímicos, acústicos, ópticos o térmicos (**Figura 5**) (Gaudin, 2017).

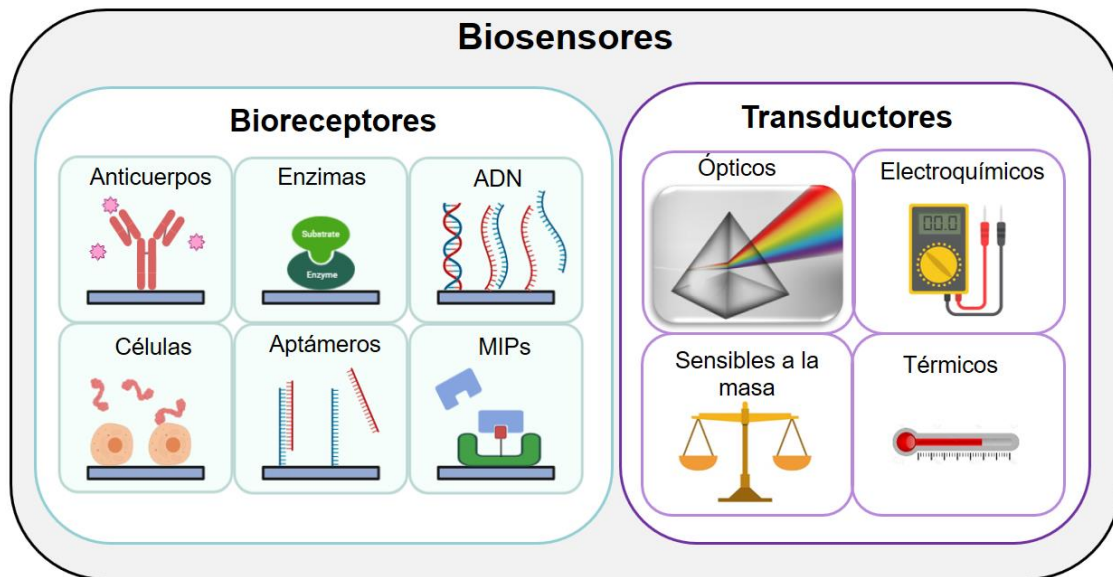


Figura 5. Diferentes tipos de biosensores de acuerdo con el transductor empleado y con el bioreceptor empleado.

Los transductores más empleados y populares en biosensores para aplicaciones de tecnología de alimentos son los electroquímicos, ópticos y acústicos. Los transductores acústicos se basan en la detección de cambios en las propiedades de las ondas acústicas generadas por el sensor cuando se producen alteraciones en su superficie. Los más comunes son los que utilizan materiales piezoeléctricos, en particular, cristales de cuarzo. El biosensor desarrollado en esta tesis doctoral emplea un cristal de cuarzo como transductor sobre el que se han inmovilizado inmunoreactivos como sustancias de bio-reconocimiento para realizar la detección de pesticidas y de antibióticos en la miel. A este tipo de biosensor se le denomina *inmunosensor*. En la siguiente sección se explican con más detalle algunos aspectos bioquímicos relativos a los inmunosensores. Los fundamentos de los cristales de cuarzo empleados como transductores se explican en la sección 1.8.

1.7.- Aspectos bioquímicos de los inmunosensores

Un inmunosensor es un tipo especial de biosensor en el que el compuesto biológico que detecta al analito diana es un inmunorreactivo que forma parte de un *inmunoensayo*. El término inmunoensayo comprende todos los procedimientos analíticos basados en el reconocimiento específico que ocurre entre un antígeno y su anticuerpo (Montoya *et al.*, 2008). Puesto que la unión del anticuerpo y el antígeno es compleja de cuantificar, se suele marcar uno de ellos para facilitar esta medida. El marcaje (*labelling*) consiste en unir químicamente al antígeno o al anticuerpo una sustancia química que sea fácil de detectar, por ejemplo, mediante un enzima que produzca un cambio de color, emisión de luz, un compuesto fluorescente u otras sustancias. Los inmunoensayos más populares son los ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y los inmunosensores. En las dos últimas décadas, los inmunoensayos se han posicionado dentro del campo analítico como métodos complementarios y/o alternativos a los clásicos por su sencillez, rapidez, bajo coste y alta selectividad y sensibilidad.

Los ELISA fueron introducidos la sección 1.4.2, en esta sección se revisan algunas características ya mencionadas anteriormente con el fin de establecer una comparativa con los inmunosensores. En los ELISA, la detección del analito siempre es indirecta, ya que uno de los inmunorreactivos está marcado con un enzima. En el último paso del ensayo se produce una señal colorimétrica cuando la enzima transforma un sustrato incoloro en un producto coloreado (Montoya *et al.*, 2008). Una de las desventajas de esta técnica, frente a los inmunosensores, es que la medición cuantitativa real se realiza con posterioridad al evento de reconocimiento bioquímico. Además, como ya se ha mencionado en una sección anterior, algunos autores afirman que el marcado con la enzima puede comprometer la actividad bioquímica (Hawkins *et al.*, 2006). Por el contrario, en los inmunosensores no se utilizan marcadores, siendo la detección directa (*label-free*), ya que uno de los inmunorreactivos se inmoviliza en la superficie del transductor, de modo que, cuando se produce la interacción con el otro inmunorreactivo, el propio transductor transforma los cambios bioquímicos que se han producido en modificaciones en las señales ópticas o eléctricas (Byfield & Abuknesha, 1994; Marty *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 2008). La detección directa y sin marcadores (*label free*) representa una ventaja esencial de los inmunosensores frente a la técnica ELISA (Janshoff *et al.*, 2000).

Los inmunosensores combinan la selectividad que proporciona el inmunoensayo con la alta sensibilidad del transductor al cambio bioquímico que se ha producido. Conseguir los mismos niveles de sensibilidad que los proporcionados por ELISA, así como su capacidad multianalito, son los retos a los que se enfrentan actualmente las líneas de investigación que emplean inmunosensores para la detección de sustancias.

Como ya se ha indicado anteriormente, en esta tesis doctoral se emplearán cristales piezoeléctricos de cuarzo como transductores. A este tipo de inmunosensor se le denomina *inmunosensor piezoeléctrico*. Como se explicará en la sección 1.8, los transductores piezoeléctricos llevan unidos sobre su superficie unos electrodos de oro que sirven para generar la resonancia del transductor. Estos mismos electrodos se emplean como soporte para realizar la inmovilización de los inmunoreactivos. En la siguiente sección se describen los diferentes formatos de inmunoensayo existentes, haciendo especial hincapié en el empleado en esta tesis doctoral.

1.7.1.- Formatos de inmunoensayo

Los anticuerpos son un tipo de proteína denominada inmunoglobulina (Ig). Existen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM (Gizeli, 2002). Los anticuerpos son producidos de forma natural por el sistema inmunitario de los animales, como respuesta a la exposición de un agente externo (antígeno). Actualmente, también se pueden producir en condiciones controladas de laboratorio para propósitos analíticos en inmunoensayos. La forma habitual de producir anticuerpos de forma controlada en un laboratorio es inyectando los antígenos correspondientes en un animal experimental (normalmente conejo, ratón, etc) para que su sistema inmunitario genere naturalmente los anticuerpos contra dichos antígenos.

Las moléculas orgánicas de bajo peso molecular, como los pesticidas y los antibióticos, no son moléculas inmunogénicas, es decir, generalmente no son reconocidas por el sistema inmunitario. En consecuencia, no producen ninguna respuesta inmune en un organismo vivo. De este modo, la simple inyección de las mismas en un animal experimental no genera los anticuerpos deseados. Para desarrollar anticuerpos específicos que reconozcan analitos de bajo peso molecular, como los que son de interés en esta tesis doctoral (pesticidas y antibióticos), es necesario sintetizar haptenos conjugados (ver sección 1.7.2.1.).

El *hapteno* es la molécula del analito diana modificado químicamente, al que se ha introducido en su estructura los grupos químicos adecuados para su conjugación con proteínas. La unión del hapteno con la proteína denominada "carrier" forma el *hapteno conjugado*, el cual se usa como antígeno (sustancia inmunogénica) para inyectar a los animales experimentales con el fin de que generen los correspondientes anticuerpos. También se usa como conjugado de ensayo en el inmunoensayo.

En los inmunoensayos más utilizados en inmunosensores, uno de los inmunorreactivos (antígeno o anticuerpo) se inmoviliza sobre la superficie del transductor. Dependiendo de la

molécula inmobilizada, se pueden establecer dos formatos diferentes de inmunoensayo: el formato de conjugado inmobilizado y el formato de anticuerpo inmobilizado (ver **Figura 6**).

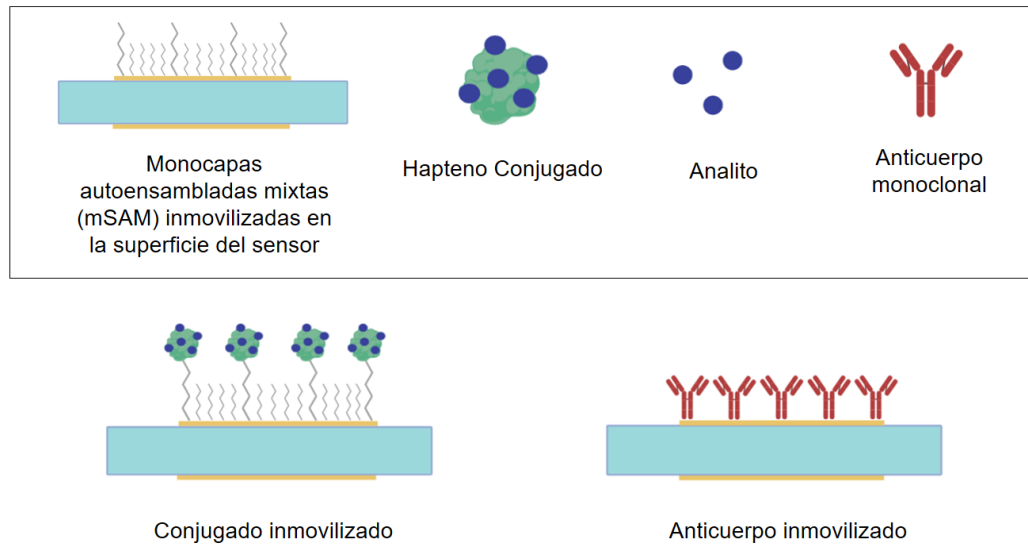


Figura 6. Formatos de inmovilización en inmunoensayos sobre soporte sólido.

En la **Figura 6** se muestra, de forma esquemática, el transductor (rectángulo azul) con los electrodos de oro en ambas caras (láminas amarillas). En el formato de ensayo en el que se inmoviliza el anticuerpo, éste se une directamente al electrodo de oro. En el formato en el que se une al transductor el hapteno conjugado, es necesario emplear una monocapa autoensamblada mixta (mSAM), esta capa permite que la unión entre el hapteno conjugado y el electrodo de oro forme una monocapa distribuida de forma ordenada. Este tipo de capas se explican con más detalle en la sección 1.7.2.3.

Para elegir cuál es el formato de ensayo más adecuado en una determinada aplicación, se deben tener en cuenta varias consideraciones, las más importantes son el peso molecular de la sustancia a detectar y la reusabilidad del inmunosensor. Respecto al peso molecular de la sustancia a detectar, cuando su peso molecular es bajo se recomienda el formato de inmunoensayo de hapteno conjugado inmobilizado. Dependiendo del formato de ensayo, es el hapteno conjugado o el anticuerpo el que se une al otro inmunoreactivo inmobilizado sobre el transductor. Teniendo en cuenta que el peso molecular del anticuerpo es superior al del hapteno conjugado, en los casos en los que se tengan que detectar sustancias de peso molecular bajo, es preferible que sea el anticuerpo el que se una. De este modo, cuando se produce el fenómeno

de reconocimiento, el cambio sobre la superficie del transductor generará una señal de mayor amplitud en el transductor (Montoya *et al.*, 2008; Rocha Gaso, 2013).

En cuanto al proceso de regeneración del inmunosensor, consiste en separar el inmunoreactivo inmovilizado del que no lo está, con el fin de dejar el biosensor preparado para la realización de otro análisis. En el formato de inmunoensayo con anticuerpo inmovilizado, el anticuerpo debe permanecer inmovilizado después de la regeneración. En el formato con hapteno conjugado inmovilizado, es el hapteno conjugado quien debe permanecer tras la regeneración. Las sustancias utilizadas para la regeneración del inmunosensor pueden modificar la estructura química del anticuerpo y dejarlo inactivo, mientras que no sucede lo mismo con el hapteno conjugado, que es más robusto en estas situaciones. Por ello, cuando se prevé la necesidad de reutilizar los biosensores, es preferible utilizar el formato de hapteno conjugado inmovilizado. Por último, otras consideraciones a tener en cuenta en la selección del formato más adecuado son la menor estabilidad del anticuerpo ante cambios de temperatura y que el formato de anticuerpo inmovilizado requiere un procedimiento de inmovilización más complejo que involucra estrategias de orientación de los anticuerpos (Mauriz *et al.*, 2006a), las cuales no son necesarias en el formato de hapteno conjugado inmovilizado.

Los residuos que se van a detectar en esta tesis doctoral (pesticidas y antibióticos) son de bajo peso molecular, además se pretende regenerar la superficie del transductor para emplear el mismo sensor en diferentes ensayos. Por lo tanto, el formato que se va a emplear es el de hapteno conjugado inmovilizado. A continuación, se explicará con más detalle el proceso de detección en este formato de inmunoensayo. Cuando se inmoviliza el hapteno conjugado, la detección del analito se basa en una inhibición de la unión del anticuerpo a dicho hapteno conjugado. De este modo, se realiza un ensayo competitivo en el que el analito libre de la muestra compite con el hapteno conjugado inmovilizado por unirse a una cantidad fija y limitante de anticuerpo en la solución. Como en todo ensayo competitivo, la señal producida disminuye con el incremento de la concentración de analito. Esta relación inversamente proporcional entre la concentración de analito y la señal del inmunosensor produce la curva de calibración estándar típica (ver sección 1.7.2.4.) de inmunoensayo competitivo como la que se muestra en la **Figura 7**.

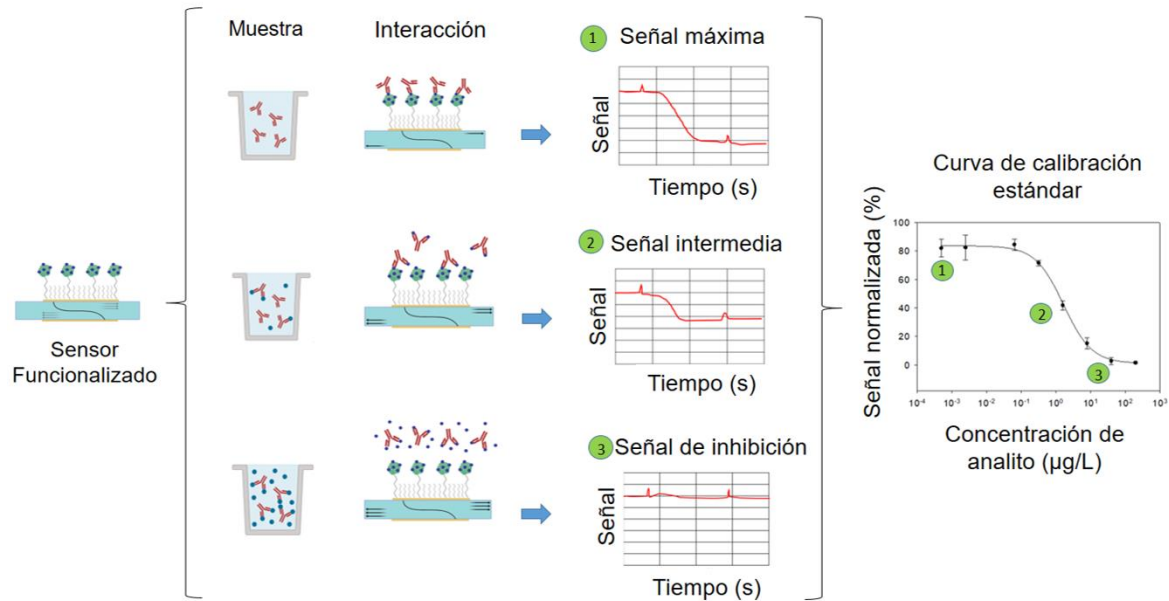


Figura 7. Principio de detección del inmunoensayo competitivo con hapteno conjugado inmovilizado.

En la **Figura 7** se han representado tres situaciones de un inmunosensor en el que se ha inmovilizado el hapteno conjugado sobre la superficie del transductor empleando mSAMS (ver sección 1.7.2.3). La primera situación representa una muestra a analizar en ausencia de analito, la segunda una muestra con una concentración intermedia de analito y la tercera una muestra con una concentración elevada de analito. Para cada caso se ha representado la señal generada por el transductor y se ha indicado el punto de la curva de calibración al que correspondería.

En ausencia de analito (caso 1 en la **Figura 7**), todo el anticuerpo disponible se unirá al conjugado inmovilizado en la superficie del transductor, provocando que el transductor genere una señal elevada como respuesta al evento de reconocimiento. Esta señal es considerada la señal máxima que se puede producir (100%), la cual corresponde al primer punto de la asíntota superior de la curva de calibración indicada en la figura. Para una concentración intermedia de analito (caso 2 en la **Figura 7**), parte del anticuerpo se unirá al analito, y el restante se unirá al conjugado inmovilizado en la superficie del sensor. Esta situación corresponde a un punto intermedio de la curva de calibración, situado en el punto de inflexión de la curva sigmoidea. Finalmente, la tercera situación (caso 3 en la **Figura 7**), representa la señal de inhibición total producida cuando hay una alta concentración de analito. Prácticamente todas las moléculas de anticuerpo se unen al analito en solución, evitando que se unan a la superficie del inmunosensor. De este modo, la señal generada por el transductor es mínima. Este tipo de señales corresponden a los puntos de la asíntota inferior de la curva de calibración.

1.7.2.- Pasos para el desarrollo del inmunosensor

El desarrollo de inmunosensores requiere un extenso trabajo previo con respecto a la producción e inmovilización de los inmunoreactivos. En los siguientes epígrafes se describen los pasos necesarios para desarrollar un inmunosensor, a saber:

1. Síntesis del hapteno.
2. Producción de anticuerpos monoclonales.
3. Inmovilización de inmunorreactivos.
4. Caracterización del inmunosensor.

1.7.2.1. Síntesis del hapteno

La generación con éxito de anticuerpos específicos para una molécula pequeña depende enormemente del diseño adecuado de un amplio panel de haptenos. Los haptenos deben ser lo más similares posible a sus analitos correspondientes, manteniendo sus principales características estructurales, grupos químicos y distribución electrónica (Wink *et al.*, 1997). En la **Figura 8** puede observarse un esquema del proceso de síntesis de los haptenos conjugados para un analito determinado, en este caso uno de los pesticidas detectados en esta tesis doctoral: el carbaril. Este proceso consiste en adicionar un grupo carboxílico a la molécula del pesticida carbaril. Este grupo químico le permitirá unirse a un grupo amino de la proteína portadora (albúmina de suero bovino, BSA) mediante un enlace amida. De este modo se obtiene el hapteno conjugado, consistente en varias moléculas de hapteno unidas a la proteína BSA.

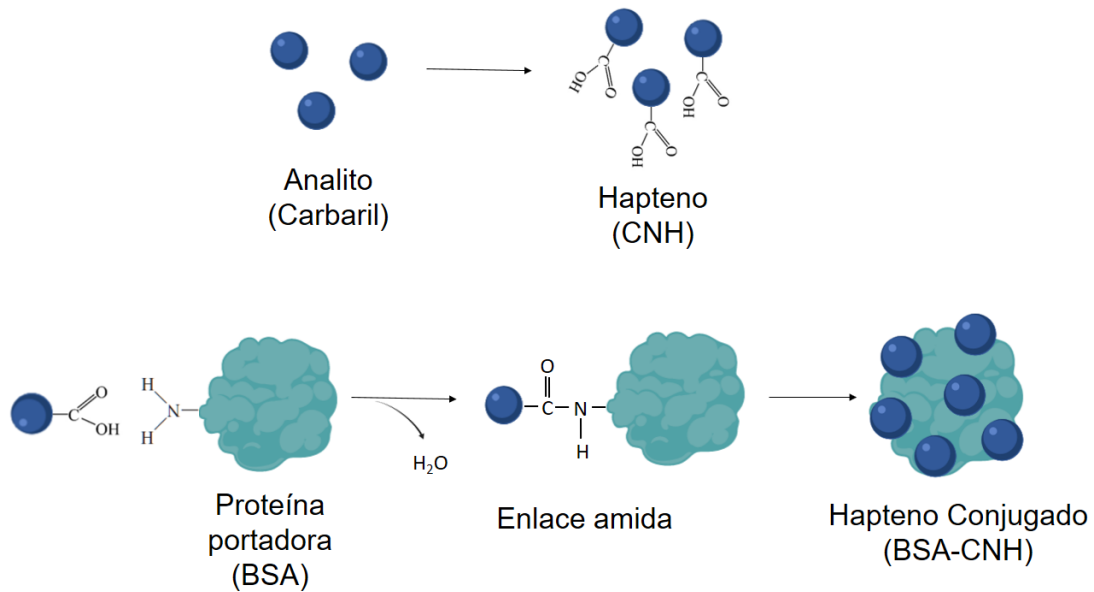


Figura 8. Preparación del hapteno conjugado a partir de analitos de bajo peso molecular.

Como se mencionó anteriormente, el diseño del hapteno es un paso clave en el desarrollo de inmunoensayos para moléculas pequeñas, ya que el hapteno es el principal responsable de determinar las propiedades de reconocimiento del anticuerpo. Los grupos funcionales del hapteno determinan el método de conjugación a emplear con la proteína portadora. Se suelen emplear grupos amina, ácido carboxílico, hidroxilo o sulfhidrilo para la unión química entre el hapteno y la proteína (Szurdoki *et al.*, 2002). Es importante destacar que esta unión determina, en parte, la especificidad del anticuerpo (Franek & Hruska, 2005).

Es bien sabida la dificultad de predecir qué hapteno es teóricamente el más apropiado para la detección de un analito en particular. El hapteno debe responder adecuadamente como inmunógeno con el fin de que el animal experimental pueda generar los anticuerpos correspondientes; del mismo modo, debe ser adecuado para que el evento de reconocimiento que se genere sobre el transductor sea suficientemente específico para no generar falsos positivos. Para explorar el número máximo de posibilidades para obtener anticuerpos de alto rendimiento, así como para mejoras adicionales en la sensibilidad del ensayo, se recomienda la síntesis de varios haptenos con diferentes brazos espaciadores unidos a través de diferentes sitios moleculares (Manclús *et al.*, 1996; Abad *et al.*, 1998a).

1.7.2.2. Producción de anticuerpos monoclonales

La preparación de anticuerpos contra haptenos conjugados, diseñados para aplicaciones analíticas como la detección de pesticidas, se basa en la inmunización de animales experimentales con los inmunógenos sintetizados. En la **Figura 9** se esquematiza el proceso de

generación de respuesta inmune de los animales de experimentación para la producción de anticuerpos específicos que reconozcan el analito objeto de estudio.

Las moléculas de bajo peso molecular, como los pesticidas y antibióticos no generan una respuesta inmune al ser inyectadas en los animales de experimentación, es decir, no provocan la producción de anticuerpos por parte del animal contra esa sustancia (**Figura 9**, primera fila). En cambio, las moléculas de alto peso molecular como la proteína BSA sí desencadenan una respuesta inmune frente a esta proteína cuando son inyectados en el animal de experimentación, es decir el animal produce anticuerpos contra la proteína (**Figura 9**, segunda fila). Por lo tanto, para producir anticuerpos que reconozcan al pesticida o analito objeto de estudio se inyecta al animal de experimentación el hapteno conjugado (BSA + analito), previamente sintetizado (ver **Figura 8**). De este modo, parte de los anticuerpos generados por la presencia de la proteína van dirigidos contra las moléculas de haptenos que aquélla lleva unidas (**Figura 9**, tercera fila).

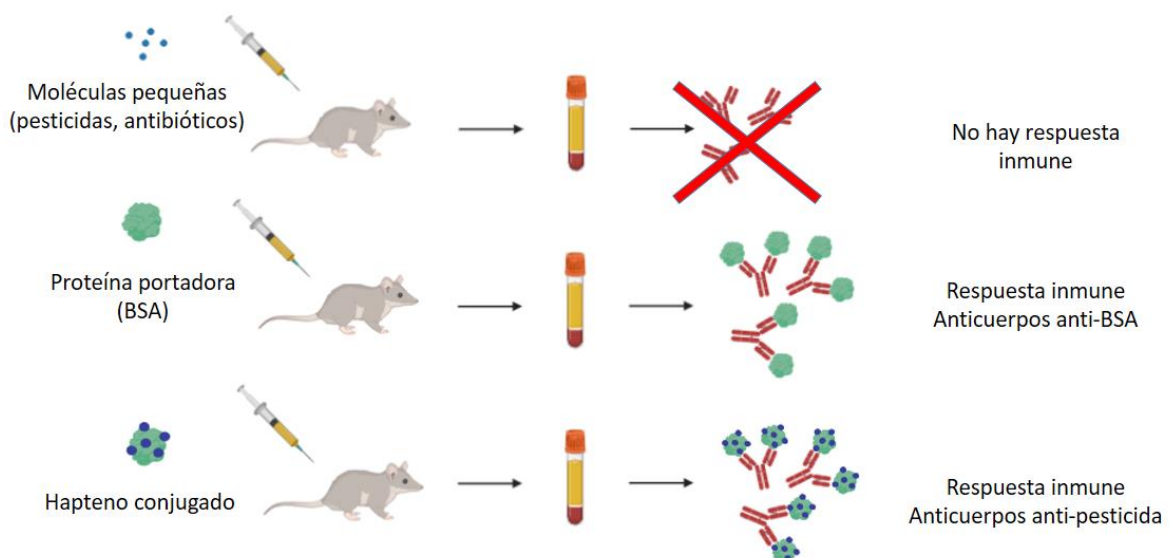


Figura 9. Generación de respuesta inmune en el ratón para la producción de anticuerpos.

Los anticuerpos producidos pueden ser de dos tipos: policlonales y monoclonales. Los anticuerpos policlonales son una mezcla heterogénea de anticuerpos producidos por diferentes clones de linfocitos B en el cuerpo, y pueden reconocer y unirse a muchos epítopos diferentes de un solo antígeno. Se producen mediante procedimientos tradicionales de inmunización y sangría, fundamentalmente en conejos, cabras, ovejas y cerdos. La inmunización consiste en inyectar el inmunógeno en el animal para provocar una respuesta inmune primaria, más

adelante se le administra una segunda inmunización al animal, e incluso una tercera, con el fin de obtener una concentración más alta de anticuerpos. Después de la inmunización los animales son sangrados y los anticuerpos policlonales se obtienen directamente del suero del animal, a partir del cual pueden purificarse para obtener una solución que esté libre de otras proteínas séricas (Labclinics, 2015). En cambio, los anticuerpos monoclonales son generados por linfocitos B idénticos que son clones de una sola célula madre. Esto significa que los anticuerpos monoclonales tienen afinidad monovalente y solo reconocen el mismo epítipo de un antígeno. Otra diferencia es que los anticuerpos policlonales se producen en animales vivos, mientras que los anticuerpos monoclonales se producen en modelos *ex vivo* utilizando cultivo celular (Labclinics, 2015).

La principal desventaja de los anticuerpos policlonales es que son, a menudo, inespecíficos y están disponibles en cantidades limitadas (Montoya *et al.*, 2008). Por lo tanto, si se requiere un suministro ilimitado de un tipo de anticuerpo único y homogéneo, la mejor opción es utilizar la tecnología del hibridoma para obtener anticuerpos monoclonales (ver **Figura 10**) (Meulenberg, 1997; Manclús *et al.*, 2004).

El procedimiento para producir anticuerpos monoclonales es similar para diferentes analitos e implica los pasos que se ilustran resumidamente en la **Figura 10**:

- 1) Inmunización de ratones de 8-10 semanas de edad.
- 2) Comprobación de la respuesta inmune y extracción del bazo de los ratones que muestran respuesta positiva.
- 3) Fusión celular de linfocitos B de ratones positivos con células de mieloma.
- 4) Selección de clones de hibridoma secretores de anticuerpos de alta afinidad. La selección y clonación del hibridoma es uno de los pasos más críticos en el desarrollo de anticuerpos monoclonales. La caracterización de los anticuerpos monoclonales de los pesticidas empleados en esta tesis doctoral implica la realización de dos ELISAS simultáneos, uno indirecto no competitivo y otro competitivo. A través de dichos ensayos se evalúa la capacidad de los anticuerpos para unirse al hapteno conjugado inmunizante y para reconocer al analito, respectivamente (Abad *et al.*, 1997). Los hibridomas seleccionados posteriormente se clonan, y los clones estables productores de anticuerpos se expanden y se criopreservan en nitrógeno líquido (Manclús *et al.*, 2004).
- 5) Purificación de los anticuerpos monoclonales obtenidos, precipitación en sulfato amónico y almacenamiento a 4°C.

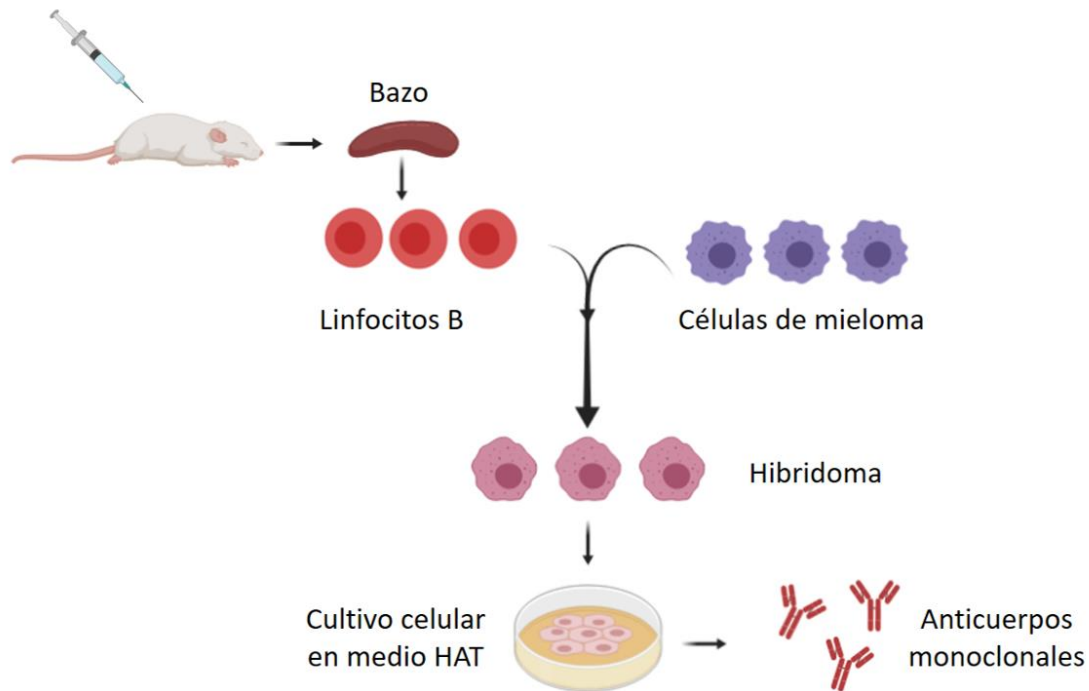


Figura 10. Producción de anticuerpos monoclonales.

1.7.2.3. Inmovilización de los inmunoreactivos

La inmovilización de las biomoléculas en el sustrato sólido que constituye la superficie del transductor es esencial para garantizar el rendimiento del sensor debido a su papel en la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y capacidad de reutilización. Algunos de los requisitos que debe cumplir un proceso de inmovilización son los siguientes: 1) mantenimiento de la actividad biológica de las biomoléculas después de la inmovilización en la superficie del sensor, 2) fijación reproducible, duradera y estable con el sustrato frente a variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica y naturaleza química del microambiente y 3) distribución uniforme, densa y orientada de las biomoléculas.

Existen varios métodos para inmovilizar biomoléculas, que han sido reportados en la literatura. Estos son: la adsorción física (Bizet *et al.*, 1998; Su *et al.*, 2000), el sistema avidina-biotina (Tombelli & Mascini, 2000) y la unión covalente (Duan & Meyerhoff, 1995; Disley *et al.*, 1998; Tombelli & Mascini, 2000; Příbyl *et al.*, 2003; Pohanka & Skládal, 2005). Entre ellos, la unión covalente es la técnica más prometedora porque cumple con la mayoría de los requisitos mencionados anteriormente. Es además la técnica empleada en esta tesis doctoral.

Se ha dedicado un gran esfuerzo al logro y la optimización de las condiciones de la unión covalente. La tecnología de monocapas autoensambladas (SAMs) proporciona los mejores

resultados (Vaughan *et al.*, 1999; Ferretti *et al.*, 2000; Susmel *et al.*, 2003; Briand *et al.*, 2006; Mauriz *et al.*, 2006a,b). SAMs es el nombre genérico dado a las metodologías y tecnologías que permiten la generación de capas monomoleculares, también llamadas monocapas de moléculas biológicas en una variedad de sustratos. La formación de tales sistemas “monocapa” es extremadamente versátil, lo que permite el desarrollo *in vitro* de bio-superficies que pueden imitar procesos de reconocimiento molecular que ocurren naturalmente. Debido a la estabilidad, orientación y capacidad de funcionalizar los grupos terminales, las SAMs pueden ofrecer un método muy conveniente y versátil para la inmovilización covalente de biomoléculas en superficies de electrodos de oro para el desarrollo de biosensores (Vaughan *et al.*, 1999; Ferretti *et al.*, 2000).

Existen diversos sistemas para llevar a cabo el proceso de autoensamblaje, pero el sistema más estudiado y el mejor caracterizado en términos de estabilidad y propiedades fisicoquímicas es el basado en especies de organosulfuro que reaccionan con superficies de metales nobles (oro y plata). Además, este enfoque aprovecha el hecho de que los compuestos que contienen azufre (alcanotioles, disulfuros de dialquilo y sulfuros de dialquilo) tienen una fuerte afinidad por las superficies de metales nobles (Ferretti *et al.*, 2000) y el azufre reacciona espontáneamente con el oro formando estructuras ordenadas autoensambladas (Daza Millone, 2011). Existen numerosas variantes de monocapas autoensambladas sobre sustratos inorgánicos dependiendo de la combinación entre bloque molecular y tipo de superficie (Love *et al.*, 2005). Entre ellas, las SAMs de alcanotioles sobre oro han sido y son las más empleadas, debido a la simplicidad de su preparación y los buenos resultados obtenidos. Se ha demostrado que los tioles y sulfuros de cadena larga son más estables termodinámicamente y que la adsorción a la superficie se produce por dos métodos: disociación iónica y más favorablemente por formación de radicales (Vaughan *et al.*, 1999).

Por otro lado, también es habitual el uso de SAMs mixtas (mSAMs), combinando compuestos tiolados con diferente longitud de cadena. En esta tesis se han empleado mSAMs para la inmovilización del hapteno conjugado a los sensores, por las ventajas que ofrecen y que se explican a continuación. Generalmente las mSAMs se forman mediante la co-adsorción de mezclas de dos tioles, uno de ellos, de cadena más larga, proporciona un grupo de cabeza funcional (como un ácido carboxílico) en una fracción molar baja, y el otro, de cadena más corta, es el tiol “diluyente” en una fracción molar alta. Esto asegura una mayor ordenación del hapteno conjugado sobre la SAM, debido a que la presencia del tiol de cadena corta reduce la concentración superficial de grupos funcionales, minimizando así el impedimento estérico entre las moléculas de hapteno conjugado entre sí, la desnaturalización parcial de la proteína y evita

las uniones inespecíficas de biomoléculas que podrían producir señales de interferencia (Montoya *et al.*, 2008). Esto produce numerosas ventajas, como la mejora de los límites de detección, la reproducibilidad y la reusabilidad (Chen *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2000; Frederix *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2006; March *et al.*, 2009).

El proceso de formación de una monocapa autoensamblada mixta (mSAM) para la unión covalente de macrobiomoléculas se ilustra en la **Figura 11**. En ella se muestra el esquema de inmovilización del conjugado para el análisis del pesticida modelo carbaril.

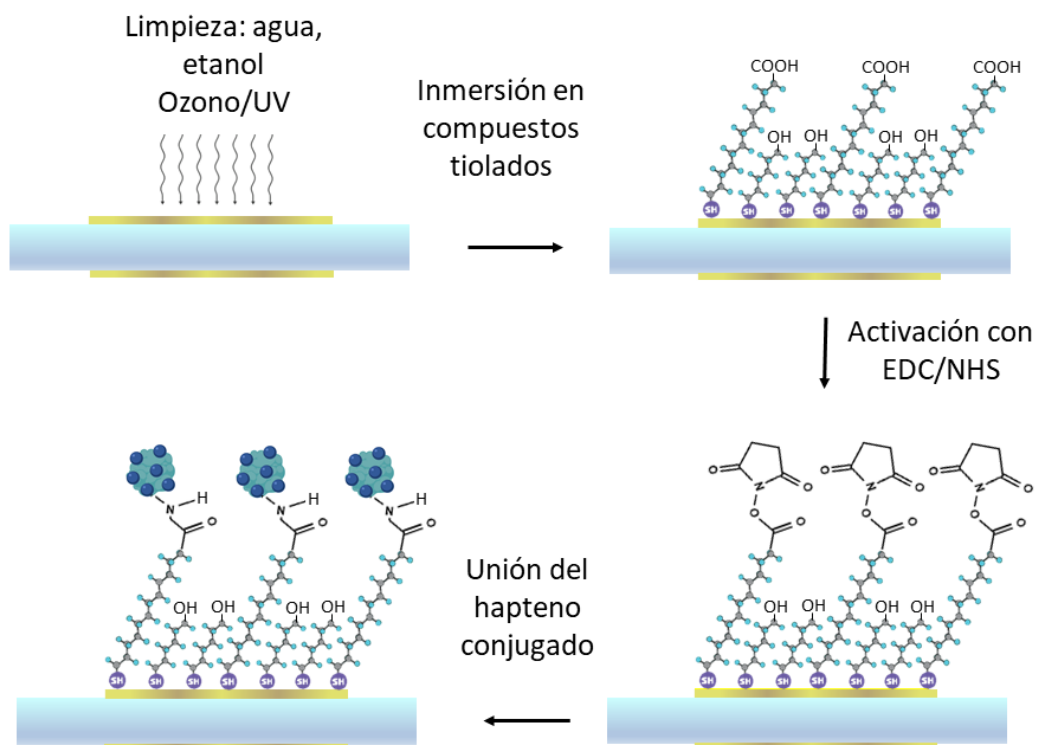


Figura 11. Procedimiento genérico de inmovilización covalente de haptenos conjugados al sensor mediante monocapas autoensambladas mixtas (mSAM).

En la presente tesis doctoral, el procedimiento de limpieza y funcionalización del sensor se llevó a cabo en una celda de inmovilización, diseñada por la spin-off de la Universitat Politècnica de València AWSensors (EPO del proyecto que ha financiado esta investigación) para tal fin. Esta celda consta de dos piezas: una base para depositar el sensor y otra pieza que se coloca sobre la base y deja libre una cavidad que permite adicionar los reactivos necesarios para la

funcionalización del sensor, exponiendo únicamente la superficie activa del sensor, es decir, donde está el electrodo de oro (ver **Figura 12**).

Para formar la mSAM, en primer lugar, se acondiciona la superficie del sensor realizando un protocolo de limpieza en la celda de inmovilización. A continuación, en la propia celda se expone la superficie de oro del sensor a una solución de mercaptoundecanol y ácido mercaptohexadecanoico. La activación de los grupos carboxílicos se realiza uniendo un reactivo intermedio (éster de N-hidroxi-succinimida) al grupo carboxilo, mediante una mezcla de N-hidroxi-succinimida (NHS) y carboxi-diimida (EDC). Este compuesto intermedio es capaz de unir covalentemente los grupos amino de los conjugados proteína-hapteno (Duan & Meyerhoff, 1995; Disley *et al.*, 1998; Susmel *et al.*, 2003; Briand *et al.*, 2006; Mauriz *et al.*, 2006a,b).

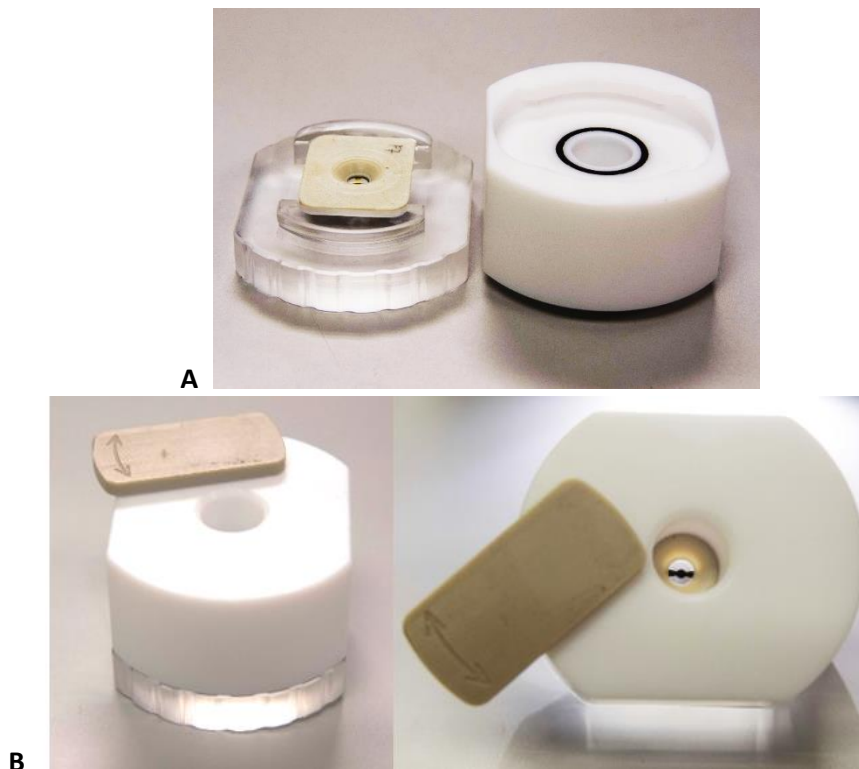


Figura 12. Celda de inmovilización (AWSensors S.L.). **A)** Celda de inmovilización desmontada con el sensor HFF-QCM en la base. **B)** Celda de inmovilización montada con el sensor HFF-QCM en su interior.

1.7.2.4. Caracterización del inmunosensor

La etapa final en el desarrollo de un inmunosensor es su caracterización. Este proceso depende en gran medida del formato de inmunoensayo elegido. Como se ha mencionado en el apartado 1.7.1. el formato empleado en esta tesis ha sido el de hapteno conjugado inmovilizado, ya que

un requisito que se buscaba era la regeneración del sensor y, además los analitos que se iban a detectar eran compuestos de bajo peso molecular. A continuación, se describe el proceso de caracterización del inmunosensor empleado.

El primer paso para caracterizar el inmunosensor es determinar sus condiciones de trabajo, es decir, las concentraciones de inmunorreactivos (hapteno conjugado inmovilizado y anticuerpo) óptimas, ya que la sensibilidad y el límite de detección del inmunosensor van a depender en gran medida de las concentraciones de empleadas (Chauhan *et al.*, 2015). Para ello, se realizan curvas dosis/respuesta. La metodología empleada para realizar estas curvas consiste en inmovilizar diferentes concentraciones de hapteno conjugado en diferentes sensores y exponerlos a diferentes concentraciones de anticuerpo, observando la señal que producen. Se selecciona la combinación óptima de concentraciones de conjugado inmovilizado y anticuerpo para alcanzar un compromiso entre el consumo mínimo de inmunoreactivos y el disponer de un nivel de señal distinguible claramente del ruido del equipo para las señales medidas de menor amplitud (correspondientes a las concentraciones más altas de analito en el ensayo competitivo). Trabajos previos realizados por el grupo de investigación del Ci2B determinaron que es suficiente una señal generada por el sensor de, al menos, $\Delta f = 1 \text{ kHz}^1$ para alcanzar este criterio (March *et al.*, 2009, 2015; Montoya *et al.*, 2016; Fernández-Benavides *et al.*, 2019). En base a estos resultados, para los diferentes analitos estudiados en esta tesis, se seleccionó la combinación de concentraciones de hapteno conjugado y anticuerpo que producían una señal de al menos 1 kHz.

Una vez determinadas las concentraciones de trabajo del sensor se procede a la elaboración de la curva de calibración estándar, que se realiza ensayando diferentes concentraciones de analito y registrando las señales que producen. A continuación, se representan las señales normalizadas (expresadas como % de la señal máxima producida en ausencia de analito) en el eje de ordenadas frente al logaritmo de la concentración de analito (eje de abscisas). Los valores experimentales obtenidos se ajustan a un modelo matemático, en este caso a una ecuación logística de cuatro parámetros (**Ecuación 1**). Dicha ecuación presenta una forma sigmoidea como se puede observar en la **Figura 13**. Este comportamiento sigmoideo de las curvas de calibración es típico de los inmunoensayos competitivos (Osterloh *et al.*, 1989).

¹ Esta magnitud será definida en la sección 1.8

$$y = D + (A - D)/(1 + (x/C)^B) \quad \text{(Ecuación 1)}$$

En la **Ecuación 1**, x es la concentración de analito, y es la señal de frecuencia normalizada ($\Delta f \times 100/\Delta f_{max}$), A es la asíntota superior (señal máxima registrada en ausencia de analito), B es la pendiente de la curva sigmoidea en punto de inflexión, C es la concentración de analito que produce el 50% de inhibición de la señal (valor I_{50}) y D es la asíntota inferior (señal de fondo, obtenida con concentraciones de analito muy altas).

Los parámetros matemáticos A , B , C y D permiten calcular a su vez los parámetros analíticos: Límite de detección (LOD), Límite de cuantificación (LOQ), I_{50} y rango de trabajo (WR). Además, también permiten interpolar la concentración de analito de una muestra para una señal determinada.

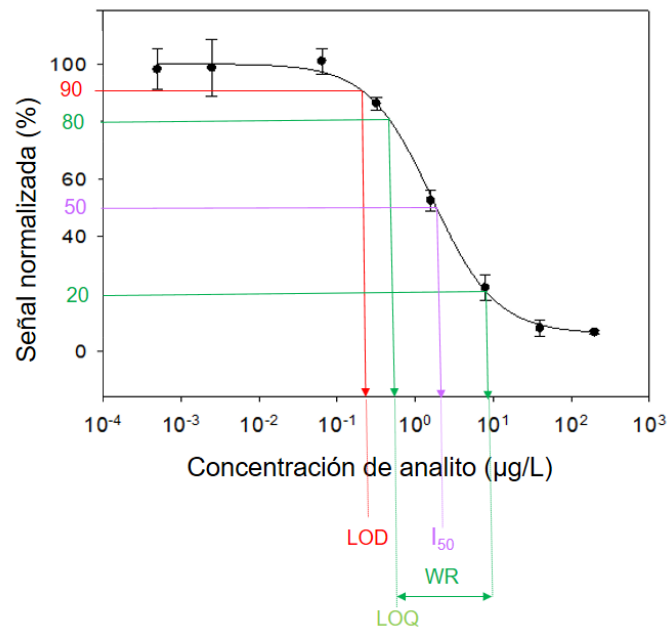


Figura 13. Curva de calibración estándar y sus parámetros analíticos.

Como puede observarse en la **Figura 13**, el LOD en este tipo de inmunoensayos se establece como la concentración de analito que produce el 90% de la señal máxima, o lo que es lo mismo, el 10% de inhibición de la señal máxima. El LOQ se establece como la concentración de analito que produce el 80% de la señal máxima. El rango de trabajo es la porción central, aproximadamente lineal, de la curva sigmoidea y viene definido por las concentraciones de analito que producen del 80% al 20% de la señal máxima. El valor de I_{50} se define como la concentración de analito que produce el 50% de la señal máxima, y se acepta generalmente

como una estimación de la sensibilidad del inmunosensor, de tal manera que cuanto menor sea el valor de I_{50} , mayor será la sensibilidad del ensayo (Montoya *et al.*, 2008; Rocha Gaso, 2013). En la **Tabla 3** se indican las relaciones entre los parámetros analíticos de la curva de calibración y los parámetros matemáticos de la ecuación sigmoidea.

Tabla 3. Modo de cálculo para la obtención de los parámetros analíticos de la curva de calibración a partir de los parámetros matemáticos.

Obtención parámetros analíticos	
Límite de detección (LOD)	$LOD = C/9^{1/B}$
Límite de cuantificación (LOQ) y límite inferior del rango de trabajo (LI)	$LOQ = LI = C/4^{1/B}$
Límite superior del rango de trabajo (LS)	$LS = C \times 4^{1/B}$

1.8.- Transductores acústicos basados en cristales piezoeléctricos de cuarzo

1.8.1.- Fundamentos físicos de los transductores piezoeléctricos basados en cristales de cuarzo

El cristal de cuarzo es el material piezoeléctrico más empleado como biosensor para determinar las propiedades físicas y bioquímicas de diferentes sustancias depositadas sobre su superficie. La piezoelectricidad se describe como el fenómeno de la aparición de cargas negativas y positivas en las superficies del cristal cuando se ejerce una presión sobre él. La deformación del material modifica su estructura cristalina generándose dipolos y quedando el material polarizado. Dicha polarización genera un campo eléctrico que produce un flujo de cargas libres cuando se colocan dos electrodos, uno en cada una de las caras del cristal, unidos por un hilo conductor. Al dejar de ejercer la presión sobre el cristal, la polarización desaparece y el flujo de cargas cesa. De este modo, el cristal de cuarzo se comporta como un transductor, puesto que la energía mecánica empleada para deformar el material se transforma en energía eléctrica. Del mismo modo, la aplicación de un campo eléctrico sobre el material a través de dos electrodos colocados sobre sus superficies provoca la deformación del cristal, si dicho campo se aplica de forma periódica el cristal se deforma también periódicamente. De entre todas las frecuencias de excitación eléctrica del cristal, existe una que hace que su deformación sea la máxima. Esta frecuencia se conoce como frecuencia de resonancia, de ahí que también se conozca a estos materiales con el nombre de resonadores piezoeléctricos.

La aplicación más antigua del cristal de cuarzo como sensor es su empleo como microbalanza (Quartz Crystal Microbalance - QCM). En 1959 Sauerbrey demostró empíricamente que la variación en la frecuencia de resonancia de un cristal de cuarzo era proporcional a la masa añadida sobre el mismo, siempre y cuando dicha masa formara una capa muy fina y uniforme (Sauerbrey, 1959).

$$\Delta f = -\frac{C_f \Delta m}{A} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

En la **Ecuación 2** Δf es la variación que se produce en la frecuencia de resonancia del cristal cuando se produce un cambio de masa Δm sobre su superficie. Un material de estas características (fino y uniforme) queda unido de forma rígida al cristal en su movimiento de vibración. En estas condiciones, las propiedades viscoelásticas del material no afectan a la frecuencia de resonancia del cristal, sólo afectan los cambios en la masa añadida. Estudios posteriores demostraron que el sensor de cuarzo era capaz de medir masas del orden de picogramos. Esta gran sensibilidad es debida a la tremenda aceleración a la que están sometidas las partículas depositadas sobre la superficie del cristal, la cual es proporcional al cuadrado de su frecuencia de vibración. Para un cristal vibrando a 10 MHz, la aceleración resultante es del orden de $10^7 g$, siendo g la aceleración de la gravedad. Esto supone que una partícula pesa 10^7 veces más sobre una balanza de cristal de cuarzo que sobre una balanza convencional.

En la **Figura 14** se muestra, de forma esquemática, la relación empírica que proporciona la ecuación de Sauerbrey. En la imagen de la izquierda se muestra un sensor de cuarzo vibrando a una determinada frecuencia de resonancia f_0 . Cuando se deposita una masa sobre su superficie (ver imagen derecha), su frecuencia de resonancia disminuye a f_1 debido a un aumento de la inercia del sistema resonante. El resultado es un desplazamiento de frecuencia $\Delta f = f_1 - f_0$.

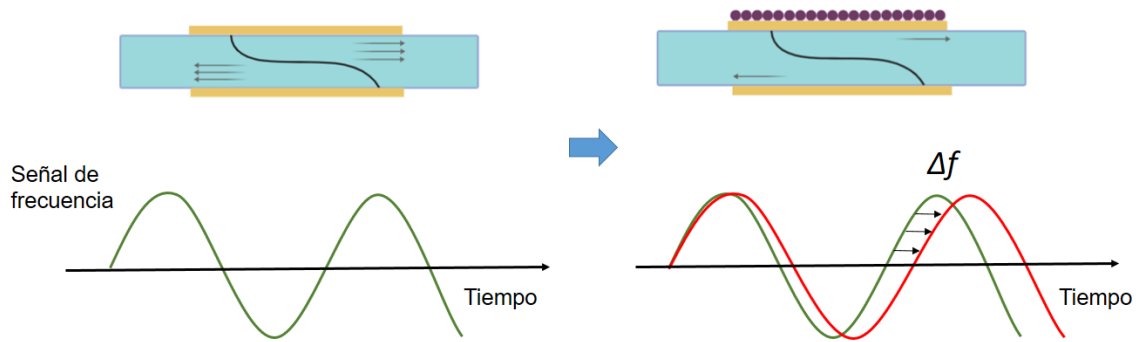


Figura 14. Representación de la ecuación empírica de Sauerbrey.

En los años 80, se demostró la estabilidad de la resonancia de los cristales de cuarzo en contacto con un medio líquido (Konash & Bastiaans, 1980). Hasta ese momento se creía que, al depositar un fluido sobre el sensor, automáticamente el movimiento del transductor cesaría, por lo que las aplicaciones estaban restringidas a situaciones en las que el medio en contacto con el sensor fuera gaseoso. Este nuevo descubrimiento abrió un nuevo abanico de aplicaciones en el que era posible utilizar el cristal de cuarzo para realizar procesos de detección que se producían en medio líquido en lugar de medio gaseoso, este es el caso de los biosensores. En este tipo de aplicaciones los agentes biológicos que intervienen en el proceso necesitan un medio líquido para no desnaturalizarse. Al recubrir el cristal con un polímero o al modificar su superficie bioquímicamente (por ejemplo, adhiriendo antígenos o anticuerpos), se obtiene una interfaz biológica útil para ser expuesta a complejos biomoleculares en solución acuosa.

Durante el desarrollo de un inmunoensayo que emplea como transductor un cristal de cuarzo, el sistema de caracterización del inmunosensor registra continuamente la frecuencia de resonancia del cristal. De modo que, mientras no se produzca ningún cambio significativo sobre la superficie del sensor, esta frecuencia debe de permanecer prácticamente inalterada. Cuando tiene lugar el evento de bio-reconocimiento, se produce un aumento en la masa de la capa inmovilizada sobre la superficie del resonador, generando un descenso en la frecuencia de resonancia. Esta variación en la frecuencia puede relacionarse con las variaciones en la masa a través de la ecuación de Sauerbrey y, por tanto, con la concentración de la sustancia a detectar a partir de una curva de calibración previamente obtenida. En la realidad, el proceso es mucho más complejo. De este modo, cualquier cambio que se produzca en el medio líquido que hay en contacto con el resonador, por ejemplo, cambios en su viscoelasticidad, también generan variaciones en la frecuencia de resonancia del cristal. El modo de distinguir un fenómeno de aumento de masa de un cambio en la viscoelasticidad, es midiendo otro parámetro eléctrico del

transductor denominado factor de disipación, ΔD . Los cambios producidos por la masa solo producen cambios en Δf , pero no en ΔD . En cambio, las variaciones en la viscoelasticidad del medio provocan cambios tanto en Δf como en ΔD . De este modo, si durante el tiempo que dura un inmunoensayo, ΔD no varía o lo hace de forma mínima, entonces puede asumirse que todos los cambios registrados en la frecuencia de resonancia son debidos a alteraciones en la masa del transductor y, por tanto, que son debidos solamente al evento de bio-reconocimiento. En estas condiciones, cuando ΔD es prácticamente nulo, se dice que el inmunosensor trabaja en régimen gravimétrico, éste es el régimen de trabajo habitual de los inmunosensores empleados en este trabajo de tesis.

Los cristales de cuarzo se obtienen cortando láminas de piezas hexagonales según determinadas direcciones. A continuación, se depositan unos electrodos de oro sobre cada cara de la lámina de cuarzo. Al aplicar una diferencia de potencial eléctrica entre los electrodos, se produce en el cristal una deformación que genera una onda acústica que se propaga en el espesor del cristal. La frecuencia de resonancia del cristal está directamente relacionada con su espesor a través de la **Ecuación 3**.

$$f = \frac{N}{h_q} n \quad \text{con } n = 1,3,5, \dots \quad (\text{Ecuación 3})$$

En la **Ecuación 3** $N = 1664 \text{kHz} \cdot \text{mm}$ para un cuarzo como el empleado en esta tesis doctoral y h_q es el espesor del cristal.

Cuando el sensor se recubre de algún material del que se quieren estudiar sus propiedades físicas, la onda acústica que se propaga por el cristal penetra en dicho material deformándolo. Al entrar en contacto con un medio de propiedades mecánicas diferentes a las del cuarzo, la onda acústica modifica su velocidad y amplitud. Debido al acoplamiento electromecánico del cuarzo, los cambios en las propiedades mecánicas del material por el que se propaga la onda se traducen en cambios en las propiedades eléctricas del resonador, por ejemplo, en su frecuencia, los cuales son medidos con el sistema de caracterización.

Los sensores QCM tradicionales trabajan a frecuencias de resonancia entre 5 y 10 MHz, frecuencias que corresponden a espesores del cristal entre $332,8 \mu\text{m}$ y $166,4 \mu\text{m}$ (Ecuación 3). En la **Figura 15A** se muestran algunas imágenes de este tipo de sensores.

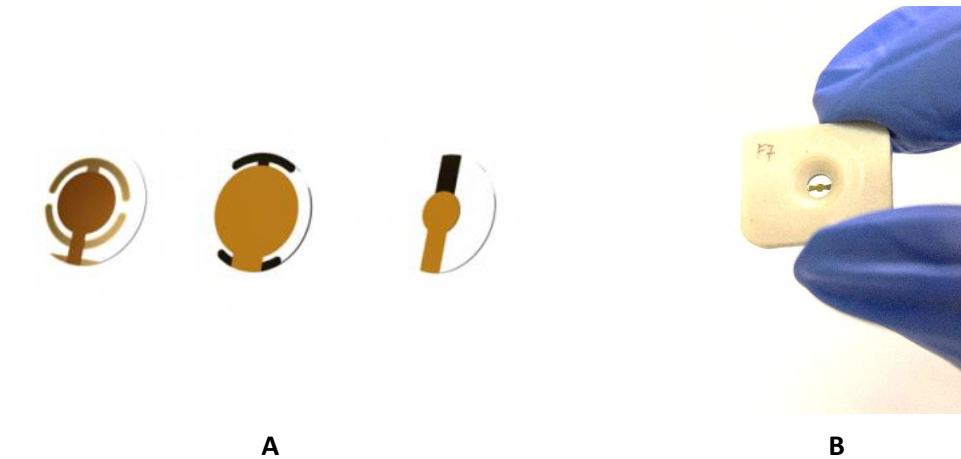


Figura 15. A) Sensores de baja frecuencia (5 y 10MHz). **B)** Sensor HFF-QCM de alta frecuencia (100 MHz).

La sensibilidad teórica del dispositivo, es decir, la variación de frecuencia que se produce en el cristal frente a una variación en la masa de la capa depositada, queda fijada por la frecuencia de resonancia fundamental del cristal de cuarzo. Aumentar la sensibilidad de este tipo de transductores, para igualarla a la obtenida con ELISA, ha sido siempre uno de los retos que se ha perseguido en esta tecnología para satisfacer la demanda de niveles de detección cada vez más bajos (Arnau *et al.*, 2009). La solución a ese reto se consigue con el uso de los sensores de alta frecuencia HFF-QCM (High Fundamental Frequency-QCM), los cuales se basan en el mismo principio físico que los QCM, pero con frecuencias de resonancia fundamentales superiores, entre 50 y 150 MHz (**Figura 15B**). El aumento de la frecuencia fundamental de resonancia de estos dispositivos se consigue disminuyendo el espesor de los cristales, lo que da lugar a la tecnología *Inverted Mesa* (ver **Figura 16**). En esta tecnología se realiza un rebaje del espesor en la parte central del cristal de cuarzo, quedando a su alrededor un marco de mayor espesor. El principal problema que se presenta cuando se trabaja a estas frecuencias es la fragilidad del sensor, para 100MHz el espesor del cristal se reduce a unas 16 μ m. Para hacerlos manejables, estos sensores se fijan a unos soportes de plástico para evitar que el cristal se rompa al manipularlo. Existen varias formas de fijar el sensor al soporte para resolver el problema de la fragilidad, por un lado, se encuentran los sensores con marcos de Poly-Phenylene Sulphide (PPS) que poseen un agujero cónico que deja accesible la superficie activa del electrodo del oro (ver **Figura 17A**). Otro modo de sujeción del cristal de cuarzo es sobre una placa de circuito impreso (PCB, printed circuit board) como se puede observar en la **Figura 17B**. En la presente tesis se ha trabajado con ambos tipos de sensores para evaluar las prestaciones de cada uno, ya que el tipo

de fijación modifica el comportamiento resonante del sensor. Los resultados más repetitivos se obtuvieron con los resonadores que utilizan el marco de fijación de PPS, por ello, los resultados que se presentan en esta tesis doctoral se han realizado con sensores HFF-QCM de 100 MHz sobre marco de PPS (**Figura 17A**). Para poder ponerlos en contacto con disoluciones acuosas es necesario introducir el sensor en una celda de fluídica que permita, además, conectar el sensor con el sistema electrónico de caracterización. En la siguiente sección se describen brevemente la celda y equipos electrónicos empleados en esta tesis doctoral para realizar las medidas con los inmunosensores piezoeléctricos empleados.

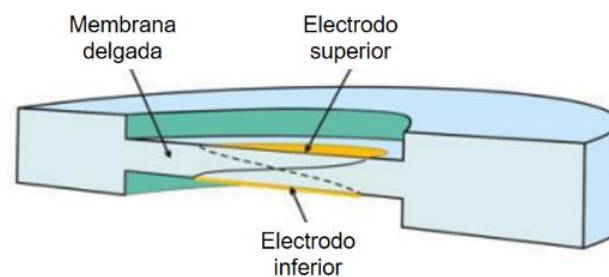


Figura 16. Tecnología *Inverted Mesa*.



Figura 17. **A)** Sensor HFF-QCM montado sobre marco de PPS. **B)** Sensor HFF-QCM montado sobre soporte de PCB.

1.8.2.- Celdas de soporte del sensor y equipos de caracterización

En la **Figura 18** se muestra la celda de fluídica empleada en esta tesis doctoral para realizar las medidas con el inmunosensor. La parte inferior de la celda es de aluminio y la parte superior es polimetil metacrilato (PMMA). El sensor se coloca en la parte inferior, que incluye la interfaz electrónica necesaria para conectar el sensor con el sistema de medición (plataforma AWS A20).

La parte superior proporciona la conexión con el sistema de flujo, por lo que 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, que crean una cámara de 2,75 μL sobre el sensor (ver **Figura 18**). Este volumen es extremadamente bajo en comparación con otras soluciones comerciales existentes, lo cual es ventajoso porque permite un menor consumo de muestra e inmunorreactivos.

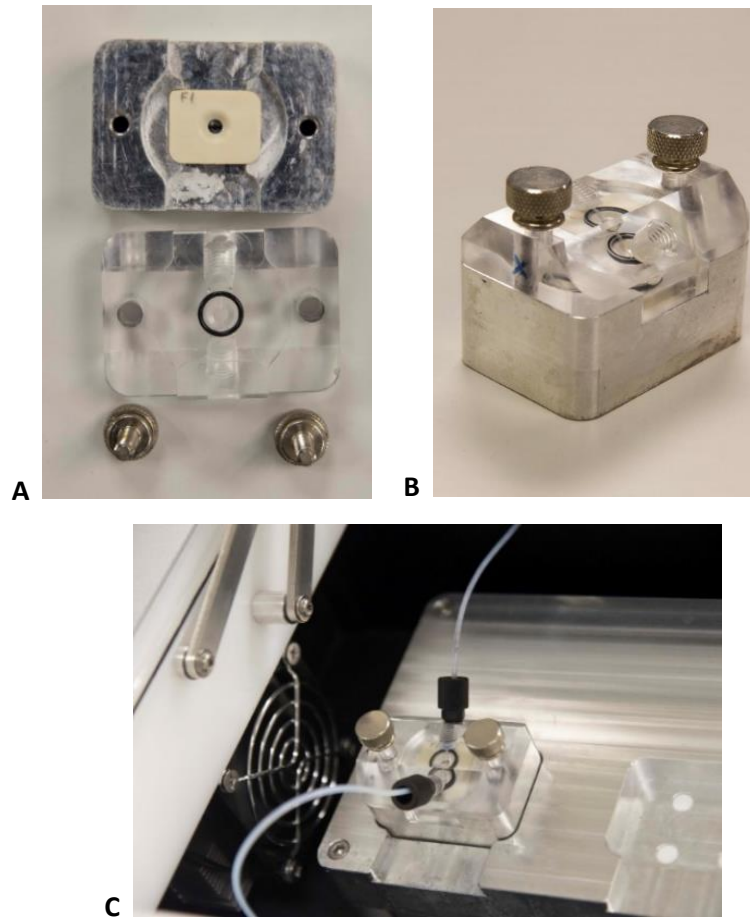


Figura 18. Celda de fluídica AWSensors. **A)** Celda de fluídica desmontada con un sensor HFF-QCM colocado en la parte inferior. **B)** Celda de fluídica montada con el sensor HFF-QCM en su interior. **C)** Celda de fluídica insertada en el equipo de medida y con el sistema de flujo conectado.



Figura 19. Plataforma de medida de sensores acústicos, integrada por el sistema de caracterización electrónica AWS A20 (bloque superior) y el sistema de microfluídica AWS F20 (bloque inferior).

En la **Figura 19** se muestra el equipo de medida de sensores acústicos que se ha utilizado en esta tesis (AWSensors, Valencia, Spain, www.awsensors.com). Este equipo consta de la plataforma AWS A20, que 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. Para aplicaciones donde se espera obtener variaciones muy pequeñas en la respuesta del sensor, y en las que se necesite una gran resolución en las medidas (este es el caso de aplicaciones con biosensores) se utiliza el modo “High Resolution”. En este modo de funcionamiento la plataforma realiza la caracterización en tiempo real de la respuesta del sensor, registrando las variaciones en la frecuencia de resonancia del mismo (Δf) junto con el parámetro que cuantifica la energía disipada en el sensor durante el experimento (ΔD).

Como ya se ha comentado anteriormente, la medida de Δf proporciona información sobre el cambio de masa producido sobre la superficie del sensor debido al evento de bio-reconocimiento, que se puede relacionar con la concentración de un determinado analito en la muestra. Mientras que el registro de ΔD proporciona información de los cambios que se producen en la superficie del sensor que no se deben al evento de bio-reconocimiento, como por ejemplo cambios de

viscosidad en el fluido en contacto en la superficie del sensor. Estos cambios (ΔD) tienen que ser pequeños para no contribuir significativamente en la respuesta del sensor (Jiménez *et al.*, 2008).

La plataforma *AWS F20 (AWSensors)* es el módulo de fluídica, y se emplea para generar un flujo continuo y uniforme sobre la superficie del sensor. Esta plataforma consta de 4 puertos de entrada de medios líquidos y un sistema de bombeo por jeringa (*Hamilton Bonaduz, GR, Switzerland*) que permite generar un flujo continuo sobre el sensor. La muestra se carga mediante una bomba solenoide en un *loop* de 250 μL y se inyecta en el circuito principal mediante una válvula de inyección. Además, la plataforma F20 posee un desgasificador (*DEGASi® Compact from Biotech, Onsala, Sweden*) para minimizar las posibles burbujas generadas por el sistema de fluídica (**Figura 20**).

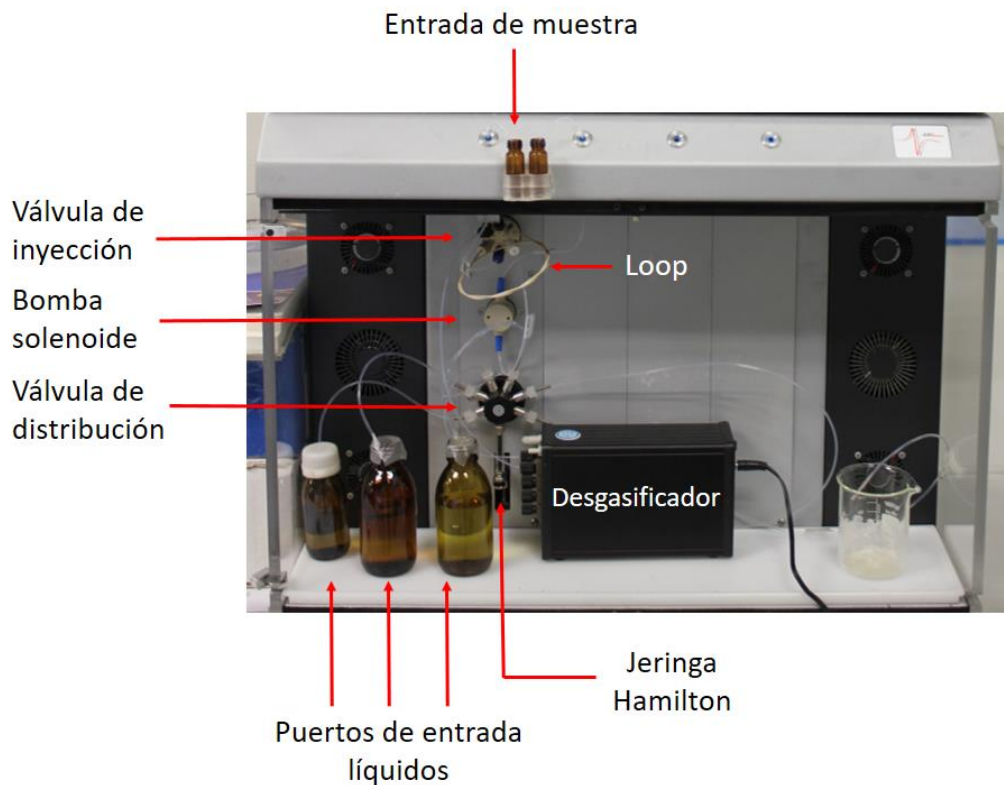


Figura 20. Sistema de fluídica AWS F20.

Ambas plataformas disponen de un sistema de control de temperatura, lo que permite realizar experimentos a una temperatura constante (en esta tesis se han realizado a 25°C). Ambas plataformas están controladas por medio del software *AWS Suit 2.5.0 version (AWSensors)*, que

permite registrar los cambios en Δf y ΔD durante todo el intervalo temporal en el que se desarrolla el inmunoensayo (Figura 21).

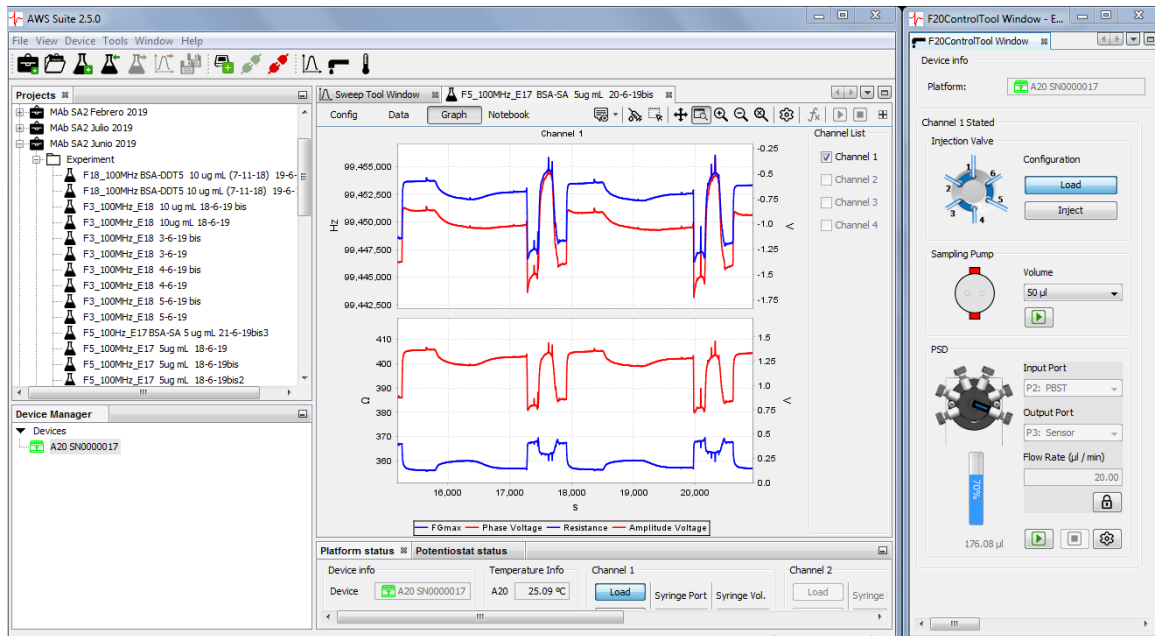


Figura 21. Software AWS Suit 2.5.0 version (AWSensors) permite el control de la flúidica y registra en tiempo real las variaciones de frecuencia y disipación del sensor.

Como paso previo a la utilización de un sensor, se debe realizar la caracterización del mismo, que consiste en la medida de dos parámetros eléctricos del sensor: la susceptancia (B) y la conductancia (G) en dos condiciones particulares, en contacto con el aire y en contacto con el agua. Para ello, se utiliza la herramienta de barrido, “sweep” del software AWS Suite. En este modo, la plataforma trabaja de forma similar a un analizador de impedancias, y permite obtener un espectro del sensor en el que se puede observar en un determinado rango de frecuencias (ver Figura 22).

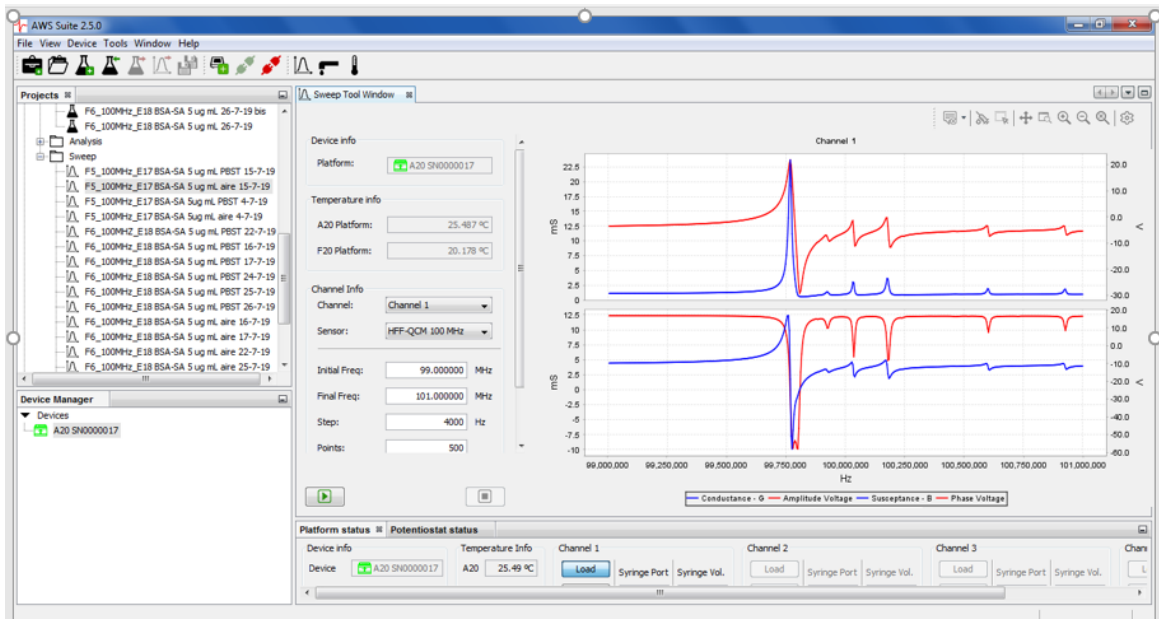


Figura 22. Captura de pantalla del software AWS Suite con la herramienta de barrido del sensor, modo “Sweep”. Espectro de un sensor de 100 MHz en aire.

Los sensores se seleccionan en función de la calidad del espectro de frecuencias registrado. Los criterios que suelen considerarse para su elección son los siguientes:

- 1) Frecuencia de resonancia fundamental bien definida (pico estrecho y alto)
- 2) Sin modos inharmónicos de vibración cercanos (en un margen de unos 300 kHz)
- 3) Se buscan sensores con espectros de frecuencia similares con la finalidad de conseguir repetitividad en las medidas.

En las **Figuras 23** y **24** se muestran, a modo ilustrativo los espectros obtenidos de un lote de sensores HFF-QCM de 100 MHz empleados en esta tesis.

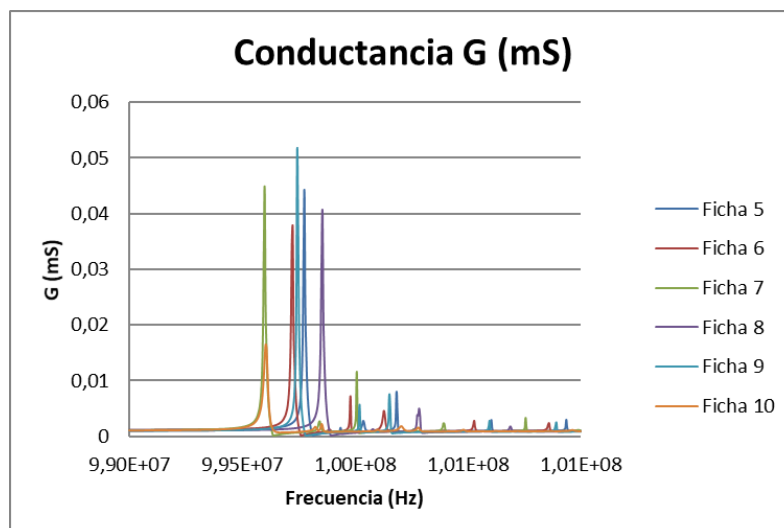


Figura 23. Representación de los espectros en aire (frecuencia frente a conductancia, G) de un lote de sensores HFF-QCM.

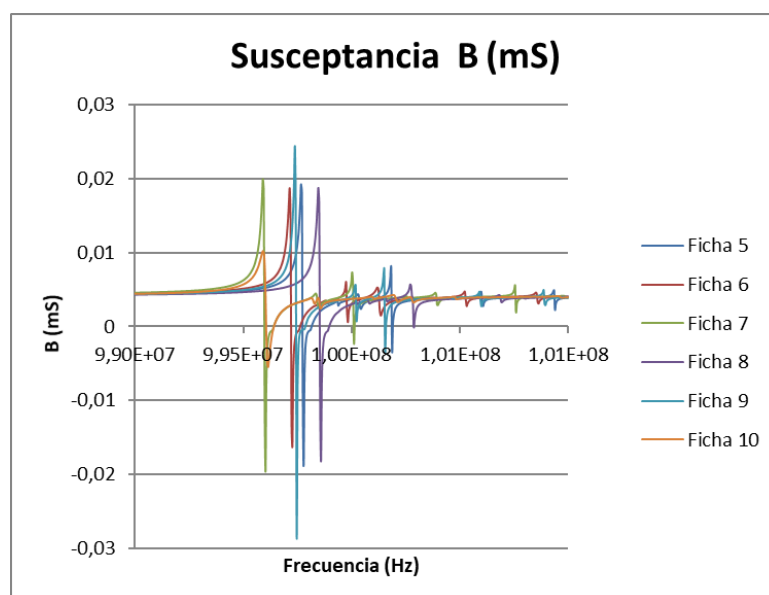


Figura 24. Representación de los espectros en aire (frecuencia frente a susceptancia, B) de un lote de sensores HFF-QCM.

En la **Figura 25** se puede observar un registro real obtenido con el equipo de medida AWS A20 y F20 y un sensor HFF-QCM inmovilizado con hapteno conjugado. En el panel superior se puede observar el registro de la frecuencia y en el panel inferior la disipación de un ciclo completo de ensayo con anticuerpo. La inyección del anticuerpo monoclonal (MAb) se produce cuando la línea base está estable. La unión de dicho anticuerpo con el hapteno conjugado inmovilizado sobre la superficie del sensor produce una disminución de la frecuencia. Es importante destacar que la variación en la disipación es prácticamente nula durante el tiempo de interacción, lo que

indica que los cambios producidos en la frecuencia de resonancia se deben, fundamentalmente, a la variación de masa producida en el sensor por la unión del anticuerpo. Una vez ha pasado toda la muestra por la superficie del sensor, se alcanza el equilibrio en la señal y se cuantifica el decremento de frecuencia producido (ΔF). Por último, se procede a la regeneración de la superficie del sensor empleando ácido clorhídrico para romper la unión entre hapteno conjugado y anticuerpo, quedando el sensor preparado para el siguiente ensayo.

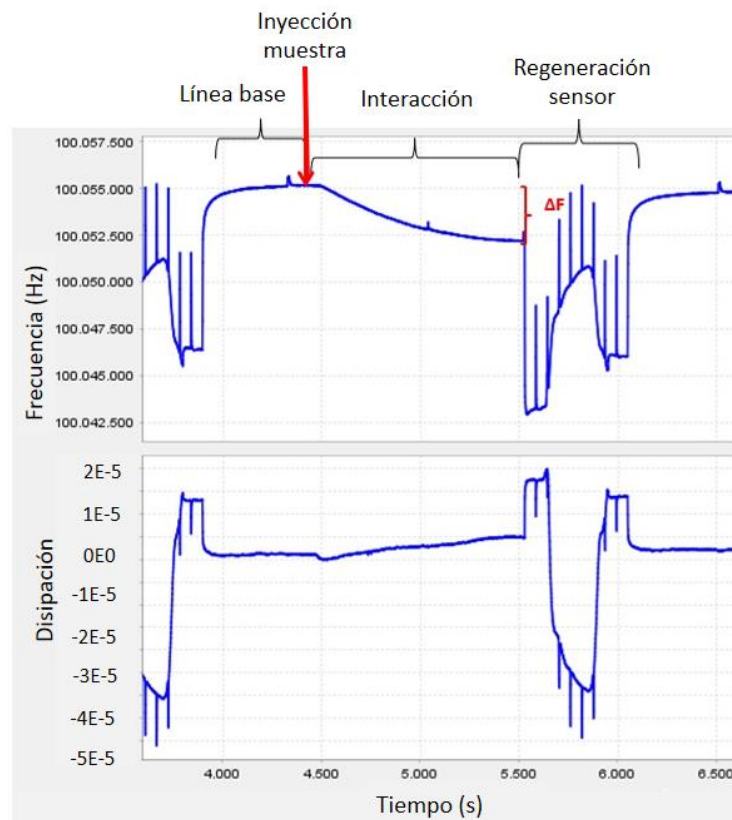


Figura 25. Registro real obtenido con el equipo de medida. Registro de la frecuencia (panel de arriba) y disipación (panel de abajo) de un sensor HFF-QCM en un ciclo completo de ensayo con anticuerpo.

1.8.3.- Ventajas y desventajas de los inmunosensores piezoeléctricos basados en tecnología HFF-QCM

Como ya se ha comentado anteriormente, los inmunosensores de uso más extendido en el ámbito del control de calidad en alimentos son los basados en técnicas ópticas y acústicas. En ese epígrafe se establece, a modo de resumen, las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Los biosensores ópticos emplean diferentes técnicas para detectar la presencia del analito y están basados en métodos bien establecidos incluyendo la quimioluminiscencia, la absorbancia de luz, la fluorescencia, la fosforescencia y ángulos de polarización y rotación óptica. Entre los métodos ópticos más empleados, destaca la resonancia de plasmón superficial (Surface Plasmon Resonance - SPR) (Myszka, 1997, 1999; Homola *et al.*, 1999, 2002; Mullett *et al.*, 2000; Baird & Myszka, 2001; Rich & Myszka, 2003, 2005; Karlsson, 2004). Los sensores basados en SPR tienen una alta capacidad de detección específica de moléculas pequeñas, lo que es de gran interés en matrices complejas. Esto los hace idóneos para su uso en los campos de biomedicina, alimentación y medio ambiente (Miura *et al.*, 1997; Daly *et al.*, 2000; Gobi *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Shankaran *et al.*, 2006).

En la **Figura 26** se ha incluido un esquema en el que describe el fundamento de este inmunosensor. Los inmunosensores SPR se basan en la emisión de luz plano-polarizada a través de un prisma para incidir sobre una superficie de oro. Esta emisión se realiza con diferentes ángulos de incidencia, para cada uno de estos ángulos se mide la intensidad de la luz reflejada mediante un detector óptico. Para determinados ángulos y longitudes de onda, los fotones reaccionan con la nube de electrones de la capa de oro, produciendo una disminución en la reflectividad. En las condiciones en las que esta disminución es máxima, el índice de refracción es muy influenciado por la cantidad de moléculas inmobilizadas en la capa de oro, por lo que la absorción de biomoléculas o interacciones con la capa producirán un cambio en el índice de refracción, dicho cambio en el índice de refracción es proporcional al incremento de masa del biosensor (Ricci *et al.*, 2007).

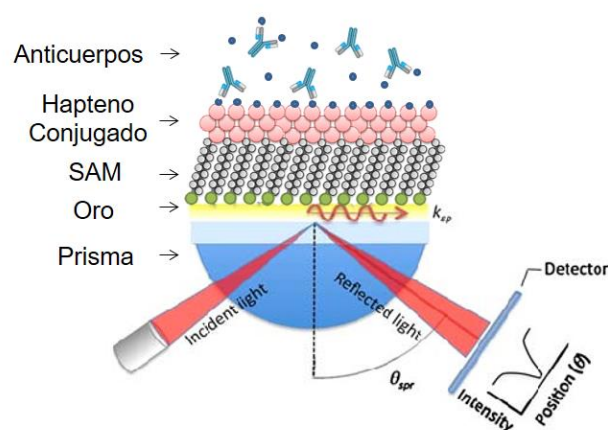


Figura 26. Fundamento de los inmunosensores SPR.

Como ya se ha indicado anteriormente, a diferencia de los inmunoensayos ELISA, los inmunosensores SPR y HFF-QCM no necesitan marcadores (*label-free*), ambos proporcionan una respuesta en tiempo real. Por tanto, en ambos casos proporcionan resultados que permiten hacer un seguimiento directo y en tiempo real de los eventos de bio-reconocimiento. Ambos inmunosensores proporcionan tiempos de ensayo más cortos que en ELISA, y sensibilidades similares respecto a ELISA. La ventaja principal de HFF-QCM frente a SPR es que permite la fabricación de sensores miniaturizados que no son posibles con la tecnología SPR. La miniaturización del dispositivo presenta dos ventajas, por un lado, se reduce el consumo de inmunoreactivos, por otro, permite la integración de varios de estos sensores sobre la misma oblea generando lo que se conoce como array de sensores. Estos arrays permiten la realización simultánea de múltiples ensayos en un único análisis, ahorrando de este modo tiempo y dinero, y resolviendo una de las principales desventajas de los inmunosensores frente a ELISA: la capacidad multianalito. Otras ventajas de la tecnología HFF-QCM frente a SPR son: (1) Su respuesta no depende de las propiedades ópticas del medio a analizar, lo que permite realizar estudios sobre una gran variedad de superficies. (2) HFF-QCM es adecuada para medidas sobre muestras reales sin purificar, eliminando la necesidad de preparación de la muestra, reduciendo así su complejidad y coste. (3) La instrumentación necesaria en SPR es más cara y compleja que la empleada con los inmunosensores HFF-QCM. Esto permite disponer de equipos más simples y portátiles que pueden ser empleados en el análisis en línea.

Las principales desventajas de la tecnología HFF-QCM tienen que ver con su elevada sensibilidad a agentes externos al ensayo, como los cambios de presión o los cambios térmicos, en comparación con otros biosensores, por ello es tan necesario tener estos aspectos muy bien controlados con sistemas termostatizados y con sistemas que eviten la generación de burbujas.

1.9.- Estado del arte de biosensores para la detección de pesticidas y antibióticos

La aplicación de biosensores para la detección de residuos tóxicos en alimentos empezó a aparecer en la literatura alrededor de 1980 (Evans *et al.*, 1986; Rawson *et al.*, 1989; Guilbault & Schmid, 1991). Desde entonces se han desarrollado numerosos biosensores basados en diversas tecnologías para detectar pesticidas y antibióticos en alimentos. Atendiendo al sistema de transducción se pueden encontrar: biosensores electroquímicos y amperométricos para detectar residuos de sulfonamidas en leche (Conzuelo *et al.*, 2012, 2013; Valera *et al.*, 2013), biosensores electroquímicos (Wang *et al.*, 2017) para la detección de clorpirifos en manzanas y vegetales verdes, biosensores ópticos basados en SPR para detectar antibióticos como la

fluoroquinolona en leche (Fernández *et al.*, 2010) y para la detección de pesticidas como el carbaril (Mauriz *et al.*, 2006a), DDT (Mauriz *et al.*, 2007) y clorpirifos (Mauriz *et al.*, 2006b). Atendiendo al elemento de reconocimiento se pueden encontrar sensores enzimáticos (Abad *et al.*, 1998b; Karousos *et al.*, 2002), MIPs (Sun & Fung, 2006; Ebarvia *et al.*, 2015) o inmunológicos (Mauriz *et al.*, 2006a; March *et al.*, 2009).

A continuación, nos centraremos en los inmunosensores piezoeléctricos, que es el tipo de biosensor objeto de estudio de esta tesis. El primer inmunosensor piezoeléctrico basado en QCM fue desarrollado por Shons *et al.* en 1972, para detectar anticuerpos anti-BSA mediante la inmovilización de BSA en un cristal de cuarzo. Desde entonces, la disponibilidad inmediata de anticuerpos comerciales contra patógenos comunes, biomarcadores de enfermedades, pesticidas, etc. ha permitido a los investigadores desarrollar una amplia variedad de inmunosensores piezoeléctricos para la detección de multitud de analitos, como puede observarse en el artículo de revisión publicado por Skladal (Skládal, 2003).

Los biosensores piezoeléctricos permiten la determinación rápida y fácil de moléculas pequeñas como medicamentos, hormonas y pesticidas. En el trabajo presentado por Cooper *et al.* en 2007 se incluye una tabla (Tabla 4) en la que se mencionan ejemplos de analitos de bajo peso molecular detectados mediante sensores QCM de baja frecuencia (Cooper & Singleton, 2007).

En cuanto a la aplicación de sensores QCM para la detección de pesticidas en alimentos, existen algunos trabajos previos, como por ejemplo el publicado por March *et al.* en 2009, en el que se desarrolló un inmunosensor QCM de baja frecuencia (9 MHz) para la detección en zumos de frutas del pesticida carbaril y del TCP (3,5,6-Tricloro-2-piridinol), principal metabolito del pesticida clorpirifos y del herbicida triclopir. En la **Tabla 4** pueden observarse otros ejemplos de sensores piezoeléctricos, mayoritariamente QCM y un ejemplo de cerámica piezoeléctrica, junto con los LODs que alcanzaron.

Tabla 4. Ejemplos de inmunosensores piezoeléctricos para la detección de pesticidas.

Sensor	Pesticida	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Muestra	Referencia
• Inmunosensor piezoeléctrico QCM 9 MHz	Carbaril TCP	11 7	Zumos de frutas Zumos de frutas	(March et al., 2009)
• Inmunosensor piezoeléctrico cerámico	Carbaril	0.11	Tampón de trabajo (<i>Buffer</i>)	(Fernández-Benavides et al., 2019)
• Inmunosensor piezoeléctrico QCM 9 MHz	Metolcarb	19	Zumos	(Pan et al., 2013)
• Inmunosensor piezoeléctrico QCM	Acetochlor	0.02	Zumo, leche	(Nartova et al., 2008)
• Inmunosensor piezoeléctrico QCM 10 MHz	Atrazina	0.11	Tampón de trabajo (<i>Buffer</i>)	(Steegborn & Skládal, 1997)

Todos los ejemplos incluidos en la **Tabla 4** corresponden a biosensores basados en materiales piezoeléctricos de baja frecuencia (<50 MHz). Hasta la fecha, sólo existen algunos trabajos previos desarrollados en el grupo de investigación en el que se engloba esta tesis (Ci2B), en los que se aplica la tecnología HFF-QCM con sensores de 100MHz para la detección de los pesticidas carbaril y tiabendazol ([March et al., 2015](#)). También se aplicó la tecnología HFF-QCM para la detección de tuberculosis ([Montoya et al., 2016](#)). Ambos trabajos fueron realizados en tampón de trabajo (tampón fosfato salino, PBS), pero no fueron aplicados a ninguna matriz alimentaria.

En cuanto al uso de biosensores para la detección de residuos de antibióticos en alimentos, las primeras publicaciones aparecieron en la década de los 80 y los 90 ([Thompson et al., 1979](#); [Kingdon, 1985](#); [Sternesjö et al., 1995](#)). Hoy en día existen muy pocas publicaciones en la literatura sobre el uso de inmunosensores piezoeléctricos para la detección de residuos de antibióticos en alimentos ([Gaudin, 2017](#)). En la **Tabla 5** se han recopilado los inmunosensores piezoeléctricos para la detección de antibióticos en alimentos que pueden encontrarse en la bibliografía, junto con los LODs que alcanzaron. Como puede observarse, en todos los casos en los que se empleó la tecnología QCM se utilizaron sensores de baja frecuencia (10 MHz).

Tabla 5. Inmunosensores piezoeléctricos para la detección de antibióticos.

Sensor	Antibiótico	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Muestra	Referencia
• Inmunosensor QCM 10 MHz	Sulfametoxazol	0.15	Agua y suelo	(Melikhova <i>et al.</i> , 2006)
• Inmunosensor QCM 10 MHz	Penicilina	0.80	Leche, hígado cerdo y ternera	(Karaseva & Ermolaeva, 2014)
	Ampicilina	3.90		
• Inmunosensor QCM 10 MHz	Cloramfenicol	0.20	Miel, carne, leche, y huevos	(Karaseva & Ermolaeva, 2012)
• Biosensor SAW (<i>Surface Acoustic Wave</i>)	Penicilina	2.20	Leche	(Gruhl & Länge, 2014)

En relación a la aplicación de la tecnología QCM para la detección de antibióticos en miel, solo existe en la literatura la publicación de Karaseva *et al.*, 2012 que desarrolló un inmunosensor QCM para la detección del antibiótico cloranfenicol en miel y otras matrices alimentarias como leche, huevos y carne (Karaseva & Ermolaeva, 2012). Y por otro lado, también se puede encontrar el trabajo de Ebarvia *et al.*, 2015 en el que se desarrolló un biosensor QCM basado en un polímero impreso molecularmente como elemento de bioreconocimiento, para la detección de cloranfenicol en miel, leche, cerdo y gambas (Ebarvia *et al.*, 2015). Este biosensor fue capaz de detectar cloranfenicol en miel y en gambas a concentraciones por debajo del LMR (0.3 $\mu\text{g/kg}$). Es importante destacar que, en ambos casos, se trata de sensores QCM de baja frecuencia (10 MHz). Los inmunosensores desarrollados en la presente tesis doctoral son de alta frecuencia (100 MHz), por lo que, como se ha explicado anteriormente, permiten alcanzar mejores límites de detección.

En la presente tesis se ha aplicado la tecnología HFF-QCM por primera vez para la detección de sustancias contaminantes en muestras fortificadas y reales de miel. En particular, se ha aplicado para detección de dos pesticidas (DDT y carbaril) y un antibiótico (sulfatiazol). Adicionalmente, se ha validado esta tecnología aplicando la metodología SANCO, y se han comparado los resultados con cromatografía.

1.10.- Motivación de la tesis

En el contexto actual, la sociedad demanda controles de calidad de la miel más estrictos que aseguren que está libre de residuos químicos perjudiciales para la salud. El desarrollo de técnicas analíticas, que alerten de forma rápida y fiable de la presencia de estas sustancias en la miel, es una de las prioridades contempladas dentro del reto en seguridad y calidad alimentaria de los planes estatales y europeos de investigación científica, técnica y de innovación actuales.

Hasta la fecha, las técnicas analíticas más sensibles y que más se aproximan a los LODs requeridos por la normativa existente son las basadas en cromatografía asociada a espectrometría de masas. Éstas se han utilizado para el análisis multiresiduo de pesticidas y antibióticos (Debayle *et al.*, 2008), sin embargo, adolecen de ciertos inconvenientes. Se trata de técnicas sólo disponibles en ciertos laboratorios centralizados, con tiempos de análisis elevados, de gran coste económico y de elevada tecnificación, que requieren de personal altamente cualificado debido a la dificultad de manejo. Las otras soluciones disponibles en el mercado son las técnicas basadas en inmunoensayos (ELISA), ensayos ópticos luminiscentes y kits comerciales que, aunque permiten la detección rápida de los residuos, no alcanzan los LODs requeridos. En consecuencia, en el sector de producción de la miel existe la necesidad de disponer de nuevos procedimientos analíticos alternativos y/o complementarios a los existentes que resuelvan los inconvenientes anteriormente mencionados. En particular, son necesarias técnicas de detección que sean simples, de bajo coste y de fácil manejo que no requieran de personal altamente cualificado. Además, deben ser rápidas, que proporcionen los resultados en pocos minutos, y portátiles para facilitar su implantación en la línea de trabajo. Es importante también que requieran un bajo consumo de muestra y que permitan analizar varios analitos simultáneamente, para aumentar su rendimiento respecto a las convencionales. Por último, deben ser fiables y tener sensibilidad suficiente para llegar a los límites de detección establecidos por la legislación actual. Este trabajo de investigación surge con el objetivo de contribuir al reto en seguridad y calidad alimentaria anteriormente mencionado. Con esta finalidad, se ha combinado la tecnología de sensores acústicos de alta resolución (*High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance* – HFF-QCM) con inmunoreactivos específicos para el desarrollo de biosensores capaces de detectar pesticidas y antibióticos de interés en la miel. Los biosensores desarrollados en esta tesis doctoral reúnen las características necesarias para sentar la base de una técnica analítica novedosa que cubra las necesidades demandadas por la sociedad.

1.11.- Referencias Bibliográficas

- Abad, A., Moreno, M.J. & Montoya, A. (1998a). Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to the N-Methylcarbamate Pesticide Methiocarb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2417–2426.
- Abad, A., Primo, J. & Montoya, A. (1997). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 1. Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassay Formats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1486–1494.
- Abad, J.M., Pariente, F., Hernández, L., Abruña, H.D. & Lorenzo, E. (1998b). Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensor. *Analytical Chemistry*, **70**, 2848–2855.
- Abyntek Biopharma. (2018). Diferencias entre ensayos ELISA y CLIA - Abyntek Biopharma [Internet document] URL <http://www.abynetek.com/diferencias-entre-ensayos-elisa-y-clia/>. Accessed 05/04/2020.
- Aecosan. (2020). Aecosan - Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición [Internet document] URL http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/residuos_productos_fitosanitarios.htm. Accessed 05/04/2020.
- AEMPS. (2020). Listado de Medicamentos Veterinarios autorizados por la AEMPS para abejas - Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [Internet document] URL <https://www.aemps.gob.es/medicamentos-veterinarios/salud-veterinaria/listado-de-medicamentos-veterinarios-autorizados-por-la-aemps-para-abejas/>. Accessed 05/04/2020.
- Albero-Romano, M.B. (2009). Determinación de residuos de contaminantes orgánicos en miel y zumos. *Tesis doctoral. Departamento de Química Analítica-Universidad Complutense de Madrid*.
- Albero, B., Sánchez-Brunete, C. & Tadeo, J.L. (2001). Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of AOAC International*, **84**, 1165–1171.

- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G. & Vieth, B. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, **25**, 838–865.
- Amendola, G., Pelosi, P. & Dommarco, R. (2010). Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, **46**, 24–34.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D. & Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, **86**, 412–431.
- Anthemidis, A.N. & Ioannou, K.I.G. (2009). Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review. *Talanta*, **80**, 413-421.
- Arnau, A., Montagut, Y., García, J. V. & Jiménez, Y. (2009). A different point of view on the sensitivity of quartz crystal microbalance sensors. *Measurement Science and Technology*, **20**.
- Arthur, C.L. & Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, **62**, 2145-2148.
- Arthur, C.L., Pratt, K., Motlagh, S., Pawliszyn, J. & Belardi, R.P. (1992). Environmental analysis of organic compounds in water using solid phase micro extraction. *Journal of High Resolution Chromatography*, **15**, 741–744.
- Atienza, J., Jiménez, J.J., Bernal, J.L. & Martín, M.T. (1993). Supercritical fluid extraction of fluvalinate residues in honey. Determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **655**, 95–99.
- Bado, I., Cordeiro, N., García, V., Robino, L., Seija, V. & Vignoli, R. (2020). Principales grupos de antibióticos [Internet document] URL [http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales grupos de antibi%F3ticos.pdf](http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales_grupos_de_antibi%F3ticos.pdf). Accessed 05/04/2020.

- Baird, C.L. & Myszka, D.G. (2001). Current and emerging commercial optical biosensors. *Journal of Molecular Recognition*, **14**, 261–268.
- Bargańska, Z., Konieczka, P. & Namieśnik, J. (2018). Comparison of two methods for the determination of selected pesticides in honey and honeybee samples. *Molecules*, **23**, 2582.
- Bargańska, Z., Namieśnik, J. & Ślebioda, M. (2011). Determination of antibiotic residues in honey. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **30**, 1035-1041.
- Barker, S.A. (2000). Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*, **880**, 63-68.
- Barroso-Arévalo, S., Fernández-Carrión, E., Goyache, J., Molero, F., Puerta, F. & Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2019). High load of deformed wing virus and Varroa destructor infestation are related to weakness of honey bee colonies in Southern Spain. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 1331.
- Bartual, J. & Berenguer, M.J. (1998). *NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales Pesticides: Classification and hazards Pesticides: Classification et risques Redactores*.
- Bayer Research. (2020). El enemigo público de la colmena, comprender el ciclo de vida del ácaro de Varroa [Internet document] URL <https://www.bayer.mx/es/prensa/publicaciones/reasearch-magazine-redirect/reasearch-magazine-2017/es/bee-protection-varroa-mite.php>. Accessed 05/04/2020.
- Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Nozal, M.J. Del, Higes, M. & Llorente, J. (2000). Gas chromatographic determination of acrinathrine and 3-phenoxybenzaldehyde residues in honey. *Journal of Chromatography A*, **882**, 239–243.
- Bizet, K., Gabrielli, C., Perrot, H. & Therasse, J. (1998). Validation of antibody-based recognition by piezoelectric transducers through electroacoustic admittance analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, **13**, 259–269.
- Blasco, C., Fernández, M., Pena, A., Lino, C., Silveira, M.I., Font, G. & Picó, Y. (2003).

- Assessment of Pesticide Residues in Honey Samples from Portugal and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 8132–8138.
- Blasco, C., Fernández, M., Picó, Y. & Font, G. (2004). Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1030**, 77–85.
- Bogaerts, R., Degroodt, J.M. & Vos, D. De. (1982). The microbiological assay of chloramphenicol hemisuccinate and application of the method with pyrrolidinomethyltetracycline (rolitetracycline). *Annales pharmaceutiques francaises*, **40**, 37–41.
- Bogaerts, R. & Wolf, F. (1980). A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in meat. *Fleischwirtschaft*, **60**, 672–673.
- Bonzini, S., Tremolada, P., Bernardinelli, I., Colombo, M. & Vighi, M. (2011). Predicting pesticide fate in the hive (part 1): Experimentally determined τ -Fluvalinate residues in bees, honey and wax. *Apidologie*, **42**, 378–390.
- Briand, E., Salmain, M., Herry, J.M., Perrot, H., Compère, C. & Pradier, C.M. (2006). Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 440–448.
- Byfield, M.P. & Abuknesha, R.A. (1994). Biochemical aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **9**, 373–399.
- Calatayud-Vernich, P. (2019). *Determination of pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing Pesticide Hazard in Spanish Apiaries*.
- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E. & Picó, Y. (2016). Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. *MethodsX*, **3**, 452–458.
- Campillo, N., Viñas, P., Peñalver, R., Cacho, J.I. & Hernández-Córdoba, M. (2012). Solid-phase microextraction followed by gas chromatography for the speciation of

- organotin compounds in honey and wine samples: A comparison of atomic emission and mass spectrometry detectors. *Journal of Food Composition and Analysis*, **25**, 66–73.
- Carson, N.A.J. & Neill, D.W. (1962). Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Archives of Disease in Childhood*, **37**, 505–513.
- CCPR. (2013). Committee detail ES | CODEX ALIMENTARIUS FAO-WHO [Internet document] URL <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/committee-detail/es/?committee=CCPR>. Accessed 06/04/2020.
- Chauhan, R., Solanki, P.R., Singh, J., Mukherjee, I., Basu, T. & Malhotra, B.D. (2015). A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for aflatoxin B1 detection in groundnut. *Food Control*, **52**, 60–70.
- Chen, S., Li, L., Boozer, C.L. & Jiang, S. (2000). Controlled chemical and structural properties of mixed self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111). *Langmuir*, **16**, 9287–9293.
- Chen, Y., Liu, L., Song, S., Kuang, H. & Xu, C. (2016). Establishment of a monoclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of trimethoprim residues in milk, honey, and fish samples. *Food and Agricultural Immunology*, **27**, 830–840.
- Choudhary, A. & Sharma, D.C. (2008). Pesticide residues in honey samples from Himachal Pradesh (India). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **80**, 417–422.
- Cieślík, E., Sadowska-Rociek, A., Ruiz, J.M.M. & Surma-Zadora, M. (2011). Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chemistry*, **125**, 773–778.
- Clinch, P.G. (1967). The residual contact toxicity to honey bees of insecticides sprayed on to white clover (*trifolium repens* L.) in the laboratory. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **10**, 289–300.

- Conzuelo, F., Campuzano, S., Gamella, M., Pinacho, D.G., Reviejo, A.J., Marco, M.P. & Pingarrón, J.M. (2013). Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, **50**, 100–105.
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., G. Pinacho, D., Reviejo, A.J., Marco, M.P. & Pingarrón, J.M. (2012). Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, **36**, 81–88.
- Cooper, M.A. & Singleton, V.T. (2007). A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: Applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *Journal of Molecular Recognition*, **20**, 154–184.
- D’Orazio, P. (2011). Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. *Clinica Chimica Acta*, **412**, 1749–1761.
- Daly, S.J., Keating, G.J., Dillon, P.P., Manning, B.M., O’Kennedy, R., Lee, H.A. & Morgan, M.R.A. (2000). Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5097–5104.
- Daza Millone, M.A. (2011). Monocapas autoensambladas de alcanotioles y α , ω -alcanoditioles sobre oro: adsorción no específica de moléculas bioactivas, biomoléculas y vesículas. *Tesis Doctoral. Departamento de química - Universidad Nacional de la Plata (Argentina)*.
- Debayle, D., Dessalces, G. & Grenier-Loustalot, M.F. (2008). Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**, 1011–1020.
- Decision 2002/657/EC. (2002). Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union*, **L221**, 8–36.
- Decisión 2003/181/CE. (2003). *Decisión de la Comisión, de 13 de marzo de 2003, por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos en*

alimentos de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea.

Decisión 2007/355/CE. (2007). *Decisión de la Comisión, de 21 de mayo de 2007, relativa a la no inclusión del carbaril en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia [notificada con*. Diario Oficial de la Unión Europea.

Devine, G.J., Dominique, E., Ogusuku, E. & Furlong, M.J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas [Internet document] . *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* URL http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342008000100011&script=sci_arttext. Accessed 06/04/2020.

Directiva 2001/110/CE. (2001). *Directiva del consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel*.

Directiva 2014/63/UE. (2014). *Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de mayo de 2014 relativa a la miel*.

Directiva 91/414/CEE. (1991). *Directiva del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios*.

Directiva 96/23/CE. (1996). *Directiva del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decis*.

Disley, D.M., Cullen, D.C., You, H.X. & Lowe, C.R. (1998). Covalent coupling of immunoglobulin G to self-assembled monolayers as a method for immobilizing the interfacial-recognition layer of a surface plasmon resonance immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **13**, 1213–1225.

Dorne, J.L.C.M., 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. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **28**, 695–707.

- Du, Z., Liu, M. & Li, G. (2013). Novel magnetic SPE method based on carbon nanotubes filled with cobalt ferrite for the analysis of organochlorine pesticides in honey and tea. *Journal of Separation Science*, **36**, 3387–3394.
- Duan, C. & Meyerhoff, M.E. (1995). Immobilization of proteins on gold coated porous membranes via an activated self-assembled monolayer of thioctic acid. *Mikrochimica Acta*, **117**, 195–206.
- Ebarvia, B.S., Ubando, I.E. & Sevilla, F.B. (2015). Biomimetic piezoelectric quartz crystal sensor with chloramphenicol-imprinted polymer sensing layer. *Talanta*, **144**, 1260–1265.
- ECDC/EFSA/EMA. (2015). European Center for Disease Prevention and Control/European Food Safety Authority/European Medicines Agency first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, **13**, 4006.
- EcuRed. (2020). Carbaril [Internet document] URL <https://www.ecured.cu/Carbaril>. Accessed 05/04/2020.
- EFSA. (2012a). 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. *EFSA Journal*.
- EFSA. (2012b). 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 Journal*.
- Eskenazi, B., Chevrier, J., Rosas, L.G., Anderson, H.A., Bomman, M.S., Bouwman, H., Chen, A., Cohn, B.A., Jager, C. de, Henshel, D.S., Leipzig, F., Leipzig, J.S., Lorenz, E.C., Snedeker, S.M. & Stapleton, D. (2009). The pine river statement: Human health consequences of DDT use. *Environmental Health Perspectives*.
- Eurachem. (2014). Method Validation [Internet document] URL <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>. Accessed 06/04/2020.

- Evans, G.P., Briers, M.G. & Rawson, D.M. (1986). Can biosensors help to protect drinking water? *Biosensors*, **2**, 287–300.
- FAO. (2020). *International Plant Protection Convention Plant health and food security*.
- Farajzadeh, M.A., Feriduni, B. & Mogaddam, M.R.A. (2014). Extraction and enrichment of triazole and triazine pesticides from honey using air-assisted liquid-liquid microextraction. *Journal of Food Science*, **79**, 2140–2148.
- Fernández-Alba, A.R. & García-Reyes, J.F. (2008). Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **27**, 973–990.
- Fernández-Benavides, D.A., Cervera-Chiner, L., Jiménez, Y., Fuentes, O.A. de, Montoya, A. & Muñoz-Saldaña, J. (2019). A novel bismuth-based lead-free piezoelectric transducer immunosensor for carbaryl quantification. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **285**, 423–430.
- Fernández, F., Hegnerová, K., Piliarik, M., Sanchez-Baeza, F., Homola, J. & Marco, M.P. (2010). A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 1231–1238.
- Fernández, M., Picó, Y. & Mañes, J. (2002). Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. *Journal of Food Protection*, **65**, 1502-1511.
- Fernícola, N.A. de. (1985). Toxicología de los insecticidas organoclorados. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, **98**, 10–19.
- Ferretti, S., Paynter, S., Russell, D.A., Sapsford, K.E. & Richardson, D.J. (2000). Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **19**, 530–540.
- Franek, M. & Hruska, K. (2005). Antibody based methods for environmental and food analysis: A review. *Veterinarni Medicina*, **50**, 1-10.
- Frederix, F., Bonroy, K., Laureyn, W., Reekmans, G., Campitelli, A., Dehaen, W. & Maes, G. (2003). Enhanced performance of an affinity biosensor interface based on mixed

- self-assembled monolayers of thiols on gold. *Langmuir*, **19**, 4351–4357.
- García-Chao, M., Agruña, M.J., Calvete, G.F., Sakkas, V., Llompарт, M. & Dagnac, T. (2010). Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. *Analytica Chimica Acta*, **672**, 107–113.
- García Pérez, M. (2003). *Estudio palinológico y colorimétrico de mieles monoflorales de la región de Murcia*. Proyecto fin de carrera. Universidad Politécnica de Cartagena. Departamento de Producción Agraria.
- Gaudin, V. (2017). Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, **90**, 363–377.
- Gaudin, V., Rault, A. & Verdon, E. (2012). Validation of a commercial receptor kit Sulfasensor® Honey for the screening of sulfonamides in honey according to Commission Decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, **29**, 942–950.
- Gaweł, M., Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Goliszek, M., Burek, O. & Posyniak, A. (2019). Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, **282**, 36–47.
- Gillet, A., Vanderhaeghe, H., Bogaerts, R., Boudru, I., Brouckaert, A., Coucke, G., Dony, G., Drion, P., Dumont, P., Haemers, A., Pijck, J. & Kerchove, C. Van. (1972). Chemical and microbiological analysis of neomycin. *Journal de Pharmacie de Belgique*, **27**, 381–401.
- Gizeli, E. (2002). Acoustic transducers. In: *Biomolecular Sensors* (edited by E. Gizeli & C. Lowe).
- Gladden, B.C. & Rogan, W.J. (1995). DDE and shortened duration of lactation in a northern Mexican town. *American Journal of Public Health*, **85**, 504–508.

- Gobi, K.V., Tanaka, H., Shoyama, Y. & Miura, N. (2004). Continuous flow immunosensor for highly selective and real-time detection of sub-ppb levels of 2-hydroxybiphenyl by using surface plasmon resonance imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 350–357.
- Gomis, D.B., Fernández, A.C., Bernardo, V.M. & Gutiérrez Alvarez, M.D. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of cymiazole in honey with UV and electrochemical detection. *Chromatographia*, **39**, 602–606.
- Greenwood, D. (2010). Sulfonamides. In: *Antibiotic and Chemotherapy: Expert Consult*. Pp. 337–343.
- Gruhl, F.J. & Länge, K. (2014). Surface Acoustic Wave (SAW) Biosensor for Rapid and Label-Free Detection of Penicillin G in Milk. *Food Analytical Methods*, **7**, 430–437.
- Guilbault, G. & Schmid, R. (1991). Biosensors for the determination of drug substances. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **14**, 133–145.
- Hawkins, E., Cooper, M. & Campbell, I. (2006). Acoustic Detection Technology in the Analysis of Biomolecular Interactions Acoustic detection technology offers life scientists the ability to detect real-time kinetic data across a broad range of sample types, purities and concentrations, without the need. *Innovations in Pharmaceutical Technology*, **21**, 30–34.
- Herrera, A., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Bayarri, S., Lázaro, R., Yagüe, C. & Ariño, A. (2005). Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **381**, 695–701.
- Homola, J., Dostálek, J., Chen, S., Rasooly, A., Jiang, S. & Yee, S.S. (2002). Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *International Journal of Food Microbiology*, **75**, 61–69.
- Homola, J., Koudela, I. & Yee, S.S. (1999). Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **54**, 16–24.

- Hrynko, I., Łozowicka, B. & Kaczyński, P. (2018). Liquid Chromatographic MS/MS Analysis of a Large Group of Insecticides in Honey by Modified QuEChERS. *Food Analytical Methods*, **11**, 2307–2319.
- Hua, X., Wang, L., Li, G., Fang, Q., Wang, M. & Liu, F. (2013). Multi-analyte enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus pesticides and neonicotinoid insecticides using a bispecific monoclonal antibody. *Analytical Methods*, **5**, 1556–1563.
- Huq, S. & Kallury, K. (2006). *Application Note TN-012: Extraction and Analysis of Sulfonamides from Honey by LC/MS/MS using strataTMX-C Polymeric SPE Sorbent and GeminiTM C18 HPLC Column.*
- ICH. (1996). *ICH harmonised tripartite guideline. Guideline for good clinical practice E6(R1).*
- Institute of Medicine (US). (2010). Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies: Workshop Summary. [Internet document] . *Forum on Microbial Threats, Washington (DC).*
- Janshoff, A., Galla, H.J. & Steinem, C. (2000). Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors? *Angewandte Chemie - International Edition*, **39**, 4004–4032.
- Jansson, C. (2000). Multiresidue method for the gas chromatographic determination of pesticides in honey after solid-phase extraction cleanup. *Journal of AOAC International*, **83**, 714–719.
- Jeannot, M.A. & Cantwell, F.F. (1997). Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. *Analytical Chemistry*, **69**, 235–239.
- Jiménez, J.J., Atienza, J. & Bernal, J.L. (1995). Characterization of fluvalinate residues in honey by gas chromatography–atomic emission detection and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of High Resolution Chromatography*, **18**, 367–372.

- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., Nozal, M.J. Del, Martín, M.T. & Mayorga, A.L. (1998). Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, **829**, 269–277.
- Jiménez, M., Mateo, J.J. & Mateo, R. (2000). Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **870**, 473–481.
- Jiménez, Y., Otero, M. & Arnau, A. (2008). QCM data analysis and interpretation. In: *Piezoelectric Transducers and Applications* (edited by V. A.A.). Pp. 331–398. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jovanov, P., Guzsvány, V., Franko, M., Lazić, S., Sakač, M., Šarić, B. & Banjaca, V. (2013). Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, **111**, 125–133.
- Juan-Borrás, M., Periche, A., Domenech, E. & Escriche, I. (2015). Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS-MS. *Food Control*, **50**, 243–249.
- Kamel, A. (2010). Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 5926–5931.
- Karaseva, N.A. & Ermolaeva, T.N. (2012). A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food. *Talanta*, **93**, 44–48.
- Karaseva, N.A. & Ermolaeva, T.N. (2014). Piezoelectric immunosensors for the detection of individual antibiotics and the total content of penicillin antibiotics in foodstuffs. *Talanta*, **120**, 312–317.
- Karlsson, R. (2004). SPR for molecular interaction analysis: A review of emerging application areas. *Journal of Molecular Recognition*, **17**, 151–161.

- Karousos, N.G., Aouabdi, S., Way, A.S. & Reddy, S.M. (2002). Quartz crystal microbalance determination of organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta*, **469**, 189–196.
- Kaufmann, A., Roth, S., Ryser, B., Widmer, M. & Guggisberg, D. (2002). Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. *Journal of AOAC International*, **85**, 853–860.
- Kim, S.J., Gobi, K.V., Harada, R., Shankaran, D.R. & Miura, N. (2006). Miniaturized portable surface plasmon resonance immunosensor applicable for on-site detection of low-molecular-weight analytes. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **115**, 349–356.
- Kingdon, C.F.M. (1985). An aminoglycoside biosensor incorporating free or immobilized bacterial cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **22**, 165–168.
- Klaveren, J.D. van & Boon, P.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*, **47**, 2879–2882.
- Kolberg, D.I., Prestes, O.D., Adaime, M.B. & Zanella, R. (2011). Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS. *Food Chemistry*, **125**, 1436–1442.
- Konash, P.L. & Bastiaans, G.J. (1980). Piezoelectric crystals as detectors in liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, **52**, 1929–1931.
- Kujawski, M.W., Bargańska, Z., Marciniak, K., Miedzianowska, E., Kujawski, J.K., Ślebioda, M. & Namieśnik, J. (2014). Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS - Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches. *LWT - Food Science and Technology*, **56**, 517–523.
- Kujawski, M.W. & Namieśnik, J. (2011). Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS. *Food Control*, **22**, 914–919.

- Labclinics. (2015). Anticuerpos Policlonales vs Monoclonales [Internet document] URL <https://www.labclinics.com/anticuerpos-policlonales-vs-monoclonales/>. Accessed 16/04/2020.
- Larsen, J.C. (2006). Risk assessment of chemicals in European traditional foods. *Trends in Food Science and Technology*, **17**, 471–481.
- Lehotay, S.J., Kok, A. De, Hiemstra, M. & Bodegraven, P. Van. (2005). Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, **88**, 595–614.
- Li, J.H., Evans, J.D., Li, W.F., Zhao, Y.Z., DeGrandi-Hoffman, G., Huang, S.K., Li, Z.G., Hamilton, M. & Chen, Y.P. (2017). New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to nosema infection. *PLoS ONE*, **12**, 1-18.
- Li, M., Zhang, J., Li, Y., Peng, B., Zhou, W. & Gao, H. (2013). Ionic liquid-linked dual magnetic microextraction: A novel and facile procedure for the determination of pyrethroids in honey samples. *Talanta*, **107**, 81–87.
- Long, E.Y. & Krupke, C.H. (2016). Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. *Nature Communications*, **7**, 11629.
- Louch, D., Motlagh, S. & Pawliszyn, J. (1992). Dynamics of Organic Compound Extraction from Water Using Liquid-Coated Fused Silica Fibers. *Analytical Chemistry*, **64**, 1187–1199.
- Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. & Whitesides, G.M. (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, **105**, 1103-1170.
- Lozano, A., Hernando, M.D., Uclés, S., Hakme, E. & Fernández-Alba, A.R. (2019). Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. *Food Chemistry*, **274**, 61–70.
- Ma, H., Xu, Y., Li, Q.X., Xu, T., Wang, X. & Li, J. (2009). Application of enzyme-linked

- immunosorbent assay for quantification of the insecticides imidacloprid and thiamethoxam in honey samples. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, **26**, 713–718.
- Malhat, F.M., Haggag, M.N., Loutfy, N.M., Osman, M.A.M. & Ahmed, M.T. (2015). Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. *Chemosphere*, **120**, 457–461.
- Manclús, J.J., Abad, A., Lebedev, M.Y., Mojarrad, F., Micková, B., Mercader, J. V., Primo, J., Miranda, M.A. & Montoya, A. (2004). Development of a Monoclonal Immunoassay Selective for Chlorinated Cyclodiene Insecticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2776–2784.
- Manclús, J.J., Primo, J. & Montoya, A. (1996). Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Insecticide Chlorpyrifos. 1. Monoclonal Antibody Production and Immunoassay Design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 4052–4062.
- March, C., García, J. V., Sánchez, Á., Arnau, A., Jiménez, Y., García, P., Manclús, J.J. & Montoya, Á. (2015). High-frequency phase shift measurement greatly enhances the sensitivity of QCM immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **65**, 1–8.
- 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.
- Marco, M.P., Gee, S.J., Cheng, H.M., Liang, Z.Y. & Hammock, B.D. (1993). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Carbaryl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 423–430.
- Marty, J.-L., Leca, B. & Noguer, T. (1998). Biosensors for the detection of pesticides. *Analysis*, **26**, 144–148.
- Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barceló, D. & Lechuga, L.M. (2006a). Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 2129–2136.

- Mauriz, E., Calle, A., Lechuga, L.M., Quintana, J., Montoya, A. & Manclús, J.J. (2006b). Real-time detection of chlorpyrifos at part per trillion levels in ground, surface and drinking water samples by a portable surface plasmon resonance immunosensor. *Analytica Chimica Acta*, **561**, 40–47.
- 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.
- Mcart, S.H., Fersch, A.A., Milano, N.J., Truitt, L.L. & Böröczky, K. (2017). High pesticide risk to honey bees despite low focal crop pollen collection during pollination of a mass blooming crop. *Scientific Reports*, **7**, 46554.
- McMullen, S.E., Lansden, J.A. & Schenck, F.J. (2004). Modifications and adaptations of the Charm II rapid antibody assay for chloramphenicol in honey. *Journal of Food Protection*, **67**, 1533–1536.
- MDA. (2020). Pesticides & Bee Toxicity | Minnesota Department of Agriculture [Internet document] URL <https://www.mda.state.mn.us/protecting/bmps/pollinators/beetoxicity>. Accessed 05/04/2020.
- Melikhova, E. V., Kalmykova, E.N., Eremin, S. a. & Ermolaeva, T.N. (2006). Using a piezoelectric flow immunosensor for determining sulfamethoxazole in environmental samples. *Journal of Analytical Chemistry*, **61**, 687–693.
- Meulenbergh, E.P. (1997). Immunochemical detection of environmental and food contaminants: Development, validation and application. *Food Technology and Biotechnology*, **35**, 153–163.
- Mitra, S. & Brukh, R. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*.
- Miura, N., Ogata, K., Sakai, G., Uda, T. & Yamazoe, N. (1997). Detection of morphine in ppb range by using SPR (surface-plasmon-resonance) immunosensor. *Chemistry Letters*, **26**, 713–714.

- Montoya, A., March, C., Montagut, Y., Moreno, M., Manclus, J., Arnau, A., Jimenez, Y., Jaramillo, M., Marin, P. & Torres, R. (2016). A High Fundamental Frequency (HFF)-based QCM Immunosensor for Tuberculosis Detection. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **17**, 1623–1630.
- Montoya, Á., Ocampo, A. & March, C. (2008). Fundamentals of piezoelectric immunosensors. In: *Piezoelectric Transducers and Applications* (edited by V. A.A.). Pp. 289–306. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Moretti, S., Saluti, G. & Galarini, R. (2017). Residue Determination in Honey. In: *Honey Analysis*. InTech.
- Mousavi, M.M., Nemati, M., Alizadeh Nabili, A.A., mahmoudpour, M. & Arefhosseini, S. (2016). Application of dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography/mass spectrometry as effective tool for trace analysis of organochlorine pesticide residues in honey samples. *Journal of the Iranian Chemical Society*, **13**, 2211–2218.
- Mullett, W.M., Lai, E.P.C. & Yeung, J.M. (2000). Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods*, **22**, 77–91.
- Myszka, D.G. (1997). Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 50–57.
- Myszka, D.G. (1999). Survey of the 1998 optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, **12**, 390–408.
- Naggar, Y. Al, Codling, G., Vogt, A., Naiem, E., Mona, M., Seif, A. & Giesy, J.P. (2015). Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **114**, 1–8.
- Nartova, Y. V., Eremin, S.A. & Ermolaeva, T.N. (2008). Mass-sensitive immunosensors for determining chloroacetanilide herbicides. *Journal of Analytical Chemistry*, **63**, 1191–1198.
- NPIC. (2020). National Pesticides Information Center. *Carbaryl (General Fact Sheet)*.

- NZF. (2012). New Zealand Formulary v6 [Internet document] URL www.nzf.org.nz. Accessed 03/02/2020.
- O'Malley, G.F. & O'Malley, R. (2018). Envenenamiento con organofosforados y carbamatos. [Internet document] . *Manual MSD versión para profesionales* URL <https://www.msmanuals.com/es/professional/lesiones-y-envenenamientos/intoxicación/envenenamiento-con-organofosforados-y-carbamatos>. Accessed.
- Osterloh, K.R.S., Smith, G.D. & Peters, T.J. (1989). Interpolation in Assay Systems with a Sigmoid Response Curve. In: *Reviews on Immunoassay Technology*. Pp. 134–144. London: Palgrave Macmillan UK.
- Ouyang, H., Tu, X., Fu, Z., Wang, W., Fu, S., Zhu, C., Du, D. & Lin, Y. (2018). Colorimetric and chemiluminescent dual-readout immunochromatographic assay for detection of pesticide residues utilizing g-C₃N₄/BiFeO₃ nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics*, **106**, 43–49.
- Pan, M., Kong, L., Liu, B., Qian, K., Fang, G. & Wang, S. (2013). Production of multi-walled carbon nanotube/poly(aminoamide) dendrimer hybrid and its application to piezoelectric immunosensing for metolcarb. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **188**, 949–956.
- Panseri, S., Catalano, A., Giorgi, A., Arioli, F., Procopio, A., Britti, D. & Chiesa, L.M. (2014). Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control*, **38**, 150–156.
- Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, Á. & Puchades, R. (2007a). Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides. Application to bee honey analysis. *Talanta*, **71**, 923–933.
- Pastor-Navarro, N., Morais, S., Maquieira, Á. & Puchades, R. (2007b). Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples. *Analytica Chimica Acta*, **594**, 211–218.
- Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J. & Barba, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged

- and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**, 1697–1714.
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I. & Bendicho, C. (2009). Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, **64**, 1-15.
- Pirard, C., Widart, J., Nguyen, B.K., Deleuze, C., Heudt, L., Haubruge, E., Pauw, E. De & Focant, J.F. (2007). Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1152**, 116–123.
- Pohanka, M. & Skládal, P. (2005). Piezoelectric immunosensor for *Francisella tularensis* detection using immunoglobulin M in a limiting dilution. *Analytical Letters*, **38**, 411–422.
- Porrini, C., Ghini, S., Girotti, S., Sabatini, A.G., Gattavecchia, E. & Celli, G. (2002). Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In: *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Devillers J. Pham-Delèngue M (eds) Taylor & Francis, London/New York, pp 186–247.
- Prestes, O.D., Friggi, C.A., Adaime, M.B. & Zanella, R. (2009). QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, **32**, 1620–1634.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, **109**, 309-318.
- Příbyl, J., Hepel, M., Halánek, J. & Skládal, P. (2003). Development of piezoelectric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **91**, 333–341.
- Proietto Galeano, M., Scordino, M., Sabatino, L., Pantò, V., Morabito, G., Chiappara, E.,

- Traulo, P. & Gagliano, G. (2013). UHPLC/MS-MS analysis of six neonicotinoids in honey by modified QuEChERS: Method development, validation, and uncertainty measurement. *International Journal of Food Science*, **2013**, 1–7.
- PubChem. (2020). Sulfathiazole | C₉H₉N₃O₂S₂ [Internet document] URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/SULFATHIAZOLE#section=Entrez-Crosslinks>. Accessed 05/04/2020.
- RASFF. (2020). Food and Feed Safety Alerts | Food Safety [Internet document] URL https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en. Accessed 05/04/2020.
- Rawson, D.M., Willmer, A.J. & Turner, A.P.P. (1989). Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors*, **4**, 299–311.
- Raymann, K., Shaffer, Z. & Moran, N.A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biology*, **15**.
- RD 1049/2003. (2003). *REAL DECRETO 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel.*
- Real Decreto 1749/1998. (1998). *de 31 de Julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.*
- Reglamento (EC) N° 396/2005. (2005). *Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal.* Diario Oficial de la Unión Europea, L70 (16 de marzo de 2005), 1-16.
- Reglamento (EU) N° 37/2010. (2010). *Reglamento de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.* Diario Oficial de la Unión Europea, L15 (20 de enero 2010), 1-72.
- Reglamento (EU) N° 470/2009. (2009). *Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009 , por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias*

farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea, L152 (16 de junio de 2009), 11-22.

Reglamento (EU) N° 485/2013. (2013). *Reglamento de la Comisión, de 24 de mayo de 2013, por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) n° 540/2011 en lo relativo a las condiciones de aprobación de las sustancias activas clotianidina, tiametoxam e imidacloprid, y se prohíben el uso y l.*

Rehana, T. & Rao, P.R. (1992). Effect of DDT on the immune system in Swiss Albino mice during adult and perinatal exposure: Humoral responses. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **48**, 535–540.

Repetto, R. & Baliga, S.S. (1996). Pesticides and the immune system: The public health risks. Executive summary. *World Resources Institute (eds). Central European Journal of Public Health*.

Rezić, I., Horvat, A.J.M., Babić, S. & Kaštelan-Macan, M. (2005). Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry*, **12**, 477–481.

Rial-Otero, R., Gaspar, E.M., Moura, I. & Capelo, J.L. (2007). Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*.

Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L. & Palleschi, G. (2007). A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, **605**, 111–129.

Rich, R.L. & Myszka, D.G. (2003). Spying on HIV with SPR. *Trends in Microbiology*, **11**, 124–133.

Rich, R.L. & Myszka, D.G. (2005). Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, **18**, 431–478.

Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Knoll, F.R.N. & Apon, B.M. (2004). Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: Determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, **1048**, 153–159.

- Rocha Gaso, 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. Electronic engineering department (UPV) and Institute for information and communication technologies electronics and applied mathematics, electrical engineering department (UCL)- Universitat Politècnica de València and Université Catholique.*
- Rodríguez López, D., Ahumada, D.A., Díaz, A.C. & Guerrero, J.A. (2014). Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, **37**, 33–40.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, 96-119.
- Salami, F.H. & Queiroz, M.E.C. (2013). Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, **51**, 899–904.
- Sampaio, M.R.F., Tomasini, D., Cardoso, L. V., Caldas, S.S. & Primel, E.G. (2012). Determination of pesticide residues in sugarcane honey by QuEChERS and liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **23**, 197–205.
- Samson-Robert, O., Labrie, G., Chagnon, M. & Fournier, V. (2014). Neonicotinoid-contaminated puddles of water represent a risk of intoxication for honey bees. *PLoS ONE*, **9**.
- Sanchez-Bayo, F. & Goka, K. (2016). Impacts of Pesticides on Honey Bees. In: *Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research*.
- Sánchez-Bayo, F. & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS ONE*, **9**.
- Sánchez-Brunete, C., Alberó, B., Miguel, E. & Tadeo, J.L. (2002). Determination of insecticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and mass spectrometric confirmation. *Journal of AOAC International*, **85**, 128–133.

- SANCO/12571/2013. (2013). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013 [Internet document] URL https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf. Accessed 06/04/2020.
- SANTE/12682/2019. (2019). Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed [Internet document] URL https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf. Accessed 17/07/2020.
- Sauerbrey, G. (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, **155**, 206–222.
- Scortichini, G., Annunziata, L., Haouet, M.N., Benedetti, F., Krusteva, I. & Galarini, R. (2005). ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: Method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. *Analytica Chimica Acta*, **535**, 43–48.
- Seija, V. & Vignoli, R. (2006). *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA Principales grupos de antibióticos*.
- Serra Bonvehí, J. & Lacalle Gutiérrez, A. (2009). Residues of antibiotics and sulfonamides in honeys from Basque Country (NE Spain). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 63–72.
- Shankaran, D.R., Matsumoto, K., Toko, K. & Miura, N. (2006). Development and comparison of two immunoassays for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) based on surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **114**, 71–79.
- Silveira-Dórea, H. & Gomes Lopes, W. (2004). Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. *Quimica Nova*, **27**, 892–896.
- Silvina, N., Florencia, J., Nicolás, P., Cecilia, P., Lucía, P., Abbate, S., Leonidas, C.L., Sebastián, D., Yamandú, M., Verónica, C. & Horacio, H. (2017). Neonicotinoids

- transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor. *Science of the Total Environment*, **581–582**, 25–31.
- Skládal, P. (2003). Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14**, 491–502.
- Souza Tette, P.A., Guidi, L.R., Abreu Glória, M.B. De & Fernandes, C. (2016). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, **149**, 124–141.
- Steebhorn, C. & Skládal, P. (1997). Construction and characterization of the direct piezoelectric immunosensor for atrazine operating in solution. *Biosensors and Bioelectronics*, **12**, 19–27.
- Sternesjö, Å., Mellgren, C. & Björck, L. (1995). Determination of sulfamethazine residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay. *Analytical Biochemistry*, **226**, 175–181.
- SU, X., CHEW, F.T. & LI, S.F.Y. (2000). Design and Application of Piezoelectric Quartz Crystal-based Immunoassay. *Analytical Sciences*, **16**, 107–114.
- Su, X., Li, S.F.Y., Liu, W. & Kwang, J. (2000). Piezoelectric quartz crystal based screening test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs. *Analyst*, **125**, 725–730.
- Subramanian, A., Irudayaraj, J. & Ryan, T. (2006). A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 998–1006.
- Sun, H. & Fung, Y. (2006). Piezoelectric quartz crystal sensor for rapid analysis of pirimicarb residues using molecularly imprinted polymers as recognition elements. *Analytica Chimica Acta*, **576**, 67–76.
- Susmel, S., Guilbault, G.G. & O'Sullivan, C.K. (2003). Demonstration of labelless detection of food pathogens using electrochemical redox probe and screen printed gold electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 881–889.
- Szurdoki, F., Szekacs, A., Le, H.M. & Hammock, B.D. (2002). Synthesis of haptens and

- protein conjugates for the development of immunoassays for the insect growth regulator fenoxycarb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 29–40.
- Tao, X., Jiang, H., Zhu, J., Wang, X., Wang, Z., Niu, L., Wu, X., Shi, W. & Shen, J. (2014). An ultrasensitive chemiluminescent ELISA for determination of chloramphenicol in milk, milk powder, honey, eggs and chicken muscle. *Food and Agricultural Immunology*, **25**, 137–148.
- Thompson, M., Worsfold, P.J., Holuk, J.M. & Stubley, E.A. (1979). Electrochemical biosensors in the assay of antibiotics. *Analytica Chimica Acta*, **104**, 195–203.
- Tian, B., Fadhil, N.H., Powell, J.E., Kwong, W.K. & Moran, N.A. (2012). Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *mBio*, **3**.
- Tombelli, S. & Mascini, M. (2000). Piezoelectric quartz crystal biosensors: Recent immobilisation schemes. *Analytical Letters*, **33**, 2129–2151.
- Torres-Sánchez, L. & López-Carrillo, L. (2007). Efectos a la salud y exposición a p,p'-DDT y p,p'-DDE. El caso de México. *Ciencia e Saude Coletiva*, **12**, 51–60.
- Tsigouri, A.D., Menkissoglu-Spiroudi, U. & Thrasyvoulou, A. (2001). Study of tau-fluvalinate persistence in honey. *Pest Management Science*, **57**, 467–471.
- Tsiropoulos, N.G. & Amvrazi, E.G. (2011). Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography. *Journal of AOAC International*, **94**, 634-644.
- Valera, E., Muriano, A., Pividori, I., Sánchez-Baeza, F. & Marco, M.P. (2013). Development of a Coulombimetric immunosensor based on specific antibodies labeled with CdS nanoparticles for sulfonamide antibiotic residues analysis and its application to honey samples. *Biosensors and Bioelectronics*, **43**, 211–217.
- Vaughan, R.D., O'Sullivan, C.K. & Guilbault, G.G. (1999). Sulfur based self-assembled monolayers (SAM's) on piezoelectric crystals for immunosensor development. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **364**, 54–57.
- Venu, S., Santhi, K., Rawson, A., Paranthaman, R. & Sureshkumar, K. (2019). Liquid

- chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for the determination of carbaryl residue in honey. *Pharmacognosy Magazine*, **15**, 205.
- Vichapong, J., Burakham, R. & Srijaranai, S. (2015). In-coupled syringe assisted octanol-water partition microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of neonicotinoid insecticide residues in honey. *Talanta*, **139**, 21–26.
- Volante, M., Galarini, R., Miano, V., Cattaneo, M., Pecorelli, I., Bianchi, M., Marinoni, M.T., Cossignani, L. & Damiani, P. (2001). A SPME-GC-MS approach for antivarroa and pesticide residues analysis in honey. *Chromatographia*, **54**, 241–246.
- Wang, D., Hou, C., Zhao, E. & Jia, C. (2015). Determination of hexachlorocyclohexane and dichlorodi-phenyltrichloroethane residues in honey by gas chromatography-mass spectrometry combined with dispersive liquid-liquid microextraction. *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)*, **33**, 40–45.
- Wang, W.H., Han, Z.J., Liang, P.J., Guo, D.Q., Xiang, Y.J., Tian, M.X., Song, Z.L. & Zhao, H.R. (2017). Co₃O₄/PAn magnetic nanoparticle-modified electrochemical immunosensor for chlorpyrifos. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **12**, 1–9.
- Wang, Z., Li, Y., Chang, Q., Kang, J. & Pang, G.F. (2018). A detection and confirmation strategy for screening of veterinary drugs in honey by liquid chromatography coupled quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Methods*, **10**, 59–68.
- WHO. (2014). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. *World Health Organization*.
- WHO, W.H.O. (2018). *WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Talanta*.
- Wink, T., Zuilen, S.J. Van, Bult, A. & Bennekom, W.P. Van. (1997). Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst*, **122**, 43–50.
- Yang, X., Zhang, S., Yu, W., Liu, Z., Lei, L., Li, N., Zhang, H. & Yu, Y. (2014). Ionic liquid-

anionic surfactant based aqueous two-phase extraction for determination of antibiotics in honey by high-performance liquid chromatography. *Talanta*.

- Yavuz, H., Guler, G.O., Aktumsek, A., Cakmak, Y.S. & Ozparlak, H. (2010). Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, **168**, 277-283.
- Yu, C. & Hu, B. (2009). Sol-gel polydimethylsiloxane/poly(vinylalcohol)-coated stir bar sorptive extraction of organophosphorus pesticides in honey and their determination by large volume injection GC. *Journal of Separation Science*, **32**, 147–153.
- Yu, J., Wu, C. & Xing, J. (2004). Development of new solid-phase microextraction fibers by sol-gel technology for the determination of organophosphorus pesticide multiresidues in food. *Journal of Chromatography A*, **1036**, 101–111.
- Yu, Q., Chen, S., Taylor, A.D., Homola, J., Hock, B. & Jiang, S. (2005). Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **107**, 193–201.
- Zhang, Y., Li, X.Q., Li, H.M., Zhang, Q.H., Gao, Y. & Li, X.J. (2019). Antibiotic residues in honey: A review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **110**, 344-356.
- Zougagh, M., Valcárcel, M. & Ríos, A. (2004). Supercritical fluid extraction: A critical review of its analytical usefulness. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **23**, 399-405.



2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es la aplicación y validación de la tecnología de inmunosensores basados en microbalanza de cuarzo de alta frecuencia (HFF-QCM) para la detección de pesticidas y antibióticos en miel.

2.2. Objetivos Específicos

Objetivo específico 1: Obtención de curvas de calibración *en tampón de trabajo (PBS)* correspondientes a los pesticidas modelo carbaril y DDT, y al antibiótico modelo sulfatiazol mediante la tecnología HFF-QCM.

Objetivo específico 2: Estudio del efecto matriz y establecimiento de las condiciones de trabajo para aplicar los inmunosensores HFF-QCM al análisis de la matriz alimentaria miel.

Objetivo específico 3: Obtención de las curvas de calibración *en matriz miel* correspondientes a los pesticidas modelo carbaril y DDT, y al antibiótico modelo sulfatiazol mediante la tecnología HFF-QCM.

Objetivo específico 4: Validación de la tecnología de inmunosensores HFF-QCM para la detección de pesticidas y antibióticos en miel mediante la aplicación de la metodología SANCO.

Objetivo específico 5: Estudio comparativo de la tecnología HFF-QCM con técnicas cromatográficas de referencia.

Objetivo específico 6: Análisis de muestras reales de miel mediante inmunosensores HFF-QCM.



3. Plan de trabajo

3. Plan de trabajo

Para la consecución del **objetivo específico 1** “*Obtención de curvas de calibración en tampón de trabajo (PBS) correspondientes a los pesticidas modelo carbaril y DDT, y al antibiótico modelo sulfatiazol mediante la tecnología HFF-QCM*”, se realizaron las siguientes tareas:

Tarea 1: Puesta a punto del proceso de funcionalización del sensor

- Selección de la técnica de inmovilización del inmunoreactivo sobre los sensores
- Selección del protocolo de limpieza de los sensores previo a la inmovilización

Tarea 2: Puesta a punto del equipo HFF-QCM

- Formación en el manejo del equipamiento de las plataformas AWSA20, F20 y del software de control de las mismas
- Selección de la celda que aloja al sensor: Elección del diseño físico, material y dimensiones.
- Selección del tipo de soporte de fijación del sensor HFF-QCM: soporte PCB o marco de PPS.
- Selección del protocolo de regeneración del sensor para su puesta a punto en el siguiente ensayo.

Tarea 3: Selección de las concentraciones de trabajo de los inmunorreactivos: curvas/dosis respuesta para cada analito (DDT, Carbaril y Sulfatiazol).

Tarea 4: Obtención de la curva de calibración de los pesticidas (carbaril y DDT) y del antibiótico sulfatiazol en tampón de trabajo (PBS) mediante los inmunosensores HFF-QCM. Para ello se analizaron diferentes concentraciones de cada analito de estudio en PBS, y las señales obtenidas normalizadas se ajustaron a una ecuación matemática logística de 4 parámetros matemáticos (A, B, C y D), de los que se derivaron los parámetros analíticos característicos del inmunosensor: LOD, LOQ, WR y I_{50} en tampón de trabajo.

La consecución del **objetivo específico 2** “*Estudio del efecto matriz y establecimiento de las condiciones de trabajo para aplicar los inmunosensores HFF-QCM al análisis de la matriz alimentaria miel*”, se llevó a cabo realizando pruebas con diferentes diluciones de miel. Se seleccionó la dilución que mantenía una viscosidad de la muestra suficientemente baja para que no interfiriera en la respuesta del sensor, y una concentración del analito suficientemente alta para ser cuantificada.

Para la consecución del **objetivo específico 3** “*Obtención de las curvas de calibración en matriz miel correspondientes a los pesticidas modelo carbaril y DDT, y al antibiótico modelo sulfatiazol mediante la tecnología HFF-QCM*”, se analizaron diferentes concentraciones de cada analito en la dilución de miel elegida. Las señales obtenidas normalizadas se ajustaron a una ecuación

matemática logística de 4 parámetros matemáticos (A, B, C y D), de los que se derivaron los parámetros analíticos característicos del inmunosensor: LOD, LOQ, WR y I_{50} en matriz miel.

La consecución del **objetivo específico 4** “Validación de la tecnología de inmunosensores HFF-QCM para la detección de pesticidas y antibióticos en miel”, se realizó mediante el análisis de muestras de miel fortificadas a diferentes niveles con los pesticidas (carbaril y DDT) y con el antibiótico sulfatiazol mediante la tecnología HFF-QCM. Se interpolaron las señales obtenidas en la curvas de calibración previamente obtenidas, con el objetivo de evaluar la exactitud y precisión de esta nueva tecnología. Se evaluó el porcentaje de recuperación y los coeficientes de variación según los criterios establecidos en la guía SANCO/12571/2013. En concreto, se aplicó el método de validación para métodos cuantitativos propuesto en el apéndice A de dicha guía. En dicho apéndice se propone el experimental para validar un método analítico cuantitativo. Este experimental consiste en preparar 5 muestras independientes fortificadas, al menos a 3 niveles con el analito objeto de estudio. Los niveles de fortificación se establecen en función del límite de cuantificación del método (LOQ), siendo el nivel más bajo de fortificación el LOQ del método a estudiar, y los siguientes niveles de fortificación múltiplos del LOQ entre 2 y 10. A continuación, se inyecta en el equipo la siguiente secuencia: los estándares de calibración, un blanco de la fase móvil, un blanco de la muestra (sin fortificar), las 5 muestras fortificadas al LOQ del método, las 5 muestras fortificadas, al menos, a 3 niveles superiores al LOQ, y para finalizar, los estándares de calibración de nuevo.

Para la consecución del **objetivo específico 5** “Estudio comparativo de la tecnología HFF-QCM con técnicas cromatográficas de referencia” se llevaron a cabo las siguientes tareas:

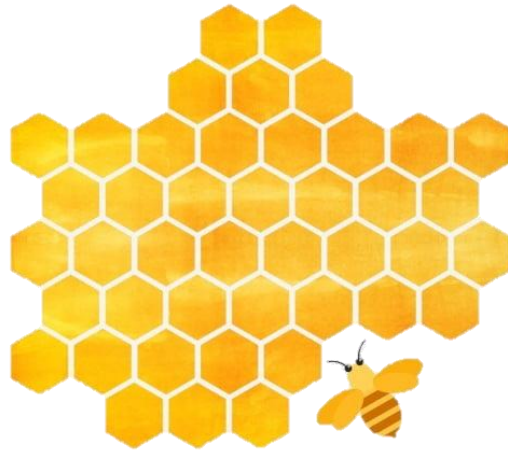
Tarea 1: Realización de curvas patrón, tanto en disolvente como en matriz miel, para cada analito mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Tarea 2: Análisis de muestras de miel fortificadas a diferentes niveles de pesticidas (carbaril y DDT) y del antibiótico sulfatiazol mediante LC-MS/MS.

Tarea 3: Comparación de los resultados obtenidos por ambas técnicas (HFF-QCM y LC-MS/MS) a partir de los siguientes parámetros: LOD, LOQ, WR, porcentajes de recuperación y coeficientes de variación.

Para la consecución del **objetivo específico 6** “Análisis de muestras reales de miel mediante inmunosensores HFF-QCM”, se analizaron muestras reales de miel (no fortificadas) de diferentes tipos y procedencias, con el objetivo de verificar la fiabilidad de esta nueva tecnología para

detectar los pesticidas (carbaril y DDT) y el antibiótico sulfatiazol. Los análisis fueron corroborados mediante LC-MS/MS.



4. Resultados

**4.1. HIGH FUNDAMENTAL FREQUENCY QUARTZ CRYSTAL
MICROBALANCE (HFF-QCM) IMMUNOSENSOR FOR PESTICIDE DETECTION
IN HONEY**

Lourdes Cervera-Chiner, Marisol Juan-Borrás, Carmen March, Antonio Arnau, Isabel Escriche,
Ángel Montoya & Yolanda Jiménez

Food Control, 92 (2018) 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.026>

Abstract

Quantification of chemical residues in honey is a market requirement to ensure consumer safety. The most common method used to analyze these compounds is the LC/MS/MS methodology, which requires highly qualified technicians and a tedious pre-treatment of the sample. The honey-packaging industry needs cheaper and faster alternatives for routine control. HFF-QCM (High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance) sensors are becoming a good option due to their high sensitivity, fast detection and low cost, while avoiding complex sample pre-treatment. The HFF-QCM technology is based on piezoelectric sensors with frequencies in the range from several tenths of MHz to hundreds of MHz. In this work a 100 MHz HFF-QCM sensor was used in a monoclonal antibody-based competitive immunoassay for specific bio-recognition of carbaryl pesticide as testing contaminant. The work intends to validate the use of HFF-QCM technology, in comparison with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique, for the detection of contaminants in honey. For this purpose, the validation criteria required by SANCO 12571/2013 guidance document were considered. The precision and accuracy (recovery) of both methods were determined by comparison of 5 replicates at 4 different concentrations (from 0 to 100 µg/kg) using the same honey matrix. HFF-QCM technology showed good accuracy, with recovery percentages always between 110 and 120%. As regards to precision, HFF-QCM coefficients of variation (CV) were around 10% higher than those recommended by GC SANCO 12571/2013. HFF-QCM limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were in the same order of magnitude as those for LC-MS/MS, which allows the analysis of carbaryl residues in honey under the established maximum residue limits (MRL), without sample pre-treatment. These results show that biosensors based on HFF-QCM technology has become a serious alternative to the traditional analytical techniques for food quality and safety applications.

Keywords: High-fundamental-frequency QCM; Piezoelectric immunosensors; Carbaryl; Pesticides; Honey

Introduction

Despite honey is a highly appreciated natural food with numerous properties and benefits, lately it has gone through many and frequent food alerts and consequently its health attributes have

been devalued. This is due to the extensive use of antibiotics and pesticides in veterinary and agricultural practices (Juan-Borrás, Domenech, & Escriche, 2016). In order to protect human health, these chemical hazards must be controlled to prevent pesticides reaching the food chain (Barganska, Slebioda, & Namiesnik, 2013). Quantification of chemical residues in honey imposed by specific regulation (EC regulation 396/2005) is a market requirement to ensure consumer safety. The most common analytical method used to quantify these residues is the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methodology (Juan-Borrás et al., 2016; Masiá, Suarez-Varela, Llopis-Gonzalez, & Picó, 2016; Souza Tette, Guidi, De Abreu Glória, & Fernandes, 2016). Although chromatographic methodology has key advantages such as sensitivity and accuracy, its high cost prevents its routine use in local laboratories. LC-MS/MS requires tedious sample pretreatment, which makes it unsuitable for on-line analysis. Moreover, it requires highly qualified technicians and high volumes of toxic solvent (Souza Tette et al., 2016). ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) is another frequently used method. It is based on antibody-antigen recognition, which offers high specificity and sensitivity, as well as cost-effectiveness (Abad & Montoya, 1997; González-Martínez et al., 1997; Marco, Gee, Cheng, Liang, & Hammock, 1993; Nunes, Toscano, & Barceló, 1998; Qian et al., 2009). However, ELISA often requires long incubation periods and repeated washing steps that make difficult their automation for on-line sample analysis (Mauriz, García-Fernández, & Lechuga, 2016). Routine control of pesticides in honey is carried out by the honey-packaging industry, which needs simpler, cheaper and faster screening methods than those currently used, while preserving their high sensitivity.

In this regard, piezoelectric immunosensors based on HFF-QCM (High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance) transducers are becoming a good alternative to on-line screening methods in food control due to their high sensitivity and specificity, fast real time detection and low cost, while avoiding complex sample pre-treatment. Disadvantages of the method are its high sensitivity to external disturbances such as pressure or temperature (Gaudin, 2017) and its low throughput. The latter is a key remaining challenge for QCM to be competitive with other immunological methods such as ELISA (Tatsuma, Watanabe, Oyama, Kitakizaki, & Haba, 1999). HFF-QCM immunosensor technology is based on the combination of highly specific antigen-antibody recognition with highly sensitive HFF-QCM transducers (March et al., 2015; Montoya et al., 2017). The transducer converts the bio-recognition events, which take place near its surface due to the presence of the pesticide in the sample, into a measurable electrical signal (electrical phase). This way, the concentration of the pesticide in the sample can be quantified by monitoring transducer phase shifts, (March et al., 2015; Montagut et al., 2011). Usually, a

second electrical parameter related to dissipation is monitored to ensure that other events different from bio-recognition, such as changes in viscosity or elasticity, do not significantly contribute to the sensor response (Jiménez *et al.*, 2006). This technology provides highly sensitive devices, able to improve about one order of magnitude the limits of detection (LOD) for pesticides such as carbaryl provided by optical transducers based on Surface Plasmon Resonance (García *et al.*, 2014; March *et al.*, 2015). Moreover, the carbaryl LOD achieved by HFF-QCM was in the same order of magnitude as that for ELISA. Therefore, HFF-QCM could be considered a suitable and reliable technique for the analysis of contaminants in complex matrices such as honey.

The aim of the present work was the application of the HFF-QCM technology, for the first time, to the detection of pesticides in honey. For this purpose, the N-methylcarbamate pesticide carbaryl was used as a model analyte, and the validation criteria required by GC SANCO 12571/2013 (European Commission, 2013) were followed. The analytical performance of the proposed method in terms of LOD, limit of quantification (LOQ), accuracy and precision, was compared to LC-MS/MS as reference technique.

Material and methods

Honey samples, reagents and immunoreagents

A carbaryl-free honey stock from the Spanish cooperative Melazahar (Valencia, Spain) was used as a “blank honey” and was fortified with the pesticide when required.

The reagents used for immobilization were: thiol compounds 11-mercapto-1-undecanol 97% (MUOH) and 16-mercaptohexadecanoic acid 90% (MHDA) from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany); 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and n-hydroxysuccinimide (NHS) from Pierce (Rockford, IL), and ethanolamine blocking agent from Sigma (St Louis, Mo). Immunoreagents [BSA-CNH protein-hapten conjugate used as assay conjugate and LIB-CNH45 monoclonal antibody (MAb)] were produced as described (Abad, Primo, & Montoya, 1997). Tween 20 surfactant was acquired from Fluka-Aldrich Chemie (St Louis, Mo).

Reagents used for LC-MS/MS were: formic acid (99%), acetonitrile and methanol, all of them from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). The composition of QuEChERS reagents was; QuEChERS I: 4 g of anhydrous magnesium sulfate, 1 g of sodium citrate tribasic dihydrate, 0,5 g

of sodium citrate dibasic sesquihydrate, the three from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and 1 g of sodium chloride from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). QuEChERS II: 100 mg of bonded silica (PSA) from Supelco (Bellefonte, USA) and 600 mg of anhydrous magnesium sulfate. All reagents were MS, HPLC or analytical grade.

The carbaryl standard, was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Ultrapure water was generated in-house from a Milli-Q 82 system (Millipore Corp., Billerica, MA).

HFF-QCM methodology

HFF-QCM immunosensor set-up

Piezoelectric sensors were supplied by AWSensors (Valencia, Spain, www.awsensors.com). They were square shaped 100 MHz AT-cut, inverted mesa crystals, with 36 mm² of total surface and with an etched area thickness of approximately 17 μm. The gold electrode active surface was 1 mm in diameter. The resonators were permanently fixed to a support of polyether ether ketone (PEEK) with a conical hole to expose the active surface of the gold electrode where interfacial events such as immunoassays will take place.

For the experiments, HFF-QCM sensors were placed into a flow-cell, designed and manufactured by AWSensors, taking into account the mechanical, electrical and chemical application requirements.

AWS A20 platform (AWSensors) was used for real-time characterization of the sensor response through the experiments performed in flow conditions. This platform consists of an electronic characterization system based on the fixed-frequency phase-shift measurement technique previously described (Montagut et al., 2011). The platform provides two electrical voltages directly related with the sensor phase and amplitude (u_{ϕ} and u_A). The AWS F20 platform (AWSensors) was used to generate a uniform flow through the sensor cell. This platform consists of an automated flow-through equipment controlled by syringe pumps (Hamilton, Bonaduz, GR, Switzerland) and thermostated at 25 °C. Sample injection was performed by an injection valve and a 250 μl loop. A degasser DEGASi[®] Compact from Biotech (Onsala, Sweden) was connected to the AWS F20 platform to prevent bubbles generation. The AWSuite software interface (AWSensors) was used to control both platforms and to register and process the acquired data.

Sensor functionalization

Covalent immobilization of HFF-QCM sensors was performed employing mixed self-assembled monolayers (mSAM) of alkane thiols as intermediate layers for surface functionalization. This

allowed the covalent attachment of the assay conjugate onto the gold electrode surface in a more orderly and stable way than with simple SAMs. With this aim, freshly cleaned crystals were placed in especially made immobilization cells (AWSensors). These cells were designed to expose only the active area of the sensors to functionalization reagents. The immobilization protocol was based on that previously described by March *et al.* (2015) with minor modifications: a) 250 μL of 0.25 mM solution of thiol compounds MUOH and MHDA in ethanol (50:1 molar ratio) was added to the immobilization cell cavity where the sensor active surface was confined; b) 250 μL ethanolic solution of EDC/NHS was incubated for 3.5 h; and c) 50 μL of BSA-CNH assay conjugate (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluted in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5 was placed onto the gold electrode active surface for 2.5 h, instead of 5 h.

Immunoassay format and protocol

The working conditions for carbaryl immunoassays were defined in the previous work by March *et al.* (2015). An indirect competitive immunoassay in the conjugate-coated format was employed. For the inhibition assays, a fixed concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LIB-CNH45 MAb was mixed (1:1 v/v) with the carbaryl standard solution or with the spiked honey samples. The mixture was pre-incubated for 1 h at 25 °C and 250 μL was pumped over the previously functionalized immunosensor surface. As the binding between free antibody and the immobilized conjugate took place, the variations in phase and amplitude were monitored in real time. The regeneration of the reactive surface was carried out with 0.1 M HCl to break the antibody-hapten conjugate binding.

Standard curve. Carbaryl calibration curves were performed in buffer solution (PBS: 10 mM phosphate-buffered saline solution, 0.9% NaCl, pH 7.4.) and in honey diluted with PBS (1:200). From a 1 mM carbaryl stock solution in N-N'-dimethylformamide, carbaryl standards in the $2 \cdot 10^3$ to $2 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ range were prepared by serial dilutions in PBS and in honey diluted with PBS. Standards were run four times, and calibration curves were subsequently obtained by plotting the phase shift vs analyte concentration. The experimental points were fitted to the four-parameters logistic equation:

$$y = D + (A - D)/(1 + (x/C)^B) \quad \text{(Equation 4)}$$

Where: x is the analyte concentration; y is the HFF-QCM signal (phase variation at the fixed fundamental frequency Δu_ϕ). A is the asymptotic maximum (maximum signal in the absence of analyte); B is the slope of the sigmoidal curve at the inflection point; C is the analyte

concentration giving 50% inhibition (I_{50} value) and D is the asymptotic minimum (background signal).

Standard curves were normalized by expressing the phase shift provided by each standard concentration as the percentage of the maximum response (maximum signal, $S_{\max}=100\%$) in the absence of analyte.

Immunoassay protocol. A 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ continuous flow rate of working buffer (PBST: PBS containing 0.005% Tween 20) was pumped through the sensor. When a nearly constant baseline was reached (signal variation less than 1 mV/min), the sample (250 μL of the pre-incubated antigen-antibody mixture) was injected. The interaction process was allowed to proceed for 20 min. Sensor regeneration was achieved by flowing 0.1 M HCl (4 min) followed by PBST (5 min), at 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ in both cases. Finally, the flow was returned to 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ in order to recover the baseline.

Honey sample preparation

The only requirement to make honey suitable for HFF-QCM immunosensor analysis was a 1/200 dilution in PBS. No other sample pre-treatment was needed.

Chromatographic methodology

Analytical standards

From a 1000 mg/L stock solution of carbaryl in methanol, stored at -20°C , a 1 mg/L working solution was prepared and stored at 4°C . The working solution was used to obtain the carbaryl standards (from 0.5 to 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ in methanol) for the calibration curve, and also to prepare the spiked honey samples at 20, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

LC-MS/MS procedure

Analytical determinations by the LC-MS/MS reference method were performed with an Agilent 1200 LC system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Agilent 6410 triple Quad LC/MS) with electrospray ionization source. The column used was Atlantis T3-C18 (100 mm x 2.1 mm, 3 μm particle size), from Waters (Mildford, Massachusetts), kept at 30°C . Chromatographic separation was carried out with a mobile phase composed by 0.5% formic acid (phase A) and methanol (phase B), with a flow rate of 0.3 mL/min. The elution program used was as follows: 5% B at 0 min and held for 0.3 min, increased to 20% B at 0.5 min, reaching 100% B at 6 min, where it was held during 2 min, then the percentage of B was decreased to 5% over 8.1 min

where it was held for 5 min (13 min total run time). The injection volume was 5 μ L. The operating parameters for the mass spectrometer were as follows: capillary voltage 4 kV; source temperature 350°C; nebulization gas (nitrogen) at a flow rate of 12 L/min and collision gas (nitrogen) at a 40 psi.

The monitored transitions (MRM) were 202>145.1 (qualitative information) and 202>117.1 (quantitative) with a collision energy of 5 and 10 respectively, setting the fragmentor to 80. The confirmation of the compounds in the samples was made taking into account: a) the analyte retention time, b) the presence of both transitions, and c) the ratio of both transitions.

Honey sample preparation

To extract the pesticide and to remove impurities from honey samples, a dispersive solid phase extraction technique following the QuEChERS procedure was performed. The protocol applied was: To 5 g of honey placed in a conical centrifuge tube, 10 mL of Milli-Q water was added and it was shaken manually until homogenization. Then, 10 mL of 0.1% formic acid in acetonitrile was added and shaken for 5 min. Subsequently, Quechers I was added and the mixture was shaken manually for 1 min and in a vortex for a further 1 min. The extract was centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The obtained supernatant (4 mL) was transferred to a 15 mL centrifuge tube containing Quechers II. This mixture was vortexed for 30 s and centrifuged again at 5000 rpm for 5 min. An aliquot of the supernatant was collected for subsequent LC-MS/MS analysis.

Method comparison

The comparison between HFF-QCM and LC-MS/MS methods was performed in accordance with SANCO 12571/2013 guidance document. The analytical performance of the methods was assessed in terms of precision (reproducibility and repeatability), accuracy (% recovery), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and working range. The maximum residue limit (MRL) established by the European Food Safety Authority (EFSA) for carbaryl in honey is 50 μ g/kg (Commission Regulation 1096/2014).

In analytical methods for compounds with established LMRs, it is recommended that the LOQ should be as low as (or even lower than) the MRL, i.e., the MRL should be included in the operative working range. For this reason, 20 μ g/kg was included as a fortification level.

Results and discussion

Standard calibration curves: Immunoassay sensitivity and matrix effect.

An immunoassay cycle performed in the HFF-QCM immunosensor is shown in **Figure 27**. After baseline stabilization sample was injected and changes in both phase (u_ϕ) and amplitude (u_A) were produced due to the specific binding of the MAb to the assay conjugate immobilized on the sensor surface. As shown, the phase voltage shift was evident and significant enough, whereas the amplitude voltage shift was negligible. Therefore, the phase voltage shift (Δu_ϕ) was selected as the suitable immunosensor signal to quantify the antibody-antigen interaction. After sensor regeneration, the baseline returned to its initial level.

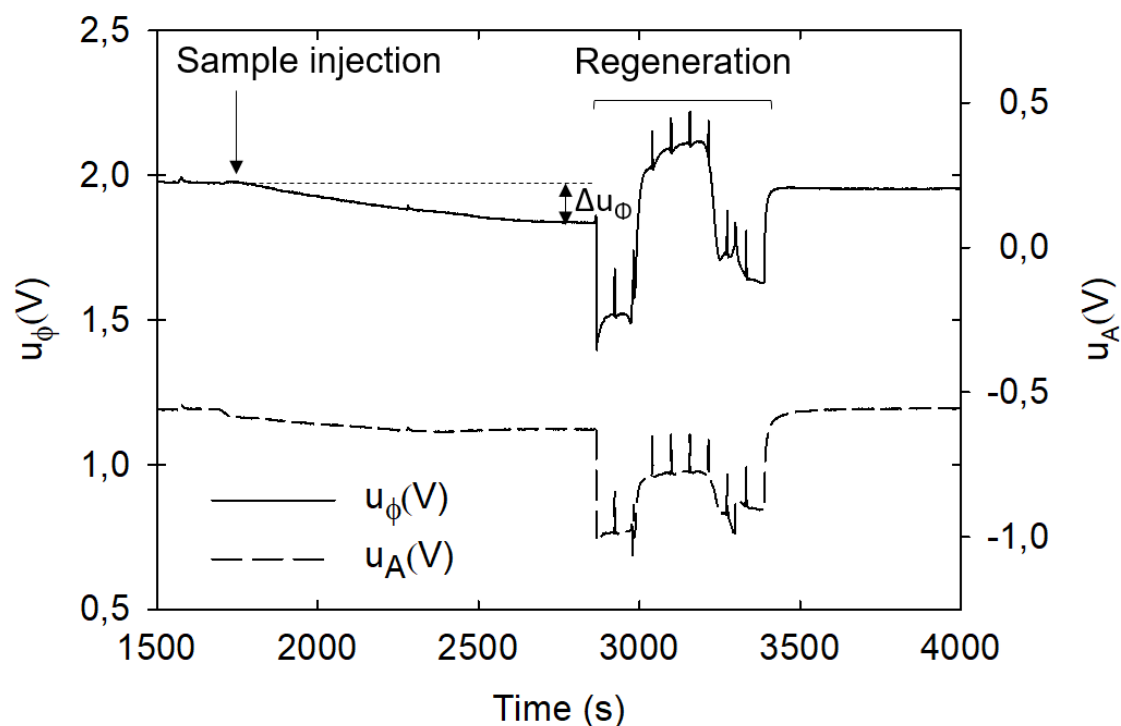


Figure 27. HFF-QCM Immunoassay cycle.

Determination of pesticide residues in honey is a challenge, due not only to their very low concentrations, but also to the interferences of the complex matrix on the analysis. (Souza Tette, Guidi, De Abreu Glória, & Fernandes, 2016). To assess the possible interference of the honey composition on HFF-QCM measurements and to minimize matrix effects (Caldow et al., 2005), the calibration curve was performed both in PBS and in PBS-diluted honey (1/200 p/V).

Both calibration curves were performed with carbaryl standards ranging between $2 \cdot 10^{-4}$ and $2 \cdot 10^3$ $\mu\text{g/L}$. The results are shown in **Figure 28**. Signals (phase voltage shifts) were normalized by expressing them as $100 \times \Delta u_{\phi} / \Delta u_{\phi 0}$, where Δu_{ϕ} is the phase change produced by a given carbaryl concentration and $\Delta u_{\phi 0}$ is the phase change obtained at zero analyte concentration (maximum signal). The experimental values were fitted to the mathematical logistic function according to **Equation 4**.

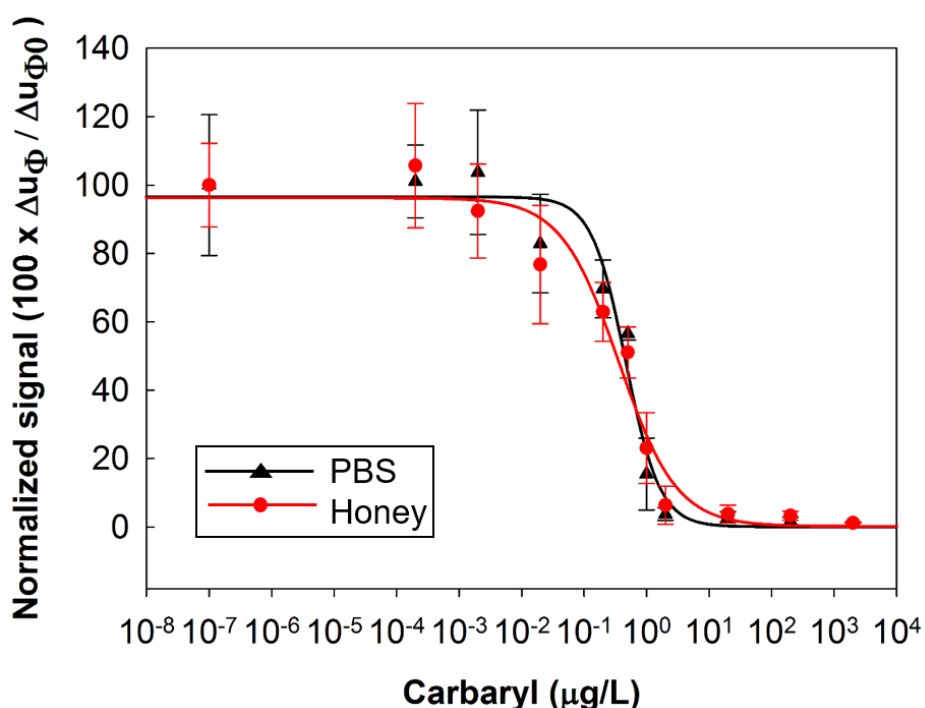


Figure 28. HFF-QCM carbaryl calibration curves in PBS and in honey diluted 1/200 in PBS. Each point is the average of 4 determinations. Vertical bars represent standard deviation.

As shown in **Figure 28**, standard curves had a typical decreasing sigmoidal shape, as expected for competitive immunoassays (Osterloh et al., 1989). Since a competition was established between the immobilized assay conjugate and the pesticide in the sample for binding to the limited free MAb, lower analyte concentrations produced the higher assay signals, whereas higher analyte concentrations provided the smaller ones. In both sigmoidal regressions, the D parameter (lower asymptote) was nearly zero, thus indicating a total inhibition at high carbaryl concentrations. Furthermore, no statistical differences were found for parameters A , B and C in both curves according to the t-test ($p < 0.05$). The analytical parameters obtained for the standard curves in PBS and in diluted honey are shown in **Table 6**. The I_{50} value is the analyte

concentration that produces the signal at the midpoint between the two asymptotes, and it is considered as an estimate of assay sensitivity.

Table 6. Analytical parameters obtained for the HFF-QCM standard curves of carbaryl in PBS and in 1/200 diluted honey.

Analytical parameter ($\mu\text{g/L}$)	PBS	1/200 diluted honey
I_{50}	0.465	0.360
LOD	0.118	0.035
LOQ	0.195	0.083
Working range	0.195 - 1.108	0.083 - 1.572

LOD and LOQ are concepts used to quantify the smallest concentration of the analyte that can be reliably detected and measured, respectively, by an analytical method. In HFF-QCM immunosensors, LOD and LOQ are defined as the pesticide concentrations that produce 10% and 20% of maximum signal inhibition, respectively. Finally, the working range is the linear portion of the calibration curve and is defined by the analyte concentrations providing 20% and 80% inhibition of the maximum signal.

As shown, the I_{50} values were quite similar in PBS and in diluted honey (the calculated I_{50} value in 1/200-diluted honey was in fact lower than that in PBS). Therefore, the dilution process applied to honey seemed to be effective to minimize matrix effects without reducing the assay sensitivity.

As for I_{50} value, LOD and LOQ seemed to improve (lower values) in diluted honey as compared to those obtained in PBS. Nevertheless, the differences observed were not statistically significant, so they were probably due to the assay variability. Likewise, the assay working range was very similar in both conditions, although a tendency to expand was found in diluted honey. This would probably facilitate the analysis of real honey samples.

In summary, the developed HFF-QCM immunosensor for carbaryl in 1/200 diluted honey showed a LOD of 0.035 $\mu\text{g/L}$ and a LOQ of 0.083 $\mu\text{g/L}$ in the assay, corresponding to 7 and 17 $\mu\text{g/kg}$, respectively, in undiluted honey. The LOD and LOQ of the LC-MS/MS method used as reference, calculated according to reference (Litte, 2015), were in the same order of magnitude

(2 and 10 $\mu\text{g/L}$, respectively). Therefore, both methods were comparable in terms of detectability.

Analysis of spiked honey samples: comparison with the LC-MS/MS method

A preliminary validation of the HFF-QCM immunosensor method was conducted in accordance with SANCO 12571/2013 guidelines. Five independent replicates of commercial honey were spiked at three different carbaryl concentrations, and the pesticide was subsequently analyzed with the HFF-QCM immunosensor. The honey stock used as blank matrix for fortification had a density of 1.4 g/mL. Therefore, potential honey matrix effects or interferences could be due to the high sample density, together with its high viscosity and sugar content. Accuracy was evaluated as the mean recovery percentage and precision was estimated from the coefficient of variation at each pesticide concentration.

Figure 29 shows a real screen record of the phase signals obtained for the consecutive injections of five honey samples spiked with 50 $\mu\text{g/kg}$ of carbaryl. As a reference, an initial injection of a non-spiked honey sample was run to show the maximum assay signal. The injection of honey samples and the regeneration reagent are indicated by continuous and dashed arrows, respectively. The measurement repetitiveness and the baseline stability can be observed.

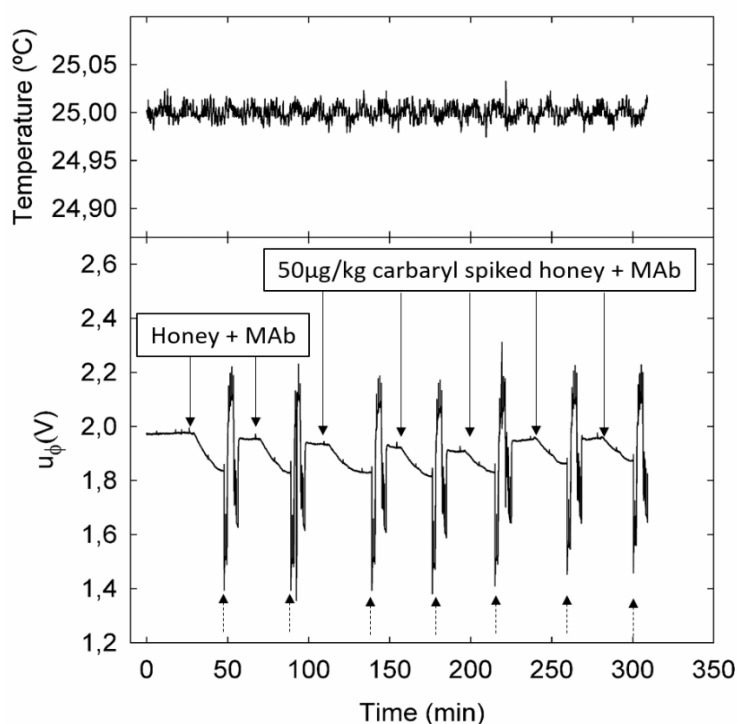


Figure 29. HFF-QCM immunosensor response of five independent honey samples spiked with carbaryl at 50 $\mu\text{g/kg}$. Continuous and dashed arrows mark the injection of honey samples and regeneration steps, respectively. The upper panel shows the temperature during the assays.

The reference method for carbaryl determination specified by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and by the World Health Organization (WHO) is reverse phase high performance liquid chromatography using UV detection and external standardization (FAO specifications and evaluations for carbaryl, 2006). Nevertheless, in this work LC-MS/MS was used for comparison with HFF-QCM because of its higher sensitivity (Debayle, Dessalces, & Grenier-Loustalot, 2008).

In **Table 7** the results obtained with HFF-QCM and LC-MS/MS methods for carbaryl-spiked honey samples are compared in terms of accuracy and precision. Honey samples were fortified in the 20-100 µg/kg range and blank honey (zero carbaryl level) was included to account for false positives. As shown, HFF-QCM technology showed good accuracy, with recovery percentages ranging from 110 to 120%. No false positives were detected in non-spiked honey.

Table 7. Analysis of carbaryl spiked honey samples. Comparison of HFF-QCM technology with LC-MS/MS.

Analysis of carbaryl in spiked honey samples*						
Fortified level	Detected	Recovery	CV (%)	Detected	Recovery	CV (%)
(µg/kg)	(µg/kg)	(%)		(µg/kg)	(%)	
HFF-QCM ¹			LC-MS/MS ²			
0	<LOD	No false positives		<LOD		
20	22 ± 7	110	32	21 ± 4	106	20
50	57 ± 19	115	33	43 ± 10	85	23
100	117 ± 29	117	25	101 ± 11	101	11

*Average of 5 independent replicates

¹ Sample dilution factor 1/200

² Sample dilution factor 1/2

To compare the accuracy of the HFF-QCM immunosensor and the LC-MS/MS method, their respective results when applied to honey samples spiked with the mentioned carbaryl concentrations were correlated with the fortification levels (**Figure 30**). Both methods provided good linear regressions, with correlation coefficients of 0.999 and 0.992 for HFF-QCM and LC-MS/MS, respectively. *Y* intercept was near zero for both models, which is in agreement with the

absence of false positives. The linear regression slopes were 1.14 for HFF-QCM and 1.02 for LC-MS/MS, without any statistically significant difference according to the t-test. Therefore, we could assume that both techniques are statistically equivalent.

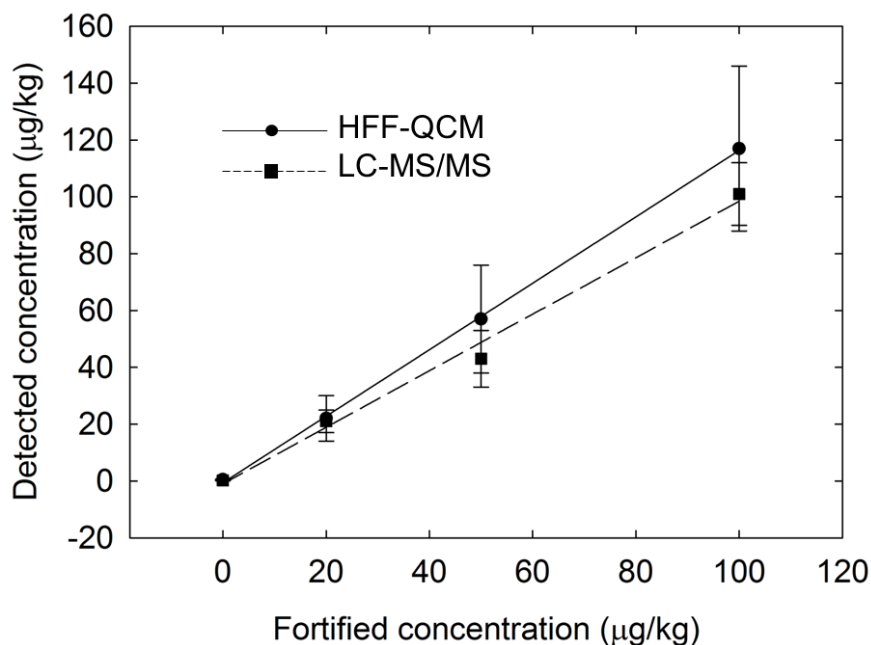


Figura 30. Comparison of HFF-QCM and LC-MS/MS in the analysis of fortified honey samples.

As regards to precision, at any of the assayed fortification levels HFF-QCM technology gave coefficients of variation (CV) around 10% higher than those established by SANCO. To this respect, dispersion has been pointed out in the literature (Gaudin, 2017) as a drawback of traditional QCM sensors working at low frequencies (5-10 MHz). Piezoelectric transducers are very sensitive to external disturbances such as thermal variations or pressure changes (evidenced as bubbles). In our experiments, the temperature was continuously controlled and kept at 25°C by AWS A20 and F20 platforms. Moreover, an external degasser was incorporated to the set-up to prevent bubbles on the sensor surface. As previously reported (Johannsmann, 2015), measurements made on the fundamental mode of the sensor have greater dispersion than those made at its third overtone, being energy trapping and electric fringe fields putative sources of this behavior. This possibility will be checked in future work by using 50 MHz fundamental frequency sensors working at its third harmonic.

Other possible sources of dispersion could be the variability in the manual process of sensor functionalization when measurements are made with different sensors, or differences in surface regeneration when measurements are performed with the same sensor.

Conclusions

To our knowledge, this is the first report dealing with pesticide detection in honey using the HFF-QCM technology. The developed HFF-QCM immunosensor is able to determine carbaryl in honey with a limit of quantification 17 µg/kg without any sample pre-treatment. Only a 1/200 sample dilution is required to minimize matrix effects. Therefore, this method allows the analysis of carbaryl residues in honey down to the levels established by the current European legislation (MRL= 50 µg/kg, (Commission Regulation 1096/2014).

A preliminary validation of the immunosensor method was conducted in accordance with SANCO 12571/2013 guidelines. The HFF-QCM immunosensor has proved to be accurate enough, with recovery percentages between 110 and 120% and the absence of false positives. As regards to precision, coefficients of variation ranged from 25 to 33%, not reaching the high standards recommended by SANCO 12571/2013 criteria. Further work with the aim of improving the method precision is going on, including the use of 50 MHz fundamental frequency sensors working at its third harmonic.

Immunosensors based on HFF-QCM technology could be a reliable alternative to current techniques for pesticide quantification in honey, since they are able to reach the limits of detection and quantification offered by traditional chromatographic methods such as LC-MS/MS, without the need of sample pre-treatment.

Acknowledgments

The authors are grateful for financial support from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain under the project AGL2013-48646-R. We also want to thank "Generalitat Valenciana" and European Social Fund for the financial support to hire research personnel through the grant "Ayudas para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral" to carry out this research (ACIF/2016/132).

References

Abad, A., & Montoya, A. (1997). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 2. Assay Optimization and Application to the Analysis of Water Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1495–1501. <https://doi.org/10.1021/jf950691w>

- Abad, A., Primo, J., & Montoya, A. (1997). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 1. Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassay Formats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1486–1494. <https://doi.org/10.1021/jf9506904>
- Barganska, Z., Slebioda, M., & Namiesnik, J. (2013). Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food Control*, 31, 196-201.
- Caldow, M., Stead, S. L., Day, J., Sharman, M., Situ, C., & Elliott, C. (2005). Development and Validation of an Optical SPR Biosensor Assay for Tylosin Residues in Honey Development and Validation of an Optical SPR Biosensor Assay for Tylosin Residues in Honey. *Work*, 7367–7370. <https://doi.org/10.1021/jf050725s>
- Commission Regulation (EU) No 1096/2014 of 15 October 2014 amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for carbaryl, procymidone and profenofos in or on certain products Text with EEA relevance
- Debayle, D., Dessalces, G., & Grenier-Loustalot, M. F. (2008). Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), 1011–1020. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2003-2>
- European Commission 396/2005. EU legislation on MRLs.
- European Commission. (2013). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. *Sanco/12571/2013*, 1–46.
- FAO specifications and evaluation for Carbaril (2006). http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Carbaryl07.pdf
- García, J. V., Rocha, M. I., March, C., García, P., Francis, L. A., Montoya, A., ... Jimenez, Y. (2014). Love Mode surface acoustic wave and high fundamental frequency quartz crystal microbalance immunosensors for the detection of carbaryl pesticide. *Procedia Engineering*, 87, 759–762. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.11.649>
- Gaudin, V. (2017). Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, 90(September 2016), 363–377. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.005>
- González-Martínez, M. A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., Abad, A., & Montoya, A.

- (1997). Development of an automated controlled-pore glass flow-through immunosensor for carbaryl. *Analytica Chimica Acta*, 347(1–2), 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00003-2)
- Jiménez, Y., Otero, M. & Arnau, A. (2008) Piezoelectric transducers and applications. Ed. Springer Verlag. ISBN: 978-3-540-77507-2
- Johannsmann, D. (2015) The Quartz Crystal Microbalance in Soft Matter Research. Fundamentals and Modeling. Ed: Springer. ISBN: 978-3-319-07836-6
- Juan-Borrás, M., Domenech, E., & Escriche, I. (2016). Mixture-risk-assessment of pesticide residues in retail polyfloral honey. *Food Control*, 67, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.051>
- Little, T. (2015). Method Validation Essentials, Limit of Blank, Limit of Detection, and Limit of Quantitation. *BioPharm International*, 28 (4).
- March, C., García, J. V., Sánchez, Á., Arnau, A., Jiménez, Y., García, P., ... Montoya, Á. (2015). High-frequency phase shift measurement greatly enhances the sensitivity of QCM immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 65, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.001>
- Marco, M. P., Gee, S. J., Cheng, H. M., Liang, Z. Y., & Hammock, B. D. (1993). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Carbaryl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3), 423–430. <https://doi.org/10.1021/jf00027a015>
- Masiá, A., Suarez-Varela, M. M., Llopis-Gonzalez, A., & Picó, Y. (2016). Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 936, 40–61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.023>
- Mauriz, E., García-Fernández, M. C., & Lechuga, L. M. (2016). Towards the design of universal immunosurfaces for SPR-based assays: A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 79, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.006>
- Montagut, Y., García, J. V., Jiménez, Y., March, C., Montoya, Á., & Arnau, A. (2011). Validation of a phase-mass characterization concept and interface for acoustic biosensors. *Sensors*, 11(5), 4702–4720. <https://doi.org/10.3390/s110504702>
- Montoya, A., March, C., Montagut, Y., Moreno, M., Manclus, J., Arnau, A., ... Torres, R. (2017). A High Fundamental Frequency (HFF)-based QCM Immunosensor for Tuberculosis Detection.

Current Topics in Medicinal Chemistry, 17(14), 1623–1630.
<https://doi.org/10.2174/1568026617666161104105210>

Nunes, G. S., Toscano, I. A., & Barceló, D. (1998). Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 17(2), 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00116-7)

Osterloh K.R.S., Smith G.D., Peters T.J. (1989) Interpolation in Assay Systems with a Sigmoid Response Curve. In: Pal S.B. (eds) *Reviews on Immunoassay Technology*. Palgrave Macmillan, London.

Qian, G., Wang, L., Wu, Y., Zhang, Q., Sun, Q., Liu, Y., & Liu, F. (2009). A monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of the organophosphorous pesticides chlorpyrifos-methyl in real samples. *Food Chemistry*, 117(2), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.097>

Souza Tette, P. A., Guidi, L. R., De Abreu Glória, M. B., & Fernandes, C. (2016). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, 149, 124–141. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>

Tatsuma, T., Watanabe, Y., Oyama, N., Kitakizaki, K., & Haba, M. (1999). Multichannel quartz crystal microbalance. *Analytical Chemistry*, 71(17), 3632–3636. <https://doi.org/10.1021/ac9904260>

**4.2. DETECTION OF DDT AND CARBARYL PESTICIDES IN HONEY BY MEANS
OF IMMUNOSENSORS BASED ON HIGH FUNDAMENTAL FREQUENCY
QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE (HFF-QCM)**

Lourdes Cervera-Chiner, Carmen March, Antonio Arnau, Yolanda Jiménez & Ángel

Montoya

Journal of Science of Science of Food and Agriculture, 100 (6), 2468-2472. (2020)

<https://doi.org/10.1002/jsfa.10267>

Abstract

In the last years, there is a concern about the presence of pesticides in honey since residues of DDT and carbaryl were found in honey samples. The traditional techniques, such as chromatography, reach the required limits of detection (LOD) but are not suitable for in-situ implementation in honey packaging industry due to their high cost and the need of highly qualified staff for routine operation. Biosensors offer simplicity, low cost and easy handling for analytical purposes in food applications. Piezoelectric immunosensors based on High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) have been developed for detection of carbaryl and DDT in honey. The biorecognition was based on competitive immunoassays in the conjugate-coated format, using monoclonal antibodies as specific immunoreagents. The assay LODs attained by the HFF-QCM immunosensors were 0.05 µg/L for carbaryl and 0.24 µg/L for DDT, thus reaching a similar detectability to that of the usual reference techniques. The practical LODs in honey samples were 8 µg/kg for carbaryl and 24 µg/kg for DDT. The immunosensors analytical performance allow the detection of these pesticides in honey at EU regulatory levels with good accuracy (recovery percentages ranging from 94 to 130% within the working range of each pesticide standard curve) and precision (coefficients of variation in the 9-36% range). The proposed immunosensor is a promising analytical tool that could be implemented for quality control in the honey packaging industry, in order to ease and to cheapen the routine pesticide analysis in this appreciated natural food.

Keywords : Immunosensors; HFF-QCM; pesticides; carbaryl; DDT; honey.

Introduction

The control of chemical residues in honey marketing is an essential requirement to ensure consumer safety. In the last years there is a concern about the presence of pesticides in honey since residues of DDT and carbaryl were found in honey samples (Blasco *et al.*, 2003; Rissato *et al.*, 2007; Ruiz-Toledo *et al.*, 2018), with the subsequent potential health risk. The available equipment and techniques, such as high-performance liquid chromatography (HPLC), reach the required limits of detection (LOD) (Juan-Borrás *et al.*, 2016) but are not suitable for in-situ implementation in honey packaging industry due to their high cost and the need of highly qualified staff for routine operation. The use of biosensors for analytical purposes in food applications is increasing because of their simplicity, low cost and easy handling. In particular, piezoelectric immunosensors are becoming an interesting alternative to classical immunoassays

for pesticide detection since they offer the advantages of real-time output, sensitivity, simplicity, and cost-effectiveness, without the requirement of reagent labeling (Marrazza, 2014). We have recently developed piezoelectric immunosensors based on High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) for the detection of pesticides (March *et al.*, 2015; Cervera-Chiner *et al.*, 2018) and disease biomarkers (Montoya *et al.*, 2016). This powerful technology, which combines the high sensitivity of HFF-QCM transducers with the extreme selectivity provided by monoclonal antibodies involved in antigen-antibody interactions, is consolidating as a real option for the analytical control of chemical residues in food. As compared to traditional methods, HFF-QCM immunosensors offer lower cost, less sample and reagent consumption, label-free detection and direct, real time signal transduction.

The aim of the present work is the application of the HFF-QCM immunosensor technology to pesticide detection in honey. Two insecticides were chosen as model analytes due to the relevance of their presence in honey: the N-methylcarbamate carbaryl and the organochlorine DDT. The analytical performance of these immunosensors to reveal carbaryl and DDT residues in honey was assessed.

Material and methods

Honey samples, reagents and immunoreagents

Two pesticide-free honey samples, as determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) for DDT detection (Blasco *et al.*, 2003) and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) for carbaryl detection (Venu *et al.*, 2019) were employed for analysis. A carbaryl-free thyme honey stock from the Spanish cooperative (Valencia, Spain) was used for carbaryl experiments. A DDT-free honey sample (Bee Natura, S.L.) from an ecological lavender grown in Sierra Calderona region (Valencia, Spain) was employed for DDT experiments.

Immunoreagents were high affinity anti-carbaryl and anti-DDT monoclonal antibodies (MAbs LIB-CNH45 and LIB-DDT5.25, respectively) used in combination with specific assay conjugates (BSA-CNH and BSA-DDT5, respectively). All of them had been previously produced as reported (Abad *et al.*, 1997b,a).

HFF-QCM immunosensor set up

100 MHz AT-cut quartz crystals with a 1.00 mm diameter gold electrode were used as transducer elements for the immunosensor (AWSensors, Valencia, Spain). For the experiments, HFF-QCM sensors were placed into a flow-cell suitable for operation at high frequencies (AWSensors, Valencia, Spain). All assays were performed in the AWS A20 platform combined with the AWS

F20 flow module (AWSensors) for real-time recording of the frequency and resistance produced as sensor responses during the assays. A uniform flow of PBST (PBS: 10 mM phosphate-buffered saline solution, 0.9% NaCl, pH 7.4, with 0.005% Tween 20) was maintained through the sensor cell by an automated flow-through equipment provided with a degasser.

Sensor functionalization

Sensors were functionalized by covalent immobilization of the BSA-CNH or BSA-DDT5 assay conjugates onto the gold electrode surface, using mixed self-assembled monolayers (mSAM) of alkane-thiols and acids as intermediate layers for conjugate attachment, as described in a previous work (Cervera-Chiner *et al.*, 2018). The concentrations of the assay conjugates were previously optimized in order to get maximum assay signals ($S_{\max} \geq 1000$ Hz) with minimum reagent consumption. They were $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the BSA-CNH conjugate for carbaryl and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the BSA-DDT5 conjugate for DDT.

Immunoassay format and protocol

For each pesticide, a MAb-based competitive immunoassay was integrated as the sensing specific bio-recognition event coupled to the HFF-QCM transducer. To perform the competitive immunoassays, a fixed and limiting concentration of each specific monoclonal antibody was used.: $2.0 \mu\text{g/mL}$ of LIB-CNH45 MAb and $1.0 \mu\text{g/mL}$ LIB-DDT5.25 MAb for carbaryl and DDT assays, respectively. Monoclonal antibody preparations were mixed (1:1 v/v) with different concentrations of pesticide standard solution or with spiked honey samples. This way, the final MAb concentrations were $1.0 \mu\text{g/mL}$ in carbaryl immunoassays and $0.5 \mu\text{g/mL}$ in DDT immunoassays. The sample-antibody mixtures were pre-incubated for 10 minutes at 25°C , and $250 \mu\text{L}$ was pumped over the functionalized immunosensor. The running buffer was PBST at a flow rate of $20 \mu\text{L/min}$. A competition was subsequently established between the analyte present in the sample and the immobilized conjugated hapten for binding to the limiting recognition sites provided by the antibody. Only the antibody molecules that remained free in the mixture was able to bind to the immobilized conjugate, thus decreasing the resonance frequency of the sensor. Immunosensor regeneration between assays was achieved by flowing 0.1 M HCl for 4 min at $250 \mu\text{L/min}$ through the surface of the sensor, in order to break the antibody-conjugate binding, followed by 5 min with PBST at $250 \mu\text{L/min}$ and 5 min with PBST at $20 \mu\text{L/min}$.

Standard calibration curves

Calibration curves for the determination of carbaryl and DDT were performed in honey with the respective HFF-QCM immunosensors by assaying different pesticide concentrations in the 10^{-4} – $10^3 \mu\text{g/L}$ range. Standards were prepared from a 1 mM carbaryl stock solution in N-N'-

dimethylformamide and from a 2.85 mM DDT stock solution in 1,4- dioxane. In order to minimize matrix effects, honey was diluted in PBS: 1/200 for carbaryl assays and 1/140 for DDT assays. Each standard concentration was measured in triplicate and calibration curves were subsequently obtained by plotting the normalized assay signal (frequency) vs analyte concentration.

Frequency signals were normalized as the percentage of the frequency shift provided by each standard concentration with respect to the maximum response in the absence of analyte (maximum assay signal, $S_{\max}=100\%$). The experimental values were fitted to the usual four-parameter logistic equation as previously described (Cervera-Chiner *et al.*, 2018).

Analysis of honey samples

Pesticide-free (as previously determined by LC-MS/MS) thyme honey samples were spiked with carbaryl at 0, 20, 50, 100, 200 and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pesticide-free (as previously determined by GC-MS) lavender honey samples were spiked with DDT at 0, 20, 50, 100, 200, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No sample pre-treatment other than PBS dilution (1/200 and 1/140 for carbaryl and DDT determinations, respectively) was required for pesticide analysis in honey samples. Assay signals produced by samples were interpolated in their respective standard curves performed in honey, and recovery and coefficient of variation were subsequently evaluated.

Moreover, six non-spiked honey samples from different origin (lavender, rosemary, eucalyptus, orange tree, oak tree and mixed-flower) and commercial source (supermarkets, honey cooperatives, etc) were analyzed by HFF-QCM in order to detect carbaryl and DDT.

Results

Standard calibration curves in honey

Each complete cycle took around 35 minutes, including regeneration with 0.1 M HCl and washing with PBST. The S_{\max} taken as the reference signal ($\geq 1000 \text{ Hz} \equiv 100\%$) was consistently reliable during 80-100 cycles. After that, a progressive S_{\max} decrease was observed and, although sensors were still usable, their sensitivity was lower probably due to the damage of the surface caused by the regeneration treatment with HCl. This phenomenon has also been reported in previous work using biosensors when many assay cycles were performed (González-Martínez *et al.*, 1997; Mauriz *et al.*, 2007; March *et al.*, 2009).

The normalized carbaryl and DDT calibration curves obtained in honey with the respective immunosensors are shown in **Figure 31**. They follow the decreasing sigmoidal shape typically associated to competitive immunoassays (ELISA and immunosensors). DDT assays showed less

dispersion (standard deviations (SD) in the 0.3–5.0 % range) than carbaryl assays (SD in the 1–18 % range).

The analytical parameters obtained for the HFF-QCM immunosensors are summarized in **Table 8**. The I_{50} value is the analyte concentration that produces 50% inhibition of the maximum assay signal. This value is usually accepted as an estimate of the sensitivity in competitive immunoassays. In the present study, I_{50} values were 0.41 $\mu\text{g/L}$ for carbaryl and 1.94 $\mu\text{g/L}$ for DDT. In HFF-QCM immunosensors with competitive standard curves, the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) are defined as the pesticide concentrations that produce 10% and 20% inhibition of the maximum signal, respectively. In this case, the immunosensor LODs were 0.05 $\mu\text{g/L}$ for carbaryl and 0.24 $\mu\text{g/L}$ for DDT. The working range is defined as the region comprised between the analyte concentrations providing 20% and 80% inhibition of the maximum signal, which in a decreasing sigmoidal model roughly coincides with the linear portion of the calibration curve. For these immunosensors, the LOQs were 0.11 $\mu\text{g/L}$ and 0.52 $\mu\text{g/L}$ for carbaryl and DDT, respectively.

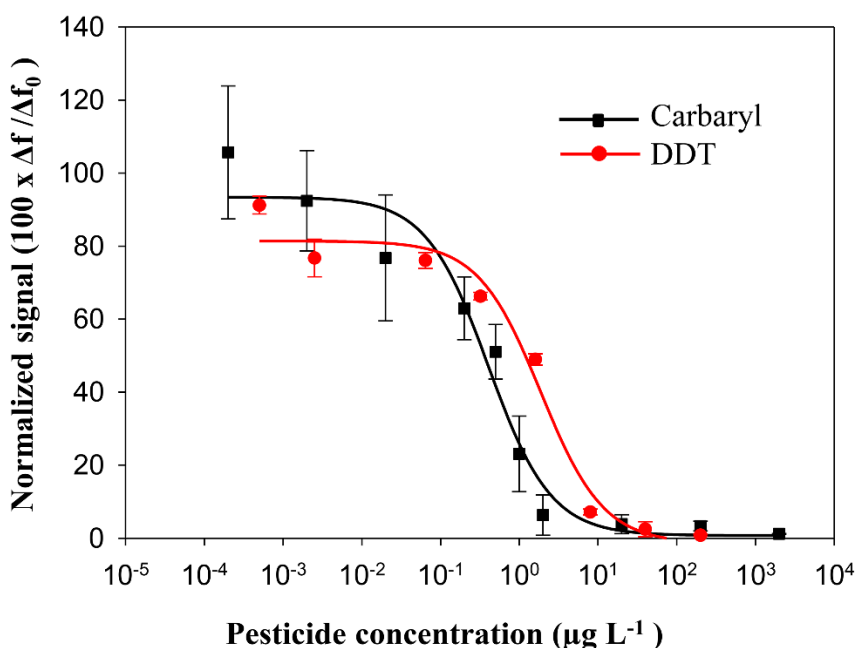


Figure 31. Calibration standard curves of the HFF-QCM immunosensors for carbaryl and DDT. Curves were performed in PBS-diluted honey: 1/200 for carbaryl and 1/140 for DDT. Each point is the mean \pm SD of three replicates.

Table 8. Analytical parameters obtained for the HFF-QCM immunosensor of carbaryl and DDT in standard assays and in real honey samples.

Analytical parameters in assay ($\mu\text{g/L}$)	Carbaryl	DDT
I_{50}	0.41	1.94
LOD	0.05	0.24
LOQ	0.11	0.52
Working range	0.11 – 1.44	0.52 – 7.26
Analytical parameters in honey ($\mu\text{g/kg}$)	Carbaryl	DDT
LOD	8	24
LOQ	16	52
Working range	16 – 206	52 – 726

The detectability attained by the HFF-QCM pesticide immunosensors in standard assays is similar to that reported for other reference techniques. LODs for DDT obtained by GC-MS/MS were around $0.7 \mu\text{g/L}$ (Sapozhnikova *et al.*, 2015). LODs reached by ELISA were $0.11 \mu\text{g/L}$ for DDT and $1.2 \mu\text{g/L}$ for carbaryl, (Sun *et al.*, 2010), and SPR immunosensors reached LODs of $1.38 \mu\text{g/L}$ for carbaryl and $0.032 \mu\text{g/L}$ for DDT (Mauriz *et al.*, 2006, 2007).

Taking into account the dilution factor of honey required to minimize matrix effects in the immunosensors (1/200 for carbaryl, 1/140 for DDT) and the average honey density (1.4 g/mL), the practical immunosensor LODs in honey were $8 \mu\text{g/kg}$ for carbaryl and $24 \mu\text{g/kg}$ for DDT. The respective LOQs were 16 and $52 \mu\text{g/kg}$, and the assay working ranges were 16 – 206 $\mu\text{g/kg}$ for carbaryl and 52 – 726 $\mu\text{g/kg}$ for DDT. This results show that HFF-QCM immunosensors allow the determination of carbaryl and DDT in honey samples at the levels established by the EU (Maximum Residue Limit: MRL = $50 \mu\text{g/kg}$).

Analysis of spiked and non-spiked honey samples

An example of a real record of the frequency signals obtained in honey analysis with the DDT immunosensor is shown in **Figure 32**. Arrows indicate the injection of honey samples and brackets indicate the regeneration cycles with 0.1 M HCl. The two first assays producing the reference maximum signal (maximum frequency decrease) correspond to the mixture of non-spiked honey with the anti-DDT MAb ($1.0 \mu\text{g/mL}$ LIB-DDT5.25). The next three assays correspond to a honey sample spiked with $200 \mu\text{g/kg}$ DDT and mixed with $1.0 \mu\text{g/mL}$ of anti-DDT MAb. As it can be appreciated, a significant signal inhibition (less frequency decrease) was produced by the presence of the analyte. The last assay is again the reference one (non-spiked, DDT-free honey sample) to verify the maintenance of the maximal assay signal.

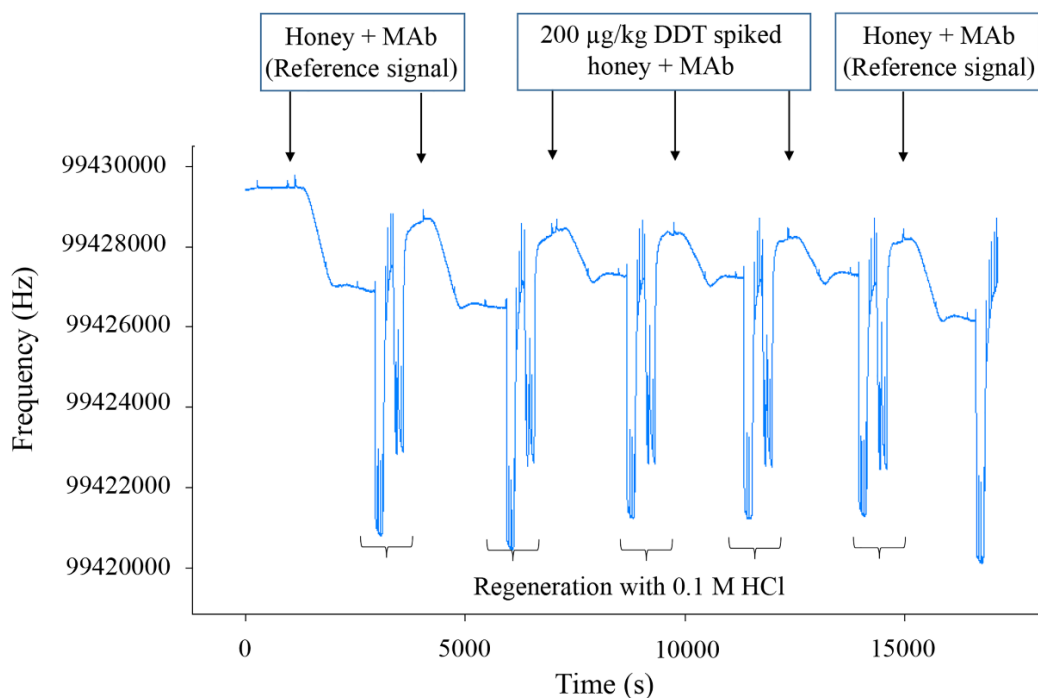


Figure 32. HFF-QCM immunosensor response: Two replicates of non-spiked honey (reference signal), followed by three replicates of honey spiked with 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ DDT and a new reference, non-spiked honey sample. The blue line shows the frequency variation during the assays. Arrows indicate the injection of honey samples and the horizontal brackets (lower part) indicate the regeneration step.

Results obtained when carbaryl- and DDT-spiked honey samples were analyzed with the HFF-QCM immunosensors are presented in **Table 9**. In samples spiked with carbaryl at concentrations within the carbaryl immunosensor working range (16 – 206 $\mu\text{g/kg}$), recoveries from 94 to 117% were obtained with coefficients of variation ranging from 20 to 33%. For the fortification level out of the working range (500 $\mu\text{g/kg}$), the recovered concentration was clearly underestimated (26% recovery with 21% coefficient of variation). This is caused by the extremely low slope of the asymptotic stretch of the calibration curve in this area, which produces a dramatic loss of assay sensitivity. Regarding honey samples fortified with DDT, recoveries from 98 to 130% were obtained for concentrations within the DDT immunosensor working range (52 – 726 $\mu\text{g/kg}$), with coefficients of variation below 20% with the exception of the 500 $\mu\text{g/kg}$ fortification level (36% coefficient of variation). For concentrations out of the working range (1000 $\mu\text{g/kg}$ DDT), similar behaviour to the carbaryl assay was observed, though in this case the recovered concentration was overestimated (260% recovery). In both immunosensors, analyte

concentrations lower than the respective LODs were undetectable. Moreover, no false positives were found in non-spiked, pesticide-free honey samples.

Regarding the analysis of non-spiked real honey by means of the HFF-QCM immunosensor, neither DDT nor carbaryl were detected in any of the six measured samples.

Table 9. Analysis of spiked honey samples (carbaril and DDT) by means of the HFF-QCM immunosensors.

Pesticide	Fortified level in honey ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Dilution factor	Found* ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CV (%)	Recovery (%)
Carbaryl	0	200	< LOD	-	-
	20	200	22 ± 7	32	110
	50	200	57 ± 19	33	115
	100	200	117 ± 29	25	117
	200	200	188 ± 37	20	94
	500	200	128 ± 27	21	26
DDT	0	140	< LOD	-	-
	20	140	< LOD	-	-
	50	140	50 ± 5	9	100
	100	140	101 ± 10	10	101
	200	140	197 ± 37	19	98
	500	140	648 ± 233	36	130
	1000	140	2603 ± 214	8	260

* Mean \pm standard deviation of three replicates.

Conclusion

Highly sensitive HFF-QCM immunosensors for the determination of carbaryl and DDT insecticides in honey were developed using functionalized 100 MHz quartz crystals as transducers and specific monoclonal antibodies as bio-recognition elements. The limits of detection and quantification and the assay working range of the immunosensors are in the same order of magnitude than those previously reported for reference techniques. When applied to the analysis of the target pesticides in honey samples, HFF-QCM immunosensors showed good accuracy and acceptable precision for immunochemical methods. In consequence, the immunosensor analytical performance allows the detection of the pesticides in honey at EU regulatory levels.

Acknowledgements

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness with FEDER funds (AGL Project 2013-48646-R). L.C.C. was the recipient of a PhD fellowship from the European Social Fund and the Generalitat Valenciana (ACIF / 2016/132).

References

- Abad, A., Manclús, J.J., Mojarrad, F., Mercader, J. V., Miranda, M.A., Primo, J., Guardiola, V. & Montoya, A. (1997a). Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to DDT and Related Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3694–3702.
- Abad, A., Primo, J. & Montoya, A. (1997b). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 1. Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassay Formats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1486–1494.
- Blasco, C., Fernández, M., Pena, A., Lino, C., Silveira, M.I., Font, G. & Picó, Y. (2003). Assessment of Pesticide Residues in Honey Samples from Portugal and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 8132–8138.
- Cervera-Chiner, L., Juan-Borrás, M., March, C., Arnau, A., Escriche, I., Montoya, Á. & Jiménez, Y. (2018). High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey. *Food Control*, **92**, 1–6.
- González-Martínez, M.A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., Abad, A. & Montoya, A. (1997). Monoclonal Antibody-Based Flow-Through Immunosensor for Analysis of Carbaryl. *Analytical Chemistry*, **69**, 2812–2818.
- Juan-Borrás, M., Domenech, E. & Escriche, I. (2016). Mixture-risk-assessment of pesticide residues in retail polyfloral honey. *Food Control*, **67**.
- March, C., García, J. V., Sánchez, Á., Arnau, A., Jiménez, Y., García, P., Manclús, J.J. & Montoya, Á. (2015). High-frequency phase shift measurement greatly enhances the sensitivity of QCM immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **65**, 1–8.
- 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.
- Marrazza, G. (2014). Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: A review. *Biosensors*.
- Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barceló, D. & Lechuga, L.M. (2006). Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-

- through immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 2129–2136.
- 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.
- Montoya, A., March, C., Montagut, Y., Moreno, M., Manclus, J., Arnau, A., Jimenez, Y., Jaramillo, M., Marin, P. & Torres, R. (2016). A High Fundamental Frequency (HFF)-based QCM Immunosensor for Tuberculosis Detection. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **17**, 1623–1630.
- Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Almeida, M. V. de, Gerenutti, M. & Apon, B.M. (2007). Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, **101**, 1719–1726.
- Ruiz-Toledo, J., Vandame, R., Castro-Chan, R.A., Penilla-Navarro, R.P., Gómez, J. & Sánchez, D. (2018). Organochlorine pesticides in honey and pollen samples from managed colonies of the honey bee *apis mellifera linnaeus* and the stingless bee *scaptotrigona mexicana* guérin from southern, Mexico. *Insects*, **9**.
- Sapozhnikova, Y., Simons, T. & Lehotay, S.J. (2015). Evaluation of a fast and simple sample preparation method for polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) pesticides in fish for analysis by ELISA compared with GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 4429–4434.
- Sun, J., Dong, T., Zhang, Y. & Wang, S. (2010). Development of enzyme linked immunoassay for the simultaneous detection of carbaryl and metolcarb in different agricultural products. *Analytica Chimica Acta*, **666**, 76–82.
- Venu, S., Santhi, K., Rawson, A., Paranthaman, R. & Sureshkumar, K. (2019). Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for the determination of carbaryl residue in honey. *Pharmacognosy Magazine*, **15**, 205.

**4.3. HIGH FUNDAMENTAL FREQUENCY QUARTZ CRYSTAL
MICROBALANCE (HFF-QCMD) IMMUNOSENSOR FOR DETECTION OF
SULFATHIAZOLE IN HONEY**

**Lourdes Cervera-Chiner, Yolanda Jiménez, Ángel Montoya, Marisol Juan-Borrás, Nuria
Pascual, Antonio Arnau & Isabel Escriche**

Food Control, 115 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107296>

Abstract

In this study, a piezoelectric immunosensor based on High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCMD) technology was developed for detection of sulfathiazole in honey. The biorecognition was based on a competitive immunoassay in the conjugate-coated format, using monoclonal antibodies as specific immunoreagents. The quantification of sulfathiazole was performed by building the corresponding calibration standard curve in diluted honey (1/140). Due to the competitive nature of the immunoassay, the standard curve showed a sigmoidal pattern with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.10 µg/kg and 2 µg/kg honey, respectively. The LOD reached by this immunosensor is 40-50 times lower than those reported by other techniques for antibiotic detection. Moreover, this method requires minimum honey pre-treatment, making it faster and simpler than other methods. This immunosensor meets the precision and accuracy requirements established by SANCO guidelines, when sulfathiazole concentration in honey is not lower than 10 µg/kg. These findings could be the basis for reaching enough reliability for lower concentrations. Therefore, HFF-QCMD immunosensors can be considered a feasible alternative to current techniques for rapid and highly sensitive determination of sulfathiazole in honey with minimum sample preparation.

Keywords: Immunosensor; HFF-QCMD; LC-MS/MS; antibiotic; sulfathiazole; honey

Introduction

The presence of antimicrobial agents in foodstuff is currently considered a serious public health problem since their residues can cause allergies, alterations in the intestinal microbiota and even the development of multibacteria resistance (ECDC/EFSA/EMA 2015; WHO, 2018). However, the use of these chemicals is sometimes a necessary and widespread practice for the treatment of infectious pathologies in different types of livestock such as the honeybees in apiculture production. The European Union, in order to ensure food safety, has established Maximum Residue Limits (MRLs) for different pharmacologically active substances in foods of animal origin (European Commission, 2010). However, referring to honey, limits have been set only for coumaphos (100 mg/kg) and amitraz (200 mg/kg); both are pesticide compounds applied to control the highly dangerous *Varroa destructor* mite, the most damaging enemy of honeybee colonies. This European Commission regulation includes only the list of approved active substances; therefore, no other substance is allowed in beekeeping. However, sometimes

beekeepers improperly use prohibited substances to prevent the death of bees when they are affected by other diseases. Among them, of special significance are the American and European Foulbrood (AFB and EFB) diseases, caused by *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*. When these bacteria affect colonies beekeepers should mandatorily burn the beehive, but this is not always occurring and by applying bad apicultural practices, they use different antibiotics for this purpose. Hence, the need to control the presence of these compounds, mainly sulfathiazole since this is the most commonly used. For this reason, this sulphonamide is on the list of compounds that are routinely evaluated in the quality control of honey during commercialization and packaging.

Liquid chromatography-Mass spectrometry tandem (LC-MS/MS) is the most applied technique for this purpose due to its high sensitivity and selectivity. However, it is an expensive analytical method, with a long and multistage sample preparation that makes the analysis time-consuming, labor-intensive, and unsuitable for routinely monitoring sulphonamide levels (Juan-Borrás *et al.*, 2015; Guillén *et al.*, 2017; Louppis *et al.*, 2017).

The honey packaging industry needs on-line and low-cost screening methods as an alternative to overcome the drawbacks of traditional chromatographic techniques. One of the first and most extensively used screening method in food control analysis has been ELISA. Its main strengths are its high sensitivity, together with its ability to analyze several food samples simultaneously with a relatively low cost (Ricci *et al.*, 2007). However, its main drawbacks concern the use of molecular labels, which can compromise the bio-chemical activity (Hawkins *et al.*, 2006; Gaudin, 2017), and its difficulty of automation, which prevents its use for on-line analysis (Mauriz *et al.*, 2006).

Immunosensors have emerged as feasible candidates to overcome the identified weaknesses of ELISA. The more extensively used for antibiotic control in food have been those based on Surface Plasmon Resonance (SPR) and Quartz Crystal Microbalance with dissipation (QCMD) technologies (Gaudin, 2017). Both immunosensors are direct label-free and real-time techniques, so they can easily and quickly provide the characteristics of binding reactions involved in the bio-recognition.

Low-frequency (5-10 MHz) QCMD immunosensors, have successfully been used for detection in food safety applications, such as pesticides in fruit juices (March *et al.*, 2009), toxins in red wine (Karczmarczyk *et al.*, 2017), hormones in milk (Ito *et al.*, 2017) and antibiotics, such as chloramphenicol in milk, meat, egg and honey (Karaseva and Ermolaeva, 2012). In all these cases, the sensitivity was around 1-2 orders of magnitude above the MRLs, when established (Regulation (EC) N° 396/2005; Regulation (EC) N° 470/2009; Regulation (EC) N° 37/2010).

The lack of sensitivity of low-frequency QCMD (its main drawback) has been overcome by High-Fundamental-Frequency QCMD technology (HFF-QCMD) (50–150 MHz). The reduced size of HFF-QCMD sensors and the simplicity in the instrumentation needed to characterize them are other important advantages of this technology, in comparison with the previously mentioned techniques such as SPR (Janshoff *et al.*, 2000). This provides a cost-effective solution that will enable the simultaneous detection of several samples in a single analysis by integrating tens of these sensors, thus, saving time, and minimizing sample consumption (Tao *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2018; Vaughan *et al.*, 2018). The advantages of HFF-QCMD technology such as screening method have been tested in previous studies (March *et al.*, 2015) and specifically in the detection of pesticides in honey (Cervera-Chiner *et al.*, 2018). Bearing in mind that this technology has not yet been used to identify sulfathiazole in foodstuff, the aim of this work was the development of a suitable HFF-QCMD immunosensor for the detection of this sulfonamide in honey. The analytical performance of this method will be compared with LC-MS/MS as reference technique, in terms of precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and working range.

Material and methods

Honey samples, reagents and immunoreagents

A mixture of 5 polyfloral honey samples (supplied by “Cooperativa Melazahar”, Valencia, Spain) without sulphonamides (checked by chromatographic analysis, Juan-Borrás *et al.*, 2015) was used as a “blank honey” for spiking with sulfathiazole (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) when required. In addition, 6 more polyfloral honey samples (purchased from different supermarkets and honey cooperatives) were used to verify the reliability of the HFF-QCMD technology for detecting sulfathiazole. These last honey samples were kept frozen until analysis to minimize losses of the target compound.

The reagents used for sensor immobilization were: thiol compounds 11-mercapto-1-undecanol 97% (MUOH) and 16-mercaptohexadecanoic acid 90% (MHDA) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany); 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and *n*-hydroxysuccinimide (NHS) (Pierce, Rockford, IL, USA), and ethanolamine blocking agent (Sigma, St Louis, Mo, USA). The immunoreagents (Custom Antibody Service, U2-ICTS-NANBIOSIS; Nb4D group-IQAC-CSIC/CIBER-BBN, Barcelona, Spain) were the following: SA2-BSA AE1 B28 protein-hapten conjugate (used as assay conjugate) and purified monoclonal antibody against sulfonamide 6C11 batch 8678. Tween 20 surfactant was acquired from Fluka-Aldrich

Chemie (St Louis, Mo, USA). The buffer used as mobile phase in HFF-QCMD experiments was PBST (PBS: 10 mM phosphate-buffered saline solution, 0.9% NaCl, pH 7.4, with 0.005% Tween 20). Ultrapure water was produced in-house using a Milli-Q 82 system (Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

HFF-QCM methodology

HFF-QCM immunosensor set-up

100 MHz HFF-QCMD sensors were supplied by AWSensors (AWSensors, Valencia, Spain, www.awsensors.com). The sensors consist of a 66 μm -thick AT-cut quartz 6×6 mm-square wafer with a 17 μm -thick and 2.92 mm-diameter circular double-sided etched region in the center. The etched region is sandwiched between two concentric 1 mm-diameter circular electrodes with a 67 nm-thick gold layer on a 5 nm Cr-adhesion layer. To make the handling of the sensors easier, they are assembled on a Polyether Ether Ketone (PEEK) support. AWS flow-through cell housing was used as crystal holder for in-liquid measurements (AWSensors). The cell creates a chamber of around 2.75 μL over the sensor.

The AWS A20 platform (AWSensors) was used for real-time characterization of the sensor response during the experiments carried out in flow conditions. This platform records variations in the resonance frequency, Δf , and energy dissipation, ΔD . Measurement of Δf provides information about the antibiotic concentration in the sample, while ΔD monitoring serves to ensure that other events different from bio-recognition, such as changes in stiffness or viscosity in the sample, do not significantly contribute to the sensor response (Jiménez *et al.*, 2008).

The AWS F20 platform (AWSensors) was used to generate a uniform flow through the sensor cell. Moreover, a degasser DEGASi® Compact from Biotech (Onsala, Sweden) was connected to the AWS F20 platform for preventing bubbles. Sample injection was carried out by an injection valve and a 250 μL loop. Both platforms allow carrying out thermostated experiments at 25 °C. They are controlled by means of the software interface AWS Suit 2.5.0 version (AWSensors), which also allows registering and processing the acquired data.

Sensor functionalization and detection format

An indirect competitive immunoassay in the conjugate-coated format was applied. Mixed self-assembled monolayers (mSAM) of alkane thiols were used as intermediate layers for covalent immobilization of the hapten conjugate to the sensor surface. The mSAMs allow more orderly and stable distribution of the hapten conjugate molecules on the sensor surface than simple SAMs. Previously to the mSAM formation, the sensors were rinsed with bidistilled water and ethanol, dried with nitrogen gas, exposed for 15 minutes to UV/Ozone ProCleaner from BioForce

Nanosciences (Utah, USA), rinsed again with ethanol and dried with nitrogen gas. The cleaning and immobilization processes were carried out in a cell especially made for immobilization (AWSensors) as described in detail by Cervera-Chiner et al., 2018.

Immunoassay protocol and standard curves

For the determination of the optimal concentrations of immunoreagents to perform the competitive immunoassays of sulfathiazole, several concentrations of SA2-BSA conjugate from 5 to 50 µg/mL were first immobilized on the HFF-QCM sensor surface and tested in combination with different concentrations (1 and 2 µg/mL) of monoclonal antibody against sulfonamide (6C11 MAb).

Competitive sulfathiazole immunoassays were carried out by mixing (1:1 v/v) a fixed concentration of 6C11 MAb (2 µg/mL) with sulfathiazole standard solution or with the spiked honey samples. The mixture was pre-incubated for 10 minutes at 25 °C and, subsequently, 250 µL were pumped over the previously functionalized sensor surface. The AWS A20 platform recorded Δf and ΔD in real time as the binding between free antibody and the immobilized conjugate took place. Once the assay reached the equilibrium, the surface sensor was regenerated by pumping 0.1 M HCl on the sensor surface, this breaks the antibody-hapten conjugate binding and makes the sensor ready for the next assay. The assay time, including sensor surface regeneration, was around 30 min. For further details of the immunoassay protocol performed, see the work reported by (Cervera-Chiner *et al.*, 2018).

Two standard sulfathiazole calibration curves were performed, one in PBS and the other in honey diluted with PBS (1/140 w/v). A 24 mg/mL stock solution of sulfathiazole was prepared in 0.5 M sodium hydroxide. From this stock, a working solution of 240 mg/L was obtained in bidistilled water. From this solution, sulfathiazole standards in the 2×10^3 to 2×10^{-4} µg/mL range were prepared by serial dilutions in PBS and in honey diluted with PBS (see section below). The calibration curves were performed running the sulfathiazole standards in quadruplicate. The frequency shifts generated by the binding (Δf) were acquired and, subsequently, processed to be expressed as a percentage of the maximum signal frequency shift (Δf_{max}) registered in the absence of the analyte. Finally, these normalized frequency signals were plotted vs each standard concentration and fitted to the four-parameters logistic equation shown below:

$$y = D + (A - D)/(1 + (x/C)^B) \quad \text{(Equation 5)}$$

Where x is the analyte concentration, y is the acquired normalized frequency ($\Delta f \times 100 / \Delta f_{max}$), A is the asymptotic maximum (maximum signal registered without analyte), B is the slope of the

sigmoidal curve at the inflection point, C is the analyte concentration giving 50% inhibition (I_{50} value) and D is the asymptotic minimum (background signal).

Honey sample preparation for HFF-QCMD

To study honey matrix effects, different honey dilutions in PBS: 1/25, 1/50, 1/100, 1/140, 1/150 (w/v) were tested. Each dilution was mixed with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MAb and injected on the sensor. The measured values for Δf and ΔD were compared with those provided by the sensor when a mixture of PBS with the same amount of MAb was injected. Dilution factors below 1/140 provided dissipation shifts (ΔD) higher than those obtained with PBS, thus confirming the effect of the viscoelastic properties of honey on the sensor response (matrix effect) for those dilutions. Matrix effect minimization was achieved only for 1/140 and 1/150 dilutions, which provided Δf and ΔD values similar to those obtained with PBS. Between them, 1/140 dilution was selected since higher dilution factors reduce the target concentration, thus impairing its detection.

To evaluate the accuracy and precision of the developed immunosensors, spiked honey samples were prepared by adding the working solution of sulfathiazole (1 mg/L) to the “blank honey” in order to obtain the suitable levels (0.5, 2, 10, 50, 100 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

LC-MS/MS methodology

A 1000 mg/L stock solution of sulfathiazole was prepared in methanol. Then, a 1 mg/L working solution was carried out in bidistilled water from the stock solution. Both solutions were stored at 4°C. The working solution was used to obtain the sulfathiazole standards (from 0.02 to 2000 $\mu\text{g}/\text{L}$ in bidistilled water). The calibration curves were built in solvent and matrix honey at this range of concentrations.

The fortified honey samples were prepared in the same way as for HFF-QCMD. A solid phase extraction (SPE) performed with Strata X-CW cartridges (33 μm polymeric strong cation 100 mg/3mL, Phenomenex, California, USA) was applied to extract the antibiotic and to remove impurities from honey samples. In each case, a 1 g of honey was weighed, spiked at the corresponding level and subjected to acid hydrolysis (2 M HCl, 1 mL) and then left for 30 min at room temperature. Then, 5 mL of 0.3 M citric acid solution were added and mixed. The cartridges were conditioned with 3 mL of methanol and were rinsed with 3 mL of bidistilled water. Then, the samples were passed through the cartridge. Subsequently, the cartridges were rinsed twice with 3 mL of bidistilled water, followed by two rinses with 3 mL of methanol/acetonitrile solution (50:50, v/v) and were allowed to dry for 2 min. Then, the extract was eluted with 3 mL of 2% ammonium hydroxide/methanol solution. The eluates were evaporated until completely dry under stream of nitrogen while being maintained at 40°C in a

thermostatic bath (Grant GR, Cambridge, England). Finally, 100 μL of bidistilled water: acetonitrile (95:5) was added and mixed with a vortex to re-dissolve the extract and transferred into a LC-MS/MS vial for subsequent analysis. The chromatography procedure was carried out following as described by Juan-Borrás et al., 2015.

Methodology comparison

In order to evaluate the analytical performance of the proposed new methodology (HFF-QCMD), five independent replicates of blank honey were spiked at seven levels: 0, 0.5, 2, 10, 50, 100 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and analyzed with both methodologies (HFF-QCMD and LC-MS/MS). The measurements performed with HFF-QCMD technology were compared with LC-MS/MS as reference method for sulfathiazole determination. Both methodologies were applied in accordance with SANCO 12571/2013 guidance document in terms of precision (reproducibility and repeatability), accuracy (% recovery), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and working range.

Since there is no maximum residue limit (MRL) established by the European Food Safety Authority (ECDC/EFSA/EMA, 2015) for antibiotics in honey, the current requirement is the absence of antibiotics. Thus, the maximum limit of antibiotic residues in honey should be established based on the detection limit of the technique used (Maudens *et al.*, 2004).

Results and discussion

Immunoassay development: selection of the optimal monoclonal antibody concentration

The sensitivity and the LOD of an immunosensor are strongly dependent on antibody and immobilized conjugate concentrations (Chauhan *et al.*, 2015). The optimal combination of the immobilized conjugate and monoclonal antibody concentrations was selected to obtain a commitment to ensure a good signal-to-noise ratio for the highest analyte concentrations in the competitive assay, with the lowest immunoreagent consumption. Previous works developed by the research group showed that values of Δf_{max} parameter of at least 1 kHz are enough to achieve the signal to noise criterion (March *et al.*, 2015; Fernández-Benavides *et al.*, 2019). The values of Δf signals provided by several combinations of immunoreagent concentrations are summarized in **Table 10**.

Table 10. Frequency signal shifts (Δf) obtained with the HFF-QCMD sensor in the checkerboard titration of several concentrations of the immobilized SA2-BSA conjugate and monoclonal anti-sulfonamide antibody 6C11. Each value is expressed as the average and the standard deviation of three measurements.

SA2-BSA conjugate concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Frequency signal shift (Δf , Hz)	
	1 $\mu\text{g/mL}$ MAb	2 $\mu\text{g/mL}$ MAb
5	660 \pm 140	1050 \pm 200
10	900 \pm 40	1100 \pm 180
20	855 \pm 160	1560 \pm 30
50	2200 \pm 300	3800 \pm 200

As expected, higher signals were observed as MAb and conjugate concentrations increased. The optimal concentrations selected to accomplish the above described tradeoff were 5 $\mu\text{g/mL}$ of SA2-BSA conjugate with 2 $\mu\text{g/mL}$ of monoclonal anti-sulfonamide antibody 6C11. Subsequent immunoassays were performed using these concentrations.

HFF-QCM sulfathiazole standard curves: matrix effect

The construction of standard calibration curves was performed in order to quantify the sulfathiazole in samples. With the aim of evaluating the matrix effect, calibration standard curves in PBS (sulfathiazole from 2×10^{-4} to 2×10^3 $\mu\text{g/L}$) and in diluted honey (1/140, w/v) were performed. **Figure 33** shows, as an example, a sensorgram of the HFF-QCMD response to different concentrations of sulfathiazole in diluted honey. As the concentration of sulfathiazole increased, a greater signal inhibition was registered, caused by less availability of free antibody. **Figure 34** depicts the sulfathiazole standard curves obtained in PBS and in diluted honey. The competitive nature of the immunoassay is reflected in the sigmoidal behavior of the standard curve (Osterloh *et al.*, 1989), i.e. the signal decreases as an inverse function of the analyte concentration. The higher the analyte concentration the lower the quantity of free available antibody molecules in the assay, thus leading to a proportional signal inhibition (Fernández-Benavides *et al.*, 2019). In both standard curves the experimental data showed excellent fitting with the logistic equation ($R^2 = 0.9918$ for PBS and $R^2 = 0.9866$ for honey).

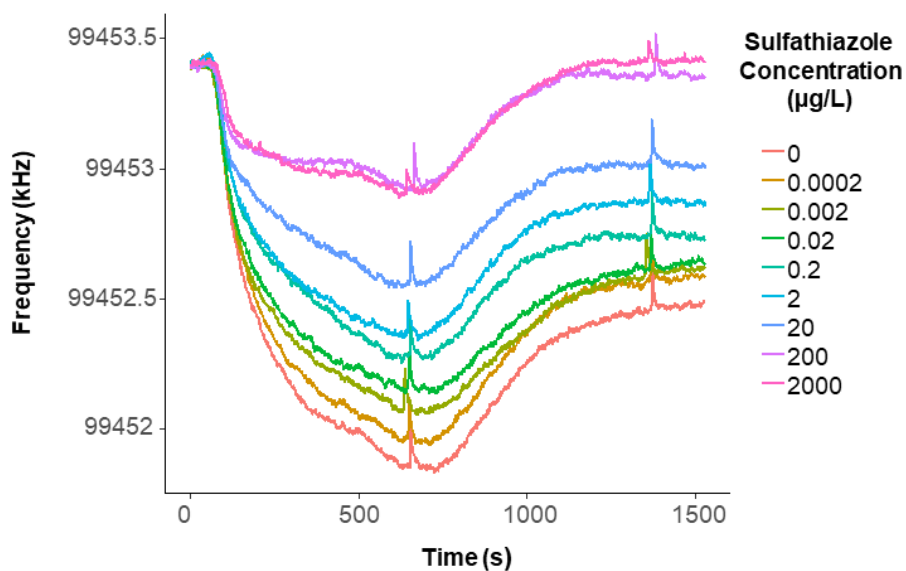


Figure 33. Sensorgram of HFF-QCMD response to the biorecognition events of different sulfathiazole concentrations in diluted honey during the performance of inhibition competitive assays.

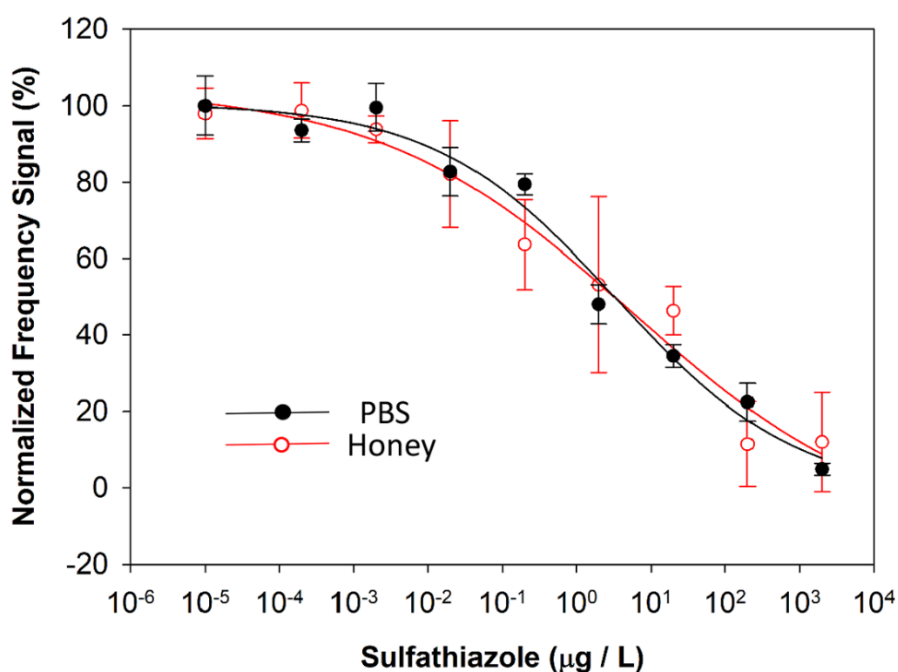


Figure 34. HFF-QCMD sulfathiazole calibration curves in PBS and in honey diluted 1/140 in PBS. Each point is the average of four determinations. Vertical bars represent standard deviation.

Table 11 shows the mathematical parameters (A, B, C and D) of **Equation 5** resulting from the fitting of both curves. No significant statistical differences for any parameter were found between both curves (t-test; $p < 0.05$), demonstrating the absence of matrix effect for 1/140 diluted honey. This result is in agreement with the great similarity between the small ΔD values measured for both PBS and diluted honey, thus confirming that viscoelastic properties of diluted honey can be neglected. This simple honey pre-treatment used with HFF-QCMD immunosensors makes this method faster and simpler than LC-MS/MS which, in turns, allows saving time in the analysis procedure.

Table 11. Mathematical parameters of logistic equation.

Parameter	PBS curve		1/140 diluted honey curve	
	Coefficient	Std. Error	Coefficient	Std. Error
A	104.4	16.5	129.0	40.3
B	0.4	0.1	0.3	0.1
C	3.4	3.1	5.4	11.9
D	1.8	13.2	12.3	32.2
R ²	0.9918		0.9866	

In addition to the mathematical parameters A, B, C and D, the standard curve has several analytical parameters that allow the comparison among different conditions. The analytical parameters of the calibration curves run in PBS and in diluted honey are summarized in **Table 12**. The I_{50} parameter provides the analyte concentration corresponding to the inflection point between the two asymptotes, and it is considered as an estimation of the assay sensitivity. The limit of detection (LOD) corresponds to the analyte concentration that produces 10% inhibition of the maximum signal. The limit of quantification (LOQ) is obtained as the analyte concentration that produces 20% inhibition of the maximum signal. Finally, the working range is calculated as the range of concentrations that provide 20 and 80% of signal inhibition.

Despite the absence of statistical differences in the mathematical parameters of the logistic equation (**Equation 5**), the curve in diluted honey was selected for the analyte quantification in fortified samples since the assay LOD and LOQ were lower in this case.

The LOD reached by the developed HFF-QCMD immunosensor was 0.0010 $\mu\text{g/L}$ in diluted honey. Taking into account the dilution factor in the assay (1/140), this value corresponds to a LOD in honey of 0.10 $\mu\text{g/kg}$. The LOQ was 0.02 $\mu\text{g/L}$ in diluted honey (2 $\mu\text{g/kg}$ in honey sample), and the working range ranged from 0.02 to 1000 $\mu\text{g/L}$ (2 to 100,000 $\mu\text{g/kg}$ honey).

Table 12. Analytical parameters obtained for the HFF-QCMD standard curves of sulfathiazole in PBS and in 1/140 diluted honey.

Analytical parameter	PBS ($\mu\text{g/L}$)	1/140 diluted honey ($\mu\text{g/L}$)	Honey sample ($\mu\text{g/kg}$)
I_{50}	3	5	-
LOD	0.007	0.0010	0.10
LOQ	0.07	0.02	2
Working range	0.07 to 100	0.02 to 1000	2 to 100,000

Regarding the sensor surface regeneration, the HFF-QCMD immunosensor developed was able to properly work for around 100 assay cycles without significant decrease in the signal. After 100 cycles the repetitiveness of the measures was highly compromised (the assay signal was around 50% of that obtained in the first assays), and a new immobilization of the assay conjugate was necessary.

The LOD achieved both in diluted honey and in honey samples, by different reported techniques for sulfathiazole detection in honey are summarized in **Table 13**.

As shown in **Table 13**, the LOD achieved by the immunosensor developed in the present work (0.10 $\mu\text{g/kg}$) is up to forty times lower than that reported for ELISA (4 $\mu\text{g/kg}$) (Pastor-Navarro *et al.*, 2007) and fifty times better than LC-MS/MS (5 $\mu\text{g/kg}$) (Juan-Borrás *et al.*, 2015). These results indicate that this immunosensor can be more sensitive than the current antibiotic detection techniques. The high sensitivity achieved by the immunosensor is mainly due to the sensitivity enhancement provided by HFF-QCMD technology and to the low noise characterization system used (March *et al.*, 2015).

Table 13. Comparison of LODs reported by different techniques for sulfathiazole detection in honey.

Technique	LOD in diluted honey ($\mu\text{g/L}$)	LOD in honey sample ($\mu\text{g/kg}$)	Reference
• High fundamental quartz crystal microbalance (HFF-QCMD) 100 MHz	0.0010	0.10	Present work
• ELISA	0.25	4	Pastor-Navarro, Gallego-Iglesias, Maquieira, & Puchades, 2007
• Immunocomplex capture fluorescence-based immunosensor device	0.11	-	Jornet, González-Martínez, Puchades, & Maquieira, 2010
• High-pressure liquid chromatography/tándem mass spectrometry	-	5	Juan-Borrás et al., 2015

Analysis of spiked honey samples: comparison with the LC-MS/MS method

In order to evaluate the analytical performance of the proposed new methodology (HFF-QCMD), in comparison with the most commonly used (LC-MS/MS) for sulfathiazole determination, the accuracy and precision were evaluated for both methods. To this aim, five independent replicates of “blank honey” spiked at seven levels: 0, 0.5, 2, 10, 50, 100 and 1000 $\mu\text{g/kg}$ were measured with both techniques. The comparison of recovery and coefficient of variation (CV) of spiked samples obtained with both techniques are listed in **Table 14**. No false positives were detected since the blank honey samples were below the LOD in both techniques. In this table, fortified concentrations higher than 2 $\mu\text{g/kg}$, showed good recoveries and CV in all cases: recoveries from 100% to 113% (HFF-QCMD) and from 94% to 103% (LC-MS/MS), whereas CVs ranged from 14% to 17% and from 0.3 to 11%, for HFF-QCMD and LC-MS/MS, respectively. This proves that, only in this range of concentrations (from 10 $\mu\text{g/kg}$ to 1000 $\mu\text{g/kg}$), the new developed HFF-QCMD immunosensor meets the requirements established by SANCO 12571/2013 guidelines (recovery percentages between 80% and 120% as well as CV lower than 20%). Looking more in detail the CV values for concentrations in the range 10-1000 $\mu\text{g/kg}$, it can be observed that these values were always higher in HFF-QCMD than in LC-MS/MS. This shows that the new method is precise enough only in this range. Consequently, to be usable at lower

concentrations it will need to be fine-tuned in future developments to try to avoid small uncontrolled or involuntary variations in its operating conditions.

Table 14. Comparison of HFF-QCMD immunosensor and LC-MS/MS for the analysis of sulfathiazole-spiked honey samples (n=5).

Fortified ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HFF-QCMD			LC-MS/MS		
	Detected	Recovery	CV	Detected	Recovery	CV
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	(%)
0	<LOD	-	-	<LOD	-	-
0.5	0.6 ± 0.4	120	55	0.5 ± 0.01	100	2.6
2	2.7 ± 0.6	135	23	2.0 ± 0.3	100	15
10	11.3 ± 1.9	113	17	10.0 ± 1.1	100	11
50	52 ± 8	104	17	47.0 ± 0.2	94	0.4
100	100 ± 15	100	14	103.0 ± 0.3	103	0.3
1000	1100 ± 170	110	16	1000 ± 60	100	6

These findings could be expected, since the spiked concentrations (from 10 to 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) lay within the working range of HFF-QCMD immunosensor (see **Table 12**). However, for lower levels (0.5 and 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) it showed poor accuracy and precision, because these concentrations were below the immunosensor LOQ.

With the aim of checking the performance of this new technology for detecting sulfathiazole in real (non-fortified) samples, six honey samples from different sources were analyzed by LC-MS/MS and HFF-QCMD, following the same steps and in the same way as detailed before for the spiked samples. Each sample was analyzed in parallel, first by the conventional procedure and after by the new methodology. None of them revealed the presence of sulfathiazole, neither by using HFF-QCMD nor LC-MS/MS, thus confirming the reliability of the immunosensor for sulfathiazole detection. Nevertheless, this is to be considered as a preliminary result and it would be necessary to extent the scope to other types of honey with the aim of taking into account further external factors that might create variations in the results.

Conclusions

This work reports the first HFF-QCMD immunosensor for quantification of sulfathiazole in honey by using a functionalized 100 MHz quartz sensor as transducer and specific monoclonal antibodies as bio-recognition elements. This immunosensor based method requires simple honey pre-treatment, making it faster and simpler than other methods. Moreover, it is highly sensitive, achieving LODs 40-50 times lower than other reported techniques for sulfathiazole detection in honey.

The requirements of precision and accuracy set by SANCO 12571/2013 are met by this HFF-QCMD immunosensor for concentration of sulfathiazole in honey equal or higher than 10 µg/kg. These findings are promising and a starting point for future developments in order to achieve a better LOQ and enough reliability for lower concentrations. Therefore, this new technique can be considered a good alternative for faster determination of sulfathiazole in honey with minimum sample preparation.

Acknowledgements

The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, with FEDER-funds, has financially supported this work through the AGL2013-48646-R project. Furthermore, authors are grateful for financial support from the European Social Fund and the Generalitat Valenciana for the PhD grant (Ayudas para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral) to Lourdes Cervera Chiner (ACIF/2016/132).

The authors would also like to thank the Universitat Politècnica de València for the support provided for contracting Marisol Juan Borrás in the frame of PAID-10-17 (Ayuda para la contratación de acceso al Sistema Español de Ciencia, Tecnología e Innovación en Estructuras de Investigación).

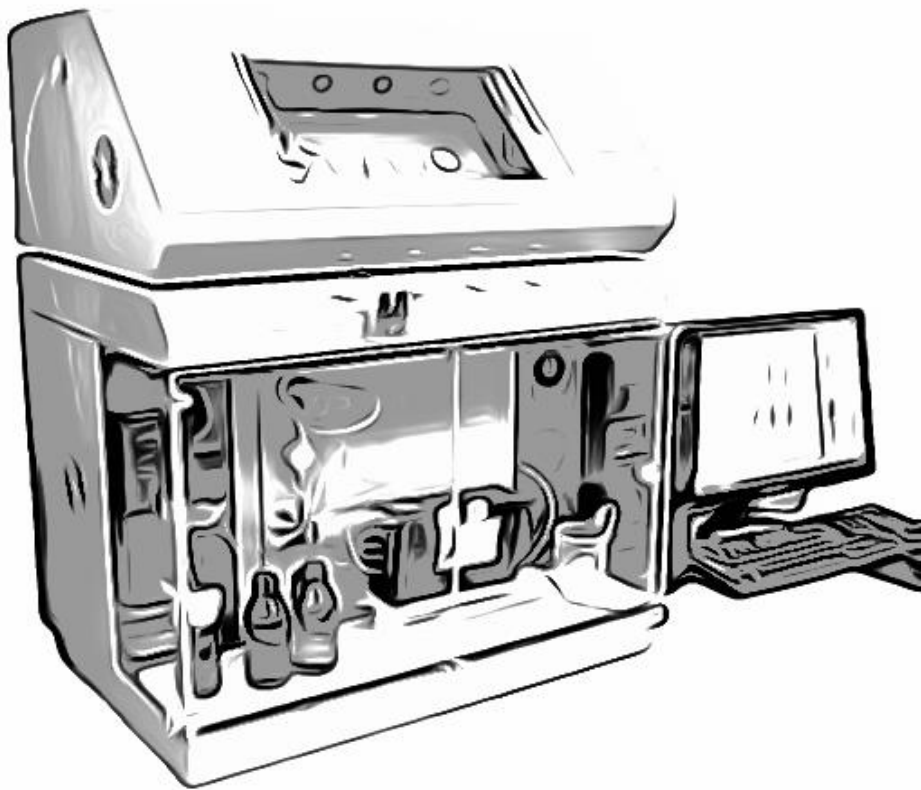
References

- Cervera-Chiner, L., Juan-Borrás, M., March, C., Arnau, A., Escriche, I., Montoya, Á. & Jiménez, Y. (2018). High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey. *Food Control*, **92**, 1–6.
- Chauhan, R., Solanki, P.R., Singh, J., Mukherjee, I., Basu, T. & Malhotra, B.D. (2015). A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for aflatoxin B1 detection in

- groundnut. *Food Control*, **52**, 60–70.
- Deng, F., Chen, W., Wang, J. & Wei, Z. (2018). Fabrication of a sensor array based on quartz crystal microbalance and the application in egg shelf life evaluation. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **265**, 394–402.
- ECDC/EFSA/EMA. (2015). ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, **13**, 4006.
- Fernández-Benavides, D.A., Cervera-Chiner, L., Jiménez, Y., Fuentes, O.A. de, Montoya, A. & Muñoz-Saldaña, J. (2019). A novel bismuth-based lead-free piezoelectric transducer immunosensor for carbaryl quantification. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **285**, 423–430.
- Gaudin, V. (2017). Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, **90**, 363–377.
- Guillén, I., Guardiola, L., Almela, L., Núñez-Delicado, E. & Gabaldón, J.A. (2017). Simultaneous Determination of Nine Sulphonamides by LC-MS for Routine Control of Raw Honey Samples. *Food Analytical Methods*, **10**, 1430–1441.
- Hawkins, E., Cooper, M. & Campbell, I. (2006). Acoustic Detection Technology in the Analysis of Biomolecular Interactions Acoustic detection technology offers life scientists the ability to detect real-time kinetic data across a broad range of sample types, purities and concentrations, without the need. *Innovations in Pharmaceutical Technology*, **21**, 30–34.
- Ito, T., Aoki, N., Tsuchiya, A., Kaneko, S., Akiyama, K., Uetake, K. & Suzuki, K. (2017). Detection of Stress Hormone in the Milk for Animal Welfare Using QCM Method. *Journal of Sensors*, **2017**, 1–7.
- Janshoff, A., Galla, H.J. & Steinem, C. (2000). Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors? *Angewandte Chemie - International Edition*, **39**, 4004–4032.
- Jiménez, Y., Otero, M. & Arnau, A. (2008). QCM data analysis and interpretation. In: *Piezoelectric Transducers and Applications* (edited by V. A.A.). Pp. 331–398. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jornet, D., González-Martínez, M.A., Puchades, R. & Maquieira, A. (2010). Antibiotic immunosensing: Determination of sulfathiazole in water and honey. *Talanta*, **81**, 1585–1592.
- Juan-Borrás, M., Periche, A., Domenech, E. & Escriche, I. (2015). Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS-MS. *Food Control*, **50**, 243–249.

- Karaseva, N.A. & Ermolaeva, T.N. (2012). A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food. *Talanta*, **93**, 44–48.
- Karczmarczyk, A., Haupt, K. & Feller, K.H. (2017). Development of a QCM-D biosensor for Ochratoxin A detection in red wine. *Talanta*, **166**, 193–197.
- Louppis, A.P., Kontominas, M.G. & Papastephanou, C. (2017). Determination of Antibiotic Residues in Honey by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, **10**, 3385–3397.
- March, C., García, J. V., Sánchez, Á., Arnau, A., Jiménez, Y., García, P., Manclús, J.J. & Montoya, Á. (2015). High-frequency phase shift measurement greatly enhances the sensitivity of QCM immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **65**, 1–8.
- 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.
- Maudens, K.E., Zhang, G.F. & Lambert, W.E. (2004). Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **1047**, 85–92.
- Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barceló, D. & Lechuga, L.M. (2006). Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 2129–2136.
- Osterloh, K.R.S., Smith, G.D. & Peters, T.J. (1989). Interpolation in Assay Systems with a Sigmoid Response Curve. In: *Reviews on Immunoassay Technology*. Pp. 134–144. London: Palgrave Macmillan UK.
- Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, Á. & Puchades, R. (2007). Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides. Application to bee honey analysis. *Talanta*, **71**, 923–933.
- Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L. & Palleschi, G. (2007). A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, **605**, 111–129.
- Tao, W., Lin, P., Ai, Y., Wang, H., Ke, S. & Zeng, X. (2016). Multichannel quartz crystal microbalance array: Fabrication, evaluation, application in biomarker detection. *Analytical Biochemistry*, **494**, 85–92.
- Vaughan, S.R., Speller, N.C., Chhotaray, P., McCarter, K.S., Siraj, N., Pérez, R.L., Li, Y. & Warner, I.M. (2018). Class specific discrimination of volatile organic compounds using a quartz crystal microbalance based multisensor array. *Talanta*, **188**, 423–428.
- WHO, W.H.O. (2018). *WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early*

implementation. Talanta.



5. Conclusiones

5. Conclusiones

5.1. Conclusiones específicas

Conclusiones del objetivo específico 1: *“Obtención de curvas de calibración en tampón de trabajo (PBS) correspondientes a los pesticidas modelo carbaril y DDT, y al antibiótico modelo sulfatiazol mediante la tecnología HFF-QCM”.*

- Se han obtenido las curvas de calibración en PBS para estos analitos mediante la tecnología HFF-QCM. Los límites de detección obtenidos para cada uno de ellos fueron: 0.12, 0.21 y 0.007 $\mu\text{g/L}$ para carbaril, DDT y sulfatiazol, respectivamente. Los límites de cuantificación fueron: 0.20, 0.45 y 0.07 $\mu\text{g/L}$ para carbaril, DDT y sulfatiazol, respectivamente. Estos resultados indican que los límites de detección alcanzados en ensayo por esta tecnología son del mismo orden de magnitud que los alcanzados con las técnicas cromatográficas de referencia.

Conclusiones del objetivo específico 2: *“Estudio del efecto matriz y establecimiento de las condiciones de trabajo para aplicar los inmunosensores HFF-QCM al análisis de la matriz alimentaria miel”.*

- Para minimizar el efecto matriz de miel en la señal del inmunoensayo HFF-QCM es suficiente con diluir convenientemente la miel, de esta forma se reduce su viscosidad, siendo éste un parámetro que afecta de forma relevante a la respuesta del inmunosensor. El porcentaje de dilución ((entre 1/140 y 1/200 (p/v)) depende del analito a detectar y del tipo de miel. En particular, se ha empleado una dilución 1/200 para carbaril empleando miel de tomillo y 1/140 para DDT y sulfatiazol empleando miel de espliego.
- Los resultados obtenidos permiten concluir que los inmunosensores HFF-QCM no requieren de un pretratamiento complejo de la muestra de miel para su análisis, como sucede en otras técnicas como la cromatografía.

Conclusiones del objetivo específico 3: *“Obtención de las curvas de calibración en matriz miel correspondientes a los pesticidas modelo carbaril y DDT, y al antibiótico modelo sulfatiazol mediante la tecnología HFF-QCM”.*

- Se han obtenido las curvas de calibración en miel diluida para los diferentes analitos mediante la tecnología HFF-QCM. Los LODs alcanzados en miel por los inmunosensores HFF-QCM fueron: 7, 24 y 0.10 µg/kg para carbaril, DDT y sulfatiazol, respectivamente. Los LOQs alcanzados en miel por el inmunosensor HFF-QCM fueron: 17, 52 y 2 µg/kg para carbaril, DDT y sulfatiazol, respectivamente.
- La tecnología de inmunosensores HFF-QCM permite el análisis de residuos de pesticidas en la miel dentro de los niveles establecidos por la legislación europea actual (Reglamento (UE) N° 396/2005, 2005): LMR= 50 µg/kg para carbaril y DDT. En el caso de las sulfonamidas, el límite recomendado en miel por los laboratorios de referencia comunitarios es 50 µg/kg, por lo que el inmunosensor desarrollado cumpliría este requisito.

Conclusiones del objetivo específico 4: *“Validación de la tecnología de inmunosensores HFF-QCM para la detección de pesticidas y antibióticos en miel”.*

- El inmunosensor HFF-QCM desarrollado para la detección de **carbaril** obtuvo porcentajes de recuperación aceptables, comprendidos entre 110 y 120% dentro del rango de trabajo del sensor, por lo que cumplió los criterios de exactitud establecidos por la guía SANCO 12571/2013. Respecto a la precisión, los coeficientes de variación oscilaron entre 25 y 33%, por lo que el inmunosensor no alcanzó los altos estándares recomendados por la guía SANCO 12571/2013, excediéndose en un 10% en los coeficientes de variación exigidos.
- El inmunosensor HFF-QCM desarrollado para la detección de **DDT** obtuvo unos porcentajes de recuperación comprendidos entre 98 y 130% dentro del rango de trabajo del sensor, con coeficientes de variación que oscilaron entre 8 y 36%. En este caso el inmunosensor excedió ligeramente los criterios establecidos por la guía SANCO 12571/2013 para ambos parámetros.
- El inmunosensor HFF-QCM desarrollado para la detección de **sulfatiazol** obtuvo unos porcentajes de recuperación comprendidos entre 100 y 113%, dentro del rango de trabajo del sensor. Los coeficientes de variación obtenidos estaban comprendidos entre

14 y 17%, para concentraciones iguales o superiores a 10 µg/kg. Por lo que, en este caso, sí se cumplieron todos los criterios establecidos por la guía SANCO 12571/2013.

- En ninguno de los tres inmunosensores desarrollados se detectaron falsos positivos.

Conclusiones del objetivo específico 5: *“Estudio comparativo de la tecnología HFF-QCM con técnicas cromatográficas de referencia”.*

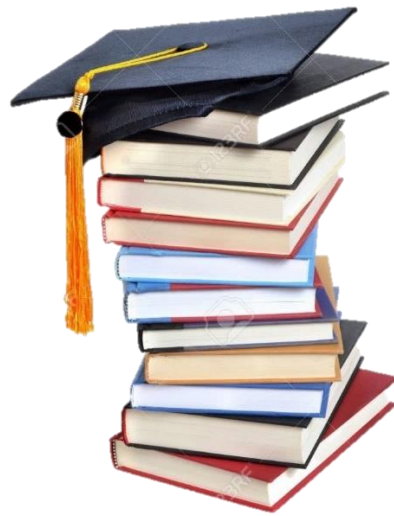
- Los límites de detección y cuantificación alcanzados por los inmunosensores HFF-QCM para los tres analitos fueron del mismo orden de magnitud que los proporcionados por las técnicas cromatográficas de referencia (LC-MS/MS y GC-MS).
- El pretratamiento de la muestra necesario en la técnica basada en inmunosensores HFF-QCM es más sencillo que el empleado en las técnicas cromatográficas.

Conclusiones del objetivo específico 6: *“Análisis de muestras reales de miel mediante inmunosensores HFF-QCM”.*

- Ninguna de las muestras de miel reales analizadas mediante HFF-QCM reveló la presencia de los pesticidas ni del antibiótico estudiados. Los resultados fueron corroborados mediante cromatografía, lo que confirma que se trata de una técnica que no proporciona falsos positivos.

5.2.- Conclusiones Generales

- La tecnología de los inmunosensores basados en microbalanza de cuarzo de alta frecuencia (HFF-QCM) con anticuerpos monoclonales como elemento de reconocimiento biológico ha sido empleada, por primera vez, para la detección de dos pesticidas modelo (carbaril y DDT) y un antibiótico modelo (sulfatiazol) en la matriz alimentaria miel.
- Los inmunosensores basados en la tecnología HFF-QCM pueden ser considerados una alternativa seria a las técnicas actuales para la cuantificación de pesticidas y antibióticos en la miel, ya que pueden alcanzar los límites de detección y cuantificación ofrecidos por los métodos cromatográficos de referencia, como LC-MS/MS y GC-MS, con un coste temporal y económico menor, mayor portabilidad y menor tecnificación.
- La técnica de análisis basada en inmunosensores HFF-QCM requiere un pretratamiento mínimo de la miel, que consiste únicamente en su dilución, lo que la convierte en una técnica más rápida y sencilla que otras.
- Los inmunosensores HFF-QCM desarrollados permiten la detección de pesticidas y antibióticos en la miel dentro de los niveles regulados por la Unión Europea.
- El inmunosensor HFF-QCM desarrollado para la detección de sulfatiazol cumple los requisitos de precisión y exactitud establecidos por la guía SANCO 12571/2013 para la cuantificación de este antibiótico en miel a concentraciones iguales o superiores a 10 µg/kg. Los inmunosensores desarrollados para la detección de los pesticidas carbaril y DDT se quedaron próximos a cumplir los criterios de validación recomendados por la guía SANCO 12571/2013.
- Los resultados obtenidos en esta tesis son prometedores y establecen un punto de partida para futuros desarrollos encaminados a lograr la detección multianalito con límites de cuantificación mejorados. Por todo ello, la técnica de inmunosensores HFF-QCM puede ser considerada como una buena alternativa para la determinación de pesticidas y antibióticos *in situ* en la industria de envasado de la miel.



6. Producción científica y actividades formativas

6. Producción científica y actividades formativas

Hasta la fecha de publicación de esta tesis, la producción científica derivada o relacionada con la misma ha sido la siguiente:

Publicaciones en revistas SCI del primer cuartil

- 1) Cervera-Chiner, L., Juan-Borrás, M., March, C., Arnau, A., Escriche, I., Montoya, Á. & Jiménez, Y. (2018). **High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey.** *Food Control*, 92, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.026>
- 2) Fernández-Benavides, D. A., Cervera-Chiner, L., Jiménez, Y., de Fuentes, O. A., Montoya, A., & Muñoz-Saldaña, J. (2019). **A novel bismuth-based lead-free piezoelectric transducer immunosensor for carbaryl quantification.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, 285, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.081>
- 3) Cervera-Chiner, L., March, C., Arnau, A., Jiménez, Y. & Montoya, A. (2020) **Detection of DDT and carbaryl pesticides in honey by means of immunosensors based on High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM).** *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 100(6):2468-2472. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10267>
- 4) Cervera-Chiner, L., Jiménez, Y., Montoya, A., Juan-Borrás, M., Pascual, N., Arnau, A. & Escriche, I. (2020) **High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCMD) Immunosensor for detection of sulfathiazole in honey.** *Food Control*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107296>

Congresos Internacionales

- 1) Ponencia oral en el congreso: 10 th Ibero-American Congress on Sensors. Ibersensor 2016, Valparaíso (Chile), 26-28 october 2016.
Título: High Fundamental Frequency (HFF) Piezoelectric Immunosensor for Sensitive Detection of DDT in Honey.
Autores: A. Montoya, M. Visquert, M. Juan-Borrás, L. Cervera-Chiner, I. Escriche, R. Fernández, J.V. García, J.J. Manclús, A. Arnau & Y. Jiménez.

- 2) Presentación de un póster en el congreso: 31st EFFoST International Conference. Food Science and Technology Challenges for the 21st Century - Research to Progress Society, Sitges (Barcelona), 15-17 november 2017.

Título: HFF-QCM immunosensor for pesticide detection in honey.

Autores: L. Cervera-Chiner, M. Juan-Borras, C.March, A. Arnau, I. Escriche, A. Montoya & Y. Jiménez.

- 3) Ponencia oral en el congreso: 2018 ISAF-FMA-AMF-AMEC-PFM Joint Conference (IFAAP 2018). May 27 – June 1, 2018. Hiroshima, Japan.

Título: A novel lead-free piezoelectric immunosensor for carbaryl detection with BNT – BKT – BT ceramic as transducer.

Autores: D.A. Fernandez-Benavides, L. Cervera-Chiner, Y. Jiménez, O.L. Arias-de Fuentes, J. Muñoz-Saldaña & A. Montoya.

- 4) Presentación de un póster en el congreso: 11th Ibero-American Congress on Sensors. Ibersensor 2018, Barcelona (Spain) 17-20 septiembre 2018.

Título: Development of piezoelectric and optical immunosensors for detection of contaminants in honey.

Autores: L. Cervera-Chiner, J.J. Manclús, E. Mauriz, N.Pascual, Y. Jiménez & A. Montoya.

- 5) Ponencia oral en el congreso: Ibersensor 2018, Barcelona (Spain), 17-20 September 2018.

Título: New lead-free piezoelectric transducer for biosensor applications.

Autores: D.A. Fernández-Benavides, L. Cervera-Chiner, Y. Jiménez, O. Arias de Fuentes, J. Muñoz-Saldaña & A. Montoya.

- 6) Ponencia oral en el congreso: 4th International conference on food and biosystems engineering (FABE), Heraklion, Crete Island (Greece), 30 May-2 June 2019.
Título: Immunosensors based on high fundamental frequency quartz crystal microbalance (HFF-QCM): a new tool for reliable pesticide detection in honey.
Autores: L. Cervera-Chiner, C. March, I. Escriche, A. Arnau, Y. Jiménez & A. Montoya.

Congresos Nacionales

- 7) Presentación de un póster en el congreso: X Congreso Nacional CyTA-CESIA, León (España) 15-17 mayo de 2019.

Título: Aplicación de biosensores en la detección de DDT en miel.

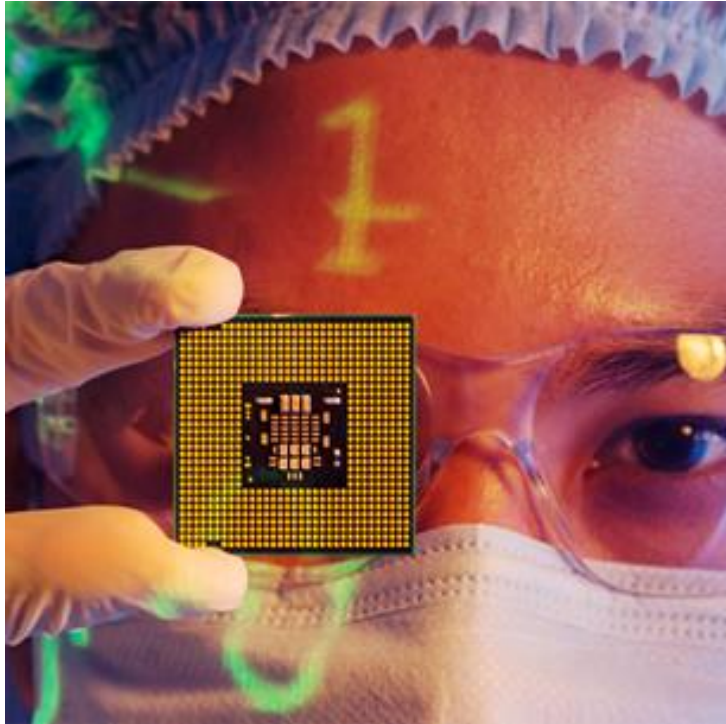
Autores: L. Cervera-Chiner, E. Mauriz, I. Escriche, A. Montoya, Y. Jiménez.

ISBN: 978-84-9773-954-2

Actividades formativas

- 1) Se realizó una estancia en otro centro de investigación (*Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de León, ICTAL*). El objetivo de la estancia era trabajar con otro tipo de inmunosensor, basado en la técnica óptica, llamada SPR (*Surface Plasmón Resonance*) para compararlo con los inmunosensores acústicos HFF-QCM. Durante la estancia se pretendía utilizar los inmunosensores ópticos para la detección de pesticidas y antibióticos en miel basados en la técnica SPR (*Surface Plasmón Resonance*). Los inmunoreactivos para la detección de antibióticos se testaron mediante la técnica ELISA. Los resultados alcanzados durante esta estancia se presentaron en el congreso internacional Ibersensor 2018.
- 2) Durante la realización de la presente tesis doctoral se realizaron estancias breves a la empresa AWSensors, spin-off de la UPV, donde se llevó a cabo una formación en el manejo, optimización y mantenimiento de las plataformas AWS y del software. Así como los experimentos preliminares realizados con el array de sensores HFF-QCM. La empresa AWSensors figura como EPO en el proyecto AGL 2013-48646-R que ha financiado esta investigación.

- 3) Colaboración en las tareas de docencia mediante la impartación de 2 créditos de prácticas de laboratorio de la asignatura “Toxicología en Procesos Industriales Alimentarios” del grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universitat Politècnica de València.



7. Líneas futuras

7. Líneas futuras

Este trabajo es un paso más en el camino hacia la implantación de la tecnología de inmunosensores HFF-QCM en la industria de envasado de la miel, para la detección de pesticidas y antibióticos que se analizan habitualmente en su control de calidad.

En esta tesis se ha logrado aplicar la tecnología HFF-QCM para la detección de dos pesticidas y un antibiótico en miel de manera individual. El siguiente reto es la detección simultánea de varios analitos en un solo ensayo. Esto será posible mediante el uso de un *array* de 24 sensores recientemente desarrollado en el grupo de investigación. Este *array* permite la inmovilización de los inmunoreactivos específicos correspondientes, para la detección de diferentes analitos en cada uno de los sensores individuales que lo forman. De este modo, se podrán detectar los diferentes compuestos de forma simultánea en un solo ensayo y en una misma muestra. Durante la realización de la última fase de la presente tesis doctoral se realizaron unas medidas preliminares con el *array* funcionalizado para la detección de carbaril en todos los sensores que lo componen. Los resultados obtenidos son prometedores y abren la posibilidad de continuar adelante con el desarrollo y mejora de esta nueva aproximación tecnológica. Actualmente, se está trabajando en la inmovilización del *array* para la detección combinada de pesticidas y anticuerpos en la misma muestra.

Todavía deben realizarse notables esfuerzos para que el uso de estos equipos pueda generalizarse a nivel industrial. En este sentido, es necesario resolver los problemas relacionados con la dispersión observada en las medidas. Esta dispersión podría ser debida a la naturaleza y calidad de los inmunorreactivos, en cuyo caso, es importante disponer de unos inmunorreactivos de alta afinidad, purificados, sin proteínas que interfieran en la medida. Otras causas de la mencionada dispersión podrían ser las interferencias ambientales que se producen sobre el sensor, como cambios de temperatura, de presión, etc. En este caso, la solución pasa por mejorar el instrumento de medida, para que sea lo más robusto posible antes estos agentes externos.

Queda pendiente también, analizar los motivos de la disminución de señal observada tras la realización de múltiples ensayos consecutivos. Este fenómeno no se observa en experimentos sin actividad bioquímica, por ejemplo, los correspondientes a cambios de medio agua-glicerol, por lo que puede ser asociado a la bioquímica de los inmunoreactivos. Este fenómeno puede deberse a cambios en las propiedades de la interfaz bioquímica del sensor debidos a los procesos de regeneración en los que se utilizan valores extremos de pH. Estos cambios tan extremos pueden contribuir a la degradación de la capa bio-activa. En este sentido, sería necesario plantear una serie de experimentos encaminados a cuantificar el efecto de los cambios extremos

de pH en la actividad bioquímica del bio-receptor. Mediante microscopía electrónica podría observarse el estado de la SAM en dos situaciones: (1) con la capa recién inmovilizada, y (2) tras la realización de muchos ensayos.

Otro de los retos pendientes, sobre los que el grupo está investigando, está relacionado con el efecto que tiene el flujo de fase móvil sobre el evento de bio-reconocimiento. Dado que la unión antígeno-anticuerpo es una unión de afinidad (no covalente), ésta se ve afectada por aspectos como las dimensiones de los canales de microfluídica que fija la celda de medida, o la velocidad del flujo empleado. Estos fenómenos pueden ser determinantes en la cinemática del proceso de unión. Actualmente, se han comenzado a realizar estudios teóricos y simulaciones con software de mecánica de fluidos para profundizar en estos fenómenos.

En cuanto al pretratamiento de la muestra en miel, podrían estudiarse otras alternativas frente a la dilución, dado que se produce una pérdida considerable de sensibilidad al tener que diluir tanto la muestra para evitar las interferencias debidas a la viscosidad y componentes de la matriz en la señal.