

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA

DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE INMUNOSENSORES
ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE PLAGUICIDAS

BRENDA ITZEL CHECA ORREGO

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ORIENTACIÓN EN
QUÍMICA ANALÍTICA

PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ

2018

Hoja de aprobación:

DEDICATORIA

Dedicado a mi madre, y a la memoria de mi papá y mis abuelos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios todopoderoso por la vida, por mi salud, por las oportunidades. A mi madre por siempre estar conmigo en todas las etapas de mi vida, por su fortaleza y entrega, a mis hermanos y sobrinos quienes me alegran el alma.

A mi asesor Dr. Rafael Vásquez por sus enseñanzas, sus conocimientos me inspiraron a trabajar esta tesis. Al profesor Orlando Leone por su siempre disposición de colaborar. Al Dr. Agustín Costa de la Universidad de Oviedo España, gracias por la forma tan desinteresada de apoyarme y junto a su equipo de investigación en especial a Beatriz Pérez Fernández colaborar en el desarrollo de esta tesis, por las donaciones recibidas, por los conocimientos, su humildad y ser humano lo han llevado a ser el profesional tan exitoso que es.

Al Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Dirección Nacional de Sanidad Vegetal, financiador de mi maestría, Institución en donde me he desarrollado profesionalmente y me han apoyado con mis proyectos e iniciativa, gracias porque una vez más me han permitido avanzar en mi carrera, en especial al Ing. Darío Gordón, actual Director Nacional de Sanidad Vegetal. A mis compañeros de trabajo que colaboraron con ejercer parte de mis responsabilidades para que yo pudiera dedicarme a mi tesis, y hago aquí una mención muy especial, a mi compañero de trabajo Samuel Hernández, quien me auxilió, me apoyó y aprendió la metodología y técnica, estaré eternamente agradecida por su gran profesionalismo demostrado.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica, que a través del Proyecto PAN 5024, logramos la adquisición del equipo utilizado para la tesis, los materiales y reactivos, así como de la asesoría técnica necesaria en especial a Britt Maestroni, quien ha sido oficial técnico de este proyecto por el OIEA y de todos los otros proyectos que he trabajado a lo largo de mi carrera, gracias por motivarme, ser una amiga y ayudarme a crecer.

A mis amistades, que siempre me han motivado a seguir mis metas personales y profesionales, a mi mejor amiga Jhoana Guerra y sobre todo a Gabriel Hernández, en las buenas y en las malas, en todo momento y en especial durante el desarrollo de esta tesis, gracias porque siempre estas cuando más lo necesito.

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-M-IgG-HRP: Anticuerpo secundario policlonal de ratón anti IgG de conejo
BSA: suero albúmina bovina
BSA-IMD: Antígeno proteína conjugada
GOx: Glucosa Oxidasa
HRP: Peroxidasa de rábano silvestre
IgG: Inmunoglobulina G
IgG-HRP: anticuerpo policlonal marcado enzimáticamente con HRP
IMD: Imidacloprid
IMD-HRP: antígeno marcado enzimáticamente
GC-MSMS: Cromatografía de Gas acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo
LC-MSMS: Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo
mAb-IMD: Anticuerpo monoclonal de imidacloprid
MWCNT: Nanotubos de múltiple pared
PBS: Buffer salino de fosfato
QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
SPCEs: Electrodo serigrafado de Carbono
SPEs: Electrodo serigrafado
SWCNT: Nanotubos de pared única
TMB: Tetrametilbencidina

RESUMEN

La introducción de métodos rápidos, económicos y accesibles, como son las técnicas electroquímicas con el desarrollo de inmunosensores nos permite que en estaciones de laboratorio cercano al campo puedan realizarse análisis de residuos de plaguicidas a niveles bajos de concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) con el fin de mejorar la capacidad analítica e incorporar alternativas que permitan accionar en campo de forma oportuna y apoyar los controles oficiales de inocuidad en cuanto al cumplimiento de los Límites Máximos de Residuos (LMRs) de plaguicidas presentes en los alimentos. Se realizó un estudio voltamétrico del imidacloprid y se determinó imidacloprid en tomate a través de un electrodo de carbono sin modificación con la técnica de onda cuadrada, con un recuperado de 107 %, una reproducibilidad de 1,35 %, y un límite de cuantificación de 1,25 μM . Se construyeron dos inmunosensores para la determinación de imidacloprid en agua y vegetales y se compararon los resultados obtenidos con la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Se obtuvo un límite de detección de 0,034 nM y un límite de cuantificación de 0,1 nM con el inmunosensor de ensayo competitivo indirecto con recuperados de 80-106 % y un límite de detección de 0,037 nM, un límite de cuantificación de 0,1 nM con el método de inmunoensayo competitivo directo con recuperados de 90 - 99 %.

ABSTRACT

The introduction of fast, economical and accessible methods, such as electrochemical techniques with the development of immunosensors, allows us to perform pesticides residue analysis at low level concentration ($\mu\text{g} / \text{kg}$) in laboratory stations close to the field. to improve the analytical capacity and incorporate alternatives that allow to operate in the field in a timely manner and support the official safety controls regarding compliance with the Maximum Residue Limits (MRLs) of pesticides present in food. A voltammetric imidacloprid study was performed and imidacloprid was determined in tomato through a carbon electrode without modification with the square wave technique, with a recovered of 107%, a reproducibility of 1,35%, and a limit of quantification of 1,25 μM . Two immunosensors were constructed for the determination of imidacloprid in water and vegetables and the results obtained were compared with the liquid chromatography technique coupled to mass spectrometry. A detection limit of 0,034 nM and a limit of quantification of 0,1 nM was obtained with the indirect competitive assay immunosensor with recovered of 80-106% and a detection limit of 0,037 nM, a limit of quantification of 0,1 nM with the direct competitive immunoassay method with recovered 90-99%.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	2
INDICE	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE CUADROS.....	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Importancia	16
1.2 Planteamiento del problema	18
1.3 Hipótesis	18
1.4 Objetivo General.....	19
1.5 Objetivos Específicos	19
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	20
2.1 Imidacloprid.....	20
2.2 Electrodo Serigrafiados	21
2.3 Nanotecnología	26

2.3.1 Electrodo modificado con nanomateriales.....	26
2.4 Técnicas Electroquímicas	28
Voltamperometría cíclica.....	28
Voltamperometría de pulso diferencial.....	28
Voltamperometría de onda cuadrada	29
Cronoamperometría	29
2.5 Biosensores	30
2.5.1 Marcas de biosensores electroquímicos.....	31
2.5.2 Inmunosensores electroquímicos	33
2.5.3 Inmovilización del elemento de reconocimiento sobre el transductor.....	34
3. METODOLOGÍA	38
3.1 Estudios por voltamperometría cíclica del Imidacloprid (reducción del grupo NO ₂)	38
3.1.1 Instrumentación analítica:	38
3.1.2 Materiales y reactivos:	38
3.1.2.3 Preparación de la solución de trabajo 3 x 10 ⁻⁵ M, 5 x 10 ⁻⁵ M y 8 x 10 ⁻⁵ M...38	
3.2 Estudios del pH entre 8 y 11 del imidacloprid con la técnica voltamperometría de onda cuadrada	39
3.2.1 Instrumentación analítica	39

3.2.2	Materiales y reactivos	39
3.4.1	Optimización de parámetros	39
3.4.2	Calibrados con las técnicas de Voltamperometría de Onda cuadrada y Pulso diferencial	40
3.4.2	Análisis de imidacloprid en muestras fortificadas con la técnica de onda cuadrada	40
3.5	Métodología de Inmunosensor ensayo competitivo indirecto	41
3.5.1	Instrumentación analítica	41
3.5.2	Materiales y reactivos	41
3.5.3	Optimización concentración antígeno marcado (BSA-IMD)	41
3.5.4	Optimización concentración anticuerpo monoclonal (mAb-IMD).....	45
3.5.5	Optimización concentración anticuerpo policlonal (anti IgG-HRP).....	47
3.5.6	Realización del ensayo competitivo.....	49
3.5.8	Fortificación y análisis de imidacloprid en frutas y vegetales	52
3.5.9	Preparación de fortificados y muestras reales método indirecto.....	53
3.5	Métodología de Inmunosensor ensayo competitivo directo.....	55
3.6.2	Instrumentación analítica	55
3.6.2	Materiales y reactivos	55
3.6.3	Optimización concentración anticuerpo monoclonal (mAb-IMD).....	55

3.6.4 Optimización concentración antígeno marcado (IMD-HRP)	58
3.6.5 Realización del ensayo competitivo.....	60
3.7 Validación analítica del Inmunosensor.....	64
3.7.1 Ensayo de Repetibilidad y reproducibilidad	64
3.7.2 Cálculo del Límite de detección (LD).....	65
3.7.3 Cálculo del Límite de Cuantificación	65
3.8 Análisis de Residuos de Plaguicidas por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría De Masas.	65
3.8.1 Análisis de vegetales por método multirresidual QuEChERS por Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo.	65
3.8.2 Análisis de agua por inyección directa, SPE Online por Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo.	67
3.8.2.2 Materiales y reactivos	68
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.1 Optimizaciones	69
4.1.1 Reducción electroquímica del Imidacloprid sobre electrodo de carbono	69
4.1.2 Estudio de pH por voltamperometría de Onda Cuadrada	70
4.1.3 Caracterización del proceso (difusión)	72
4.1.4 Optimización de la Frecuencia voltamperometría de onda cuadrada	73
4.1.5 Calibrados Voltamperometría de Onda Cuadrada y Pulso diferencial	74

4.2	Análisis de imidacloprid en muestra fortificada con la técnica de onda cuadrada...	76
4.3	Resultados del desarrollo de inmunosensores	78
4.3.1	Optimización de parámetros Inmunosensor ensayo competitivo indirecto	78
4.3.2	Optimización de Antígeno proteína conjugada (BSA-IMD)	79
4.3.3	Optimización Anticuerpo monoclonal de imidacloprid (mAb-IMD)	79
4.3.4	Optimización policlonal (anti IgG-HRP): escogido 3 μg /mL (0,5 μg /mL, 0,8 μg /mL mAb)	80
4.3.4	Características analíticas	81
4.3.4.1	Recta de calibrado:.....	81
4.3.1	Optimización Nanopartículas de Oro.....	82
4.3.2	Tiempo de reacción con TMB	83
	Fue seleccionado 1 minuto (10 μg /mL de mAb-IMD, 1 μg /mL IMD-HRP)	83
4.3.3	Optimización mAb-IMD.....	84
	Fue seleccionada la concentración de 6 μg /mL (1 μg /mL IMD-HRP, 1 minuto con TMB).....	84
4.3.4	Optimización IMD-HRP	85
	Fue seleccionado 3 μg /mL (6 μg /mL mAb-IMD y 1 minuto con TMB)	85
4.3.5	Características Analíticas.....	86
4.3.5.1	Recta de calibrado.....	86

4.4 Precisión: Estudio de repetibilidad y reproducibilidad.....	86
4.5 Método multirresidual QuEChERS por Cromatografía líquida Acoplada a Espectrometría de Masas.....	87
5. CONCLUSIONES	92
6. RECOMENDACIONES.....	93
7. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	94
8. BIBLIOGRAFÍA CITADA	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del imidacloprid	21
Figura 2. Reacción de reducción electroquímica del grupo NO ₂ del Imidacloprid	21
Figura 3. Electrodo serigrafiado de carbono	22
Figura 4. Inmovilización del antígeno marcado con BSA	42
Figura 5. Bloqueo de la superficie del electrodo con BSA al 1%	42
Figura 6. Incubación del anticuerpo monoclonal	43
Figura 7. Incubación del anticuerpo policlonal marcado enzimáticamente	44
Figura 8. TMB oxidado enzimáticamente por HRP	44
Figura 9. Inmovilización de antígeno marcado con BSA	45
Figura 10. Bloqueo de la superficie con BSA al 1 %	45
Figura 11. Anticuerpo monoclonal	46
Figura 12. Incubación del anticuerpo monoclonal	46
Figura 13. TMB oxidado enzimáticamente por HRP	46
Figura 14. Inmovilización de antígeno marcado con BSA	47
Figura 15. Bloqueo BSA	47
Figura 16. Anticuerpo monoclonal a 0,8 mg/L en PBS	48
Figura 17. Incubación del anticuerpo policlonal a diferentes concentraciones	48

Figura 18. TMB reacciona con la enzima HRP	49
Figura 19. Inmovilización del antígeno BSA-IMD	49
Figura 20. Bloqueo de la superficie del electrodo con BSA al 1 %	50
Figura 21. Anticuerpo monoclonal 0,8 mg/L en PBS.....	50
Figura 22. mAB libres unido al BSA-IMD depositado	51
Figura 23. TMB oxidado se reduce electroquímicamente	51
Figura 24. Nanoestructuración con Au del electrodo	56
Figura 25. Inmovilización del anticuerpo mAb-IMD.....	56
Figura 26. Incubación de antígeno IMD-HRP	56
Figura 27. TMB oxidado enzimáticamente por HRP	57
Figure 28. Incubación del anticuerpo monoclonal mAB-IMD	58
Figura 29. Incubación del anticuerpo policlonal IMD-HRP.....	59
Figura 30. TMB oxidado enzimáticamente por HRP	59
Figura 31. Nanoestructuración con Au del electrodo	60
Figura 32. Incubación del anticuerpo monoclonal mAB-IMD.....	60
Figura 33. Ensayo competitivo de IMD libre con IMD-HRP.....	61
Figura 34. Incubación de IMD-HRP.....	61
Figura 35. Método de análisis de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales por GC-MSMS y LC-MSMS	66

Figura 36. Sistema de enriquecimiento en línea (SPE Online).....	67
Figura 37. Método de Análisis de residuos de plaguicidas en agua por inyección directa	68
Figura 38. Voltametría cíclica del Imidacloprid en diferentes concentraciones.....	69
Figura 39. Reducción del grupo NO ₂	70
Figura 40. Dependencia de la corriente vs pH.....	71
Figura 41. Dependencia del Voltaje vs pH.....	71
Figura 42. Estudio de pH por Voltametría de Onda Cuadrada.....	72
Figura 43. Velocidades de barrido vs Intensidad de pico.....	73
Figura 44. Optimización de la Frecuencia por Voltametría de Onda Cuadrada.....	74
Figura 45. Recta de calibrado de concentraciones de Imidacloprid por Voltametría de Onda Cuadrada.....	74
Figura 46. Recta de Calibrado de concentraciones de Imidacloprid por Voltametría de Pulso diferencial.....	75
Figura 47. Recta de calibración de niveles de concentración de imidacloprid por el método de mínimos cuadrados.....	76
Figura 48. Análisis de Imidacloprid en muestra de tomate.....	77
Figura 49. Optimización de la concentración de BSA.....	78
Figura 50. Optimización de antígeno proteína conjugada BSA-IMD.....	79
Figura 51. Optimización de la concentración de anticuerpo monoclonal de imidacloprid mAb-IMD.....	80

Figura 52. Optimización del anticuerpo policlonal.....	80
Figura 53. Recta de Calibrado método de ensayo competitivo indirecto	81
Figura 54. Optimización de Nanopartículas de Oro	82
Figura 55. Optimización del tiempo de reacción del TMB.....	83
Figura 56. Optimización del anticuerpo monoclonal.....	84
Figura 57. Optimización del antígeno marcado enzimáticamente (IMD-HRP)	85
Figura 58. Recta de calibrado del método de ensayo competitivo directo del Imidacloprid	86
Figura 59. Medición cronoamperométrica de imidacloprid en una muestra real de.....	87
Figura 60. Análisis cuantitativo de imidacloprid una muestra real de pimentón por LC-MSMS	88
Figura 61. Análisis cuantitativo de imidacloprid en agua.....	90
Figura 62. Señal de imidacloprid a una concentración de 0,01 mg/kg en tomate por LC-MSMS	91
Figura 63. Análisis de imidacloprid en tomate por el método de ensayo competitivo directo	91

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Tabla de tiempos método de ensayo competitivo indirecto	43
CUADRO 2. Volúmenes de reactivos para la determinación de IMD en muestras método indirecto.	53
CUADRO 3. Tabla de tiempos método de ensayo competitivo directo	57
Cuadro 4. Volúmenes de reactivos para la determinación de IMD en muestras método indirecto.	64
CUADRO 5 Cálculo de los LD y LC con la recta de regresión de mínimos cuadrados ...	76
CUADRO 6. Análisis cuantitativo de imidacloprid con inmunosensor método ensayo competitivo indirecto	89

1. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria, como mecanismo de garantía para la trazabilidad de alimentos inocuos, constituye el concepto principal que relaciona la producción de alimentos y la salud pública. El estado panameño ha realizado grandes esfuerzos por mejorar la capacidad del sector oficial en cuanto al desarrollo de programas y normas en función a la inocuidad de alimentos y trazabilidad agrícola para apoyar a la producción nacional (DNSV-MIDA, 2012). La inocuidad de alimentos implica la ausencia o niveles aceptables y seguros de contaminantes que pueden ser perjudiciales para la salud de manera aguda o crónica; sin embargo, el uso de plaguicidas juega un importante papel en la agricultura, ya que permite alcanzar los niveles máximos de producción que exige la demanda creciente de alimentos (FAO-MIDA, 2011).

Los plaguicidas se encuentran generalmente a muy bajas concentraciones en matrices muy complejas, por lo que es necesaria la utilización de metodologías confiables para su detección y cuantificación. En este sentido, el empleo de la cromatografía (de gases y de líquidos) acopladas a espectrometría de masas ha permitido la detección adecuada de este tipo de sustancias contaminantes en los alimentos a concentraciones extremadamente bajas.

En Panamá existe un programa de monitoreo de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales desde el 2007 a la fecha. Los resultados han identificado cultivos como el apio y pimentón los cuales en los primeros años de monitoreo se detectaron y confirmaron la presencia de insecticidas organofosforados en más del 80 % de las muestras analizadas en el programa. A raíz de estos datos se realizan acciones en el tema de aplicaciones terrestres de plaguicidas a través de su reglamentación y se han prohibido y restringido plaguicidas organofosforados (FAO-MIDA, 2011).

El desarrollo de biosensores para la detección de plaguicidas ha sido un área de investigación de beligerancia en los últimos años, en respuesta a la demanda de técnicas simples, rápidas, selectivas y de bajo costo. El avance de la nanotecnología ha permitido

desarrollar electrodos serigrafiados para la construcción de biosensores muy sensibles y específicos para el monitoreo de contaminantes emergentes en alimentos y en muestras ambientales (Rotariu, Lagarde, Jaffrezic-Renault, & Bala, 2016). El desarrollo de biosensores no busca competir con las técnicas convencionales sino complementarlas, pues su desarrollo específico a diferentes contaminantes permitirá incorporar un mayor número de matrices a los programas nacionales de monitoreo.

Un biosensor electroquímico explora la detección de propiedades físico-químicas de las sustancias electroactivas para realizar el biorreconocimiento que proporciona la señal mensurable: la corriente eléctrica, voltaje, resistencia o carga superficial (Liu, S.; Zheng Z.; Li, 2013).

En la clasificación de los biosensores tenemos como elemento de reconocimiento los anticuerpos (monoclonales o policlonales), los ácidos nucleicos y los que han sido desarrollados basándose en la inhibición enzimática. Esta actividad se puede medir mediante el empleo de diferentes técnicas de transducción, por ejemplo, amperometría, potenciometría, espectrometría, fluorimetría y termometría, para la detección de diferentes sustratos o productos de la reacción enzimática (Liu, S.; Zheng Z.; Li, 2013).

El principal inconveniente de los biosensores amperométricos basados en la acetilcolinesterasa (AChE) está relacionado con el alto potencial que se debe aplicar para mantener constante la generación de producto enzimático, es decir, tiocolina, que tiene como consecuencia la inestabilidad del biosensor. Una solución que se ha aplicado a este problema, es el uso de mediadores y materiales altamente conductores tales como nanotubos de carbono (Oliveira et al., 2013) y otros materiales nanoestructurados como las nanopartículas de oro (Vargas-Bernal, Rodríguez-Miranda, & Herrera-Pérez, 2012). Las nanopartículas de oro (Au-NP), son uno de los nanomateriales utilizados más comúnmente como materiales de detección de trazas de sustancias debido a sus excelentes propiedades fotoeléctricas (Luo, Wu, & Gou, 2013).

Los nanomateriales de carbono ofrecen oportunidades atractivas para mejorar los rendimientos de los sensores debido a sus excelentes propiedades eléctricas y mecánicas, alta superficie específica y biocompatibilidad. La incorporación de nanomateriales de carbono en las plataformas biosensoras es ahora un área de rápido crecimiento en el diseño de biosensores (Sainz, Baldrich, Martínez, & Rodríguez, 2014). La nanoestructuración del electrodo de trabajo, al modificar la superficie serigrafiada con nanopartículas de distinta naturaleza le van a conferir propiedades inherentes a las mismas que en general van a ampliar su campo de aplicación sin encarecer demasiado su costo (Gonzales & Costa, 2010).

En la fabricación de los biosensores se utilizan varios métodos de inmovilización como son la adsorción física a la superficie sensora, la unión covalente, el atrapamiento en el interior de matrices poliméricas o el acoplamiento indirecto de especie biomoleculares intermedias. La mayoría de los inmunosensores desarrollados que utilizan como elemento de reconocimiento anticuerpos monoclonales se basan en un ensayo competitivo o en un sándwich, por ejemplo: 1. Ensayo competitivo directo que usa antígeno marcado con enzima; 2. Ensayo en sándwich usando anticuerpo de detección marcado con enzima; 3. Ensayo competitivo directo que usa anticuerpo primario marcado con enzima; 4. Ensayo competitivo indirecto usando un anticuerpo secundario marcado con enzima. Para los inmunosensores electroquímicos, el soporte es un electrodo de trabajo (Arduini et al., 2016). En este trabajo hemos utilizado los métodos de ensayo competitivo directo y ensayo competitivo indirecto para la cuantificación de imidacloprid en muestras de agua y vegetales.

1.1 Importancia

Las técnicas electroquímicas nos ofrecen una importante oportunidad de desarrollar métodos de análisis rápidos por su simplicidad, bajo costo, su rápida respuesta, así como límites de detección en el orden de las partes por billón. Los biosensores se han convertido en foco de investigación utilizados en la detección de plaguicidas en los programas de

monitoreo de alimentos. Ellos poseen características tales como: una alta sensibilidad, respuesta rápida, bajo costo y la miniaturización, facilitando una determinación en tiempo real (Cesarino, Moraes, Lanza, & MacHado, 2012). El uso de electrodos serigrafados (SPEs) como transductores para la construcción de sensores electroquímicos ofrece, además, grandes ventajas debido a su carácter desechable y gran versatilidad, que reside en la amplia gama de posibles métodos de modificación de la superficie, entre los que se encuentran la incorporación de mediadores redox o nanopartículas metálicas. Esto último, por lo general, mejora notablemente la sensibilidad del sensor desechable debido a sus excelentes propiedades catalíticas (Marta, Peña, & Renedo, 2014).

Los inmunosensores son biosensores que usan anticuerpos o antígenos como elemento sensor específico y proporcionan señales dependientes de la concentración. Existe un gran potencial en las aplicaciones de tecnologías de inmunosensayo para la detección rápida de residuos de plaguicidas en los alimentos y el medio ambiente (Lu QIAO, Huiying JIA, Xia SUN, 2014).

Los resultados de análisis químicos cuantitativos nos proveen una información válida y confiable, el tiempo de respuesta en estos análisis, es un desafío; obteniéndose resultados entre 5 a 7 días y la toma de decisiones para cuarentenar, decomisar y destruir un lote o parcela contaminado no puede hacerse de forma inmediata, por lo que es necesario contar con técnicas más rápidas de análisis en la que pueda ser determinada en pocas horas la presencia del residuo o contaminante en la fruta o vegetal.

En el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas en Frutas y Vegetales del Ministerio de Desarrollo Agropecuario en Panamá y en sus Estaciones de campo en Chiriquí y Las Tablas, ha sido implementada una metodología de análisis rápido que detecta dos familias químicas de plaguicidas organofosforados y carbamatos a través de la inhibición de la acetilcolinesterasa. Se realiza la medición, y de acuerdo a porcentajes de inhibición existen categorías para rechazar un lote de frutas y vegetales. Sin embargo, es preciso introducir otras técnicas en la cuales se pueda detectar otras familias químicas de

plaguicidas y contaminantes de manera rápida y así accionar en campo de forma oportuna. Específicamente para plaguicidas distintos de los organofosforados que a partir del año 2012 han presentado frecuentemente incidencia de contaminación, los cuales han sido ejecutados con las técnicas convencionales de cromatografía acoplada a espectrometría de masas. Tal es el caso de plaguicidas como bifentrina, carbendazim, cipermetrina fipronil, e imidacloprid actualmente muy utilizados en Panamá entre otros (DNSV-MIDA, 2012).

Son muy pocos los países que han basado sus esquemas de monitoreo de residuos de plaguicidas sobre métodos de análisis rápido como complemento de las técnicas químicas convencionales. Países como Belice y Uruguay, el Organismo Internacional Regional de la Sanidad Agropecuaria y el Organismo Internacional de Energía Atómica han mostrado interés en este esquema, por lo que es sumamente importante desarrollar otros métodos rápidos (screening) para el análisis de moléculas de plaguicidas distintas de los organofosforados y carbamatos ya implementados.

1.2 Planteamiento del problema

Actualmente existe la necesidad de desarrollar técnicas rápidas de detección y análisis que puedan ser utilizadas como métodos de "advertencia", de pronta detección de residuos de plaguicidas en los alimentos, antes de que estos lleguen al consumidor. A través de metodologías de análisis rápido se logra monitorear una gran cantidad de muestras en las zonas mayormente productivas de la región, lo que facilita tener una representatividad y suficientes datos para dar inicio a un análisis de riesgo.

1.3 Hipótesis:

A través del desarrollo y aplicación de los inmunosensores electroquímicos se logran detectar plaguicidas en vegetales a muy bajas concentraciones en unidades de $\mu\text{g}/\text{kg}$.

1.4 Objetivo General

Desarrollar metodologías de análisis rápidos, eficientes y confiables como herramienta para determinar residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal con el fin de apoyar a los entes reguladores en sus controles para la inocuidad alimentaria.

1.5 Objetivos Específicos

1. Estudiar las propiedades electroquímicas de imidacloprid
2. Construir un inmunosensor para la cuantificación del imidacloprid en muestras de origen vegetal.
3. Comparar los resultados obtenidos con el biosensor electroquímico con técnicas analíticas de alta confiabilidad como la cromatografía acoplada a espectrometría de masas.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Imidacloprid

El imidacloprid (1- (6-cloro-3-piridilmetil) -N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine) es el primer miembro de la familia de los neonicotinoides y su introducción representa un hito en la investigación de los insecticidas (Navalon, El-Khattabi, Gonzalez-Casado, & Vilchez, 1999). Es uno de los neonicotinoides más utilizados para la protección de cultivos en todo el mundo debido a su baja persistencia en suelo y alta actividad insecticida a muy baja dosis de aplicación (Brahim, Belhadj Ammar, Abdelhédi, & Samet, 2016). El imidacloprid afecta principalmente el sistema nervioso central de los insectos (Guzsvány, Papp, Zbiljic, Vajdle, & Rodic, 2011) (River-Guzman, Franco, García-Beltrán, Calderon, & Nagles, 2018) y es efectivo para el control de pulgones, moscas blancas, escamas, psyllidae, insectos de plantas y otras especies dañinas de plagas, incluyendo cepas resistentes. Se utiliza como aderezo de semillas, tratamiento de suelos y tratamientos foliares en diferentes cultivos, incluidos arroz, algodón, cereales, maíz, remolacha azucarera, papas, hortalizas, cítricos, pepitas y frutas de hueso. Debido a la extensa aplicación de los insecticidas neonicotinoides que incluyen imidacloprid para operaciones agrícolas, sus residuos pueden aparecer en frutas y verduras y, por lo tanto, puede representar un riesgo potencial para los consumidores.

Teniendo en cuenta los riesgos que representan para las abejas, la Unión Europea ha dispuesto que las semillas tratadas con productos fitosanitarios que contengan imidacloprid no se comercialicen ni se usen excepto cuando se destinen a ser utilizadas únicamente en invernaderos permanentes y los cultivos resultantes vayan a permanecer en un invernadero permanente durante todo su ciclo vital (Food & Authority, 2016).

La detección rápida del imidacloprid y otros insecticidas neonicotinoides se vuelve cada vez más importante para la protección de la salud y del medioambiente. Los métodos analíticos comunes para la determinación de imidacloprid incluyen Cromatografía líquida

acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo, detección amperométrica, y la técnica de ELISA (Brahim et al., 2016).

La reacción de reducción de imidacloprid [1- (6-cloro-3-piridilmetil) -N-nitroimidazolidin-2-ylideneamina] en un electrodo de mercurio muestra dos ondas bien definidas en el rango de pH 2.0-11.0. El analito captura cuatro electrones en el primer paso y dos en el segundo para dar la hidroxilamina.y derivados de aminas, respectivamente ((Navalon et al., 1999)

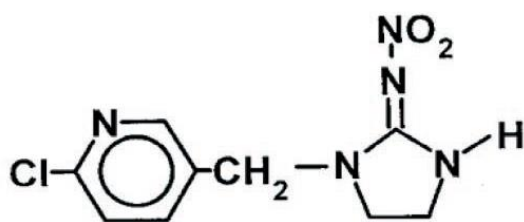


Figura 1. Estructura del imidacloprid

La reacción de reducción electroquímica del imidacloprid se produce a través de la reducción del grupo nitro-NO₂ de la estructura química del imidacloprid al producir derivados de hidroxilamina

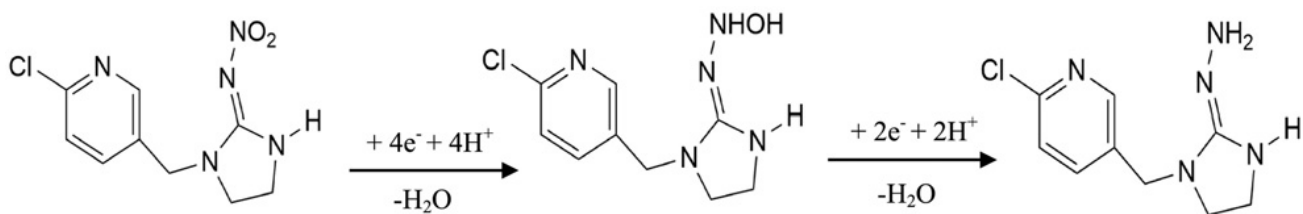


Figura 2. Reacción de reducción electroquímica del grupo NO₂ del Imidacloprid

2.2 Electroodos Serigrafiados

Según la IUPAC, un sensor químico es un dispositivo que transforma información química (cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa) en una señal analíticamente útil (Dudok de Wit, 1987) . Un sensor químico como cualquier dispositivo miniaturizado que

responde de manera inequívoca a un analito concreto en el seno de una muestra compleja, consta esencialmente de dos partes: el elemento de reconocimiento que interactúa con el analito y concede selectividad al sensor y el transductor que permite convertir esa interacción en una señal analítica. Cuando el transductor es un electrodo, el sensor será un sensor electroquímico y cuando en el elemento de reconocimiento intervienen especies biológicas estaremos en presencia de un biosensor. (Fanjul-Bolado, Queipo, Lamas-Ardisana, & Costa-García, 2007)

Los electrodos serigrafiados (SPEs) con el tiempo están siendo mayormente utilizados que los electrodos convencionales más comunes como son la pasta de carbono, carbono vítreo o metálicos (oro, platino, mercurio). El diseño de los SPEs, más utilizado y sencillo es el que se representa en la figura 3, el electrodo de trabajo con geometría circular está rodeado por los electrodos de referencia y auxiliar. Este diseño permite conectar eléctricamente los tres electrodos entre sí con la adición de un pequeño volumen de electrolito sobre ellos (Fanjul-Bolado et al., 2007).

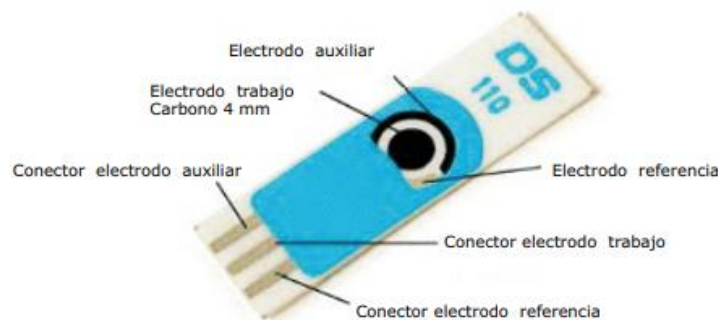


Figura 3. Electrodo serigrafiado de carbono

Las importantes ventajas que presentan los SPEs frente a otras herramientas electrónicas, se destacan su bajo costo ya que estos dispositivos se pueden producir en masa y de manera automatizada, lo cual permite que se puedan utilizar con un carácter desechable y puedan ser eliminados después de hacer cada análisis (Ricci, Adornetto, & Palleschi, 2012). Esta característica adquiere importancia para ciertos tipos de muestras complejas, que puedan invalidar la superficie electródica tras una sola medida. La flexibilidad del diseño y

fabricación de electrodos serigrafiados personalizados, concede a los investigadores desarrollar un método específico para cada aplicación.

La robustez de los materiales y los formatos de los electrodos serigrafiados permiten una fácil modificación de la superficie con otro tipo de materiales para mejorar las propiedades químicas o electroquímicas que presentan y su empleo en nuevas aplicaciones. Los SPEs se han modificado con numerosos materiales entre los que se destacan: Nanotubos de carbono, grafeno, proteínas, hebras de ADN, monocapas autoensambladas, nanopartículas metálicas o semiconductoras. Además, la superficie electródica pueden ser tratada de diferentes formas para mejorar sus propiedades electroquímicas, como por ejemplo, mediante la aplicación de un plasma o adición de especies químicas (Washe, Lozano-Sánchez, Bejarano-Nosas, & Katakis, 2013).

El electrodo de referencia sólido, normalmente de plata, funciona como un electrodo de quasireferencia; en ciertas condiciones experimentales, el potencial de este electrodo podría no ser totalmente reproducible y estable a lo largo de un experimento. Además, el potencial de este electrodo podría variar al utilizar diferentes electrolitos de fondo y no puede ser definido de manera precisa (Martin & Grgicak, 2014). Algunos autores han intentado mejorar el comportamiento del electrodo de referencia, ya sea generando una película fina de AgCl en la superficie (aunque no dejaría de ser un electrodo de quasireferencia), o además de la película de AgCl, añadir un polímero con una cantidad constante de Cl⁻ para mantener el potencial de este electrodo (Cepriá, Córdova, Jiménez-Lamana, Laborda, & Castillo, 2014).

Los electrodos serigrafiados se fabrican con la tecnología de microfabricación screen-printing que permite obtener electrodos sólidos planos, mecánicamente robustos, y con la geometría deseada. Esta tecnología está bien establecida industrialmente en la actualidad para la producción en masa de estos dispositivos mediante una fabricación sencilla, rápida y versátil (Albareda-Sirvent, Merkoçi, & Alegret, 2000). Normalmente, los SPEs son fabricados en un pequeño sustrato, generando dispositivos miniaturizados y maximizando

la producción, hecho que conduce a dispositivos de bajo costo. (Renedo, Alonso-Lomillo, & Martínez, 2007) (Taleat, Khoshroo, & Mazloun-Ardakani, 2014).

La composición de la tinta para serigrafiar es información de propiedad del fabricante, pero algunos de los aglutinantes más utilizados suelen ser resinas epoxy, alquídicas, fenólicas o de poliuretano. En algún estudio previo, se ha encontrado que el aglutinante en varias de las tintas utilizadas consiste básicamente de cloruro de polivinilo (PVC) (Kadara, Jenkinson, & Banks, 2009). Se disponen gran cantidad de tintas comerciales para serigrafiar, siendo las más empleadas las de grafito, oro, plata y platino, pero la posibilidad de combinarlas con otras especies químicas, permite obtener una variedad de tintas casi ilimitada. La tinta elegida para la fabricación es un parámetro crítico ya que va a tener una gran influencia en el comportamiento final del dispositivo. De hecho, tintas fabricadas con el mismo material (por ejemplo, grafito), pueden presentar diferencias en sus características (Wang, Tian, Nascimento, & Angnes, 1998). El comportamiento de una especie puede variar usando diferentes tintas, y por tanto, al utilizar diferentes electrodos comerciales (Fanjul-Bolado, Hernández-Santos, Lamas-Ardisana, Martín-Pernía, & Costa-García, 2008). El grafito es el material más empleado para los electrodos de trabajo serigrafiados ya que es químicamente inerte, presenta una baja corriente de fondo, una ventana de potenciales amplia y es de bajo costo (McCreery, 2008).

Los electrodos serigrafiados así producidos ya constituyen un buen sistema de transducción y son útiles para la construcción de un buen número de sensores electroquímicos. La nanoestructuración del electrodo de trabajo va a hacer posible el nacimiento de transductores de nueva generación que al modificar la superficie serigrafiada con nanopartículas de distinta naturaleza le van a conferir propiedades inherentes a las mismas que en general van a ampliar su campo de aplicación sin encarecer demasiado su costo (Martín-Yerga, González-García, & Costa-García, 2012).

Los electrodos pueden ser de diversas maneras con nanomateriales para generar un electrodo nanoestructurado (Pereira da Silva Neves, García, Delerue-Matos, & García,

2011). La forma de modificación y el material de partida utilizado es una etapa clave para obtener un detector electroquímico de alta calidad. Una de las cualidades de los electrodos serigrafiados es la facilidad con la que se puede modificar su superficie para conseguir mejoras en su comportamiento (Putzbach & Ronkainen, 2013). Algunas de las formas más importantes de nanoestructuración de electrodos serigrafiados se describen a continuación (Reverté, Prieto-Simón, & Campàs, 2016):

Dopado de la tinta: el nanomaterial se puede combinar con la tinta de serigrafiado, y el electrodo puede ser fabricado incorporando el nanomaterial dentro de su estructura. La ventaja de esta metodología es que los dispositivos fabricados ya poseen el material y no es necesaria una modificación posterior (Randviir, Brownson, Metters, Kadara, & Banks, 2014).

Adsorción directa: el nanomaterial es adsorbido de forma física (ya sea por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas) o química (llamada quimisorción, proceso en el que se forma enlaces covalentes espontáneos) sobre la superficie del electrodo, por simple colocación de una gota del nanomaterial dispersado en un disolvente adecuado y posterior secado para evaporación del disolvente (Pereira da Silva Neves et al., 2011). El disolvente utilizado debe ser compatible con el material electródico.

Unión covalente: mediante la unión de grupos funcionales presentes en la superficie electródica y en el nanomaterial a inmovilizar.

Electrodeposición: diferentes nanomateriales especialmente nanopartículas metálicas o polímeros conductores pueden ser electrodepositados sobre la superficie electródica mediante la aplicación de un potencial, barrido o de potenciales o corriente eléctrica a una disolución que contenga un metal o complejo metálico oxidado (Martínez-Paredes, González-García, & Costa-García, 2009) (Fernández et al., 2015).

2.3 Nanotecnología

2.3.1 Electrodo modificado con nanomateriales

La nanotecnología ha proporcionado unas posibilidades muy interesantes en diferentes aplicaciones, entre ellas en análisis electroquímico (Marek Trojanowicz, 2016). Una aplicación en este campo es la mejora de las propiedades electródicas utilizando electrodos modificados con nanomateriales (Jubete et al., 2009). Estos electrodos pueden funcionar como transductores electroquímicos si están acoplados a un elemento de reconocimiento, o pueden funcionar como detectores electroquímicos si se utilizan para la cuantificación de alguna especie sin formar parte de un sensor. En estos casos, la electrocatálisis que proporcionan ciertos nanomateriales suele ser muy importante para obtener un dispositivo analítico ciertamente selectivo. Algunas de las ventajas más importantes que poseen los electrodos nanoestructurados son las siguientes:

Un aumento del área superficial debido a la alta relación superficie/volumen de los nanomateriales. Este hecho ofrece diferentes resultados como la posibilidad de inmovilizar el transductor con una mayor carga protéica que mejore el rendimiento del sensor. Una mayor área superficial está, normalmente, relacionada con una mayor respuesta analítica y por tanto, con una mejora en la sensibilidad (Araque Caballero, 2015).

La alta biocompatibilidad de muchos materiales nanoestructurados permite una mejora en la fabricación de la fase sensora evitando la pérdida de funcionalidad que puede ocurrir al inmovilizar directamente las biomoléculas en su soporte sólido macroscópico. El tamaño similar de los nanomateriales y las biomoléculas permiten un contacto más eficiente y una unión menos agresiva (Shohayeb, Arida, Mersal, & El-Badawy, 2016).

Los nanomateriales de carbono ofrecen oportunidades atractivas para mejorar los rendimientos de los sensores debido a sus excelentes propiedades eléctricas y mecánicas, alta superficie específica y biocompatibilidad. La incorporación de nanomateriales de

carbono en las plataformas biosensoras es ahora un área de rápido crecimiento en el diseño de biosensores (Sainz et al., 2014).

Los nanomateriales de carbono más utilizados hasta la fecha son nanotubos (de pared única (SWCNT) y de paredes múltiples (MWCNT)) son tubos de tamaño nanométrico constituidos por unidades hexagonales de átomos de carbono con hibridación sp^2 ; los diámetros suelen ir desde 0,4 nm a 3 nm para los SWCNTs y desde 2 a 100 nm para los MWCNTs (Kim, Rusling, & Papadimitrakopoulos, 2007) y grafenos (grafeno (GR), óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO)), pero carbono quantum-dots (QD) emerge como materiales novedosos para la construcción de sensores. Los quantum dots son nanopartículas semiconductoras de compuestos metálicos, que presenta unas propiedades ópticas y electroquímicas muy interesantes, y son ampliamente utilizados en aplicaciones con fundamento óptico, energético o bioanalítico (Martín-Yerga, González-García, & Costa-García, 2014).

Las nanopartícula de oro han tenido siempre un gran atractivo tanto desde el punto de vista biológico, por la excelente biocompatibilidad entre las proteínas y el oro, como por sus aplicaciones electroanalíticas, debido tanto a la elevada conductividad de las mismas como a la elevada relación superficie/volumen que presentan. Esto unido a la fiabilidad de obtener sus suspensiones coloidales estables con un tamaño medio de partículas con muy poca desviación ha abierto en la actualidad un nuevo campo en la transducción electroquímica (Daniel & Astruc, 2004). El grafeno es un material que se compone de una red bidimensional de átomos de carbono enlazados por hibridación sp^2 , esta estructura le proporciona unas propiedades muy interesantes como una elevada área superficial incluso mayor que los nanotubos, una excepcional conductividad eléctrica y térmica, alta resistencia mecánica y elasticidad. Estas características han resultado tener un gran impacto en electroquímica general (Güell, Ebejer, Snowden, MacPherson, & Unwin, 2012) (Güell et al., 2015) y en sensores electroquímicos en particular (Bahadir & Sezginürk, 2016). Como el grafeno suele ser poco soluble en disolventes acuosos, el óxido de grafeno suele emplearse en mayor medida para aplicaciones electroanalíticas. Su reducción (Calvo et al.,

2015) o electrodeposición (Hilder, Winther-Jensen, Li, Forsyth, & MacFarlane, 2011), permite recuperar las mejores propiedades gráficas para este tipo de aplicaciones.

2.4 Técnicas Electroquímicas

Las técnicas voltamperométricas fueron desarrolladas a partir de la polarografía, la cual fue descubierta por Heyrovsky, a principios de los años veinte, cuando estudiaba las propiedades que poseía un electrodo goteante de mercurio (B. Segura, 2016). En las técnicas voltamperométricas se evalúa el cambio en la corriente tras aplicar un barrido de potenciales, es decir, el potencial aplicado varía en función de tiempo (Pingarrón Carrazón, 1999). Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas según el tipo y magnitud de la excitación aplicada para producir la reacción electroquímica, y la magnitud medida como señal electroquímica. A continuación, se explicarán brevemente las técnicas electroquímicas empleadas en este trabajo:

Voltamperometría cíclica es la técnica electroquímica más utilizada tanto para estudiar procesos redox como para caracterizar el comportamiento de un electrodo. Esta técnica se basa en la medida de la intensidad de la corriente generada cuando se realiza un barrido de potencial. Este se aplica en sentido directo (desde un potencial inicial E_0 hasta un potencial final E_i) e inverso (desde el potencial E_i hasta un potencial E_{ii} que suele ser igual, aunque no necesariamente, a E_0), realizando lo que se denomina un barrido triangular de potencial. La pendiente correspondiente a la variación del potencial con el tiempo es la velocidad de barrido (Sosa, 2015).

Voltamperometría de pulso diferencial fue originalmente introducida para el electrodo goteante de mercurio (DME) (polarografía de pulsos) con el objetivo de aplicar un pulso por cada nueva gota de mercurio utilizada. En esta técnica se aplica un barrido de potenciales; básicamente consiste en una secuencia de pulsos de amplitud constante que se superpone a un incremento de potencial escalonado. La corriente es medida justo antes de la aplicación del pulso y al final del pulso, y la respuesta obtenida se representa por la

diferencia entre ambas corrientes como función del potencial al pie del pulso, resultando en una respuesta voltamperométrica en forma de pico (Pingarrón Carrazón, 1999).

Voltamperometría de onda cuadrada se aplica un barrido de pulsos con un potencial de base que varía de forma escalonada. En cada escalón de potencial un doble pulso simétrico es superpuesto. El primer pulso incrementa el potencial sobre el nivel del escalón, mientras que el segundo desplaza el potencial por debajo de este nivel. La corriente es detectada al final de cada pulso y la respuesta obtenida es la diferencia de las corrientes entre cada pulso positivo y negativo. Esta forma es realmente interesante para sistemas reversibles, donde se puede estar produciendo tanto a la oxidación como reducción de la especie redox, por lo que la diferencia entre las corrientes se incrementa. Una ventaja de esta técnica con la de pulso diferencial es que la velocidad de barrido puede ser mucho más rápida. Las características de onda cuadrada hacen que la técnica voltamperométrica sea más sensible, especialmente si las corrientes capacitivas no son muy importantes (ya que la onda cuadrada se ve más afectada por su contribución en comparación a la de Pulso diferencial, por la aplicación de pulsos más agresivos con una mayor amplitud (Pingarrón Carrazón, 1999).

Cronoamperometría se basa en la medida de la corriente electrolítica en función del tiempo cuando se aplica un potencial. Este potencial puede ser constante durante toda la medida o, en experimentos más complicados, se pueden aplicar diferentes potenciales durante diferentes tiempos a lo largo de toda la medida. En una cronoamperometría la intensidad faradaica decae exponencialmente desde un valor teórico de infinito $t=0$ y tiende a cero a medida que aumenta el tiempo. Para un electrodo plano, cuando el transporte de masa es controlado por difusión, la relación entre la corriente y el tiempo viene dada por la ecuación de Cottrell:

$$i(t) = \frac{nFAD_{Fe^{3+}}^{1/2} C_{Fe^{3+}}^*}{\pi^{1/2} t^{1/2}}$$

2.5 Biosensores

Un biosensor electroquímico hace posible la combinación de la sensibilidad de las técnicas electroquímicas con la selectividad de los procesos de reconocimiento biológico de una forma sencilla (Xu & Wang, 2012). En términos generales la selectividad de un biosensor debería ser atribuida al elemento de reconocimiento y la sensibilidad del mismo debería ser responsabilidad del transductor y de la técnica electroquímica suelen también influir en la selectividad del biosensor. Se puede asegurar que la sensibilidad del sensor depende exclusivamente del transductor (Gonzales & Costa, 2010), de la técnica electroquímica elegida y de la metodología analítica seguida. De ahí que la metodología analítica tenga un papel preponderante en el desarrollo de biosensores de elevada sensibilidad.

Una de las clasificaciones más importantes de los biosensores se corresponde con el tipo de transducción que utiliza. Existen dos tipos posibles de transducción: química y física. En la transducción química, se determina el cambio en la composición química de la fase sensora en respuesta al proceso de reconocimiento. Este cambio puede determinarse directamente o con la ayuda de un reactivo secundario del proceso de reconocimiento. La transducción física mide el cambio en una propiedad física del sistema tras la reacción de reconocimiento

La característica analítica de los biosensores se puede determinar mediante los parámetros típicos utilizados en la caracterización de un método analítico convencional. Estos parámetros estadísticos son descritos en literatura especializada (Miller, J.N., 2010); sin embargo a continuación describen los más importantes:

Exactitud: grado de concordancia entre el resultado de una determinación (o la media de n resultados) dado por el biosensor y la concentración real del analito en la muestra.

Precisión: indica el grado de coincidencia entre los resultados de medidas independientes obtenidas bajo condiciones similares. Dentro de la precisión se pueden distinguir dos

términos: repetibilidad, cuando las medidas son realizadas en las mismas condiciones (mismo operador, aparatos y laboratorio, y en un intervalo corto de tiempo) y reproducibilidad, cuando las condiciones bajo las que se realizan las medidas son diferentes (diferente operador, aparatos, laboratorios y en largos periodos de tiempo).

Selectividad: indica el grado de discriminación de un sensor para determinar un analito sin interferencia de otras especies en la muestra. Si un concomitante de la muestra afecta a la respuesta del sensor por interactuar con la superficie sensora, esto produce una interferencia no específica.

Rango dinámico: es el rango de concentraciones que es capaz de detectar el sensor.

Sensibilidad: indica el cambio en la respuesta del biosensor producido por una variación (en una unidad) en la concentración del analito. Para una concentración de analito fija la sensibilidad será mayor cuanto mayor sea el cambio en la respuesta dada por el biosensor. Si la respuesta del biosensor se relaciona con la concentración del analito de forma lineal, es decir, mediante una recta de calibrado, la pendiente de esa recta es la sensibilidad.

Límite de detección: es la mínima concentración de analito que el biosensor es capaz de detectar con un grado de incertidumbre aceptable.

Límite de cuantificación: es la mínima cantidad de analito que el biosensor es capaz de cuantificar con un grado de incertidumbre aceptable.

2.5.1 Marcas de biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos sin marca pueden hacer uso de diferentes estrategias para detectar la reacción de reconocimiento biológica. Las marcas electroactivas directas consisten en la funcionalización de algún componente de la reacción de reconocimiento con una especie que pueda ser oxidada o reducida fácilmente. Algunas marcas de este tipo pueden ser el dinitrofenol, ferroceno, complejos de oro (I) o el

hexaaminrutenio que se une a hebras de ADN. La fácil medida directa de estas especies es su mayor ventaja, pero, normalmente, no permite una gran amplificación a no ser que se utilicen en sistemas de unión más complejos.

Las ventajas de las marcas enzimáticas se basan principalmente en la capacidad de la reacción enzimática de catalizar la generación de un producto a lo largo del tiempo y por tanto, de obtener un cierto grado de amplificación, con unos resultados muy interesantes en términos de sensibilidad (y límites de detección). Existen numerosas enzimas que pueden ser utilizadas con diferentes estrategias de detección electroquímica como, por ejemplo:

Detección de la enzima directamente, que involucra la transferencia electrónica entre el centro redox de la enzima y el electrodo. Esta transferencia es difícil, por lo que se suele introducir alguna especie capaz de funcionar como cable conductor y transferir electrones entre la enzima y el electrodo.

La reacción enzimática genera un producto electroactivo que es medido en el electrodo.

El intermedio enzimático puede reaccionar con un mediador redox externo cuyo producto es electroactivo y que, normalmente, se mide a un potencial muy bajo (cerca de cero).

Ejemplos de las enzimas más utilizadas en biosensores electroquímicos son la fosfatasa alcalina (AP), la peroxidasa del rábano silvestre (HRP) o la glucosa oxidasa (GOx). Una metodología muy interesante para aumentar la sensibilidad es la generación de un producto sólido de la reacción enzimática que se preconcentra en la superficie del electrodo y que, además, es electroactivo. La preconcentración en una superficie electródica permite una detección más sensible ya que una elevada cantidad de la especie se encuentra en íntimo contacto con el electrodo, lo que produce una señal amplificada.

En este trabajo utilizamos la peroxidasa del rábano silvestre (HRP) y la 3,3', 5,5'-Tetrametilbencidina (TMB), como co-sustrato.

El TMB es utilizado hoy en día como el co-sustrato más utilizados en los kits de ELISA que usa HRP. El mecanismo de oxidación del TMB se puede seguir de forma óptica debido a que esa reacción genera productos coloreados. En presencia de HRP y H_2O_2 , el TMB se oxida y forma un complejo azul (producto de oxidación involucrado en e^-). TMB no es mutagénico ni carcinogénico TMB es el cromógeno más sensible para HRP, su uso como sustrato electroquímico ha sido ampliamente explotado (Fanjul-Bolado, González-García, & Costa-García, 2005)

2.5.2 Inmunosensores electroquímicos

Se define como inmunosensor a aquel sensor cuyo elemento de reconocimiento está constituido por anticuerpos o fracciones de anticuerpos, antígenos o haptenos y cuyo fundamento son las interacciones epítipo-parátipo o reacciones inmunológicas controladas por constantes de afinidad o avidéz. La gran selectividad de los anticuerpos viene dada por la estereoespecificidad de los puntos de unión con el antígeno (parátipos), lo que hace que estos sistemas sean sumamente interesantes para el desarrollo de biosensores, ya que permiten la detección y cuantificación de antígenos a niveles muy bajos (incluso picogramos) en muestras tan complejas como suero o plasma (Burcu Bahadir & Kemal Sezgintürk, 2015).

Los anticuerpos son glicoproteínas producidas por el sistema inmune como reacción a la presencia de un antígeno; son el producto de la respuesta humoral a la entrada en el organismo de moléculas extrañas. La parte del antígeno reconocida por el anticuerpo se denomina epítipo. Los anticuerpos pueden también generarse para que respondan a compuestos de bajo peso molecular (haptenos) especies que no producen una respuesta inmune en el organismo (Warsinke, Benkert, & Scheller, 2000).

Los anticuerpos típicos son las inmunoglobulinas (Ig), una clase de proteínas abundantes en el plasma, siendo la más prevalente la inmunoglobulina G (IgG). Cada molécula de anticuerpo es bivalente ya que tiene dos sitios de unión al antígeno (paratopos). Los

anticuerpos poseen grupos funcionales $-NH_2$, $-COOH$ y $-SH$ que pueden ser utilizados para su funcionalización con otras especies de interés (biotina, proteínas, nanomateriales) (Adley, 2014). La producción de anticuerpos pueden realizarse en animales (típicamente, ratones, conejos, cabras o camellos) o por cultivo celular, pudiendo obtenerse anticuerpos policlonales que pueden unirse a diferentes zonas del antígeno (epítomos), o anticuerpos monoclonales, que se unen a una sola zona específica del antígeno (Burcu Bahadir & Kemal Sezgintürk, 2015).

2.5.3 Inmovilización del elemento de reconocimiento sobre el transductor

Es el proceso más importante en la fabricación de un biosensor ya que de él dependen características tan cruciales como el tiempo de vida o la sensibilidad del mismo. La modificación del transductor con el elemento de reconocimiento puede realizarse de diversas formas. El objetivo principal es permitir un contacto eficaz entre el elemento sensor y el transductor, manteniendo intacta la estabilidad y actividad de la biomolécula. En general, los métodos de inmovilización se pueden clasificar en dos grupos: físicos, donde incluye la adsorción y el atrapamiento; y químicos, entre los que se encuentran el entrecruzamiento y las monocapas autoensambladas (Pingarrón Carrazón, 1999). Diversas publicaciones en la literatura describen los diferentes métodos de inmovilización del elemento sensor (Putzbach & Ronkainen, 2013) (Mohamad, Marzuki, Buang, Huyop, & Wahab, 2015), en tal sentido resumimos de forma simplificada, los más importantes los cuales son:

Adsorción física: el elemento de reconocimiento se pone en contacto con la superficie del transductor y en función del tiempo se adsorbe físicamente (por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas) sobre el transductor. Aunque es un método muy sencillo, no permite una modificación ordenada del elemento de reconocimiento sobre el transductor, y, aleatoriamente, puede que la zona de reconocimiento no esté disponible para la formación del complejo.

Enlace covalente: unión covalente entre el elemento de reconocimiento y la superficie activada del transductor por medio de grupos bifuncionales o espaciadores como glutaraldehído, carbodiimida o silanización, entre otras. Aunque más complejo que otros métodos, permite obtener superficies sensoras más estables. Una de las últimas tendencias es la utilización de grupos diazonio para la modificación covalente de superficies transductoras.

Unión de afinidad: en este método se modifica el transductor con alguna especie que interaccione por afinidad con el elemento de reconocimiento (en alguna posición que no influya en su función). El sistema más utilizado es la modificación del transductor con estreptavidina y del elemento de reconocimiento con biotina, y tras su unión se forma la fase sensora en el transductor. Si el elemento de reconocimiento está funcionalizado con biotina en una posición fija determinada, se puede conseguir un transductor modificado con la fase sensora altamente localizada, dejando la posición reactiva más disponible para el reconocimiento molecular.

Atrapamiento polimérico: el elemento de reconocimiento puede estar combinado con un polímero o membrana que se coloca sobre el transductor por adsorción física. El polímero o membrana puede funcionar como una barrera protectora para moléculas interferentes.

Monocapas autoensambladas: son monocapas de un compuesto generadas espontáneamente sobre la superficie del transductor. Este compuesto tiene un extremo con alta afinidad por el material del transductor, mientras que el otro extremo deja libre un grupo funcional que puede interactuar con el elemento de reconocimiento (normalmente, formando un enlace covalente). Son típicas las monocapas autoensambladas de tioles sobre superficie de oro. Este método suele presentar menor adsorción inespecífica y un mejor control de la orientación del elemento de reconocimiento.

Los biosensores, especialmente los inmunosensores y genosensores, pueden ser diseñados de diferente forma que pueden ofrecer ventajas en la detección y la sensibilidad del sistema. A continuación, se describen algunos de los formatos más utilizados en inmunosensores

2.5.3.1 Anticuerpo inmovilizado

En los tres primeros formatos, el anticuerpo es inmovilizado en el transductor y funciona como elemento de reconocimiento del sensor:

Formato A: el antígeno de la muestra compite por los sitios de unión del anticuerpo con el mismo antígeno funcionalizado con una marca de detección (ensayo competitivo). Cuanta mayor concentración de antígeno exista en la muestra, menor cantidad de antígeno marcado reacciona, y la detección producirá una menor respuesta (inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra). Es un formato muy utilizado para antígenos pequeños, que solamente poseen un sitio de unión.

Formato B: este es un ensayo tipo sándwich, donde el antígeno reacciona con el anticuerpo de la fase sensora y a continuación, un anticuerpo secundario marcado reacciona por otro sitio de unión del antígeno. Este formato mejora la selectividad del sistema, ya que el antígeno tiene que ser reconocido por los dos anticuerpos para producir una respuesta, pero el antígeno debe poseer al menos dos epítomos diferentes para su unión con dos anticuerpos. Un ensayo muy conocido de este tipo es el llamado Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Formato C: en este formato el antígeno reacciona con el elemento de reconocimiento directamente, y esta reacción se monitorea mediante una detección sin marca.

2.5.3.2 Antígeno Inmovilizado

Formato D: el antígeno inmovilizado en la fase sensora y el antígeno de la muestra compiten por los sitios de unión de un anticuerpo marcado (ensayo competitivo). Al haber mayor concentración de antígeno en la muestra, reacciona en mayor medida con el anticuerpo marcado en disolución, y menos anticuerpo estará disponible para reaccionar con la fase sensora. Por esa razón, la respuesta final será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra.

Formato E: este es un ensayo tipo sándwich, pero con el fin de detectar anticuerpos. La fase sensora compuesta por el antígeno reacciona con el anticuerpo específico de la muestra, y a continuación, un anticuerpo secundario marcado reacciona con ese anticuerpo para llevar a cabo la detección de la reacción inmunológica.

Formato F: este formato es similar al formato C, pero el anticuerpo en disolución, que es la especie de interés, es el que reacciona con el antígeno inmovilizado. La respuesta del sensor se obtiene sin utilizar una marca de detección.

3. METODOLOGÍA

3.1 Estudios por voltamperometría cíclica del Imidacloprid (reducción del grupo NO₂)

3.1.1 Instrumentación analítica:

Multi potencióstato/galvanostato μ Stat 8000, dimensiones: 22 x 20 x 7 cm. Electrodo serigrafiado de carbono marca Dropsens, modelo 110. Para las mediciones por voltamperometría cíclica se trabajó en un rango de potencial de - 0,2 V a - 1,5 V, con una velocidad de escaneo de 0,05 V/s.

3.1.2 Materiales y reactivos:

Estándar analítico de imidacloprid (99 %) casa proveedora LGC Standard, Buffer Britton Robinson (B-R) 0,1 M: (ácido fosfórico 85 %, ácido acético glacial, ácido bórico al 99,5 %), agua desionizada o Mili Q.

3.1.2.1 Preparación de Buffer Britton Robinson 0,1 M:

En un matraz de 1000 mL se añaden 6,74 mL de ácido fosfórico H₃PO₄ 85 %, 5,76 mL de ácido acético glacial y 6,19 g de ácido bórico H₃BO₄ al 99,5 %. Posteriormente se afora con agua Mili Q o agua desionizada.

3.1.2.2 Preparación de la solución madre de imidacloprid 1×10^{-2} M:

Se pesó 25,82 mg del estándar analítico disuelto en agua desionizada en un matraz aforado de 10 mL.

3.1.2.3 Preparación de la solución de trabajo 3×10^{-5} M, 5×10^{-5} M y 8×10^{-5} M:

Se toma una alícuota de la solución madre requerida o necesaria para obtener estas concentraciones de trabajo.

3.2 Estudios del pH entre 8 y 11 del imidacloprid con la técnica voltamperometría de onda cuadrada

3.2.1 Instrumentación analítica

Multi potencioestado/galvanostato μ Stat 8000, dimensiones: 22 x 20 x 7 cm.
Potenciómetro marca HACH sensION 3. Electrodo serigrafiado de carbono marca Dropsens, modelo 110. Para el análisis a pH 8, 9, 10 y 11 las condiciones de la medición por Voltamperometría de Onda Cuadrada fueron:
Potencial inicial: -0,5 V
Potencial final: -1,5 V
Amplitud: 0,05 V
Frecuencia: 20 Hz

3.2.2 Materiales y reactivos

Estándar analítico de imidacloprid (99 %) casa proveedora LGC Standard, buffer Britton Robinson (B-R) 0,1 M: (ácido fosfórico 85 %, ácido acético glacial, ácido bórico al 99,5 %), agua desionizada o Mili Q, NaOH 1 M.

3.3 Caracterización del proceso (difusión)

3.3.1 Condiciones del equipo:

Voltaje inicial: -0,2 V
Voltaje final: -1,8 V
Velocidad de barrido: 0,05 V

3.4. Estudios con pulso diferencial y onda cuadrada

3.4.1 Optimización de parámetros

3.4.1.1 Estudio de la frecuencia y amplitud para onda cuadrada

3.4.1.1.1 Se escoge la frecuencia a medir, en este trabajo se realizaron a 10 Hz, 20 Hz y 30 Hz, se grafica la intensidad de corriente en μ A vs el potencial V. Se escoge la amplitud a trabajar para el ensayo se realizó a una amplitud de 0,05 V.

3.4.2 Calibrados con las técnicas de Voltamperometría de Onda cuadrada y Pulso diferencial

Seleccionamos 5 niveles de concentración del imidacloprid (20, 30, 50, 80 y 100 μM) y se mide directamente en un potencióstato utilizando electrodos serigrafiados de carbono y se escoge la técnica Voltamperometría de Onda Cuadrada y luego se mide con Pulso Diferencial.

3.4.2 Análisis de imidacloprid en muestras fortificadas con la técnica de onda cuadrada

3.4.2.1 Se realiza fortificación de imidacloprid al nivel 3 de concentración de la recta de calibrado a 50 μM y se realizó por triplicado el ensayo. La extracción de imidacloprid se realiza como sigue:

3.4.2.1 Se pesa 15 g de muestra vegetal blanco (sin plaguicida) y se fortifica con imidacloprid a la concentración deseada ó (al LC: límite de cuantificación).

3.4.2.2 Se pesan 15 g de muestra vegetal (colectada en campo)

3.4.2.3 Después de 5 minutos, añadir 15 mL de acetonitrilo que contenía ácido acético al 1% (v / v), y se agitó por 1 minutos.

3.4.2.4 Se añadió 1,5 g de acetato de sodio y 6 g de sulfato de magnesio anhidro (Kit de extracción QuEChERS AOAC method), se agitó vigorosamente por 1 min.

3.4.2.5 La fase orgánica se separó por centrifugación a 4500 rpm durante 5 min.

3.4.2.6 Se toma una alícuota de 8 mL y luego se evaporan los 8 mL con una corriente de Nitrógeno, y se reconstituyen con el Buffer Britton Robinson.

3.5 Metodología de Inmunosensor ensayo competitivo indirecto

3.5.1 Instrumentación analítica

Multi potencioestado/galvanostato μ Stat 8000, dimensiones: 22 x 20 x 7 cm.
Potenciómetro marca HACH sensION 3

3.5.2 Materiales y reactivos

Estándar analítico de Imidacloprid (IMD) LGC-Standard del Dr. Ehrenstorfer, Buffer salino de fosfato (PBS) = ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Dihidrogeno fosfato de sodio monohidratado); Na_2HPO_4 (Hidrógeno fosfato de sodio); NaCl . 10 mM pH 7.4, Suero Albúmina Bovina (BSA), 3,3',5,5' tetrametil bencidina (TMB) fueron comprados de Sigma-Aldrich. Antígeno-proteína conjugada (BSA-IMD), anticuerpo monoclonal IMD (mAb-IMD) Valencia, España. Policlonal (anticuerpo secundario) IgG-HRP (anti-M-IgG-HRP) Dako, Agilent, España. Agua ultrapure fue obtenida de EMD Millipore™ Direct-Q5™ purification system from Millipore Ibérica SA. (Madrid, Spain) fue utilizada a lo largo de este trabajo. Las soluciones de trabajo de BSA-IMD, mAb-IMD, anti-M-IgG-HRP, BSA fueron preparados diariamente en 10 mM pH 7,4 buffer de PBS.

3.5.3 Optimización concentración antígeno marcado (BSA-IMD)

3.5.3.1 La inmovilización del antígeno marcado con BSA se lleva a cabo depositando 10 μL de las diferentes concentraciones (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15 y 20 mg/L) de BSA-IMD en PBS 10 mM a pH 7,4 y se deja toda la noche en la nevera a 4°C (Tres electrodos para cada concentración – 24 electrodos).

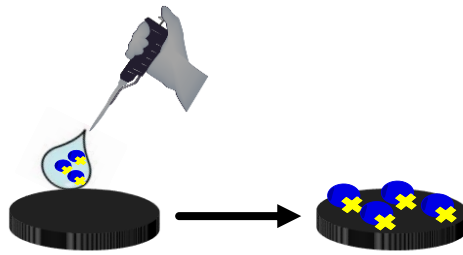


Figura 4. Inmovilización del antígeno marcado con BSA

3.5.3.2 Al día siguiente, siguiendo la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación se añaden 40 μ L de BSA al 1% (en PBS 10 mM a pH 7,4) para bloquear la superficie del electrodo. Esta incubación se lleva a cabo durante 40 minutos a temperatura ambiente.

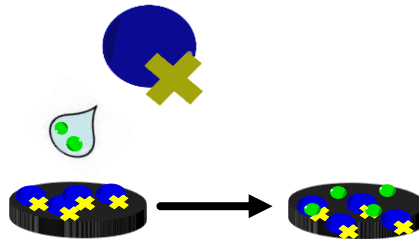


Figura 5. Bloqueo de la superficie del electrodo con BSA al 1%

CUADRO 1. Tabla de tiempos método de ensayo competitivo indirecto

	0 ppm (BSA-IMD)			0,1 ppm (BSA-IMD)			0,5 ppm (BSA-IMD)			1 ppm (BSA-IMD)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BSA-IMD en PBS 10mM pH 7,4 (10µL) Overnight 4°C	0:00:00	0:01:00	0:02:00	0:03:00	0:04:00	0:05:00	0:06:00	0:07:00	0:08:00	0:09:00	0:10:00	0:11:00
Lavar H ₂ O milli-Q	0:00:00	0:01:00	0:02:00	0:03:00	0:04:00	0:05:00	0:06:00	0:07:00	0:08:00	0:09:00	0:10:00	0:11:00
BSA 1% en PBS 10mM pH 7,4 (40µL) T ^{amb}	0:00:00	0:01:00	0:02:00	0:03:00	0:04:00	0:05:00	0:06:00	0:07:00	0:08:00	0:09:00	0:10:00	0:11:00
Lavar H ₂ O milli-Q	0:40:00	0:41:00	0:42:00	0:43:00	0:44:00	0:45:00	0:46:00	0:47:00	0:48:00	0:49:00	0:50:00	0:51:00
mAb-IMD en PBS 10mM pH 7,4 0,5% BSA (10µL) T ^{amb}	0:00:00	0:01:00	0:02:00	0:03:00	0:04:00	0:05:00	0:06:00	0:07:00	0:08:00	0:09:00	0:10:00	0:11:00
Lavar H ₂ O milli-Q	1:00:00	1:01:00	1:02:00	1:03:00	1:04:00	1:05:00	1:06:00	1:07:00	1:08:00	1:09:00	1:10:00	1:11:00
anti IgG-HRP en PBS 10mM pH 7,4 0,5% BSA (10µL) T ^{amb}	0:00:00	0:01:00	0:02:00	0:03:00	0:04:00	0:05:00	0:06:00	0:07:00	0:08:00	0:09:00	0:10:00	0:11:00
Lavar H ₂ O milli-Q	1:00:00	1:01:00	1:02:00	1:03:00	1:04:00	1:05:00	1:06:00	1:07:00	1:08:00	1:09:00	1:10:00	1:11:00
TMB (40µL) T ^{amb} tapado	0:00:00	0:02:00	0:04:00	0:06:00	0:08:00	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00
Medida	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00	0:32:00

	5 ppm (BSA-IMD)			10 ppm (BSA-IMD)			15 ppm (BSA-IMD)			20 ppm (BSA-IMD)		
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
BSA-IMD en PBS 10mM pH 7,4 (10µL) Overnight 4°C	0:12:00	0:13:00	0:14:00	0:15:00	0:16:00	0:17:00	0:18:00	0:19:00	0:20:00	0:21:00	0:22:00	0:23:00
Lavar H ₂ O milli-Q	0:12:00	0:13:00	0:14:00	0:15:00	0:16:00	0:17:00	0:18:00	0:19:00	0:20:00	0:21:00	0:22:00	0:23:00
BSA 1% en PBS 10mM pH 7,4 (40µL) T ^{amb}	0:12:00	0:13:00	0:14:00	0:15:00	0:16:00	0:17:00	0:18:00	0:19:00	0:20:00	0:21:00	0:22:00	0:23:00
Lavar H ₂ O milli-Q	0:52:00	0:53:00	0:54:00	0:55:00	0:56:00	0:57:00	0:58:00	0:59:00	1:00:00	1:01:00	1:02:00	1:03:00
mAb-IMD en PBS 10mM pH 7,4 0,5% BSA (10µL) T ^{amb}	0:12:00	0:13:00	0:14:00	0:15:00	0:16:00	0:17:00	0:18:00	0:19:00	0:20:00	0:21:00	0:22:00	0:23:00
Lavar H ₂ O milli-Q	1:12:00	1:13:00	1:14:00	1:15:00	1:16:00	1:17:00	1:18:00	1:19:00	1:20:00	1:21:00	1:22:00	1:23:00
anti IgG-HRP en PBS 10mM pH 7,4 0,5% BSA (10µL) T ^{amb}	0:12:00	0:13:00	0:14:00	0:15:00	0:16:00	0:17:00	0:18:00	0:19:00	0:20:00	0:21:00	0:22:00	0:23:00
Lavar H ₂ O milli-Q	1:12:00	1:13:00	1:14:00	1:15:00	1:16:00	1:17:00	1:18:00	1:19:00	1:20:00	1:21:00	1:22:00	1:23:00
TMB (40µL) T ^{amb} tapado	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00	0:32:00	0:34:00	0:36:00	0:38:00	0:40:00	0:42:00	0:44:00	0:46:00
Medida	0:34:00	0:36:00	0:38:00	0:40:00	0:42:00	0:44:00	0:46:00	0:48:00	0:50:00	0:52:00	0:54:00	0:56:00

3.5.3.3 A continuación, siempre siguiendo la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se añaden 10 µL de una concentración fija (2 mg/L en PBS 10 mM a pH 7,4 con 0,5 % de BSA) de anticuerpo monoclonal (**mAb-IMD**). Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

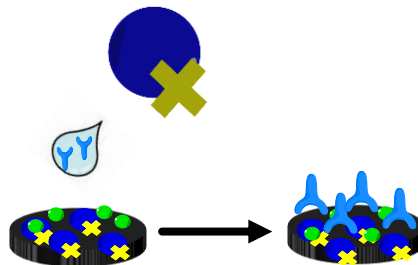


Figura 6. Incubación del anticuerpo monoclonal

3.5.3.4 Después de 1 h de incubación se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se añaden 10 µL de una concentración fija (5 mg/L en PBS 10 mM a pH 7,4 con 0,5% de BSA) de anticuerpo policlonal marcado enzimáticamente (**anti IgG-HRP**). Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

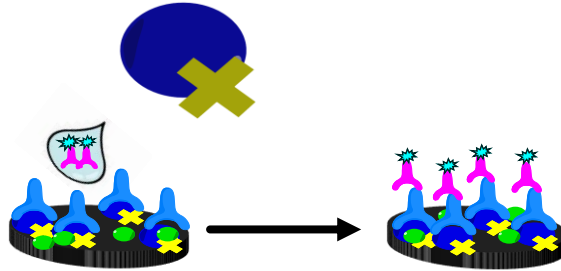


Figura 7. Incubación del anticuerpo policlonal marcado enzimáticamente

3.5.3.5 Al cabo de 1h se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación se depositan 40µL del reactivo TMB que será oxidado enzimáticamente por el HRP.

3.5.3.6 Se deja reaccionar durante 10 minutos en ausencia de luz y a continuación el TMB oxidado se reduce electroquímicamente mediante cronoamperometría aplicando un potencial de - 0,2 V durante 60 s.

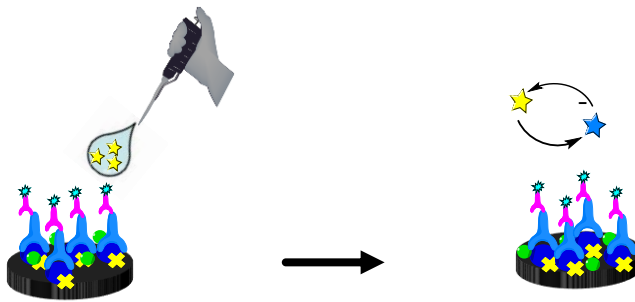


Figura 8. TMB oxidado enzimáticamente por HRP

3.5.3.7 Una vez registrado el cronoamperograma se mide la intensidad de corriente a los 60 s. Esta corriente será proporcional a la concentración de BSA-IMD que tengamos

inmovilizado en el electrodo de trabajo. A mayor concentración mayor será la intensidad de corriente de reducción.

3.5.4 Optimización concentración anticuerpo monoclonal (mAb-IMD)

3.5.4.1 La inmovilización del antígeno marcado con BSA se lleva a cabo depositando 10 μL una concentración de 0,5 mg/L de BSA-IMD en PBS 10 mM a pH 7,4 y se deja toda la noche en la nevera a 4°C (Tres electrodos por cada concentración de monoclonal a optimizar 30 electrodos).

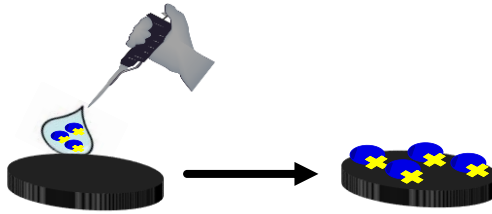


Figura 9. Inmovilización de antígeno marcado con BSA

3.5.4.2 Al día siguiente, según la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se añaden 40 μL de BSA 1% (en PBS 10 mM a pH 7,4) para bloquear la superficie del electrodo. Esta incubación se lleva a cabo durante 40 minutos a temperatura ambiente.

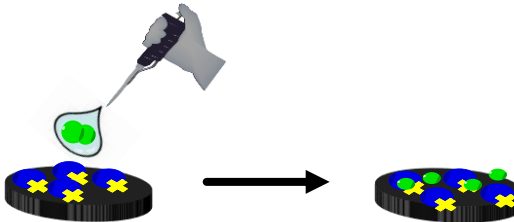


Figura 10. Bloqueo de la superficie con BSA al 1 %

3.5.4.3 Al cabo de 40 minutos, siempre según la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación se añaden 10 μL de las diferentes concentraciones (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 4; 6 y 8 mg/L) de anticuerpo monoclonal (mAb-IMD) en PBS 10 mM a pH 7,4 con 0,5 % de BSA. Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

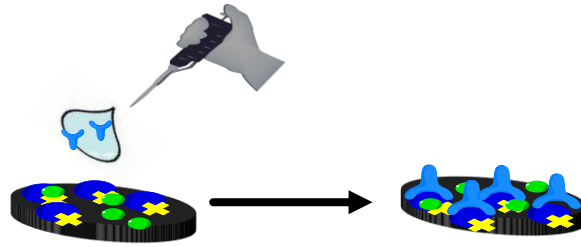


Figura 11. Anticuerpo monoclonal

3.5.4.4 Después de 1 h de incubación se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación se añaden 10 μ L de una concentración fija (5 mg/L en PBS 10 mM a pH 7,4 con 0,5 % de BSA) de anticuerpo policlonal marcado enzimáticamente (**anti IgG-HRP**). Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

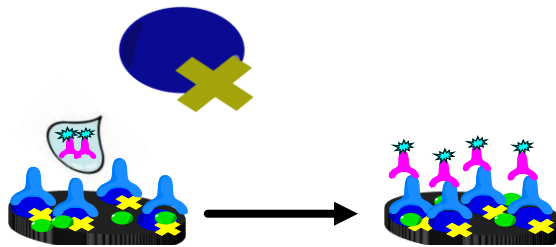


Figura 12. Incubación del anticuerpo monoclonal

3.5.4.5 Al cabo de 1 h se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se depositan 40 μ L del reactivo TMB que será oxidado enzimáticamente por el HRP. Se deja reaccionar durante 10 minutos en ausencia de luz y a continuación el TMB oxidado se reduce electroquímicamente mediante cronoamperometría aplicando un potencial de -0,2 V durante 60 s.

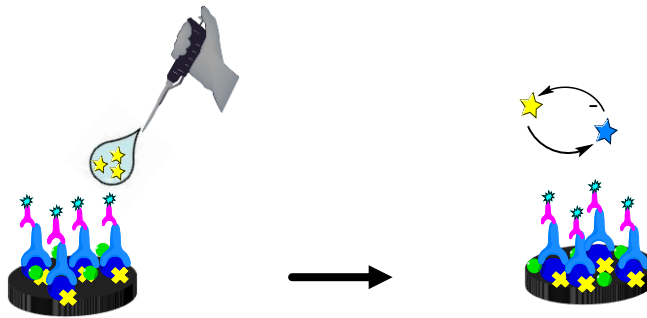


Figura 13. TMB oxidado enzimáticamente por HRP

3.5.4.6 Una vez registrado el cronoamperograma se mide la intensidad de corriente a los 60 s. Esta corriente será proporcional a la concentración de mAb-IMD que tengamos inmovilizado en el electrodo de trabajo. A mayor concentración mayor será la intensidad de corriente de reducción.

3.5.5 Optimización concentración anticuerpo policlonal (anti IgG-HRP)

3.5.5.1 La inmovilización del antígeno marcado con BSA se lleva a cabo depositando 10 μL una concentración de 0,5 mg/L de BSA-IMD en PBS 10 mM a pH 7,4 y se deja toda la noche en la nevera a 4°C (Tres electrodos por cada concentración de anti IgG-HRP que queramos optimizar – 36 electrodos).

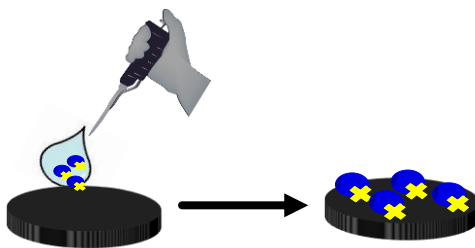


Figura 14. Inmovilización de antígeno marcado con BSA

3.5.5.2 Al día siguiente, siguiendo la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H_2O Milli-Q. A continuación, se añaden 40 μL de BSA 1% (en PBS 10 mM a pH 7,4) para bloquear la superficie del electrodo. Esta incubación se lleva a cabo durante 40 minutos a temperatura ambiente.

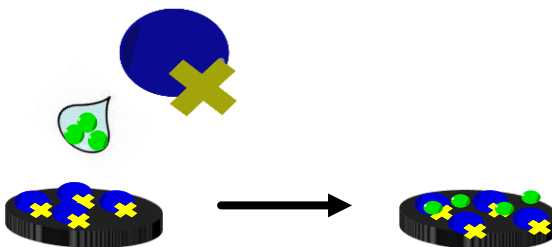


Figura 15. Bloqueo BSA

3.5.5.3 A continuación se lavan, siempre teniendo en cuenta la tabla de tiempos para todos los pasos, los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se añaden 10 μ L de una concentración fija (0,8 mg/L en PBS 10 mM a pH 7,4 con 0,5% de BSA) de anticuerpo monoclonal (mAb-IMD). Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

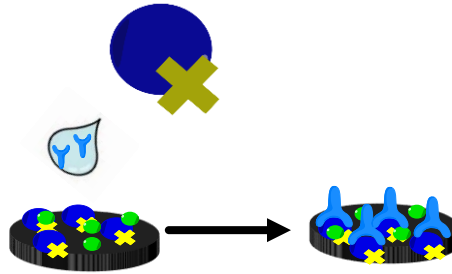


Figura 16. Anticuerpo monoclonal a 0,8 mg/L en PBS

3.5.5.4 Después de 1 h de incubación se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se añaden 10 μ L de las diferentes concentraciones (0; 0,4; 0,8; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 y 9 mg/L) anticuerpo policlonal marcado enzimáticamente (**anti IgG-HRP**) en PBS 10 mM a pH 7,4 con 0,5 % de BSA. Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

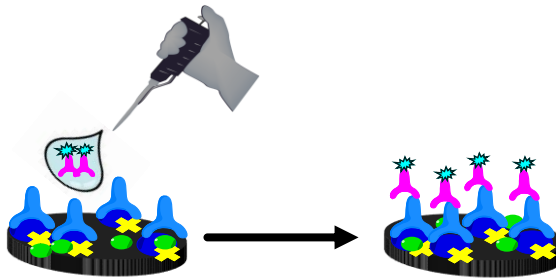


Figura 17. Incubación del anticuerpo policlonal a diferentes concentraciones

3.5.5.5 Al cabo de 1 h se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se depositan 40 μ L del reactivo TMB que será oxidado enzimáticamente por el HRP. Se deja reaccionar durante 10 minutos en ausencia de luz y a continuación el TMB oxidado se reduce electroquímicamente mediante cronoamperometría aplicando un potencial de - 0,2 V durante 60 s.

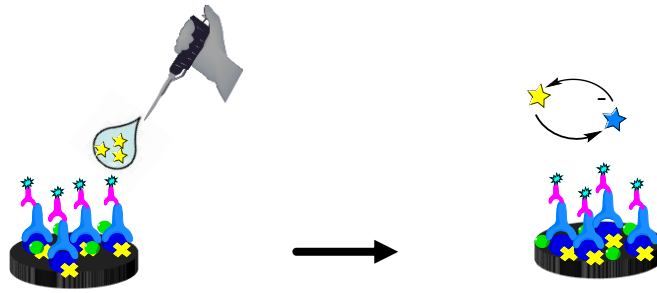


Figura 18. TMB reacciona con la enzima HRP

3.5.5.6 Una vez registrado el cronoamperograma se mide la intensidad de corriente a los 60 s. Esta corriente será proporcional a la concentración de anti IgG-HRP que tengamos inmovilizado en el electrodo de trabajo. A mayor concentración mayor será la intensidad de corriente de reducción.

3.5.6 Realización del ensayo competitivo

3.5.6.1 La inmovilización del antígeno marcado con BSA se lleva a cabo depositando 10 μL una concentración de 0,5 mg/L de BSA-IMD en PBS 10 mM a pH 7,4 y se deja toda la noche en la nevera a 4°C (Tres electrodos por cada concentración de IMD libre que queramos medir – 24 electrodos).

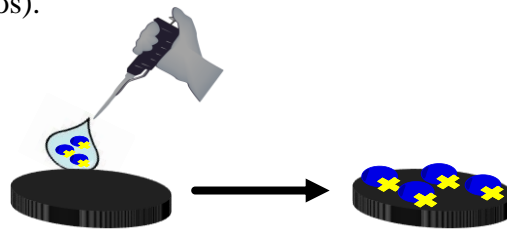


Figura 19. Inmovilización del antígeno BSA-IMD

3.5.6.2 Al día siguiente se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q, siguiendo la tabla de tiempos. A continuación, se añaden 40 μL de BSA 1% (en PBS 10 mM a pH 7,4) para bloquear la superficie del electrodo. Esta incubación se lleva a cabo durante 40 min a temperatura ambiente.

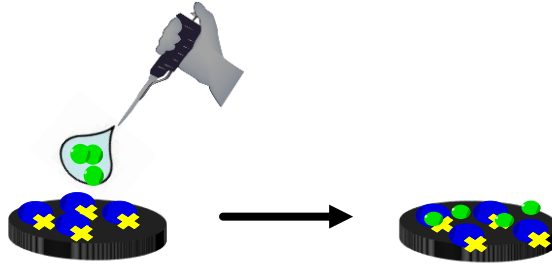


Figura 20. Bloqueo de la superficie del electrodo con BSA al 1 %

3.5.6.3 Al cabo de 40 minutos se van lavando los electrodos con H₂O Milli-Q según la tabla de tiempos. A continuación, se añaden 10 μ L de una mezcla de una concentración fija (0,8 mg/L en PBS 10 mM a pH 7,4 con 0,5 % de BSA) de anticuerpo monoclonal (mAb-IMD) junto con las diferentes concentraciones (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 5 y 10 nM) de IMD libre. Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

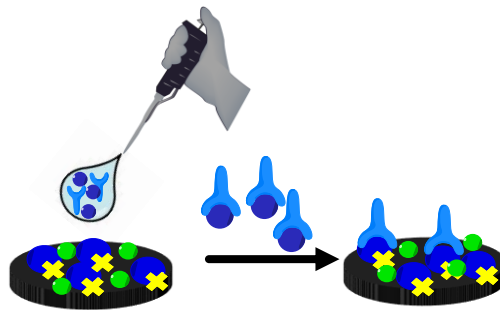


Figura 21. Anticuerpo monoclonal 0,8 mg/L en PBS

3.5.6.4 Después de 1 h de incubación se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. En este caso todos los mAb-IMD que se han unido al IMD libre se eliminarán quedando en el electrodo los mAb-IMD libres que se unen al BSA-IMD depositado en el electrodo. A continuación, se añaden 10 μ L de una concentración fija (1 mg/L en PBS 10 mM a pH 7,4 con 0,5 % de BSA) de anticuerpo policlonal marcado enzimáticamente (anti IgG-HRP). Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

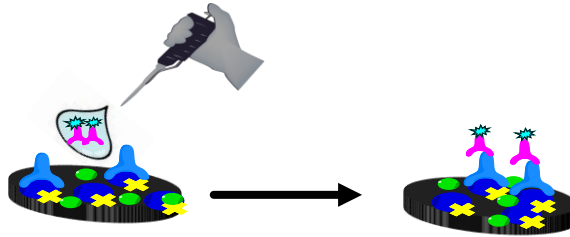


Figura 22. mAB libres unido al BSA-IMD depositado

3.5.6.5 Al cabo de 1 h se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se depositan 40 μ L del reactivo TMB que será oxidado enzimáticamente por el HRP. Se deja reaccionar durante 1 minutos en ausencia de luz y a continuación el TMB oxidado se reduce electroquímicamente mediante cronoamperometría aplicando un potencial de - 0,2V durante 60 s.

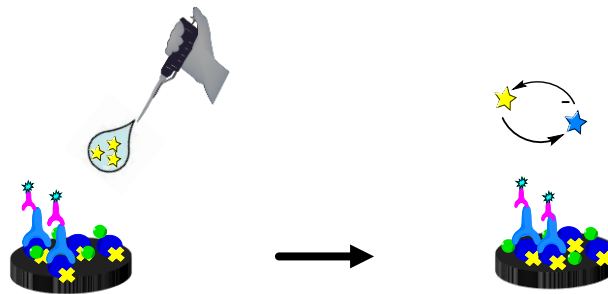


Figura 23. TMB oxidado se reduce electroquímicamente

3.5.6.6 Una vez registrado el cronoamperograma se mide la intensidad de corriente a los 60 s. Esta corriente será inversamente proporcional a la concentración de IMD que tengamos inmovilizado en el electrodo de trabajo. A mayor concentración menor será la intensidad de corriente de reducción, ya que se ha unido menor cantidad de mAb-IMD, con ello menor cantidad de anti IgG-HRP y por ende menor TMB oxidado enzimáticamente tendremos en el electrodo.

3.5.7 Método del ensayo competitivo indirecto resumido

3.5.7.1 La inmovilización del antígeno marcado con BSA se lleva a cabo depositando 10 μ L una concentración de 0,5 mg/L de BSA-IMD en PBS 10 mM a pH 7,4 y se deja toda la noche en la nevera a 4°C .

3.5.7.2 La superficie de cada electrodo es bloqueada con 40 μ L de 1 % de BSA en 10 mM PBS, pH 7,4 (por 40 minutos).

3.5.7.3 Después de 40 minutos, los electrodos son lavados con agua desionizada y secados con papel.

3.5.7.4 Mezclar 0,8 mg /L del anticuerpo monoclonal (mAb-IMD), 1,0 mg/L del anticuerpo policlonal marcado enzimáticamente (anti IgG-HRP), y la cantidad requerida de imidacloprid para obtener los puntos deseados de la curva de calibración ó el contenido del fortificado en vegetales o agua.

3.5.7.5 10 μ L se colocan en la superficie de los electrodos y se dejan allí durante 1 hora a temperatura ambiente.

3.5.7.6 Después de una hora, cada electrodo es lavado y secado. Luego, 40 μ L de reactivo de TMB es agregado sobre los electrodos, por 1 minuto, en ausencia de luz. Después de 1 minuto, es llevado a cabo una medida cronoamperométrica aplicando un potencial de - 0,2 V por 60 segundos.

3.5.8 Fortificación y análisis de imidacloprid en frutas y vegetales

3.5.8.1 Se pesa 15 g de muestra vegetal blanco (sin plaguicida) y se fortifica con imidacloprid a la concentración deseada ó (al LC: límite de cuantificación).

3.5.8.2 Se pesan 15 g de muestra vegetal (colectada en campo)

3.5.8.3 Después de 5 min, añadir 15 mL de acetonitrilo que contenía ácido acético al 1% (v / v), y se agitó por 1 minuto.

3.5.8.4 Se añadió 1,5 g de acetato de sodio y 6 g de sulfato de magnesio anhidro (Kit de extracción QuEChERS AOAC method), se agitó vigorosamente por 1 minuto.

3.5.8.5 La fase orgánica se separó por centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos.

3.5.8.6 Se toma una alícuota de 8 mL y luego se evaporan los 8 mL con una corriente de Nitrógeno, y se reconstituyen con el Buffer PBS.

3.5.8.7 Del extracto reconstituido se toma el volumen necesario, según la tabla de preparación, para mezclarlo con los anticuerpos y luego hacer la determinación con los electrodos.

3.5.9 Preparación de fortificados y muestras reales método indirecto

3.5.9.1 Para el método indirecto, el fortificado se preparó de la siguiente manera:

3.5.9.2 La muestra se fortificó a 10 $\mu\text{g/L}$ (ó 39.11 nM) ($\mu\text{g/kg}$), para determinar en los electrodos a 0,6 nM (ó 0,15 $\mu\text{g/L}$), a través de una dilución.

CUADRO 2. Volúmenes de reactivos para la determinación de IMD en muestras método indirecto.

Concentración De IMD deseada a determinar en la muestra (nM)	Volumen de muestra reconstituido (μL)	Volumen de monoclonal (μL)	Volumen de policlonal (μL)	Volumen de 0,5% BSA en PBS (μL)
0,6	1,07	2,8 (a partir de 20 mg/L)	7 (a partir de 10 mg/L)	59,13

3.5.9.3 Como se observa en el cuadro 2, del extracto limpio de la muestra se toma un volumen de 1,07 μL y se agrega en un tubo eppendorff que contiene 0,5 % de BSA en PBS, monoclonal y policlonal, para hacer un volumen final de 70 μL .

3.5.9.4 El resultado que se obtiene al realizar la lectura debe multiplicarse por:

- Un factor de corrección: $8/15 = 0,5333333333333333$, este factor proviene de la etapa en que se toman 8 mL del sobrenadante extraído ya que originalmente la muestra fue extraída en 15 mL de solvente, por eso es el factor de 8 dividido entre 15.
- Y un factor de dilución: $70/1,07 = 65,42056074766355$, este factor proviene de la dilución que se hace al agregar 1,07 μL del extracto de muestra en un volumen de 70 μL .

3.5 Metodología de Inmunosensor ensayo competitivo directo

3.6.2 Instrumentación analítica

Multi potencioestado/galvanostato μ Stat 8000, dimensiones: 22 x 20 x 7 cm.
Potenciómetro marca HACH sensION 3, electrodos serigrafados de carbono

3.6.2 Materiales y reactivos

Estándar analítico de Imidacloprid (IMD) LGC-Standard del Dr. Ehrenstorfer, buffer salino de fosfato (PBS) = ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado); Na_2HPO_4 (Hidrógeno fosfato de sodio); NaCl 10 mM pH 7,4 y 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Anticuerpo monoclonal de IMD (mAb-IMD), antígeno conjugado enzimáticamente (IMD-HRP) Valencia, España. Estándar de Oro (H (AuCl_4) $3\text{H}_2\text{O}$ in 12.7% HCl) Merck. Kit de ELISA de Imidacloprid fue comprado a Abraxis. Agua ultrapura fue adquirida mediante el sistema EMD Millipore™ Direct-Q5™ purification system from Millipore Ibérica SA. (Madrid, España). Las soluciones de trabajo de mAb-IMD, IMD-HRP fueron diariamente preparadas en 10 mM pH 7,4 buffer de PBS. Las soluciones de trabajo de, mAb-IMD, anti-M-IgG-HRP, fueron preparados diariamente en 10 mM pH 7,4 buffer de PBS.

3.6.3 Optimización concentración anticuerpo monoclonal (mAb-IMD)

3.6.3.1 El primer paso es realizar la nanoestructuración con Au del electrodo (Tres electrodos por cada concentración de mAb-IMD que queremos optimizar – 27 electrodos). Para ello se depositan 40 μL de una disolución de AuCl_4^- 1 mM en HCl 0,1 M. A continuación, mediante cronopotenciometría, se aplica una corriente de reducción de -100 μA durante 180 s.

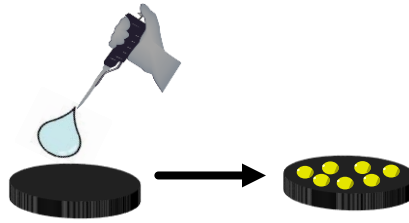


Figura 24. Nanoestructuración con Au del electrodo

3.6.3.2 La inmovilización del anticuerpo se lleva a cabo depositando 10 μL de las diferentes concentraciones (0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 2,5) de mAb-IMD en PBS 10 mM a pH 7,4 y se deja toda la noche en la nevera a 4°C. Al día siguiente, lavar los electrodos con agua desionizada, secar los electrodos cuidadosamente con papel.

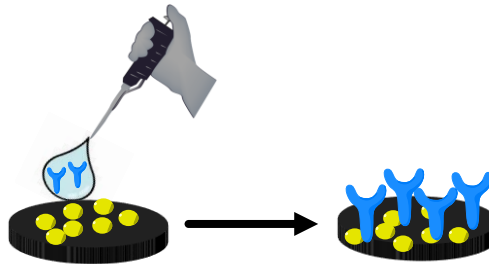


Figura 25. Inmovilización del anticuerpo mAb-IMD

3.6.3.3 Al día siguiente, según la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se añaden 10 μL de una concentración fija (0,5 mg/L en PBS 10 mM a pH 7,4) de antígeno marcado enzimáticamente (IMD-HRP). Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

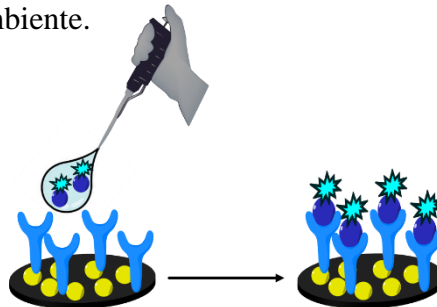


Figura 26. Incubación de antígeno IMD-HRP

3.6.3.4 Al cabo de 1 h, siguiendo los tiempos, se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se depositan 40 μL del reactivo TMB que será oxidado enzimáticamente por

el HRP. Se deja reaccionar durante 10 minutos en ausencia de luz y a continuación el TMB oxidado se reduce electroquímicamente mediante cronoamperometría aplicando un potencial de - 0,2 V durante 60 s.

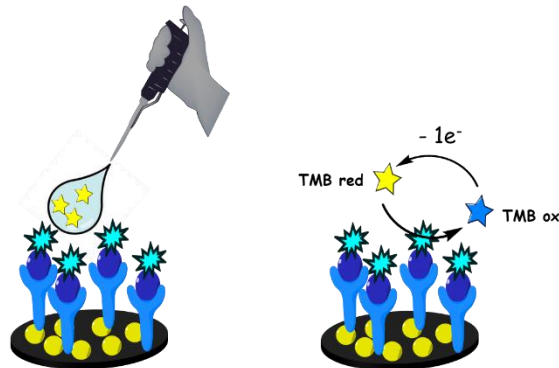


Figura 27. TMB oxidado enzimáticamente por HRP

CUADRO 3. Tabla de tiempos método de ensayo competitivo directo

	0 ppm mAb-IMD			1 ppm mAb-IMD			4 ppm mAb-IMD			6 ppm mAb-IMD		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
mAb-IMD en PBS 10mM pH 7,4 (10µL) Overnight 4°C	0:00:00	0:01:00	0:02:00	0:03:00	0:04:00	0:05:00	0:06:00	0:07:00	0:08:00	0:09:00	0:10:00	0:11:00
Lavar H ₂ O milli-Q	0:00:00	0:01:00	0:02:00	0:03:00	0:04:00	0:05:00	0:06:00	0:07:00	0:08:00	0:09:00	0:10:00	0:11:00
IMD-HRP en PBS 10mM pH 7,4 (10µL) Tª amb	0:00:00	0:01:00	0:02:00	0:03:00	0:04:00	0:05:00	0:06:00	0:07:00	0:08:00	0:09:00	0:10:00	0:11:00
Lavar H ₂ O milli-Q	1:00:00	1:01:00	1:02:00	1:03:00	1:04:00	1:05:00	1:06:00	1:07:00	1:08:00	1:09:00	1:10:00	1:11:00
TMB (40µL) Tª amb tapado	0:00:00	0:02:00	0:04:00	0:06:00	0:08:00	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00
Medida	0:10:00	0:12:00	0:14:00	0:16:00	0:18:00	0:20:00	0:22:00	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00	0:32:00

	8 ppm mAb-IMD			9 ppm mAb-IMD			10 ppm mAb-IMD			12 ppm mAb-IMD			14 ppm mAb-IMD		
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
mAb-IMD en PBS 10mM pH 7,4 (10µL) Overnight 4°C	0:12:00	0:13:00	0:14:00	0:15:00	0:16:00	0:17:00	0:18:00	0:19:00	0:20:00	0:21:00	0:22:00	0:23:00	0:24:00	0:25:00	0:26:00
Lavar H ₂ O milli-Q	0:12:00	0:13:00	0:14:00	0:15:00	0:16:00	0:17:00	0:18:00	0:19:00	0:20:00	0:21:00	0:22:00	0:23:00	0:24:00	0:25:00	0:26:00
IMD-HRP en PBS 10mM pH 7,4 (10µL) Tª amb	0:12:00	0:13:00	0:14:00	0:15:00	0:16:00	0:17:00	0:18:00	0:19:00	0:20:00	0:21:00	0:22:00	0:23:00	0:24:00	0:25:00	0:26:00
Lavar H ₂ O milli-Q	1:12:00	1:13:00	1:14:00	1:15:00	1:16:00	1:17:00	1:18:00	1:19:00	1:20:00	1:21:00	1:22:00	1:23:00	1:24:00	1:25:00	1:26:00
TMB (40µL) Tª amb tapado	0:24:00	0:26:00	0:28:00	0:30:00	0:32:00	0:34:00	0:36:00	0:38:00	0:40:00	0:42:00	0:44:00	0:46:00	0:48:00	0:50:00	0:52:00
Medida	0:34:00	0:36:00	0:38:00	0:40:00	0:42:00	0:44:00	0:46:00	0:48:00	0:50:00	0:52:00	0:54:00	0:56:00	0:58:00	1:00:00	1:02:00

3.6.3.5 Una vez registrado el cronoamperograma se mide la intensidad de corriente a los 60 s. Esta corriente será proporcional a la concentración de mAb-IMD que tengamos inmovilizado en el electrodo de trabajo. A mayor concentración mayor será la intensidad de corriente de reducción.

3.6.4 Optimización concentración antígeno marcado (IMD-HRP)

3.6.4.1 El primer paso es realizar la nanoestructuración con Au del electrodo (Tres electrodos por cada concentración de IMD-HRP que queremos optimizar – 27 electrodos). Para ello se depositan 40 μL de una disolución de AuCl_4^- 1 mM en HCl 0,1 M. A continuación, mediante cronopotenciometría, se aplica una corriente de reducción de -100 μA durante 180 s.

3.6.4.2 Depositamos 10 μL de 10 mg/L de mAb-IMD en PBS 10 mM a pH 7,4 y se deja toda la noche en la nevera a 4°C.

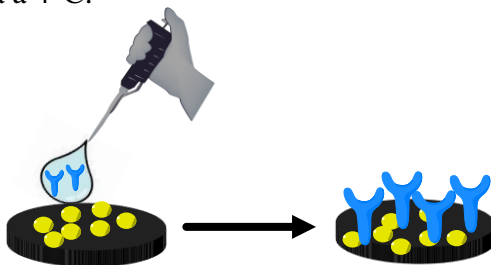


Figure 28. Incubación del anticuerpo monoclonal mAb-IMD

3.6.4.3 Al día siguiente, siguiendo la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H_2O Milli-Q. A continuación se añaden 10 μL de las diferentes concentraciones (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50 mg/L) de IMD-HRP en PBS 10 mM a pH 7,4. Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

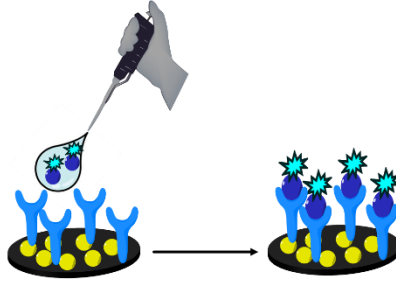


Figura 29. Incubación del anticuerpo policlonal

3.6.4.4 Al cabo de 1 h, según la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se depositan 40 μ L del reactivo TMB que será oxidado enzimáticamente por el HRP. Se deja reaccionar durante 10 minutos en ausencia de luz y a continuación el TMB oxidado se reduce electroquímicamente mediante cronoamperometría aplicando un potencial de -0,2 V durante 60 s.

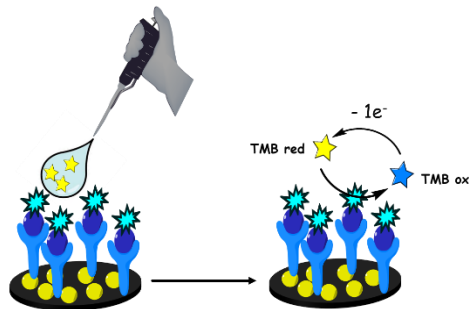


Figura 30. TMB oxidado enzimáticamente por HRP

3.6.4.5 Una vez registrado el cronoamperograma se mide la intensidad de corriente a los 60 s. Esta corriente será proporcional a la concentración de IMD-HRP que tengamos inmovilizado en el electrodo de trabajo. A mayor concentración mayor será la intensidad de corriente de reducción.

3.6.5 Realización del ensayo competitivo

3.6.5.1 El primer paso es realizar la nanoestructuración con Au del electrodo (Tres electrodos por cada concentración de IMD libre que queremos determinar – 24 electrodos). Para ello se depositan 40 μL de una disolución de AuCl_4^- 1 mM en HCl 0,1M. A continuación, mediante cronopotenciometría, se aplica una corriente de reducción de -100 μA durante 180 s.

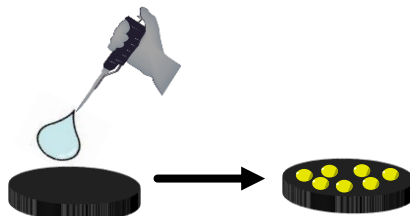


Figura 31. Nanoestructuración con Au del electrodo

3.6.5.2 Depositamos 10 μL de 10 mg/L de mAb-IMD en PBS 10 mM a pH 7,4 y se deja toda la noche en la nevera a 4°C.

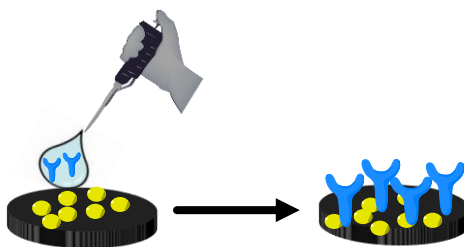


Figura 32. Incubación del anticuerpo monoclonal mAB-IMD

3.6.5.3 Al día siguiente, siguiendo la tabla de tiempos, se lavan los electrodos con H_2O Milli-Q. A continuación se añaden 10 μL de las diferentes concentraciones (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 5; 10; 20 nM) de IMD libre (en PBS 10 mM a pH 7,4) que queremos hacer competir con el IMD-HRP. Esta incubación se lleva a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

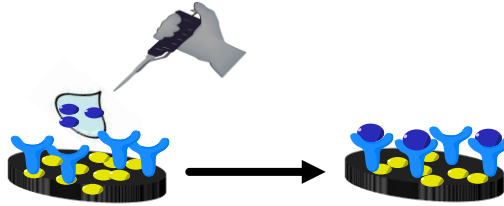


Figura 33. Ensayo competitivo de IMD libre con IMD-HRP

3.6.5.4 Al cabo de 1 h de incubación lavamos con H₂O Milli-Q siguiendo la tabla de tiempos. El siguiente paso sería añadir 10 μ L de 5 mg/L IMD-HRP, que se unirán a los anticuerpos que están libres. Esta incubación se lleva a cabo también durante 1 h a temperatura ambiente.

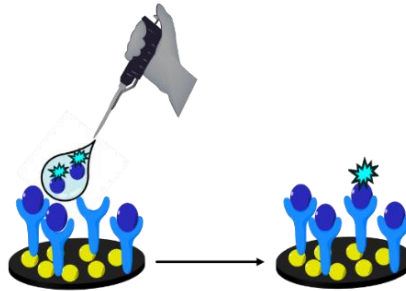


Figura 34. Incubación de IMD-HRP

3.6.5.5 Al cabo de 1 h se lavan los electrodos con H₂O Milli-Q. A continuación, se depositan 40 μ L del reactivo TMB que será oxidado enzimáticamente por el HRP. Se deja reaccionar durante 10 minutos en ausencia de luz y a continuación el TMB oxidado se reduce electroquímicamente mediante cronoamperometría aplicando un potencial de - 0,2 V durante 60 s.

3.6.5.6 Una vez registrado el cronoamperograma se mide la intensidad de corriente a los 60 s. Esta corriente será inversamente proporcional a la concentración de IMD que tengamos inmovilizado en el electrodo de trabajo. A mayor concentración menor será la intensidad de corriente de reducción, ya que se ha unido menor cantidad de IMD-HRP y por ende menor TMB oxidado enzimáticamente tendremos en el electrodo.

3.6.6 Método del ensayo competitivo directo resumido

3.6.6.1 Nanoestructurar los electrodos con oro aplicando $-100 \mu\text{A}$ durante 180 s.

3.6.6.2 Lavar y secar con cuidado.

3.6.6.3 Inmovilización del anticuerpo monoclonal añadiendo $10 \mu\text{L}$ de mAb-IMD $6 \mu\text{g/mL}$.

3.6.6.4 Dejar durante toda la noche en nevera.

3.6.6.5 Al día siguiente lavar y secar.

3.6.6.6 Añadir $10 \mu\text{L}$ de las diferentes concentraciones de IMD libre. Dejar durante 1 h

3.6.6.7 Lavar y secar.

3.6.6.8 Añadir $10 \mu\text{L}$ de $3 \mu\text{g/mL}$ (3 mg/L) de IMD-HRP. Dejar durante 1 h.

3.6.6.9 Lavar y secar.

3.6.6.10 Añadir $40 \mu\text{L}$ de TMB, dejar 1 min tapado y medir por cronoamperometría durante 60 s a -0.2 V .

3.6.6.11 La muestra de fruta o vegetal real o fortificada con imidacloprid se analiza como sigue:

- Se pesa 15 g de muestra vegetal blanco (sin plaguicida) y se fortifica con imidacloprid a la concentración deseada ó (al LC: límite de cuantificación).
- Se pesan 15 g de muestra vegetal (colectada en campo)
- Después de 5 min, añadir 15 mL de acetonitrilo que contenía ácido acético al 1% (v / v), y se agitó por 1 minuto.

- Se añadió 1,5 g de acetato de sodio y 6 g de sulfato de magnesio anhidro (Kit de extracción QuEChERS AOAC method), se agitó vigorosamente por 1 minuto.
- La fase orgánica se separó por centrifugación a 4500 rpm durante 5 min.
- Se toma una alícuota de 8 mL y luego se evaporan los 8 mL con una corriente de Nitrógeno, y se reconstituyen con el Buffer PBS.
- Del extracto reconstituido se toma el volumen necesario, según la tabla de preparación.

Cuadro 4. Volúmenes de reactivos para la determinación de IMD en muestras método indirecto.

Concentración a determinar en el extracto de muestra (nM)	Vol. De muestra reconstituido (μL)	Vol. De PBS (μL)
0,6	1,07	68,93

Como se muestra en el cuadro 4, del extracto limpio de la muestra se toma un volumen de 1,07 μL y se agrega en el tubo de eppendorff que contiene el PBS, para hacer un volumen final de 70 μL .

De igual manera, el resultado que se obtiene al realizar la lectura debe multiplicarse por:

- Un **factor de corrección: $8/15= 0,5333333333333333$** , este factor proviene de la etapa en que se toman 8 mL del sobrenadante extraído ya que originalmente la muestra fue extraída en 15 mL de solvente, por eso es el factor de 8 dividido entre 15.
- Y un **factor de dilución: $70/1,07= 65,42056074766355$** , este factor proviene de la dilución que se hace al agregar 1,07 μL del extracto de muestra limpia en un volumen de 70 μL .

3.7 Validación analítica del Inmunosensor

3.7.1 Ensayo de Repetibilidad y reproducibilidad

Para el ensayo de repetibilidad se realizó en un mismo día con 5 inmunosensores, se promedian y se calcula la desviación estándar y coeficiente de variación. Para el ensayo de

la reproducibilidad se llevó a cabo 5 medidas usando 5 diferentes sensores en diferentes días, en los dos métodos de ensayo competitivo directo e indirecto.

3.7.2 Cálculo del Límite de detección (LD)

El Límite de detección se calcula con la medición de 10 lecturas del blanco en los inmunosensores, se promedian los valores y se calcula la desviación estándar. El Límite de detección = $3 s/m$ donde m es igual a la pendiente de la recta de regresión lineal.

3.7.3 Cálculo del Límite de Cuantificación

El Límite de cuantificación se calcula con la medición de 10 lecturas al nivel 1 de la curva de calibración en los inmunosensores, se promedian los valores y se calcula la desviación estándar. El Límite cuantificación es = $10 s/m$ donde m es igual a la pendiente de la recta de regresión lineal.

3.8 Análisis de Residuos de Plaguicidas por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría De Masas.

3.8.1 Análisis de vegetales por método multirresidual QuEChERS por Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo.

3.8.1.1 Instrumentación analítica

Cromatógrafo Líquido 1200 con espectrometría de masas triple cuadrupolo marca agilent modelo 6460.

Método: Plaguicidas-DMRM_1200 inf.m

3.8.1.2 Materiales y reactivos

Acetonitrilo, grado pesticida, agua, osmótica, acetonitrilo, grado pesticida o LC-MS, ácido acético, agua, grado HPLC u osmótica, metanol grado HPLC, acetato amónico grado HPLC, estándar analítico de imidacloprid.

3.8.1.3 Método de análisis de imidacloprid en vegetales

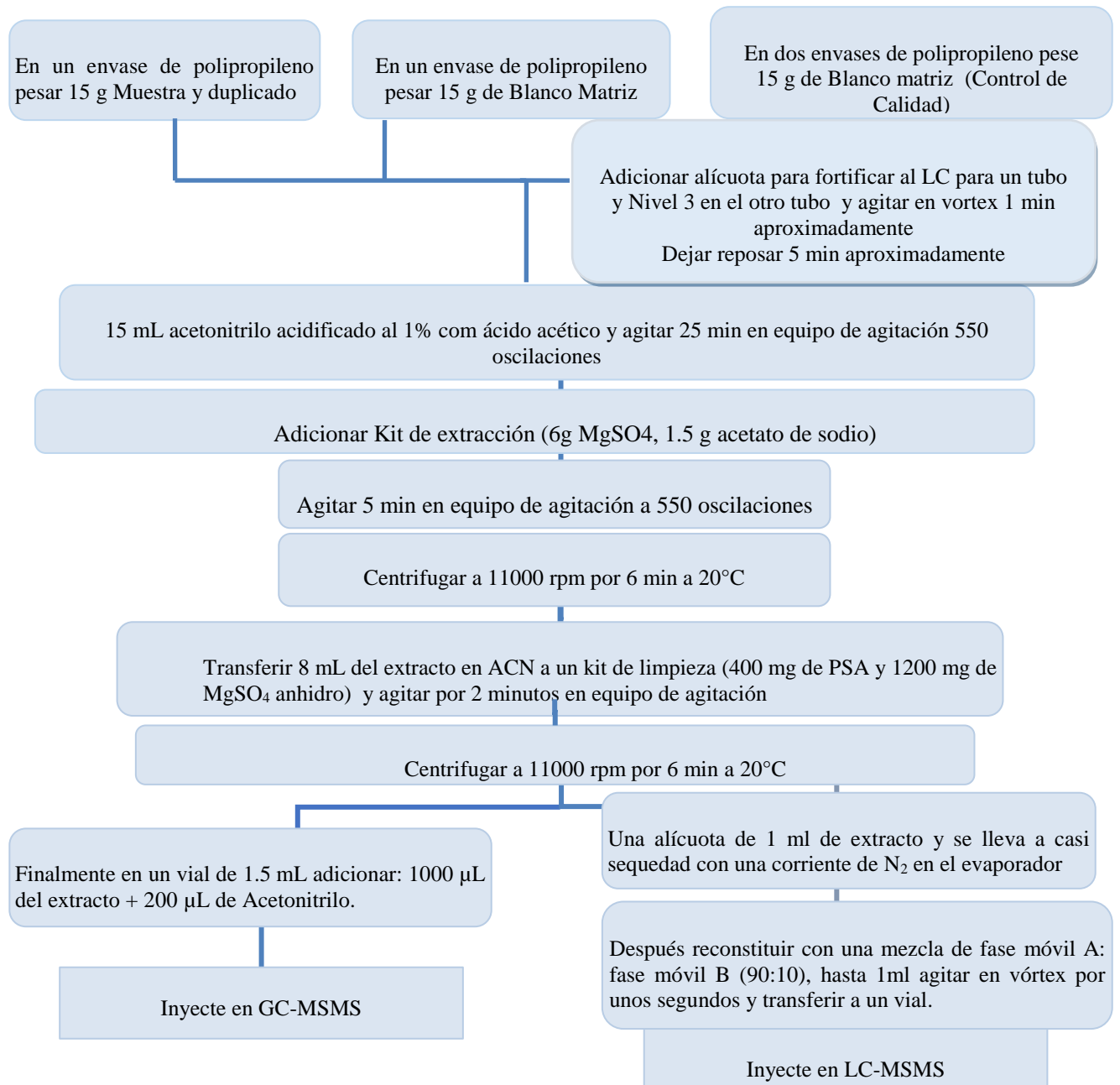


Figura 35. Método de análisis de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales por GC-MSMS y LC-MSMS

3.8.2 Análisis de agua por inyección directa, SPE Online por Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo.

3.8.2.1 Instrumentación analítica

Cromatógrafo Líquido 1200 con espectrometría de masas triple cuadrupolo marca agilent modelo 6430 con sistema de enriquecimiento en línea SPE online.

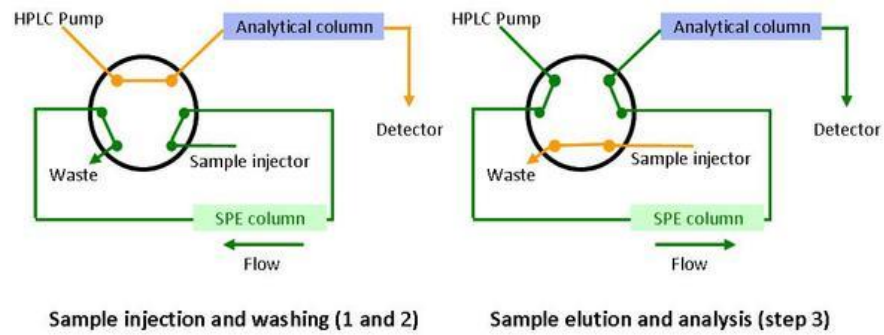


Figura 36. Sistema de enriquecimiento en línea (SPE Online)

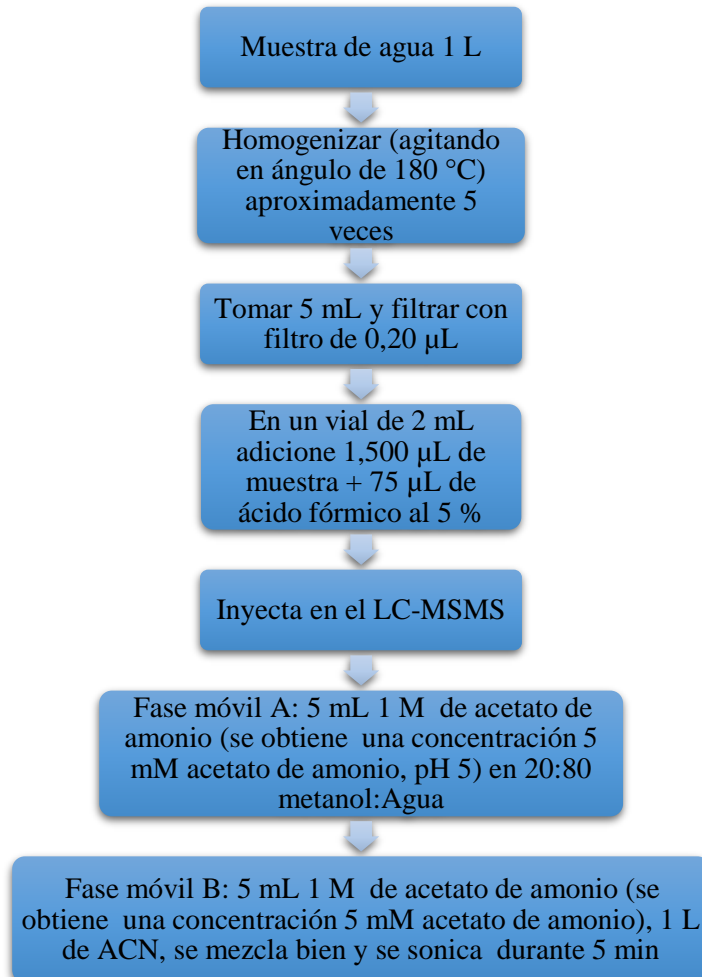


Figura 37. Método de Análisis de residuos de plaguicidas en agua por inyección directa

3.8.2.2 Materiales y reactivos

Acetonitrilo, grado pesticida o LC-MS, Agua, grado HPLC, Ácido fórmico, estándar analítico de imidacloprid.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimizaciones

4.1.1 Reducción electroquímica del Imidacloprid sobre electrodo de carbono

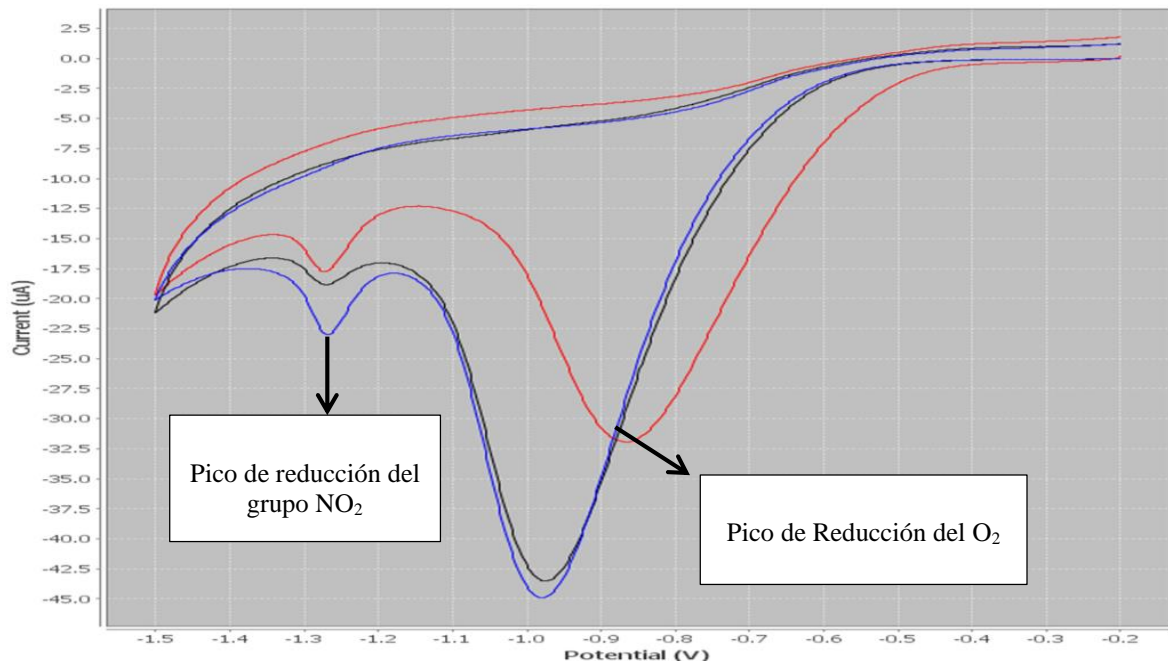


Figura 38. Voltametría cíclica del Imidacloprid en diferentes concentraciones

En la figura 38 podemos observar la reducción del oxígeno y la reducción del grupo NO₂ del imidacloprid al producir derivados de hidroxilamina con suficiente distancia, por lo que la señal del oxígeno no interfiere con la señal del imidacloprid, podemos observar también el aumento de la señal en los 3 niveles de concentración estudiados (3×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 8×10^{-5} M).

4.1.2 Estudio de pH por voltamperometría de Onda Cuadrada

El comportamiento voltamétrico del imidacloprid en un electrodo serigrafiado de carbono se analizó con una solución amortiguadora de Britton-Robisson a valores de pH de 8, 9, 10 y 11. Se escogió el pH de trabajo de 10, porque fue el que presentó la mejor señal para la determinación de imidacloprid en una solución amortiguadora de Britton Robisson.

La dependencia del voltaje de pico con el pH de la solución (78,7 mV/pH) va en línea con el mecanismo general propuesto por Hevrosky para el proceso de reducción del grupo nitro de imidacloprid (Navalon et al., 1999) como se muestra en la figura 39. La corriente decrece a medida que aumenta el pH como lo observado en la figura 40, lo cual unido a la dependencia observada para el voltaje de pico figura 41, sugiere la preprotonación del grupo nitro de imidacloprid para que tenga lugar la reducción electroquímica del mismo. A los pH más alcalinos se aprecia la formación de segundo pico a un voltaje más negativo, como se muestra en la figura 42.

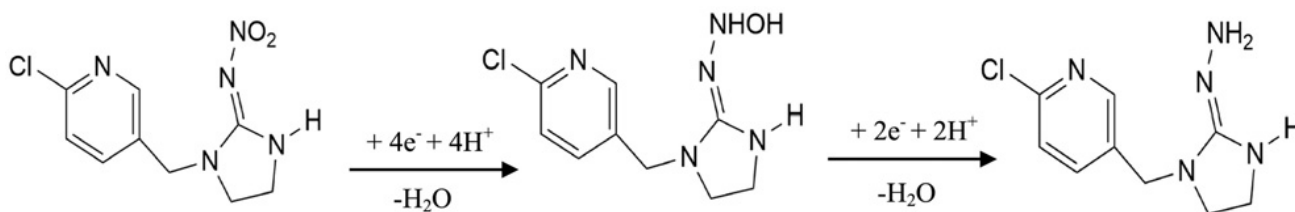


Figura 39. Reducción del grupo NO₂

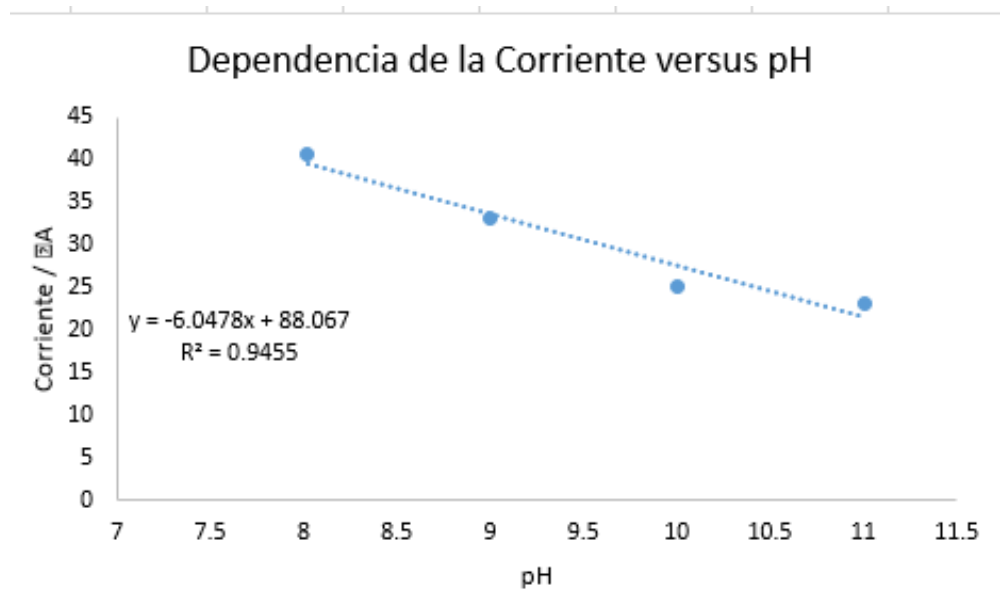


Figura 40. Dependencia de la corriente vs pH

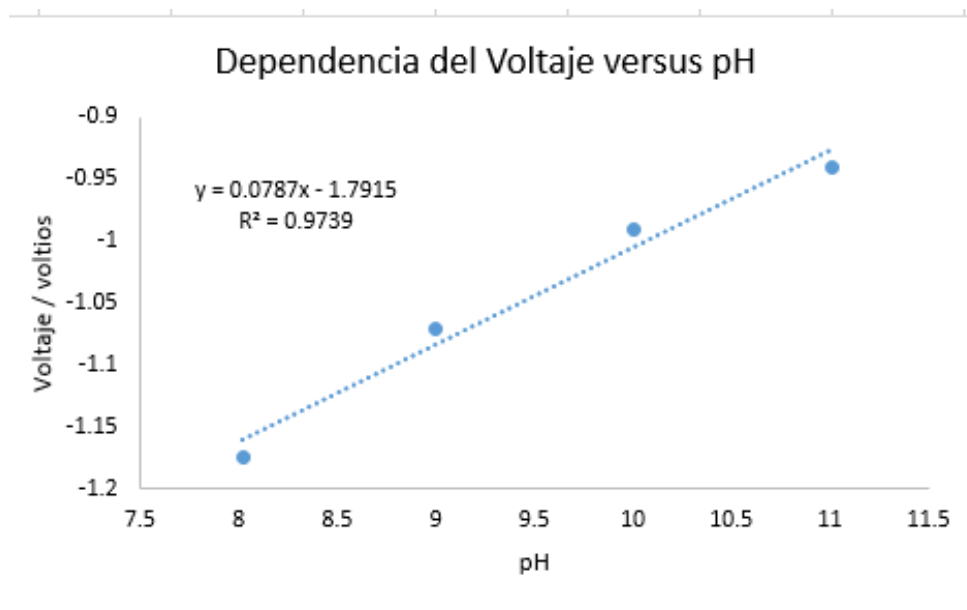


Figura 41. Dependencia del Voltaje vs pH

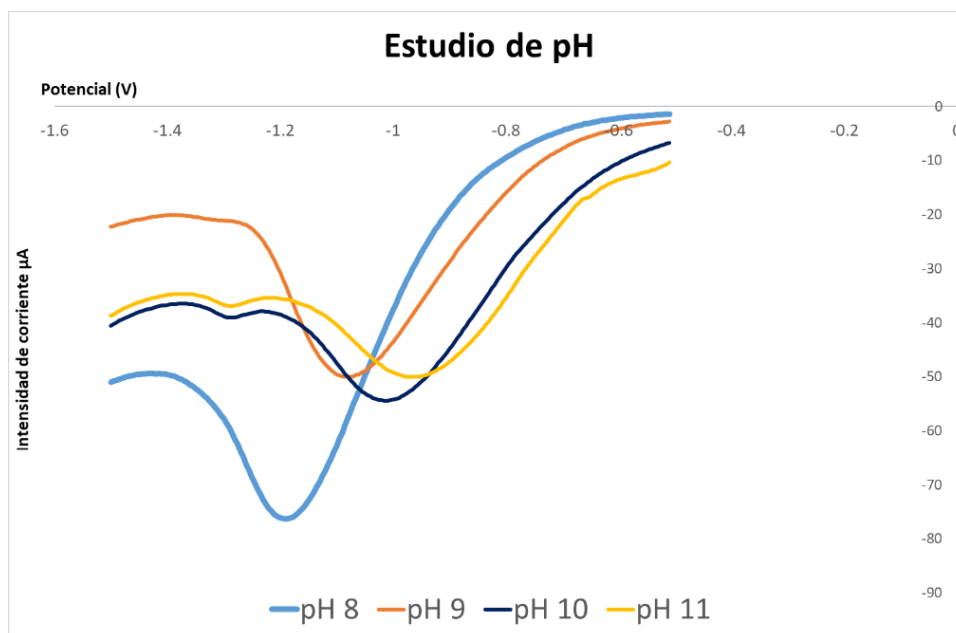


Figura 42. Estudio de pH por Voltametría de Onda Cuadrada

4.1.3 Caracterización del proceso (difusión)

4.1.3.1 Velocidad de Barrido por voltametría cíclica: **Prueba de proceso de difusión**

Un proceso de difusión depende de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de acuerdo con la ecuación $i_p = (2,99 \cdot 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A C \cdot D^{1/2} v^{1/2}$ para un proceso irreversible.

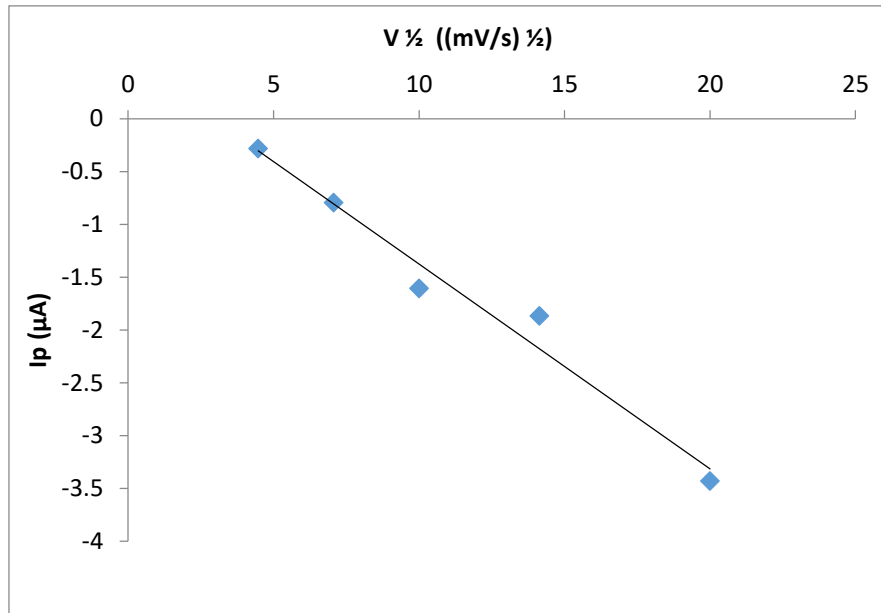


Figura 43. Velocidades de barrido vs Intensidad de pico

Con el resultado ilustrado en la figura 43 comprobamos que el proceso que tiene lugar está controlado por el régimen de difusión del analito (imidacloprid) hacia la superficie del electrodo serigrafiado de carbono.

4.1.4 Optimización de la Frecuencia voltamperometría de onda cuadrada

Se realizó la optimización del parámetro de frecuencia se escogieron 3 frecuencias a 10 Hz, 20 Hz y 30 Hz, la frecuencia que resultó con mayor señal fue la de 20 Hz, como se muestra en la figura 44 con el pico más intenso y definido, aunque con una leve diferencia entre las otras dos.

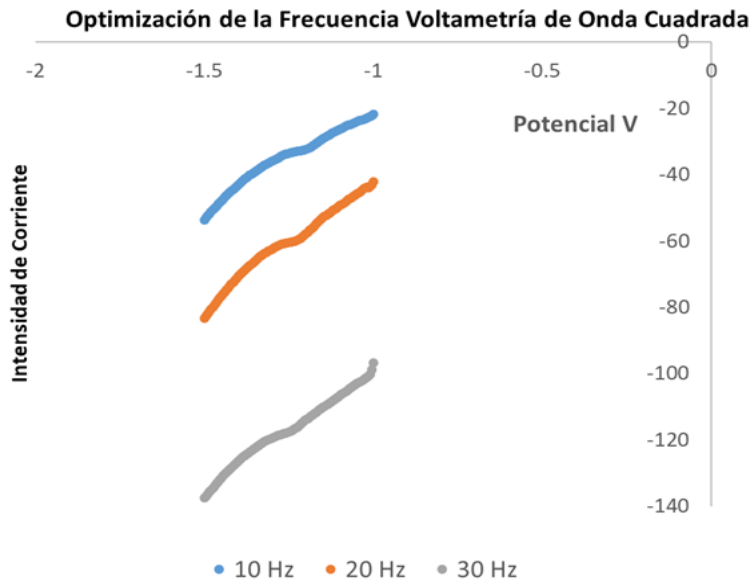


Figura 44. Optimización de la Frecuencia por Voltametría de Onda Cuadrada

4.1.5 Calibrados Voltamperometría de Onda Cuadrada y Pulso diferencial

Se realizó una curva de calibración con 5 niveles de concentración de imidacloprid a 20, 30, 50, 80 y 100 μM , con las técnicas de Voltamperometría de Onda Cuadrada y Pulso diferencial como se observa en las figuras 45 y 46.

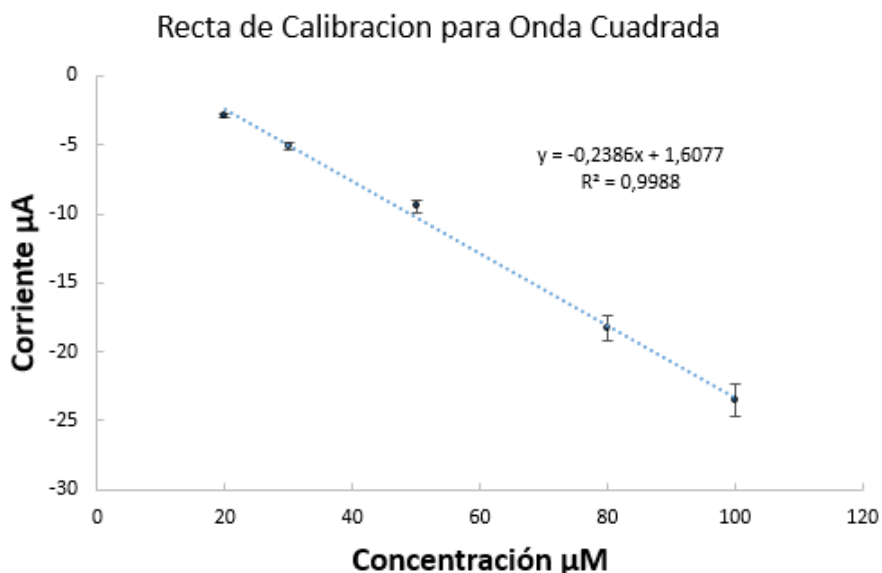


Figura 45. Recta de calibrado de concentraciones de Imidacloprid por Voltametría de Onda Cuadrada

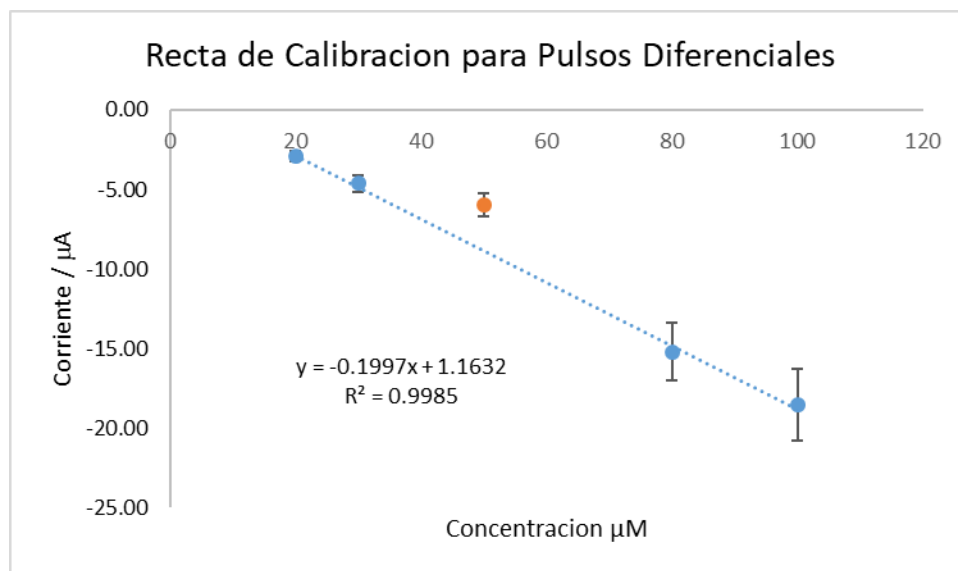


Figura 46. Recta de Calibrado de concentraciones de Imidacloprid por Voltametría de Pulso diferencial

Para pulsos diferenciales se obtiene una recta de calibración como se muestra en la figura 46 con una pendiente y un coeficiente de regresión del mismo grado de sensibilidad que la obtenida por onda cuadrada figura 45. Sin embargo, en este caso la mayor acumulación de los productos de reacciones subsecuentes a la reducción electroquímica del grupo NO_2 de imidacloprid conduce a una barra de error en las medidas un poco mayor que el doble de la observada con la técnica de onda cuadrada. En consecuencia, utilizamos la técnica de onda cuadrada para el análisis del analito (imidacloprid) en matrices reales sobre la superficie de un electrodo de carbono.

Se realizó una recta de calibrado con el método de los mínimos cuadrados como se muestra en la figura 47 y se calculó el límite de detección y cuantificación como se describe en el cuadro que sigue:

CUADRO 5 Cálculo de los LD y LC con la recta de regresión de mínimos cuadrados

desviación estandar de la regresión / Sr	Desviación standard de la pendiente	Desviación estandar del intercepto	Límite de detección 3Sa/b	Límite de cuantificación 10Sa/m (mM)
0,574886969	0,008550928	0,0326527	0,3746634	1,25

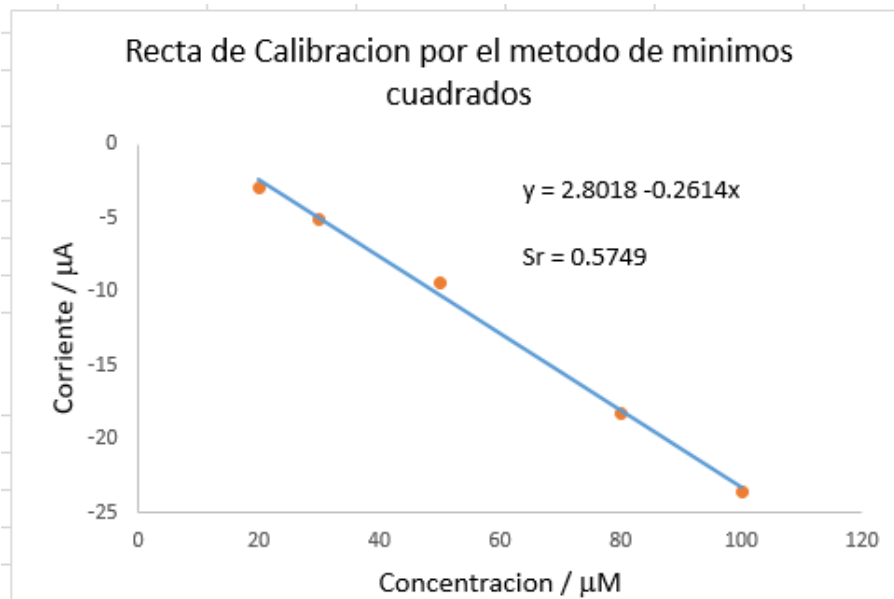


Figura 47. Recta de calibración de niveles de concentración de imidacloprid por el método de mínimos cuadrados

4.2 Análisis de imidacloprid en muestra fortificada con la técnica de onda cuadrada

Se realizó la determinación de imidacloprid mediante voltamperometría de onda cuadrada sobre electrodos serigrafiados de carbono, como se muestra en la figura 48. Se obtuvo un recuperado de 107 % de imidacloprid en el tomate, y una reproducibilidad (Coeficiente de variación) entre electrodos de 1,35 %, lo que indica una buena medición a concentraciones de mg/kg (ppm). Cabe resaltar que se trabajaron a concentraciones mayores al límite de cuantificación con la intención de estudiar la reproducibilidad de los electrodos de carbono.

También es importante mencionar que los límites máximos de residuos en frutas y vegetales están definidos en un rango entre 0,01 a 1 mg/kg y en algunos casos especiales de acuerdo a los ensayos supervisados en Buenas Prácticas Agrícolas han sido definidos entre 5 a 15 mg/kg. En el caso del imidacloprid en tomate, el Límite Máximo de Residuos de Plaguicidas ha sido fijado por la Unión Europea en 0,5 mg/kg (<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=product.resultat&language=ES&selectedID=116>).

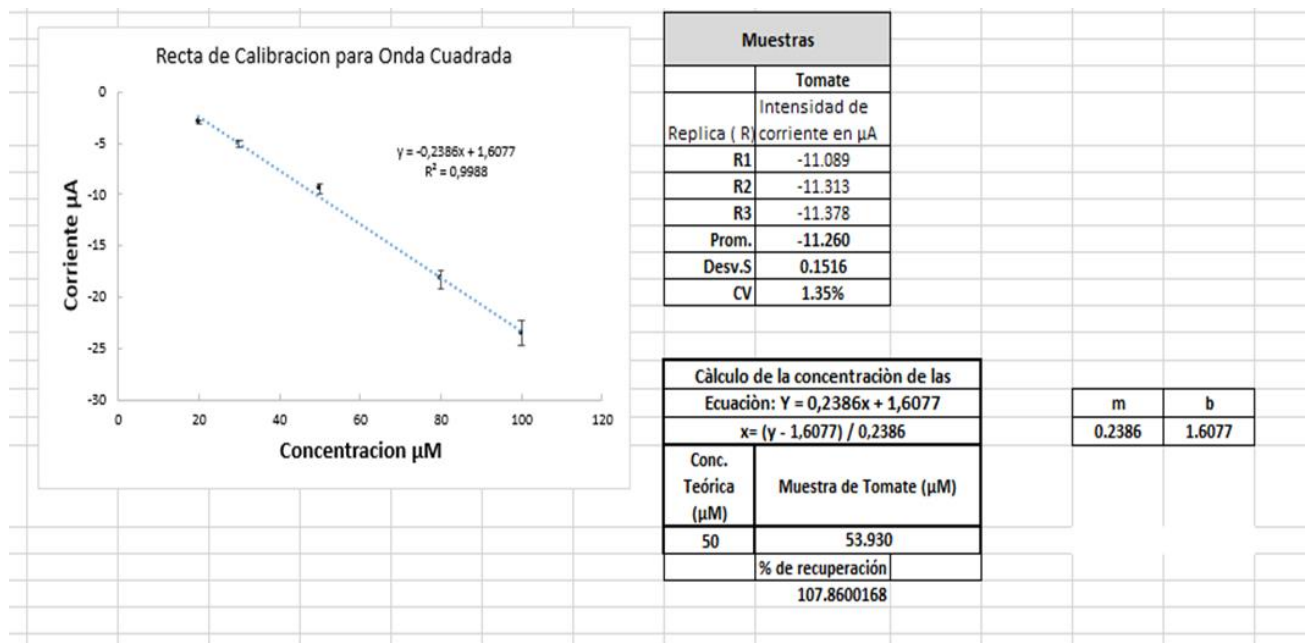


Figura 48. Análisis de Imidacloprid en muestra de tomate

La recta de los mínimos cuadrados nos sugiere trabajar en un rango más bajo de concentración los cuales podemos obtener concentraciones a nivel de 0,25 mg/kg y así lograr determinar imidacloprid a una concentración más baja de la calculada a través de la técnica de onda cuadrada; sin embargo podríamos estar trabajando con un rango lineal con residuales más altos y la incertidumbre de la medición pudiera aumentar, por lo que nos inclinamos a contar con una metodología que nos permita reproducir de manera confiable y cómoda en un análisis rutinario, modificando la superficie del electrodo de carbono con nanomateriales o desarrollando biosensores más específicos para un analito determinado

como lo que hemos trabajado en esta tesis. En la sección siguiente presentamos el desarrollo de inmunosensores utilizando en uno de los métodos con nanopartícula de oro.

4.3 Resultados del desarrollo de inmunosensores

Se llevó a cabo el desarrollo de dos inmunosensores para la determinación específica de imidacloprid, uno a través del ensayo competitivo indirecto y el otro método es el ensayo competitivo directo. Primero pasamos a presentar los ensayos realizados para las optimizaciones de las concentraciones de los reactivos utilizados a lo largo del estudio, mostrados en gráficas de barras; iniciaremos con el método de ensayo competitivo indirecto y posteriormente se presenta las optimizaciones del método de ensayo competitivo directo.

4.3.1 Optimización de parámetros Inmunosensor ensayo competitivo indirecto

Se realizó la optimización de la concentración de BSA a diferentes concentraciones y fue escogido BSA al 1% (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA-IMD, mAb-IMD y anti IgG-HRP), como podemos observar en la figura 49, ya que proporciona la mayor señal para el ensayo.

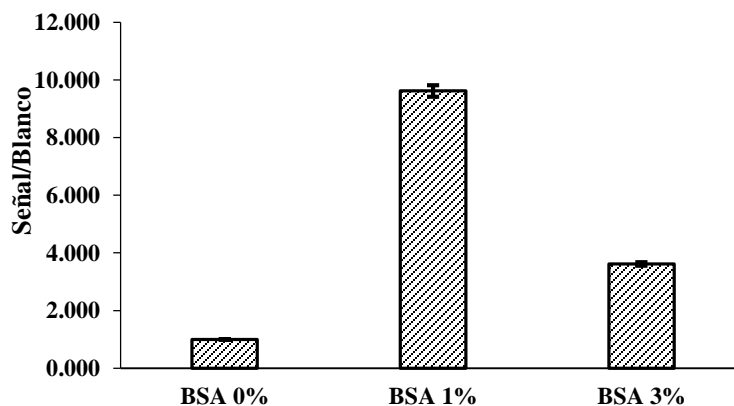


Figura 49. Optimización de la concentración de BSA

4.3.2 Optimización de Antígeno proteína conjugada (BSA-IMD)

Para la optimización de BSA-IMD escogimos la concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mAb-IMD y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti IgG-HRP), ya que presenta una mejor señal como se muestra en la figura 50.

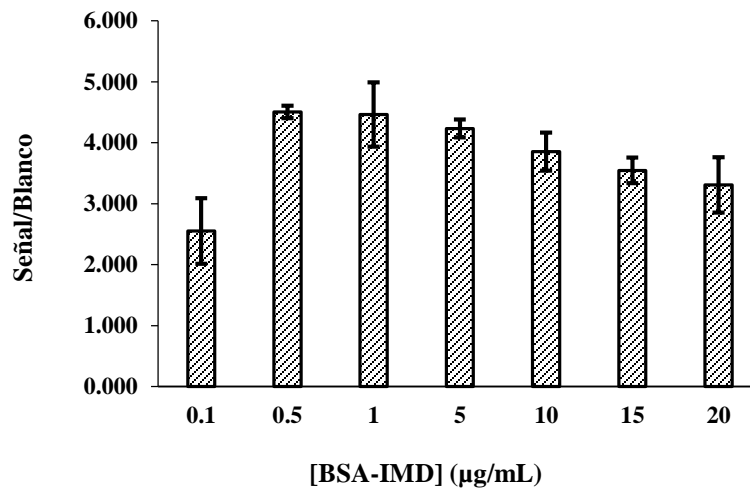


Figura 50. Optimización de antígeno proteína conjugada BSA-IMD

4.3.3 Optimización Anticuerpo monoclonal de imidacloprid (mAb-IMD)

Para la Optimización del anticuerpo monoclonal de imidacloprid se realizaron ensayos a diferentes concentraciones. La concentración escogida fue la de 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como se observa en la figura 51. Se seleccionó 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como valor de la máxima pendiente o máxima señal que le da la sensibilidad al método.

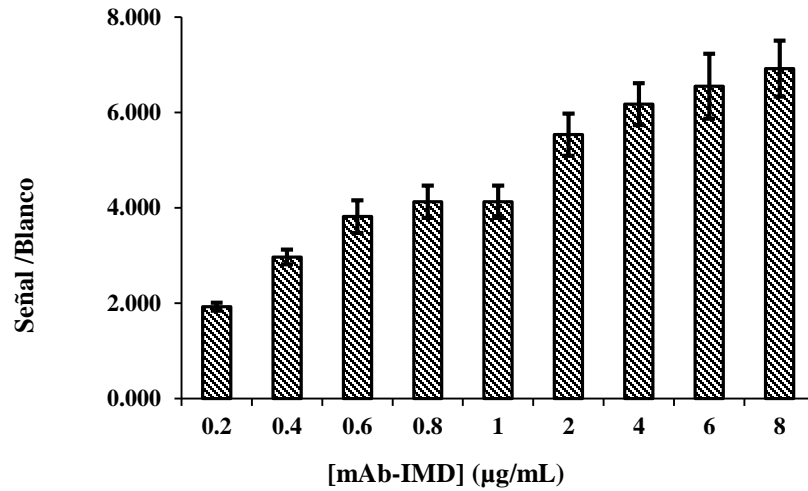


Figura 51. Optimización de la concentración de anticuerpo monoclonal de imidacloprid mAb-IMD

0,8 µg/mL (0,5 µg/ml BSA-IMD, 5 µg/ml anti IgG-HRP)

4.3.4 Optimización policlonal (anti IgG-HRP): escogido 3 µg /mL (0,5 µg /mL, 0,8 µg/mL mAb

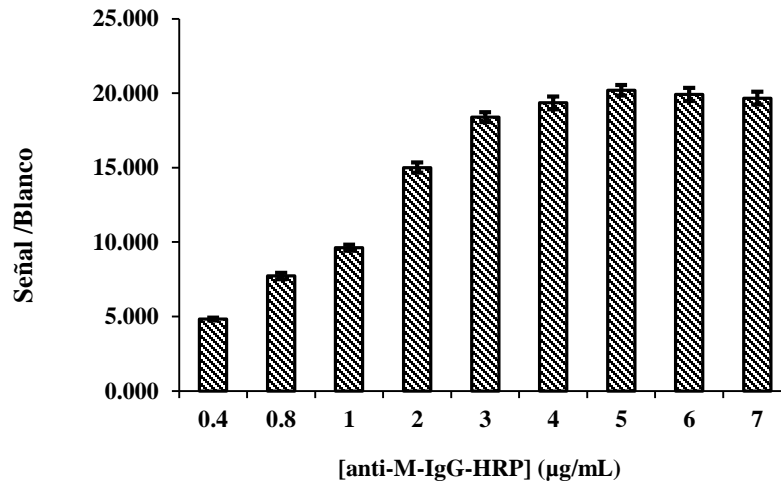


Figura 52. Optimización del anticuerpo policlonal

Se busca la máxima señal por lo cual se escogió el 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como se observa en la figura 52.

4.3.4 Características analíticas

4.3.4.1 Recta de calibrado:

Rango lineal de 0,1 nM a 2,5 nM con un límite de detección (LD): 0,034 nM y un límite de cuantificación (LC): 0,1nM, como mostrado en la figura 53.

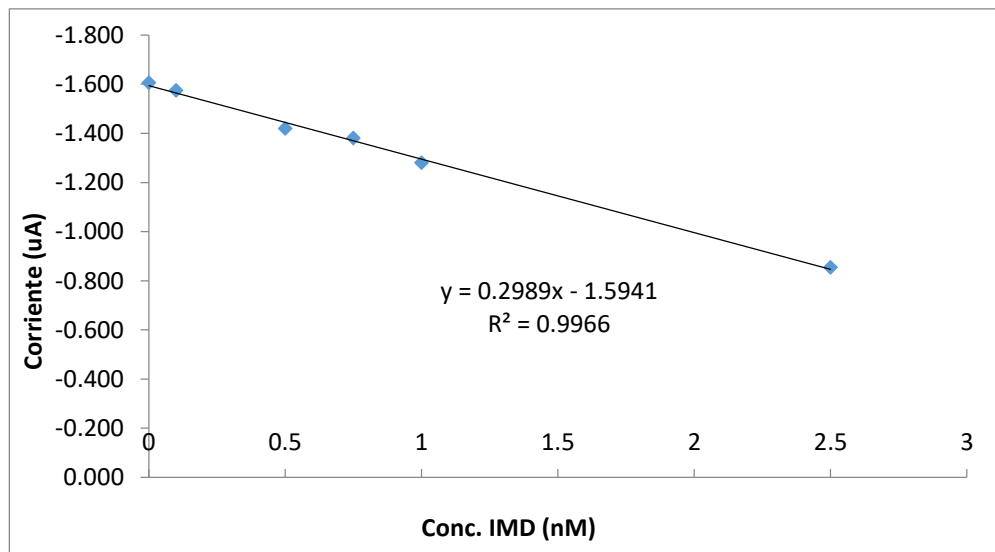


Figura 53. Recta de Calibrado método de ensayo competitivo indirecto

Se realizó la recta de calibrado a 6 de niveles de concentración 0,1 nM, 0,25 nM, 0,5 nM, 0,75 nM, 1,0 nM y 2,5 nM, obteniéndose el rango lineal del método y a bajas concentraciones a nivel de 0,026 $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb).

4.3 Optimización De Parámetros Inmunosensor Ensayo Competitivo Directo

4.3.1 Optimización Nanopartículas de Oro

Nanopartículas de oro -100 μ A durante 180 s. En la figura 54 se puede observar la diferencia notoria al realizar los ensayos sin la nanoestructuración con oro en el electrodo serigrafiado, por lo que la nanopartículas de oro le proporcionan al método una mejor señal debido tanto a la elevada conductividad de las mismas como a la elevada relación superficie/volumen que presentan.

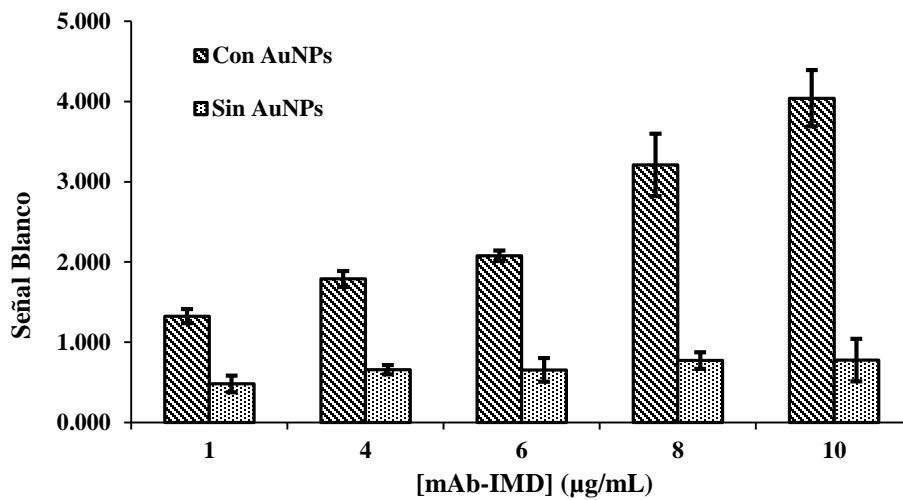


Figura 54. Optimización de Nanopartículas de Oro

4.3.2 Tiempo de reacción con TMB

Fue seleccionado 1 minuto (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb-IMD, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IMD-HRP)

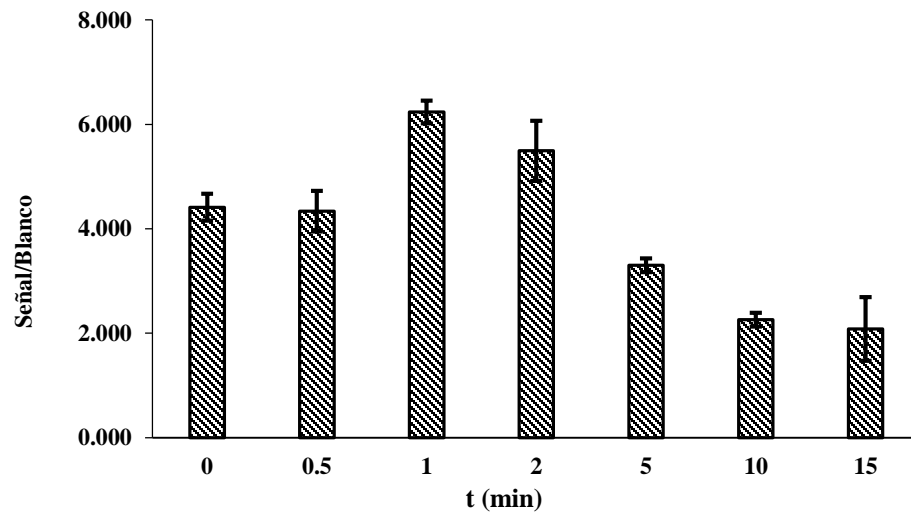


Figura 55. Optimización del tiempo de reacción del TMB

4.3.3 Optimización mAb-IMD

Fue seleccionada la concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($1\mu\text{g}/\text{mL}$ IMD-HRP, 1 minuto con TMB)

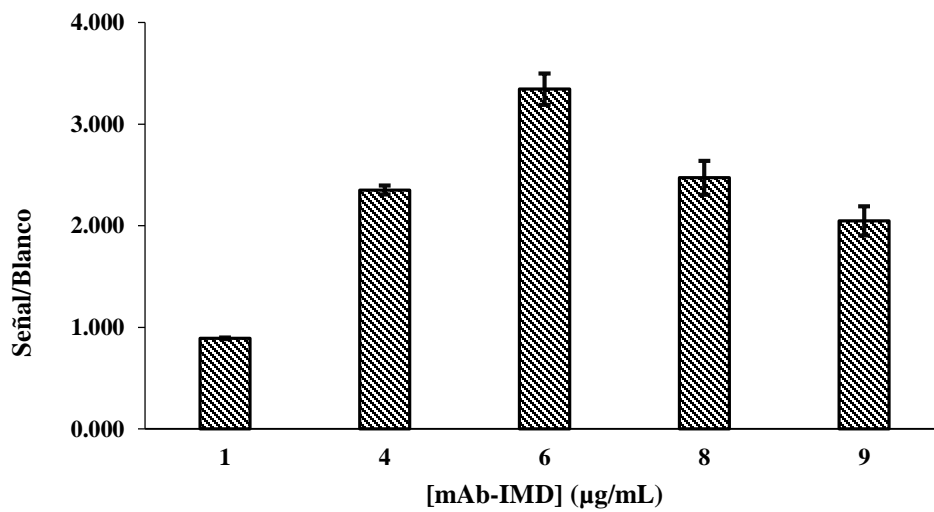


Figura 56. Optimización del anticuerpo monoclonal

4.3.4 Optimización IMD-HRP

Fue seleccionado 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mAb-IMD y 1 minuto con TMB)

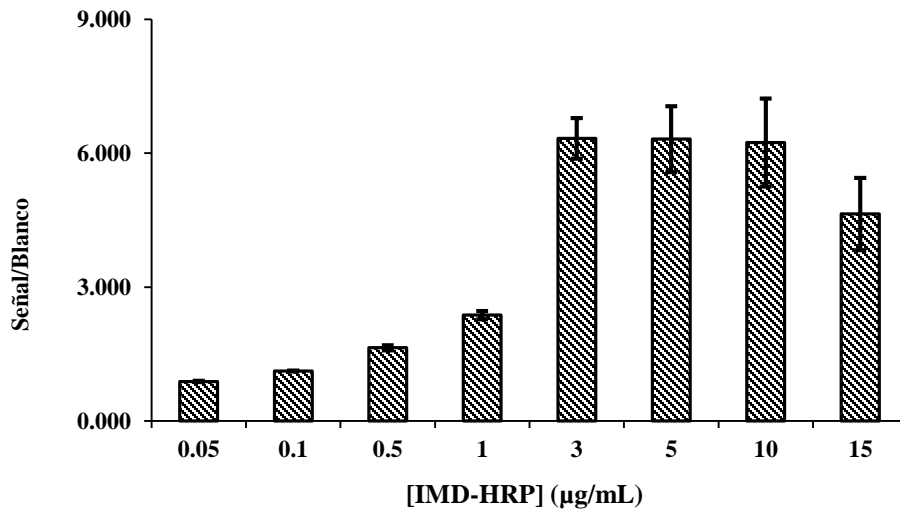


Figura 57. Optimización del antígeno marcado enzimáticamente (IMD-HRP)

4.3.5 Características Analíticas

4.3.5.1 Recta de calibrado

Rango lineal de 0,1 nM a 2,5 nM con un límite de detección (LD): 0,037 nM y un límite de cuantificación (LC): 0,1 nM, como se muestra en la figura 58.

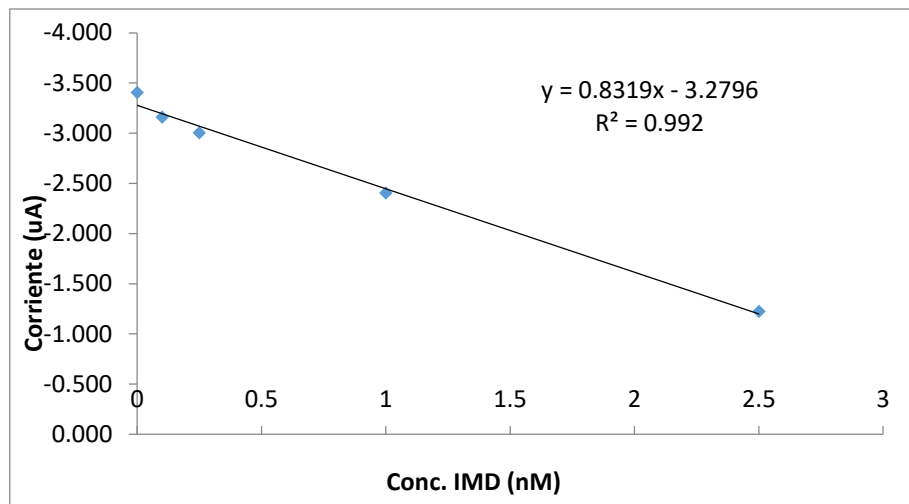


Figura 58. Recta de calibrado del método de ensayo competitivo directo del Imidacloprid

Se realizó la recta de calibrado a 5 de niveles de concentración 0,1 nM, 0,25 nM, 0,5 nM, 1,0 nM y 2,5 nM, obteniéndose el rango lineal del método y a bajas concentraciones a nivel de 0,026 µg/L (ppb).

4.4 Precisión: Estudio de repetibilidad y reproducibilidad

Un estudio de precisión del inmunosensor se llevó a cabo evaluando la reproducibilidad de los ensayos para el método de ensayo competitivo indirecto y para el método de ensayo competitivo directo en diferentes inmunosensores y diferentes días. Cinco diferentes sensores fueron realizados cada día y los resultados obtenidos indican una buena reproducibilidad del inmunosensor con un coeficiente de variación de 9,7 % para el competitivo indirecto y de 9,0 % para el ensayo competitivo directo. Estos resultados

muestran que los dos métodos proporcionan medidas precisas. Para la repetibilidad se ensayó en un mismo día 5 sensores a una concentración de 0,6 nM para el método de ensayo competitivo indirecto fue de 7,0 % y para el método competitivo directo fue de 3.8 %.

4.5 Método multirresidual QuEChERS por Cromatografía líquida Acoplada a Espectrometría de Masas.

Después de optimizar las condiciones de prueba con el inmunosensor de método de ensayo competitivo indirecto, se analizó una muestra de pimentón real, que se detectó a 0,19 mg/kg de imidacloprid utilizando el método QuEChERS mediante LC-MSMS. La misma muestra se analizó con el método de inmunoensayo electroquímico obteniendo 0,16 mg / kg.

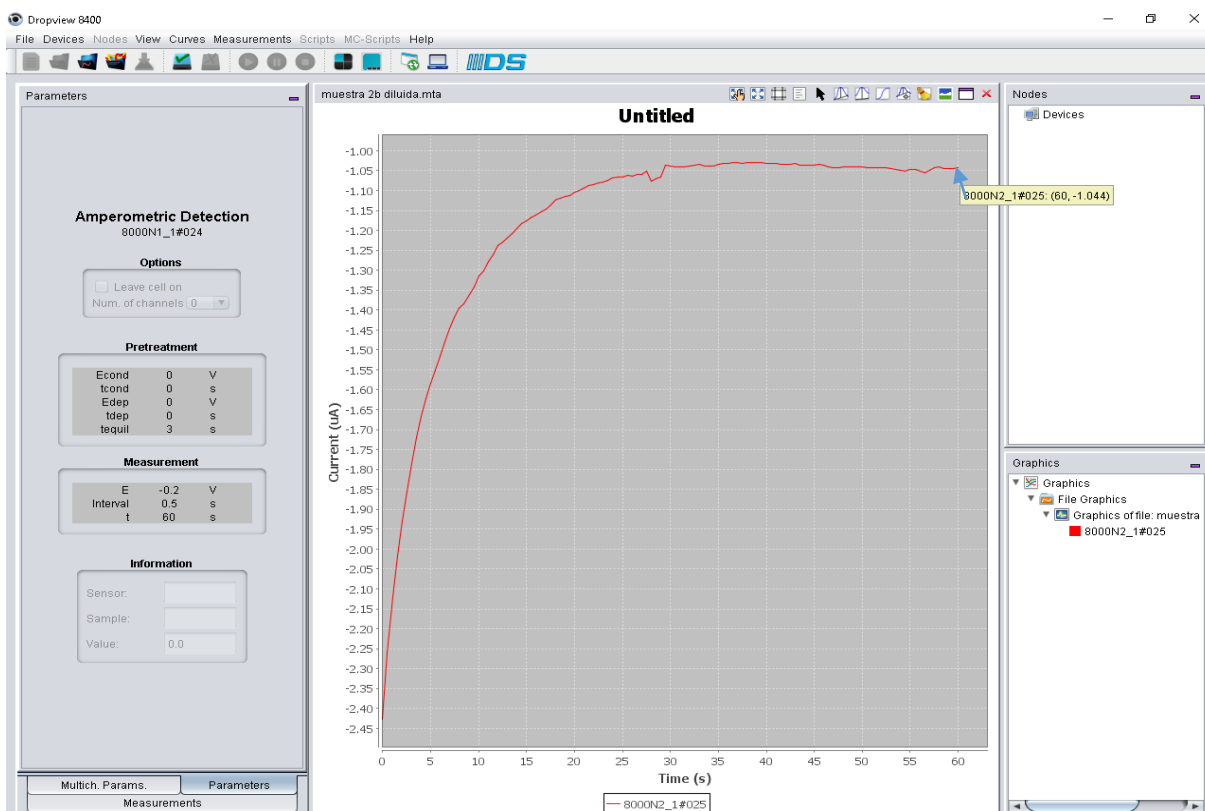


Figura 59. Medición cronoamperométrica de imidacloprid en una muestra real de pimentón

En la figura 59 se observa a una mayor concentración de imidacloprid, se obtiene una intensidad más baja de la corriente de reducción, ya que cuando se agrega más analito hay

una cantidad menor tanto de imidacloprid monoclonal libre como de anticuerpo policlonal y por lo tanto habrá un TMB oxidado en la superficie del electrodo.

Quantitative Analysis Summary Report						
&[Picture]	D:\MassHunter\Data\FRUTAS y VEGETALES\2018\Septiembre\05\QuantResults\834-839.batch.bin					
Analysis Time	9/10/2018 8:28 AM	Analyst Name	Agilent6460\MIDA			
Report Time	9/10/2018 8:36 AM	Reporter Name	Agilent6460\MIDA			
Last Calib Update	9/10/2018 8:28 AM	Batch State	Processed			
Quant Batch Version	B.07.01	Quant Report Version	B.07.01			
Target Compound	<i>Imidacloprid</i>					
Data File	Compound	Sample Type	Response	Final Conc	Exp Conc	Accuracy
Blanco pimenton.d	Imidacloprid	Blank	5115	0.0000		
CCN1 P.d	Imidacloprid	Calibration	44438	4.7934	5.0000	95.87
CCN2 P.d	Imidacloprid	Calibration	55664	6.5504	10.0000	65.50
CCN3 P.d	Imidacloprid	Calibration	197353	28.7268	25.0000	114.91
CCN4 P.d	Imidacloprid	Calibration	324082	48.5617	50.0000	97.12
CCN5 P.d	Imidacloprid	Calibration	666687	102.1844	100.0000	102.18
CCN6 P.d	Imidacloprid	Calibration	1605890	249.1833	250.0000	99.67
FN2 P.d	Imidacloprid	QC	54913	6.4329	10.0000	64.33
FN3 P.d	Imidacloprid	QC	131498	18.4196	25.0000	73.68
LRT-835-2018 A.d	Imidacloprid	Sample	1236972	191.4423		
LRT-835-2018 B.d	Imidacloprid	Sample	1224396	189.4740		

Figura 60. Análisis cuantitativo de imidacloprid una muestra real de pimentón por LC-MSMS

En la figura 60 se muestra el reporte de análisis cuantitativo de una muestra real de pimentón que se le determinó imidacloprid a 0,19 mg/kg o 190 µg/kg de imidacloprid, por LC-MSMS.

CUADRO 6. Análisis cuantitativo de imidacloprid con inmunosensor método ensayo competitivo indirecto

Análisis cuantitativo de imidacloprid en muestras de agua y tomate		
	Agua (intensidad de corriente)	Tomate (intensidad de corriente)
R1	-1,395	-1,112
R2	-1,231	-1,410
Prom.	-1,461	-1,261
Desv.S	0.1160	0.0700
CV	8%	6%
Cálculo de la concentración de las muestras:		
Ecuación: $Y = 0,681x - 1,881$		
$x = (y + 1,881) / 0,681$		
Concentración teórica	Concentración teórica	
39,11 nM	39,11 nM	
Muestra de Agua (nM)	Muestra de Tomate (nM)	
40,38	31,57	
Recuperados		
Agua	Tomate	
103,25 %	80,71 %	

Se analizaron muestras fortificadas de agua y tomate con el inmunosensor por el método de ensayo competitivo indirecto y directo. Para el análisis de imidacloprid y otros plaguicidas en una muestra de agua, el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas en Plantas y Productos Vegetales, tiene validado el método de inyección directa utilizando un sistema de enriquecimiento online, con un límite cuantificación de 0,1 µg/L; por lo que se realizó un ensayo fortificando agua a 0,15 µg/L, determinado por ambas metodologías con el inmunosensor y comparado con LC-MSMS en la figura 61 se observa la cuantificación de imidacloprid en agua con un valor a 0,18 µg/L.

Para el análisis de la muestra vegetal como está descrito en la metodología se fortifica a 0,01 mg/kg y se realiza una dilución de la muestra a 0,6 nM (0,15 µg/L) para ser analizada en una recta de calibrado de 0,1 nM a 2,5 nM y luego el resultado se multiplica por el factor de dilución, la medición directa sin dilución no es recomendable, ya que se satura el inmunosensor.

Cabe resaltar que el inmunosensor cuenta con un LC de 0,1 nM ó 0,026 µg/L. y el Método con técnicas cromatográficas acoplada a espectrometría de masas LC-MSMS tiene un LC de 0,01 mg/kg, por lo que no fue posible comparar con una muestra vegetal a una fortificación de 0,026 µg/L. La señal de imidacloprid en tomate analizado por LC-MSMS se muestra en la figura 62.

Quantitation Results						
Target Compound						
Data File	Compound	Sample Type	Response	Final Conc	Exp Conc	Accuracy
FORTIFICADO 1.d	IMIDACLOPRID	Sample	83513	0.1736		
FORTIFICADO 2.d	IMIDACLOPRID	Sample	87747	0.1889		
N1 (Agua).d	IMIDACLOPRID	Calibration	40437	0.0183	0.1001	18.25
N2 (Agua).d	IMIDACLOPRID	Calibration	108722	0.2646	0.3003	88.10
N3 (Agua).d	IMIDACLOPRID	Calibration	348254	1.1285	1.0000	112.85
N4 (Agua).d	IMIDACLOPRID	Calibration	291849	0.9251	2.0000	46.25
N5 (Agua).d	IMIDACLOPRID	Calibration	631153	2.1489	4.0000	53.72
N6 (Agua).d	IMIDACLOPRID	Calibration	2804785	9.9890	10.0000	99.89
FN3.d	IMIDACLOPRID	QC	355971	1.1564	1.0000	115.64

Figura 61. Análisis cuantitativo de imidacloprid en agua

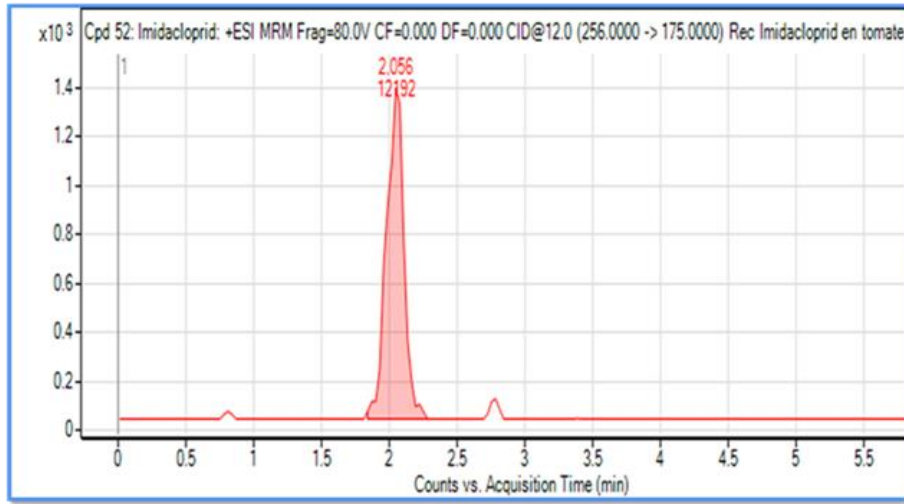


Figura 62. Señal de imidacloprid a una concentración de 0,01 mg/kg en tomate por LC-MSMS

Recuperados			
Blanco Fortificado a 10 µg/kg			
R1	-1.274	$y = mx + b$ $y = 0.2989x - 1.5941$ $(y + 1.5941) / 0.2989 = x$	
R2	-1.287		
R3	-1.290		
Prom.	-1.284		
		Conversión	
		(mg/kg)	(µg/kg)
Concentración obtenida del recuperado nM	36.24	0.009265118	9.265
Factor de dilución en el recuperado			
(0.53*65.42056075)	34.89		
% Recuperación µg/kg	µg/kg		
Concentración Teórica	10.00		
Concentración Real	9.26		
Resultado (%)	92.64%		
Concentración real	39.11		
Concentración obtenida	36.24		
Resultado %	92.65		

Figura 63. Análisis de imidacloprid en tomate por el método de ensayo competitivo directo

Se realizaron varios ensayos del método de ensayo competitivo directo para el análisis de imidacloprid en tomate, como se muestra como ejemplo en la figura 63 a una concentración de 39,11 nM.

5. CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto un método electroquímico fundamentado en la difusión para la determinación de imidacloprid en frutas y vegetales por voltamperometría de onda cuadrada y por voltamperometría de pulso diferencial. Se determinó imidacloprid en tomate en un electrodo serigrafiado de carbono sin modificación con un recuperado de 107 % y un límite de cuantificación de 1,25 μM (320,5 $\mu\text{g/L}$) alcanzado con la técnica electroquímica de onda cuadrada.

Se desarrollaron dos inmunosensores a través del método de ensayo competitivo indirecto y el método de ensayo competitivo directo para la determinación de imidacloprid en agua y vegetales, los cuales fueron comparados con técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masa triple cuadrupolo. Se obtuvieron límites de cuantificación de 0,1 nM (0,026 $\mu\text{g/L}$) y recuperados de 80 a 106 % en ambos métodos, con una reproducibilidad de 9,0 % para el método de ensayo competitivo directo y 9,7 % para el método de ensayo competitivo indirecto.

Con los resultados obtenidos se demuestra que con el desarrollo de inmunosensores se obtiene una alta selectividad dada por los anticuerpos, siendo este un método rápido para un “screening” con muestras que no contengan excesivas interferencias. Además de otras matrices más complejas ofrece la versatilidad y confiabilidad analítica para el análisis de imidacloprid a bajas concentraciones ($\mu\text{g/L}$) y altos recuperados.

Los electrodos serigrafiados hacen eficiente el manejo de reactivos analíticos y se minimiza la generación de desechos. A través de las técnicas electroquímicas y el desarrollo de inmunosensores, siendo un análisis rápido y de bajo costo se podrá monitorear una gran cantidad de muestras, lo que facilita tener una representatividad y suficientes datos para dar inicio a un análisis de riesgo.

6. RECOMENDACIONES

Desarrollar un kit inmunológico portátil para la determinación de imidacloprid en el campo como para la determinación de otros plaguicidas como piretroides, aspectos en los que seguimos trabajando, ya que son plaguicidas de gran uso en Panamá.

Dar continuidad a un estudio el cual se inició durante la ejecución de este trabajo sobre el desarrollo de un inmunosensor para la determinación de piretroides basados en nanopartículas magnéticas.

Implementar los inmunosensores desarrollados para el análisis de imidacloprid en mieles.

7. GLOSARIO DE TÉRMINOS

7.1 Anticuerpos: Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, abreviado Ig) son glucoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias y virus.

7.2 Anticuerpo primario: es una inmunoglobulina que se une específicamente a una proteína concreta u otra biomolécula objeto de investigación con la finalidad de purificarla o detectarla y, posteriormente, medirla. Los anticuerpos primarios se producen como anticuerpos monoclonales (los mAbs) o policlonales (pAbs) usando la especie animal tal como la rata, el ratón, la cabra, y el conejo como ordenador principal.

7.3 Anticuerpo secundario: se unen al anticuerpo primario para ayudar en la detección, clasificación y purificación de los antígenos diana. Para permitir la detección, el anticuerpo secundario debe tener especificidad por la especie de anticuerpo y el isotipo del anticuerpo primario que se está utilizando y generalmente está conjugado.

7.4 Antígeno: Es cualquier sustancia que provoca que el sistema inmunitario produzca anticuerpos contra sí mismo. Esto significa que su sistema inmunitario no reconoce la sustancia, y está tratando de combatirla.

7.5 Biosensores: Dispositivo bioquímico-electrónico que permite identificar, transformar y cuantificar un evento biológico

7.6 Cronoamperometría: Se basa en la medida de la corriente electrolítica en función del tiempo cuando se aplica un potencial. Este potencial puede ser constante durante toda la medida o, en experimentos más complicados, se pueden aplicar diferentes potenciales durante diferentes tiempos a lo largo de toda la medida

7.7 Electrodo serigrafiado: Es una pequeña tarjeta donde se encuentra un circuito eléctrico integrado que consiste en los electrodos en sí, junto a contactos eléctricos para su conexión al sistema de medición.

7.8 Inmunoensayo: es un conjunto de técnicas inmunoquímicas analíticas de laboratorio que tienen en común el usar complejos inmunes, es decir los resultantes de la conjugación de anticuerpos y antígenos, como referencias de cuantificación de un analito (sustancia objeto de análisis) determinado, que puede ser el anticuerpo (Ac) o un antígeno (Ag), usando para la medición una molécula como marcador que hace parte de la reacción con el complejo inmune en la prueba o ensayo químico

7.9 Inmunosensores: Son biosensores que usan anticuerpos o antígenos como elemento sensor específico y proporcionan señales dependientes de la concentración.

7.10 Límite Máximo de Residuos de Plaguicidas: Es la concentración Máxima de Residuos de Plaguicida expresada en mg/kg), recomendada por la Comisión del Codex Alimentarius, a ser legalmente permitida en productos alimenticios y alimentos para animal, que han sido producidos bajo el concepto de buenas prácticas agrícolas (BPA).

7.11 Nanoestructuración: está enfocado en la síntesis y caracterización de los nanomateriales: nanopartículas, nanohilos, nanotubos, nanofibras, interfases nanoporoso, nanocompuestos, recubrimientos delgados y cristales líquidos.

7.12 Nanomateriales: Se define como cualquier material que tiene propiedades únicas o nuevas, debido a la estructuración a escala nanométrica (escala nano metro).

7.13 Nanotecnología: La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nano escala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nano escala.

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adley, C. (2014). Past, Present and Future of Sensors in Food Production. *Foods*, 3(3), 491–510. <https://doi.org/10.3390/foods3030491>
- Albareda-Sirvent, M., Merkoçi, A., & Alegret, S. (2000). Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 69(1), 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00536-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00536-0)
- Araque Caballero, E. (2015). Nanomateriales híbridos de óxido de grafeno y polímeros hidrosolubles para el diseño de plataformas biosensoras electroquímicas, 225. <https://doi.org/http://eprints.ucm.es/34134/1/T36634.pdf>
- Arduini, F., Micheli, L., Moscone, D., Paleschi, G., Piermarini, S., Ricci, F., & Volpe, G. (2016). Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 79, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.032>
- B. Segura, F. N. J. y L. R. G. (2016). Prototipo de potenciostato con aplicaciones en procesos. *Chemical Engineering Progress*, 19, 61–69.
- Bahadir, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). Applications of graphene in electrochemical sensing and biosensing. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 76, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.008>
- Brahim, M. Ben, Belhadj Ammar, H., Abdelhédi, R., & Samet, Y. (2016). Electrochemical behavior and analytical detection of Imidacloprid insecticide on a BDD electrode using square-wave voltammetric method. *Chinese Chemical Letters*, 27(5), 666–672. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2015.12.032>
- Burcu Bahadir, E., & Kemal Sezgintürk, M. (2015). Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta*, 132, 162–174.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.063>

- Calvo, A. S., Botas, C., Martín-Yerga, D., Álvarez, P., Menéndez, R., & Costa-García, A. (2015). Comparative Study of Screen-Printed Electrodes Modified with Graphene Oxides Reduced by a Constant Current. *Journal of The Electrochemical Society*, *162*(10), B282–B290. <https://doi.org/10.1149/2.1021510jes>
- Cepriá, G., Córdova, W. R., Jiménez-Lamana, J., Laborda, F., & Castillo, J. R. (2014). Silver nanoparticle detection and characterization in silver colloidal products using screen printed electrodes. *Analytical Methods*, *6*(9), 3072–3078. <https://doi.org/10.1039/c4ay00080c>
- Cesarino, I., Moraes, F. C., Lanza, M. R. V, & MacHado, S. A. S. (2012). Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes. *Food Chemistry*, *135*(3), 873–879. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.147>
- Daniel, M., & Astruc, D. (2004). ISA - Congresses | Conferences | Meetings | Workshops | Seminars on Sociology and Social Sciences. <https://doi.org/10.1021/cr030698>
- Dudok de Wit, C. (1987). Medische informatie voor verpleegkundigen. Autologe bloedtransfusie. *Tijdschrift Voor Ziekenverpleging*, *41*(20), 655–657. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Fanjul-Bolado, P., González-García, M. B., & Costa-García, A. (2005). Amperometric detection in TMB/HRP-based assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *382*(2), 297–302. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3084-9>
- Fanjul-Bolado, P., Hernández-Santos, D., Lamas-Ardisana, P. J., Martín-Pernía, A., & Costa-García, A. (2008). Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta*, *53*(10), 3635–3642. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.12.044>

- Fanjul-Bolado, P., Queipo, P., Lamas-Ardisana, P. J., & Costa-García, A. (2007). Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta*, *74*(3), 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.07.035>
- Fernández, E., Vidal, L., Martín-Yerga, D., Blanco, M. D. C., Canals, A., & Costa-García, A. (2015). Screen-printed electrode based electrochemical detector coupled with ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume back-extraction for determination of mercury in water samples. *Talanta*, *135*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.069>
- Food, E., & Authority, S. (2016). Peer review of the pesticide risk assessment for the active substance imidacloprid in light of confirmatory data submitted, *14*(October). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4607>
- Gonzales, M. B., & Costa, A. (2010). Los biosensores electroquímicos : herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. *Inmunoelectroanalisis*, 197–222. <https://doi.org/http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.1068>
- Güell, A. G., Cuharuc, A. S., Kim, Y. R., Zhang, G., Tan, S. Y., Ebejer, N., & Unwin, P. R. (2015). Redox-Dependent spatially resolved electrochemistry at graphene and graphite step edges. *ACS Nano*, *9*(4), 3558–3571. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00550>
- Güell, A. G., Ebejer, N., Snowden, M. E., MacPherson, J. V., & Unwin, P. R. (2012). Structural correlations in heterogeneous electron transfer at monolayer and multilayer graphene electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(17), 7258–7261. <https://doi.org/10.1021/ja3014902>
- Guzsvány, V., Papp, Z., Zbiljic, J., Vajdle, O., & Rodic, M. (2011). Bismuth modified carbon-based electrodes for the determination of selected neonicotinoid insecticides. *Molecules*, *16*(6), 4451–4466. <https://doi.org/10.3390/molecules16064451>

- Hilder, M., Winther-Jensen, B., Li, D., Forsyth, M., & MacFarlane, D. R. (2011). Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *13*(20), 9187–9193. <https://doi.org/10.1039/c1cp20173e>
- Jubete, E., Loaiza, O. A., Ochoteco, E., Pomposo, J. A., Grande, H., & Rodríguez, J. (2009). Nanotechnology: A Tool for Improved Performance on Electrochemical Screen-Printed (Bio)Sensors. *Journal of Sensors*, 2009(February 2014). <https://doi.org/10.1155/2009/842575>
- Kadara, R. O., Jenkinson, N., & Banks, C. E. (2009). Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *138*(2), 556–562. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.044>
- Kim, S. N., Rusling, J. F., & Papadimitrakopoulos, F. (2007). Carbon nanotubes for electronic and electrochemical detection of biomolecules. *Advanced Materials*, *19*(20), 3214–3228. <https://doi.org/10.1002/adma.200700665>
- Liu, S.; Zheng Z.; Li, X. (2013). Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives. *Anal Bioanal Chem*, *405*, 63–90.
- Lu QIAO, Huiying JIA, Xia SUN, X. W. (2014). Recent Advance of Electrochemical Immunosensor for Pesticide Residues Detection. *Sensors & Transducers*, *164*(2), 6–24.
- Luo, S., Wu, Y., & Gou, H. (2013). A voltammetric sensor based on GO-MWNTs hybrid nanomaterial-modified electrode for determination of carbendazim in soil and water samples. *Ionics*, *19*(4), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s11581-013-0868-3>
- Marek Trojanowicz. (2016). Recent advances and trends in Analytical Nanoscience and Nanotechnology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *84*(part A), 22–47.
- Marta, A., Peña, M., & Renedo, M. (2014). Puesta a punto de un biosensor para la determinación de urea.

- Martín-Yerga, D., González-García, M. B., & Costa-García, A. (2012). Use of nanohybrid materials as electrochemical transducers for mercury sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *165*(1), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.02.031>
- Martín-Yerga, D., González-García, M. B., & Costa-García, A. (2014). Electrochemical immunosensor for anti-tissue transglutaminase antibodies based on the in situ detection of quantum dots. *Talanta*, *130*, 598–602. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.010>
- Martin, C., & Grgicak, C. (2014). The Effect of Repeated Activation on Screen-Printed Carbon Electrode Cards. *ECS Transactions*, *61*(26), 1–8. <https://doi.org/10.1149/06126.0001ecst>
- Martínez-Paredes, G., González-García, M. B., & Costa-García, A. (2009). In situ electrochemical generation of gold nanostructured screen-printed carbon electrodes. Application to the detection of lead underpotential deposition. *Electrochimica Acta*, *54*(21), 4801–4808. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.03.085>
- McCreery, R. L. (2008). Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chemical Reviews*, *108*(7), 2646–2687. <https://doi.org/10.1021/cr068076m>
- Miller, J.N., J. C. M. (2010). *Statistic and Chemometrics for Analytical*.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *29*(2), 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Navalon, A., El-Khattabi, R., Gonzalez-Casado, A., & Vilchez, J. L. (1999). Differential-pulse polarographic determination of the insecticide imidacloprid in commercial formulations. *Mikrochimica Acta*, *130*(4), 261–265.

<https://doi.org/10.1007/bf01242914>

- Oliveira, T. M. B. F., Fátima Barroso, M., Morais, S., De Lima-Neto, P., Correia, A. N., Oliveira, M. B. P. P., & Delerue-Matos, C. (2013). Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. *Talanta*, *106*, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.017>
- Pereira da Silva Neves, M. M., García, M. B. G., Delerue-Matos, C., & García, A. C. (2011). Nanohybrid materials as transducer surfaces for electrochemical sensing applications. *Electroanalysis*, *23*(1), 63–71. <https://doi.org/10.1002/elan.201000427>
- Pingarrón Carrazón, J. M. (1999). *Química electroanalítica Fundamentos y aplicaciones* (Editorial). Madrid.
- Putzbach, W., & Ronkainen, N. J. (2013). Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors (Switzerland)*, *13*(4), 4811–4840. <https://doi.org/10.3390/s130404811>
- Randviir, E. P., Brownson, D. A. C., Metters, J. P., Kadara, R. O., & Banks, C. E. (2014). The fabrication, characterisation and electrochemical investigation of screen-printed graphene electrodes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *16*(10), 4598–4611. <https://doi.org/10.1039/c3cp55435j>
- Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A., & Martínez, M. J. A. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, *73*(2), 202–219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.03.050>
- Reverté, L., Prieto-Simón, B., & Campàs, M. (2016). New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review. *Analytica Chimica Acta*, *908*, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.050>
- Ricci, F., Adornetto, G., & Palleschi, G. (2012). A review of experimental aspects of

- electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*, 84, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033>
- River-Guzman, K., Franco, L. M., García-Beltrán, O., Calderon, J. A., & Nagles, E. (2018). Electrochemical detection of imidacloprid using a screen printed single walled carbon nanotubes coated with and ionic liquids. *International Journal of Electrochemical Science*, 13(6), 5775–5787. <https://doi.org/10.20964/2018.06.73>
- Rotariu, L., Lagarde, F., Jaffrezic-Renault, N., & Bala, C. (2016). Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants - trends and perspective. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 79, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.017>
- Sainz, Z. H., Baldrich, D. E., Martínez, F., & Rodríguez, J. (2014). Superficies nanoestructuradas para el desarrollo de biosensores electroquímicos e integración en un sistema de detección portable. Retrieved from <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/285057/zhs1de1.pdf?sequence=1>
- Shohayeb, M., Arida, H., Mersal, G. A. M., & El-Badawy, M. (2016). Development of a nanotechnology-based screen-printed biosensor for detection of *Schistosoma mansoni* antibodies. *International Journal of Electrochemical Science*, 11(2), 1337–1344.
- Sosa, V. (2015). *Aplicación de técnica voltamperométricas con electrodos serigrafados a la especiación de metales pesados en muestras naturales.*
- Taleat, Z., Khoshroo, A., & Mazloum-Ardakani, M. (2014). Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchimica Acta*, 181(9–10), 865–891. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1>
- Vargas-Bernal, R., Rodríguez-Miranda, E., & Herrera-Pérez, G. (2012). *Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides. Pesticides -Advances in Chemical and Botanical Pesticides.*
- Wang, J., Tian, B., Nascimento, V. B., & Angnes, L. (1998). Performance of screen-printed

carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochimica Acta*, 43(23), 3459–3465. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(98\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(98)00092-9)

Warsinke, A., Benkert, A., & Scheller, F. W. (2000). Electrochemical immunoassays. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6–7), 622–634. <https://doi.org/10.1007/s002160051557>

Washe, A. P., Lozano-Sánchez, P., Bejarano-Nosas, D., & Katakis, I. (2013). Facile and versatile approaches to enhancing electrochemical performance of screen printed electrodes. *Electrochimica Acta*, 91, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.12.110>

Xu, Y., & Wang, E. (2012). Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. *Electrochimica Acta*, 84, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.03.147>