

## CONTAMINANTES, ANTICUERPOS, ORO: ¡ACCIÓN!

### Determinación de contaminantes en el mar por medio de un inmunoensayo plasmónico acoplado a un sistema en flujo

Natcha Kaewwonglom<sup>1</sup>, Miquel Oliver<sup>2</sup>, David J. Cocovi-Solberg<sup>2</sup>, Katharina Zirngibl<sup>3</sup>, Dietmar Knopp<sup>3</sup>, Jaroon Jakmunee<sup>1</sup>, Manuel Miró<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>*Research Center on Chemistry for Development of Health Promoting Products from Northern Resources, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.*

<sup>2</sup>*FI-TRACE Group, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of the Balearic Islands, E-07122 Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain.*

<sup>3</sup>*Institute of Hydrochemistry and Chemical Balneology, Chair of Analytical Chemistry and Water Chemistry, Technische Universität München, Marchioninistrasse 17, 81377 München, Germany.*

Palabras clave: contaminante emergente; ELISA; sistema en flujo automatizado; nanopartículas de oro.

La contaminación ambiental es un hecho y el agua superficial es uno de los ecosistemas más vulnerables. Actualmente hay un gran número de compuestos provenientes del uso abusivo de fármacos y productos de cuidado personal que, debido a la eliminación incompleta en plantas de tratamiento de agua residual, terminan en el mar. A esos compuestos no regulados y presentes de forma ubicua en el ambiente se les conoce como contaminantes de preocupación emergente (CE). El diclofenaco, un antiinflamatorio, es uno de ellos.

Incluso las bajas concentraciones a las que se encuentra un compuesto en el agua son suficientes para alterar las interacciones ecológicas [1]. Se han observado como niveles traza de algunos CE provocan cambios en el comportamiento animal, alteraciones en comunidades microbianas y un aumento en la resistencia a los antibióticos. Además, existe el riesgo de que esos CE se acumulen en los tejidos de los seres vivos y pasen a la cadena trófica hasta llegar a nosotros.

Teniendo en cuenta esa problemática hemos desarrollado un método basado en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) acoplado a la generación *in situ* de nanopartículas de oro (AuNP), conocido como ELISA plasmónico, en un sistema en flujo automatizado. A modo de prueba esto se ha aplicado a la determinación ultrasensible de diclofenaco en agua de mar.

El ELISA implica el uso de un anticuerpo que reconoce de forma específica al diclofenaco [2] discriminando el resto de los compuestos presentes en la muestra. De este modo no es necesario un pretratamiento del agua de mar para eliminar interferentes facilitando y reduciendo el tiempo de ensayo y nos asegura que solo determinamos nuestro compuesto en muestras complejas.

Las AuNP tienen la característica de presentar un color u otro en función de su forma, tamaño y/o grado de agregación pasando de un color rosado hasta azul grisáceo (Fig.1).

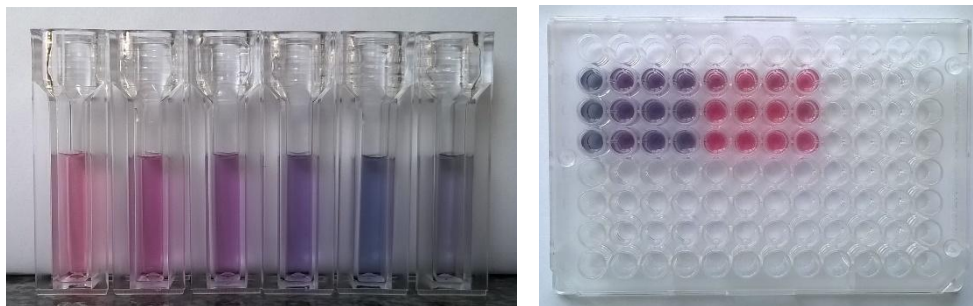


Figura 1. Variación del color de la disolución de las AuNP según tamaño. 1A. Gradiente de color de las AuNP en cubetas. 1B. Placa para ELISA constituida por 96 pocillos de 400  $\mu$ L cada uno lo que permite un gran número de ensayos a la vez y una fácil visualización.

Así, alterando sus propiedades físicas, podemos relacionar el color de las AuNP con la cantidad de diclofenaco en nuestra muestra por lo que con un simple vistazo y sin necesidad de ningún equipo ya podemos tener una idea de su concentración.

En este caso, cuanto menor es la concentración de diclofenaco en nuestra muestra de agua de mar, mayor será la cantidad de agua oxigenada producida a través de una serie de reacciones acontecidas durante el ELISA. Lo interesante es que cuanto más agua oxigenada más rosas serán nuestras AuNP generadas; por otro lado, cuanto más diclofenaco tengamos, menor agua oxigenada y más grises las AuNP.

El problema, sin embargo, de las AuNP es su sensibilidad a un gran número de condiciones experimentales, sobre todo durante su generación, lo que puede alterar el color y por tanto llevarnos a resultados erróneos. Para ello recurrimos a un sistema en flujo automatizado (Fig 2) donde se mide el color de las AuNP a tiempo real, evitando a su vez posibles interferencias del ELISA y reduciendo la intervención por parte del usuario. De este modo conseguimos mejorar la repetibilidad y precisión del método llegando a medir valores tan bajos de hasta 10 ng/L de diclofenaco en agua de mar sin necesidad de pretratamiento ni instrumentación cara.

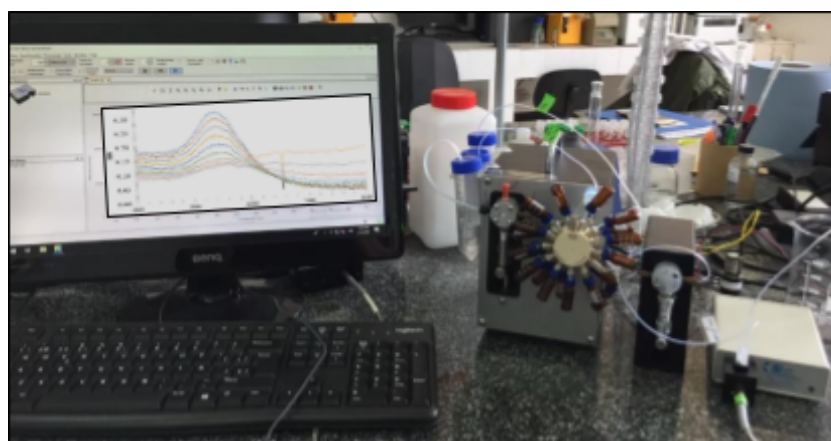


Figura 2. Sistema automático en flujo con 24 puertos para muestras y dos jeringas acoplado a un espectrofotómetro. Permite la determinación de diclofenaco usando la generación de *in situ* de AuNP posterior al ELISA.

## **Agradecimientos**

Manuel Miró, Miquel Oliver y David J. Cocovi-Solberg agradecen el apoyo económico del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España (MCIU) y de la Agencia Estatal de Investigación (AEI) a través de los Proyectos CTM2017-84763-C3-3-R (MCIU / AEI / FEDER, UE) y CTM2017-90890-REDT (MCIU / AEI / FEDER, UE). La asistencia técnica del Dr. de la Rica se aprecia enormemente. Se agradece el apoyo financiero del Fondo de Investigación de Tailandia (TRF), la Comisión de Educación Superior, la Facultad de Ciencias y la Universidad de Chiang Mai. El programa de doctorado Royal Golden Jubilee (RGJ) recibe un agradecimiento por la beca otorgada a N.Kaewwonglom (N.K.).

## **Referencias**

[1] I.B. Gomes, J.Y. Maillard, L.C. Simões, M. Simões, Emerging contaminants affect the microbiome of water systems-strategies for their mitigation. npj Clean Water 3 (2020) 39.

[2] M. Huebner, E. Weber, R. Niessner, S. Boujday, D. Knopp, Rapid analysis of diclofenac in freshwater and wastewater by a monoclonal antibody-based highly sensitive ELISA. Anal Bioanal Chem. 407(2015) 8873-82.