

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Química



Desarrollo de un inmunoensayo multianálisis, basado en anticuerpos monoclonales, para la determinación de plaguicidas N-metilcarbamatos en frutas y hortalizas.

TESIS

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta
MARÍA JOSÉ MORENO TAMARIT

Laboratorio Integrado de Bioingeniería



VALENCIA
2002

D. ÁNGEL MONTOYA BAIDES, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Electrónica y Director del Grupo de Inmunotecnología del Laboratorio Integrado de Bioingeniería de la Universidad Politécnica de Valencia, y

D. ANTONIO ABAD FUENTES, Investigador del Grupo de Inmunotecnología del Laboratorio Integrado de Bioingeniería de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **Desarrollo de un inmunoensayo multianalito, basado en anticuerpos monoclonales, para la determinación de plaguicidas N-metilcarbamatos en frutas y hortalizas**, ha sido realizada bajo su dirección, en el Laboratorio Integrado de Bioingeniería, por la Licenciada en Ciencias Químicas Dña. MARÍA JOSÉ MORENO TAMARIT.

Y para que conste a los efectos legales oportunos, se extiende la presente certificación en Valencia, a 27 de Mayo de 2002.

Fdo.:

Fdo.:

Ángel Montoya Baidés

Antonio Abad Fuentes

VºBº DE LA TUTORA DE LA TESIS

Rosa Puchades Pla

A Salva y a María

*“Aprender es como remar contra corriente:
en cuanto se deja, se retrocede”*

Benjamín Britten

*“El modo de dar una vez en el clavo es dar
cien veces en la herradura”*

Miguel de Unamuno

“La paciencia es amarga, pero sus frutos son dulces”

Jean Jacques Rousseau

AGRADECIMIENTOS

Al concluir este trabajo de investigación quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de una forma u otra han colaborado en la realización de esta tesis.

En primer lugar deseo mostrar mi agradecimiento a Ángel Montoya, responsable del Grupo de Inmunotecnología del Laboratorio Integrado de Bioingeniería y mi director de tesis. Siempre le estaré agradecida por la oportunidad que me dio y por estar cuando lo he necesitado. También quiero agradecer a Antonio Abad, codirector de tesis además de un excelente compañero de trabajo, la infinita paciencia y dedicación que ha tenido conmigo.

Gracias a Rosa Puchades por tutelar este trabajo.

A Juanjo, Carmen, Jovi, Tomás, M^a José y al resto de compañeros, que continúan o no realizando su trabajo en el LIB, por su ayuda y amistad.

A Manuel Adelantado por su asistencia técnica en el análisis espectral.

También quisiera mostrar mis más profundo agradecimiento a mi familia. A mis padres por su apoyo incondicional, aunque creo que no han acabado de entender para qué sirve todo esto, y a mis hermanos. Gracias a Salva por todo, por su ayuda y comprensión, por sus palabras de ánimo cuando las he necesitado, por ser como es. No quisiera olvidarme de María, mi mayor alegría y la causa por la que este trabajo estuvo un tiempo paralizado.

Finalmente quisiera dejar constancia de que este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una beca del Programa de Incentivo a la Investigación de la Universidad Politécnica de Valencia.

PRESENTACIÓN

El uso de los plaguicidas es necesario para combatir las plagas que afectan a las cosechas y satisfacer de esta manera la gran demanda de los productos agroalimentarios en nuestra sociedad. Sin embargo, el empleo masivo de los plaguicidas está provocando una amplia distribución de sus residuos en el entorno natural causando graves problemas. Como consecuencia, surge la necesidad de supervisar las concentraciones de residuos en muestras agroalimentarias y medioambientales. Para llevar a cabo esta tarea, continuamente se están proponiendo métodos de análisis y, aunque los más habituales son las técnicas cromatográficas, en los últimos años los inmunoensayos se han revelado como métodos altamente eficaces para el análisis de un gran número de muestras debido a su sencillez, sensibilidad y especificidad.

Una de las principales líneas de trabajo del Laboratorio Integrado de Bioingeniería (LIB) de la Universidad Politécnica de Valencia es, precisamente, el desarrollo de inmunoensayos tipo ELISA, basados en anticuerpos monoclonales, para el análisis de residuos de plaguicidas pertenecientes a distintas familias: organofosforados, organoclorados, *N*-metilcarbamatos y benzimidazoles. La especificidad inherente a los ELISAs, que puede resultar ventajosa en algunas ocasiones, dificulta sin embargo su aceptación como instrumento de análisis en los programas de control y seguimiento de residuos, en los cuales los métodos multiresiduo son los preferidos. Con el objetivo de promover una mayor aceptación de los inmunoensayos como métodos de rutina, el LIB ha emprendido recientemente el desarrollo de ELISAs multiresiduo para el análisis de plaguicidas. Es justamente en esta línea de trabajo en la que se enmarca la presente tesis: **el desarrollo de un inmunoensayo multianalito, basado en anticuerpos monoclonales, para la determinación de plaguicidas N-metilcarbamatos en frutas y hortalizas.**

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. PROBLEMÁTICA DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.	5
2. PLAGUICIDAS <i>N</i> -METILCARBAMATOS: CARBARYL, CARBOFURAN Y METHIOCARB.	8
2.1. Síntesis.	10
2.2. Toxicidad y metabolismo.	11
3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS	13
3.1. Métodos cromatográficos.	14
3.1.1. Aplicación de los métodos cromatográficos al análisis de <i>N</i> -metilcarbamatos.	15
3.2. Métodos inmunológicos.	16
3.2.1. Aplicación de los inmunoensayos al análisis de <i>N</i> -metilcarbamatos	18
3.2.2. Ventajas e inconvenientes de los inmunoensayos. . .	19
3.3. Desarrollo de la metodología inmunoquímica.	21
3.3.1. Preparación de inmunógenos.	22
3.3.2. Producción de anticuerpos.	24
3.3.2.1. Producción de anticuerpos monoclonales .	25
3.3.3. Diseño y optimización del inmunoensayo	28
3.3.3.1. Diseño del inmunoensayo	28
3.3.3.2. Optimización del inmunoensayo	35
3.3.4. Validación del inmunoensayo	35
4. APLICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS AL ANÁLISIS MULTIRRESIDUO.	37
5. OBJETIVOS DE LA TESIS.	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. REACTIVOS E INSTRUMENTOS.	45
2. SÍNTESIS DE LOS HAPTENOS DE METHIOCARB.	47
2.1. Síntesis de las series MXN*, MCN*, DPN*, MPN*, PN*. . .	47
2.2. Síntesis de la serie MXO*.	52

3. SÍNTESIS DE LOS HAPTENOS DE CARBOFURAN.	54
3.1. Síntesis de la serie BFN*Y BDNH.	54
3.2. Síntesis de BFOH Y BDOH.	56
4. PREPARACIÓN DE LOS CONJUGADOS PROTEICOS Y ENZIMÁTICOS.	58
4.1. Preparación de los conjugados de inmunización.	58
4.2. Preparación de los conjugados de tapizado.	58
4.3. Preparación de los conjugados enzimáticos.	59
5. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.	60
5.1. Inmunización de ratones.	60
5.2. Fusión celular.	60
5.3. Selección de hibridomas y clonación.	61
5.4. Purificación de anticuerpos monoclonales.	61
6. INMUNOENSAYOS.	63
6.1. Condiciones generales.	63
6.2. ELISA de conjugado inmovilizado (CI).	63
6.3. ELISA de anticuerpo inmovilizado (AI).	64
6.4. ELISA de anticuerpo inmovilizado indirectamente (AII)	64
7. OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO.	65
7.1. Efecto de las concentraciones de los inmunorreactivos.	65
7.2. Influencia de los factores externos.	65
7.3. Presencia de disolventes orgánicos.	66
8. ESTIMACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS.	67
8.1. Parámetros de la curva estándar.	67
8.2. Estudios de reactividad cruzada.	67
9. APLICACIÓN DE LOS ELISAs DE CARBARYL, CARBOFURAN Y MEHTIOCARB AL ANÁLISIS DE FRUTAS Y HORTALIZAS. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN Y VALIDACIÓN.	68
9.1. Fortificación y extracción de muestras.	68
9.2. Determinaciones por ELISA.	69
9.3. Determinaciones por HPLC.	69
10. DESARROLLO DEL ELISA MULTIANALITO.	71
11. APLICACIÓN DEL ENSAYO MULTIANALITO. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.	73

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	75
1. DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS PARA METHIOCARB. ...	77
1.1. Síntesis de haptenos.	77
1.2. Producción de anticuerpos frente a methiocarb.	79
1.2.1. Caracterización de los antisueros de ratón.	79
1.2.2. Producción de anticuerpos monoclonales.	80
1.3. Diseño de inmunoensayos para methiocarb.	80
1.3.1. Ensayos en el formato de conjugado inmovilizado. .	81
1.3.2. Ensayos en el formato de anticuerpo inmovilizado. .	84
1.4. Caracterización de los ensayos.	86
1.4.1. Optimización de las concentraciones de los inmunorreactivos.	87
1.4.2. Influencia de la fuerza iónica.	88
1.4.3. Influencia del pH.	89
1.4.4. Tolerancia de los inmunoensayos a los disolventes orgánicos	92
1.4.5. Estudio de la especificidad de los inmunoensayos .	93
1.4.6. Características de los ensayos optimizados.	95
2. DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS PARA CARBOFURAN. ...	97
2.1. Síntesis de haptenos.	97
2.2. Producción de anticuerpos frente a carbofuran.	98
2.3. Diseño de inmunoensayos para carbofuran.	99
2.3.1. Evaluación del formato de conjugado inmovilizado.	99
2.3.2. Evaluación del formato de anticuerpo inmovilizado.	102
2.3.3. Estudio de la especificidad de los inmunoensayos.	103
2.4. Caracterización de los ensayos.	106
2.4.1. Efecto de la fuerza iónica.	106
2.4.2. Efecto del pH.	107
2.4.3. Tolerancia de los inmunoensayos a los disolventes orgánicos.	110
2.4.4. Características de los ensayos optimizados.	111
3. APLICACIÓN DE LOS ELISAs DESARROLLADOS AL ANÁLISIS DE FRUTAS Y HORTALIZAS. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN Y VALIDACIÓN FRENTE A HPLC.	113
3.1. Estudios de recuperación.	114
3.1.1. Determinación de carbaryl.	115
3.1.2. Determinación de carbofuran.	115
3.1.3. Determinación de methiocarb.	116
3.2. Estudios de validación frente a HPLC.	120

4. DESARROLLO DEL ENSAYO MULTIANALITO.	124
4.1. Caracterización de diferentes anticuerpos monoclonales de methiocarb y carbaryl.	124
4.2. Ensayos no competitivos.	129
4.3. Ensayos competitivos.	136
4.4. Estudios de interferencias.	136
5. APLICACIÓN DEL ENSAYO MULTIANALITO. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.	139
5.1. Análisis de muestras de tampón fortificadas.	139
5.2. Análisis de muestras reales.	141

CONCLUSIONES.	143
---------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA.	147
---------------------------	------------

APÉNDICE I. Espectros de los compuestos sintetizados.	169
---	------------

1. ESPECTROS DE LOS HAPTENOS Y DE LOS CONJUGADOS HAPTÉNICOS DEL METHIOCARB.	171
MXNP.	171
MXNB.	174
MXNH.	177
DPNP.	180
DPNB.	182
DPNH.	184
MCNP.	187
MCNB.	190
MCNH.	192
MCNP.	195
MPNB.	197
MPNH.	199
PNP.	201
PNB.	203
PNH.	205
MXOA.	207
MXOB.	209
MXOH.	211
2. ESPECTROS DE LOS HAPTENOS Y DE LOS CONJUGADOS HAPTÉNICOS DEL CARBOFURAN.	213
BFNP.	213
BFNB.	216
BFNH.	219

BDNH.	221
BFOH.	223
BDOH.	225

APÉNDICE II. Publicaciones y desarrollos derivados de esta tesis.	227
---	------------

ABREVIATURAS.

1NA	ácido 1-naftoxiacético
1NAH	ácido N-(1-naftoil)-6-aminohexanoico
2NAH	ácido N-(2-naftoil)-6-aminohexanoico
AcM	anticuerpo monoclonal
AI	anticuerpo inmovilizado
A _{max}	absorbancia máxima
BDNH	ácido 6-[[2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-oxi]carbonil]-amino]hexanoico
BDOH	ácido 6-(2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-oxi)hexanoico
BFNB	ácido 4-[[2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi]carbonil]-amino]butanoico
BFNH	ácido 6-[[2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi]carbonil]-amino]hexanoico
BFNP	ácido 3-[[2,3-Dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi]carbonil]-amino]propanoico
BFOH	ácido 6-(2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi)hexanoico
BSA	seroalbúmina bovina
CI	conjugado inmovilizado
CL	cromatografía líquida
CNA	ácido 3-[[1-naftiloxi]carbonil]amino]propanoico
CNH	ácido 6-[[1-naftiloxi]carbonil]amino]hexanoico
CPNU	1-(5-carboxipentil)-3-(1-naftil)urea
CV	coeficiente de variación
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DPNB	ácido 4-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]butanoico
DPNH	ácido 6-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]hexanoico
DPNP	ácido 3-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]propanoico
ELISA	enzimoinmunoensayo en soporte sólido
F	tampón salino 100 mM fosfato sódico, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4
FB	tampón F con un 0.1 % de BSA y un 0.02 % de thimerosal
FT	tampón F con un 0.01 % de Tween y un 0.02 % de thimerosal
GC	cromatografía de gases
HAT	medio selectivo de cultivo con hipoxantina, aminopterina y timidina
HFCS	suplemento del medio de cultivo para la fusión y clonación de hibridomas
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	peroxidasa de rábano picante
HT	medio HAT sin aminopterina

I ₅₀	concentración de analito en el inmunoensayo que reduce la señal al 50% del valor de la asíntota máxima
I ₉₀	concentración de analito en el inmunoensayo que reduce la señal al 90% del valor de la asíntota máxima
IA	inmunoensayo
LMR	límite máximo de residuos
LOD	límite de detección del inmunoensayo
MCNB	ácido 4-[[1-(4-(metiltio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]butanoico
MCNH	ácido 6-[[1-(4-(metiltio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]hexanoico
MCNP	ácido 3-[[1-(4-(metiltio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]propanoico
MPNB	ácido 4-[[1-(4-(metiltio)feniloxi)carbonil]amino]butanoico
MPNH	ácido 6-[[1-(4-(metiltio)feniloxi)carbonil]amino]hexanoico
MPNP	ácido 3-[[1-(4-(metiltio)feniloxi)carbonil]amino]propanoico
MXNH	ácido 6-[[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)carbonil]amino]hexanoico
MXNP	ácido 3-[[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)carbonil]amino]propanoico
MXNB	ácido 4-[[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)carbonil]amino]butanoico
MXOA	ácido 2-[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)]acético
MXOB	ácido 4-[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)]butanoico
MXOH	ácido 6-[1-(4-(metiltio)-3,5-xililoxi)]hexanoico
OPA	o-ftaldialdehído
OPD	o-fenilendiamina
OVA	ovoalbúmina
PBS	tampón fosfato salino, 10 mM fosfato sódico, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4
PBS-B	tampón PBS con un 0.1% de BSA
PBS-T	tampón PBS con un 0.05% de tween 20
PEG	polietilenglicol
PNB	ácido 4-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]butanoico
PNH	ácido 6-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]hexanoico
PNP	ácido 3-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]propanoico
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
RM	relación molar
RMN	resonancia magnética nuclear
UV	ultravioleta

PARTE I:
INTRODUCCIÓN.

1. PROBLEMÁTICA DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.

Los plaguicidas son sustancias que se emplean para combatir los parásitos de los cultivos, del ganado, de los animales domésticos, y del hombre y su ambiente (Primo y Carrasco, 1990). Se pueden clasificar, en función de la plaga a la que van dirigidos, en: insecticidas, acaricidas, fungicidas, antibióticos, rodenticidas y herbicidas; y también se pueden clasificar, atendiendo al grupo químico que los caracteriza, en: organofosforados, organoclorados, carbamatos, piretroides, etc.

El uso de plaguicidas no es reciente. A principios del siglo XIX el empleo de compuestos inorgánicos con acción plaguicida como el azufre, las sales de cobre y compuestos fluorados o arsenicales estaba ampliamente extendido, e incluso hay constancia de que ya eran utilizados por las primeras civilizaciones para combatir algunas plagas y poder obtener un mayor rendimiento en los cultivos (Baker *et al.*, 1987; Hayes, 1991). Sin embargo, no es hasta mediados del siglo XX, con el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT, cuando se produce una verdadera revolución en el mundo de la agricultura. Gracias a este hecho, empiezan a sucederse con rapidez los descubrimientos de nuevos plaguicidas orgánicos que sucesivamente van sustituyendo a los inorgánicos por ser más activos, y se desarrollan las bases científicas de investigaciones posteriores.

Según se relaciona en *The Pesticide Manual* (Tomlin, 1997), actualmente existen alrededor de 700 plaguicidas o principios activos disponibles, que son principalmente utilizados en agricultura (68%), en actividades industriales y comerciales (17%), y en aplicaciones domésticas (8%) y gubernamentales (7%) (Cantoni y Comi, 1997). Hoy en día se buscan nuevos métodos de lucha que sean más naturales y selectivos, tales como los métodos biológicos, aunque todavía están lejos de reemplazar a los plaguicidas químicos (Primo, 1991).

En la actualidad, una de las prioridades en el mundo y especialmente en los países en vías de desarrollo es cubrir las necesidades alimentarias de una población que va en aumento. En este sentido, el tratamiento de los cultivos y de las cosechas con plaguicidas garantiza la satisfacción de estos requerimientos de alimentos al aumentar la producción y controlar las pérdidas que se producen durante su almacenamiento. Por otra parte, es incuestionable el beneficio que aportan los plaguicidas al prevenir las enfermedades infecciosas transmitidas por los insectos tanto al hombre como a los animales. Sin embargo, los plaguicidas son por definición biocidas y su uso abusivo (se estima que cada año se emplean 2.5 millones de toneladas, según publicó Van der Werf en 1996) está

ocasionando serios problemas en el medio ambiente, al desequilibrar los sistemas ecológicos, y también en el hombre, siendo los residuos que quedan en los alimentos el riesgo más importante para su salud. No obstante, las prohibiciones y las limitaciones impuestas por los gobiernos de algunos países desarrollados han reducido el número y la concentración de residuos detectados en alimentos en el periodo comprendido entre 1960 y 1996 (Cantoni y Comi, 1997).

Por todo lo expuesto es importante definir claramente el concepto de residuo de plaguicida. El Codex Alimentarius (FAO/OMS) entiende por **residuo de plaguicida** toda sustancia presente en un producto alimentario destinado al hombre o a los animales como consecuencia de la utilización de un plaguicida. Este concepto de residuo engloba no sólo los restos de la molécula de plaguicida en su forma original, sino también todos sus productos de degradación y otros constituyentes de la formulación, así como sus metabolitos, que puedan presentar toxicidad propia. Ahora bien, debemos distinguir entre la definición técnica, que suele coincidir con la que se ha enunciado, aunque existan divergencias de matiz entre las legislaciones de distintos países, y lo que en la práctica se considera legalmente como residuo de cada uno de los plaguicidas que, en la mayor parte de los casos, son únicamente los restos de la molécula original y sólo en algunos plaguicidas son estos restos más algunos metabolitos. (Coscollá, 1993a)

Como consecuencia de la peligrosidad que puedan presentar sus residuos, el uso de plaguicidas y su concentración máxima aceptable en alimentos deben ser regulados. Por este motivo, las autoridades de la mayor parte de los países han establecido normas con el fin de proteger la salud de los consumidores, incluyendo unos límites máximos de residuos de plaguicidas o tolerancias en los alimentos tratados con ellos. El límite máximo para residuos, **LMR**, se define como la concentración máxima de un residuo de plaguicida que se permite o reconoce legalmente como aceptable en o sobre un alimento, producto agrícola o alimento para animales. No obstante, se trata de un concepto legal, por lo que los LMR no son necesariamente indicativos de la toxicidad del producto. La concentración se expresa normalmente en miligramos de residuo de plaguicida por kilogramo de producto, o lo que es lo mismo, en partes por millón (ppm). Para la determinación de los LMRs, aunque hay diferentes procedimientos y cada país es libre de actuar a su manera, se consideran dos criterios básicos: uno toxicológico (la ingestión diaria de residuos de plaguicidas ha de ser tal que se tenga la seguridad de que no provocará efectos nocivos) y otro agronómico (el plaguicida ha de lograr una eficacia adecuada sobre la plaga a combatir con la menor utilización posible). El hecho de que cada país pueda actuar con libertad para fijar los límites que crea conveniente, da lugar a notables discrepancias. Por ello, en el ámbito de la UE (Unión Europea) ya se está intentando armonizar algunos LMRs, como los que se incluyen en la Directiva 93/58/CEE. Esta tarea está resultando muy difícil, dada la gran diversidad de opiniones e intereses de los países que integran la Unión. La cuestión se complica mucho más si se

piensa en unificar criterios en todo el mundo. No obstante, las organizaciones FAO (*Food and Agriculture Organization*) y WHO (*World Health Organization*) recomiendan periódicamente una lista de LMRs, que se utiliza como punto de partida por parte de muchos países (Coscollá, 1993b).

Los primeros intentos armonizadores en la UE arrancan de las Directivas del Consejo 76/895/CEE para residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas, y de la Directiva 86/362/CCE en materia de residuos de plaguicidas en cereales. En 1990, la Directiva 90/642/CEE establece un nuevo marco legal para la fijación de LMRs comunitarios y para el control de los residuos de plaguicidas mediante planes anuales que deben establecer los países miembros (Brotons, 1995). En algunos casos, para los plaguicidas de alta toxicidad se aplica la tolerancia cero, es decir, estos compuestos no se deben encontrar en cantidad alguna para un cierto alimento. La Directiva 80/778/CCE sobre aguas de bebida considera que la máxima concentración permisible en aguas será de 0.1 : g/l para cada plaguicida considerado individualmente y 0.5 : g/l para el total de plaguicidas (Coscollá, 1993b). Sin embargo, la WHO recomienda concentraciones máximas permisibles individualizadas y diferenciadas para distintos plaguicidas según su toxicidad.

2. PLAGUICIDAS N-METILCARBAMATOS: CARBARYL, CARBOFURAN Y METHIOCARB.

Los *N*-metilcarbamatos pertenecen a una familia más amplia de plaguicidas, los carbamatos. Se empezaron a sintetizar a partir de 1957, año en que se dieron a conocer las propiedades insecticidas del carbaryl (Haynes *et al.*, 1957). Estas propiedades están basadas en su capacidad para inhibir la enzima acetilcolinesterasa, que a su vez está implicada en la transmisión del impulso nervioso. Los plaguicidas *N*-metilcarbamatos suman aproximadamente una veintena, según aparece en la edición de *The Pesticide Manual* (Tomlin, 1997) y su estructura general se representa en la figura 1.1. Los sustituyentes sobre el anillo fenólico dan lugar a compuestos de diferentes características, afectando de esta forma la capacidad para formar un complejo con la acetilcolinesterasa. La presencia del grupo metilo unido al átomo de nitrógeno es también determinante, puesto que su sustitución por un grupo alquílico de cadena más larga provoca una disminución de la actividad insecticida de estos compuestos.

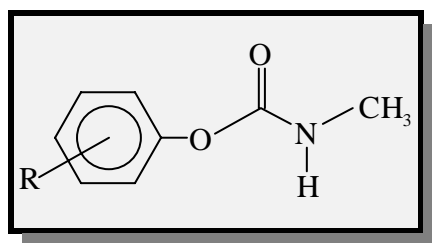


Figura 1.1. Estructura general de los *N*-metilcarbamatos.

Tres de los plaguicidas *N*-metilcarbamatos más utilizados y que con mayor frecuencia aparecen en el análisis de productos hortofrutícolas son el **carbaryl**, el **carbofuran** y el **methiocarb**, cuyas estructuras se muestran en la figura 1.2. Las principales características y propiedades físico-químicas de estos insecticidas se describen a continuación (Baron, 1991; Tomlin, 1997):

El **carbaryl** (1-naftil *N*-metilcarbamato), también denominado sevín, empezó a utilizarse en 1958 como insecticida de contacto y acción estomacal. Se usa en el control de lepidópteros, coleópteros y otros insectos sobre más de 120 cultivos diferentes. También actúa como regulador del crecimiento en las plantas. Es un sólido con un peso molecular de 201.20, de suave olor fenólico y ligeramente coloreado. Tiene un punto de fusión de 142°C y una presión de vapor de 0.041 mPa a 23.5°C. Su solubilidad en agua

es 120 mg/l a 20°C. Es moderadamente soluble en disolventes orgánicos polares como la DMF (*N,N*-dimetilformamida), el dimetilsulfóxido y la acetona, y poco soluble en hexano, benceno y metanol. El carbaryl es estable en condiciones normales, pero en medio básico se hidroliza rápidamente a 1-naftol.

El **carbofuran** (2,3-dihidro-2,2dimetil-7-benzofuranil *N*-metilcarbamato), más comúnmente comercializado con el nombre Furadan, fue desarrollado en la década de los 60 e introducido en 1967 como un insecticida de amplio espectro, sistémico y de contacto. Es ampliamente utilizado como insecticida de suelo, donde ha reemplazado a los ciclodienos para el control de coleópteros y otras plagas. Se usa también con aplicación foliar, sobre una gran variedad de cultivos agrícolas. En estado puro es un sólido blanco cristalino sin olor, de peso molecular 221.3. Tiene un punto de fusión de 154°C y una presión de vapor de 0.031 mPa a 20 °C. La solubilidad del carbofuran en agua es 320 mg/l a 20 °C, en diclorometano es mayor que 200 mg/l, en isopropanol entre 20 y 50 mg/l y en tolueno entre 10 y 20 mg/l. El carbofuran es inestable en medio alcalino y se degrada por encima de 130°C.

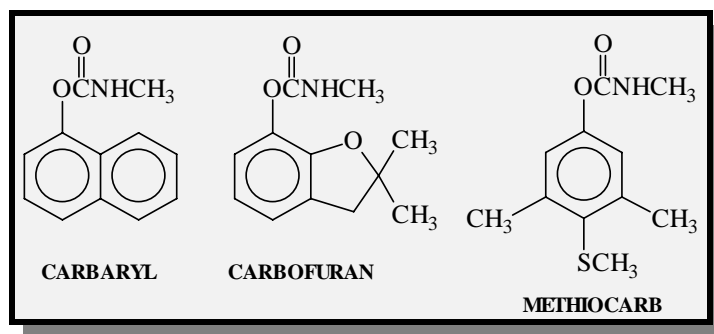


Figura 1.2. Estructuras de los *N*-metilcarbamatos carbaryl, carbofuran y methiocarb.

El **methiocarb** (4-metiltio-3,5-xilil *N*-metilcarbamato), conocido también como mesurol, empezó a usarse en la década de los 60 como un insecticida no sistémico y acaricida de contacto y acción estomacal. Igualmente, el methiocarb es un molusquicida con acción neurotóxica. También actúa como repelente de pájaros sobre arándanos, cerezas y uva. Tiene un peso molecular de 225.33. Forma polvos blancos cristalinos de suave olor. El punto de fusión es 119°C, y la presión de vapor es 0.015 mPa a 20°C. La solubilidad del methiocarb en agua es 27 mg/l a 20°C, en diclorometano es mayor que 200 mg/l, en isopropanol entre 50 y 100 mg/l, en tolueno entre 20 y 50 mg/l y en hexano entre 1 y 2 mg/l. Como todos los carbamatos, es inestable en medio alcalino.

2.1. SÍNTESIS.

La síntesis industrial de los *N*-metilcarbamatos tiene lugar por uno de los procedimientos que aparecen esquematizados en la figura 1.3. La forma más habitual de obtenerlos es mediante el procedimiento **b**, utilizando isocianato de metilo que se transforma en carbamato por condensación con un alcohol o un fenol, con rendimientos muy elevados. Sin embargo, el isocianato de metilo es un reactivo altamente peligroso y está implicado en uno de los mayores desastres industriales de la historia: como consecuencia del escape de 40 toneladas de isocianato de metilo de una planta de Unión Carbide dedicada a la producción de carbaryl en Bhopal (India), más de 3000 personas murieron de edema pulmonar en los tres días siguientes al accidente (Varma y Guest, 1993). El procedimiento alternativo **a** ha tenido, como más adelante se verá, una gran importancia en la síntesis de las moléculas implicadas en el desarrollo de este trabajo.

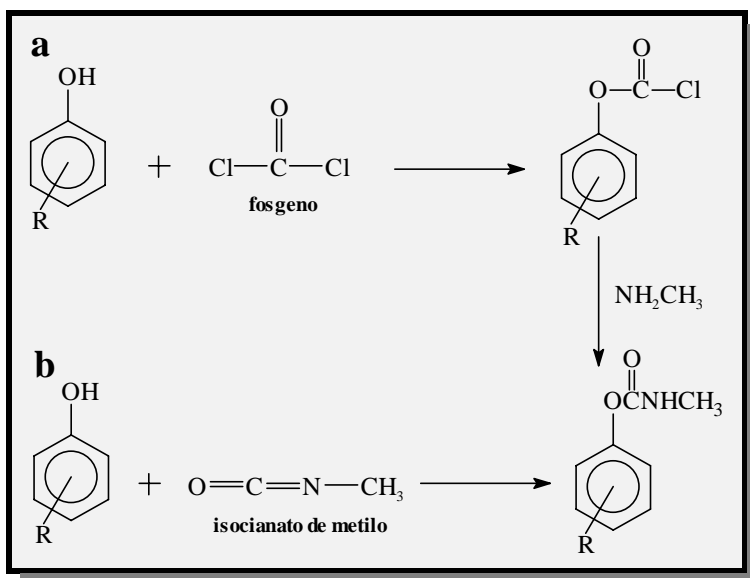


Figura 1.3. Representación esquemática de los dos procedimientos más utilizados en la síntesis industrial de los *N*-metilcarbamatos.

2.2. TOXICIDAD Y METABOLISMO.

Los insecticidas carbamatos son, después de los organofosforados, los más utilizados. En este sentido, un estudio realizado en España entre 1991 y 1996 demuestra que el 33% de las intoxicaciones producidas por plaguicidas fueron debidas a carbamatos y el 40% a organofosforados (García-Repetto *et al.*, 1998). La principal causa de toxicidad de los carbamatos en mamíferos, insectos y nematodos, está basada en la inhibición de la acetilcolinesterasa, que es la enzima responsable de la hidrólisis de la acetilcolina en colina y ácido acético. Los carbamatos tienen un nitrógeno cuaternario a una distancia adecuada del carbonilo, de tal forma que pueden reaccionar con el sitio aniónico de la enzima produciéndose la carbamilación de ésta. La acetilcolina, al no ser hidrolizada, se acumula en la sinapsis nerviosa, la placa motora y el sistema nervioso, provocando efectos parecidos a los causados por la exposición a los insecticidas organofosforados. Ambas familias de insecticidas causan envenenamiento sistémico con mayor frecuencia que otras clases de plaguicidas. Aunque tengan efectos parecidos, los debidos a los carbamatos tienen una duración más corta porque el complejo formado entre el carbamato y la enzima se descompone fácilmente. Así por ejemplo, mientras algunos pacientes envenenados con organofosforados pueden tener síntomas durante 1 o 2 semanas, muchos pacientes intoxicados con carbamatos se recuperan en 24 horas (O'Malley, 1997). Los casos más graves de intoxicación producida por carbamatos pueden desembocar en una complicación cardíaca (Saadeh *et al.*, 1997).

Además de los efectos sobre la acetilcolinesterasa, los carbamatos también pueden provocar disfunción del sistema reproductivo y endocrino, al afectar a las concentraciones en sangre de las hormonas implicadas en el metabolismo y en la reproducción (Baron, 1991; Rawlings *et al.*, 1998). Por otra parte, los *N*-metilcarbamatos no son mutagénicos, pero podrían influir en la proliferación celular de muchos procesos cancerosos. Sin embargo, los estudios realizados con los derivados *N*-nitroso de algunos carbamatos indican que éstos resultan ser potentes agentes mutagénicos y cancerígenos. Estos metabolitos se forman por nitración de los carbamatos en el ambiente o bajo las condiciones de temperatura y acidez que se dan en el estómago, aunque se ha demostrado que para que se dé esta transformación en humanos es necesario ingerir cantidades elevadas de nitrito y de precursor (Baron, 1991; Wang *et al.*, 1998 a, b).

En general, la relativamente baja toxicidad en mamíferos y la poca persistencia en el medio ambiente han propiciado que su uso esté muy extendido en la agricultura. La poca repercusión de los plaguicidas *N*-metilcarbamatos en el medio ambiente y los seres vivos se debe a los procesos de transformación que ocurren tras su aplicación como consecuencia de la actuación de diferentes agentes físicos, químicos o biológicos. Así, la degradación de los *N*-metilcarbamatos en el agua, producida en su mayor parte por la luz,

da como productos mayoritarios los correspondientes fenoles (Chiron *et al.*, 1996; Climent y Miranda, 1996). En muchas ocasiones, los ácidos húmicos presentes en el agua favorecen la degradación de estos plaguicidas (De Bertrand y Barceló, 1991; Chiron *et al.*, 1996; Galadi y Julliard, 1996), aunque en algunos casos puedan inhibirla (Bachman y Patterson, 1999). También los organismos vivos son capaces de transformarlos utilizando sus sistemas biológicos. Por ejemplo, en los animales superiores, la rápida degradación de los *N*-metilcarbamatos es debida a reacciones de hidrólisis, oxidación y conjugación, que dan como resultado productos más solubles y fácilmente excretables (Baron, 1991; Machemer y Pickel, 1994). En las plantas y los insectos el metabolismo es similar al de los vertebrados (Metcalf *et al.*, 1968). Por último, la degradación de estos plaguicidas en el suelo es posible gracias a la acción de los microorganismos que habitan en él. Se han descrito diferentes cepas de *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* entre otras, capaces de transformar los insecticidas *N*-metilcarbamatos mediante la hidrólisis del enlace carbamato (Chapalamadugu y Chaudhry, 1991; Behki *et al.*, 1994; Pareck *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1997). Sin embargo, son pocos los artículos publicados sobre la purificación y caracterización de las enzimas responsables (Mulbry y Eaton, 1991).

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.

La mayoría de los análisis de plaguicidas, antes de la aplicación de los métodos cromatográficos, se realizaban mediante espectrofotometría UV-visible o infrarroja, métodos biológicos tales como las técnicas bioquímicas de inhibición enzimática, o bioensayos. Estas técnicas se caracterizaban por presentar baja sensibilidad y poca selectividad. Fue a partir de los años 60 cuando la aplicación de la cromatografía de gases (GC) revolucionó el análisis de los plaguicidas. Con el tiempo se han ido mejorando las columnas, que han aumentado su poder de resolución permitiendo la separación de un gran número de plaguicidas con propiedades físico-químicas similares, así como los detectores. Actualmente es la técnica más utilizada, aunque la aparición de nuevos plaguicidas más volátiles, polares y termolábiles, tales como los *N*-metilcarbamatos y las fenilureas, difíciles de analizar por GC, impulsó a finales de los años 70 la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) al análisis de plaguicidas.

Las investigaciones realizadas por Ercegovich (1971) y por Hammock y Mumma (1980) acerca del uso de los inmunoensayos en la agricultura y en el ámbito medioambiental, pusieron de manifiesto las posibilidades que podían ofrecer los inmunoensayos en la determinación de plaguicidas. A partir de este momento, la cantidad de inmunoensayos para plaguicidas y/o sus derivados que se han desarrollado y validado ha ido en aumento, lo que demuestra la consolidación creciente de esta metodología sobre todo en el análisis semicuantitativo o en aquellos casos en los que las técnicas convencionales presentan muchas dificultades (Vanderlaan *et al.*, 1990; Meulenberg, 1997).

Tanto las técnicas cromatográficas como las bioquímicas se están mejorando continuamente para satisfacer los requerimientos analíticos, cada vez mayores. En este sentido, los continuos avances en el campo de la bioquímica y su combinación con la tecnología electrónica han posibilitado, por ejemplo, el desarrollo de los biosensores. Esta nueva técnica consiste en la inmovilización de biomoléculas en diferentes transductores electrónicos u optoelectrónicos, para detectar el analito a través de sus interacciones específicas. Generalmente los biosensores aplicados al análisis de plaguicidas están basados en la inhibición enzimática combinada con una variedad de transductores entre los que podemos citar los fototérmicos, los espectrofotométricos, los amperométricos y los piezoeléctricos, entre otros (Abad *et al.*, 1998; Noguera *et al.*, 1999; Pogacnik y Franko, 1999). Aunque normalmente se utilice la enzima acetilcolinesterasa en el análisis de plaguicidas, como en el caso de los insecticidas organofosforados y carbamatos,

también se pueden utilizar otras, por ejemplo la aldehído-deshidrogenasa, como ocurre en el análisis de los fungicidas ditiocarbamatos (Noguer *et al.*, 1999). Los biosensores enzimáticos pueden ser más simples, rápidos y económicos que los métodos cromatográficos. La detección también puede ser bastante selectiva y puede llevarse a cabo sin la necesidad de utilizar instrumentación cara (Abad *et al.*, 1998). Las investigaciones también van encaminadas hacia la obtención de métodos de análisis que combinen las ventajas asociadas con la metodología cromatográfica, inmunoquímica y/o de biosensores, tales como el inmunoanálisis de inyección de flujo (Krämer y Schmid, 1991; Wittman y Schmid, 1994; Dietrich y Krämer, 1995; González-Martínez *et al.*, 1997; González-Martínez *et al.*, 1999) y las columnas de inmunoafinidad, que a su vez pueden ser acopladas a otros métodos analíticos como la GC, la HPLC, la electroforesis capilar o el ELISA (Marx *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1996; Rollag *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 1997; Spinks *et al.*, 1999; Hage, 1999; Bou *et al.*, 2001). Las ventajas que aportan estos tipos de ensayos son la rapidez, la precisión, y la fácil automatización.

3.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

Los métodos más habituales utilizados en el análisis de plaguicidas son la GC y en menor medida la HPLC. Ambos métodos, tanto si son unirresiduo como multirresiduo, constan de una serie de etapas básicas que permiten analizar, cuantificar y confirmar la presencia de residuos de plaguicidas en diferentes matrices:

Extracción. Consiste en extraer el analito de la matriz.

Purificación. En esta etapa se intenta eliminar en lo posible los compuestos co-extraídos, utilizando un disolvente orgánico y/o una columna empaquetada con sílica, florisil o alúmina.

Análisis instrumental. Consiste en separar los analitos entre sí.

Detección. Permite obtener una señal relacionada con la cantidad de analito.

La detección es posible gracias a una variedad de detectores específicos de GC, tales como el de ionización de llama, el termoiónico o el de captura de electrones, y de LC, entre los que podemos citar el sistema de detección por matriz de diodos, el ultravioleta, el de fluorescencia o el electroquímico. Sin embargo, el detector más valorado es el espectrómetro de masas (MS) que puede ser acoplado tanto a GC como a LC (Slobodník *et al.*, 1997a). Desafortunadamente muchos de estos detectores no proporcionan suficiente sensibilidad. Para paliar este problema, se han ido introduciendo

numerosas mejoras en las etapas de extracción y purificación que aportan al análisis cromatográfico una serie de ventajas, como la disminución del uso de disolvente, el aumento de la selectividad en la extracción, y la posibilidad de un análisis rápido y automatizado (Torres *et al.*, 1996). A pesar de estas mejoras, el análisis solamente puede ser realizado en laboratorios centralizados muy bien equipados, dada la complejidad de la instrumentación necesaria. Esta inversión en equipamientos repercute en el coste del análisis que, evidentemente, aumenta. En general, sería deseable que las técnicas de análisis no fueran muy laboriosas y permitieran el análisis de un elevado número de muestras en poco tiempo, por lo cual es necesario continuar progresando en el desarrollo de nuevas tecnologías que complementen las instrumentales.

3.1.1. Aplicación de los métodos cromatográficos al análisis de *N*-metilcarbamatos.

Los *N*-metilcarbamatos, debido a su inestabilidad térmica, se descomponen en sus fenoles cuando son analizados por GC (Liska y Slobodník, 1996). Aunque estos problemas se pueden evitar variando las condiciones de operación (Mueller y Stan, 1990) o utilizando técnicas de derivatización desarrolladas para los carbamatos durante las décadas de los 60 y 70 (Greenhalgh *et al.*, 1976; Maitlen, 1981; Miller *et al.*, 1985; Ballesteros *et al.*, 1993; Färber y Schöler, 1993; Bakowski *et al.*, 1994), generalmente la determinación de los *N*-metilcarbamatos es llevada a cabo por LC con detección UV (Cabras *et al.*, 1996; Minelli, 1997; Menezes y Fèlix, 1998; Nunes *et al.*, 1998 a; Primus *et al.*, 1998), fluorescente (Primus *et al.*, 1998), electroquímica (Díaz *et al.*, 1996), o utilizando un sistema MS con diferentes interfases (Slobodník *et al.*, 1997b; García-Blazquez *et al.*, 1998; Salau *et al.*, 1998). Aunque la absorbancia en el UV sea el método de detección más utilizado, gracias a su facilidad de aplicación y combinación con muchos sistemas de HPLC, es poco sensible para algunos analitos y produce interferencias debidas a la co-extracción de compuestos no deseables de la muestra. Desde este punto de vista, la detección fluorescente, con la transformación previa de los plaguicidas no fluorescentes mediante reacciones de derivatización, supone una buena alternativa a la detección UV porque ofrece un aumento de la selectividad y de la sensibilidad de un orden de magnitud o más (McGarvey, 1993; Primus *et al.*, 1998). A este respecto, se han publicado diferentes métodos de análisis de plaguicidas basados en HPLC, que emplean reacciones de derivatización tanto pre-columna como, sobre todo, post-columna (McGarvey, 1994).

La primera HPLC basada en una hidrólisis post-columna con derivatización y detección fluorescente, fue desarrollada por Moye y colaboradores en 1977. El método fue posteriormente optimizado y validado en productos agrícolas (Krause 1985a,b). Desde entonces, el método se ha ido modificando (De Kok y Hiemstra, 1992; De Kok *et*

al., 1992; Hiemstra y De Kok, 1994) y, con muy ligeras variaciones, constituye el procedimiento actual para la determinación de *N*-metilcarbamatos por HPLC, conocido como método EPA 531.1, tanto en agua (Hiemstra y De Kok, 1994), como en frutas y verduras (Tsumura *et al.*, 1994; Sojo, 1997).

3.2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.

Un inmunoensayo (IA) es un método de análisis basado en la interacción específica de un anticuerpo con un antígeno. Esta interacción no es covalente, sino que incluye enlaces de hidrógeno, iónicos, hidrofóbicos y de van der Waals. La ocupación de los sitios de unión del anticuerpo está relacionada con la concentración de analito en el medio. Como esta unión en sí misma no produce una señal detectable, se suele emplear una marca, generalmente un radioisótopo o una enzima. En una reciente revisión (Hage, 1999), aparece una clasificación de los diferentes tipos de inmunoensayos en base al tipo de marca que se ha utilizado, discutiéndose los últimos avances que se han logrado en cada uno de ellos. Todos los IAs para plaguicidas tienen en común tres componentes: un anticuerpo específico, un hapteno conjugado a una proteína y el analito. El elemento clave en un IA es el anticuerpo, ya que las características analíticas del inmunoensayo vendrán determinadas, en gran medida, por la calidad del anticuerpo utilizado.

Los anticuerpos, llamados también inmunoglobulinas, son glicoproteínas del suero producidas por los linfocitos B, normalmente con ayuda de las células T, como parte de la respuesta del sistema inmunológico a la presencia de sustancias extrañas de alto peso molecular. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. La inmunoglobulina predominante en el suero es la IgG, con un peso molecular de 160.000 daltons. Se ha demostrado que todas las inmunoglobulinas tienen una estructura característica en forma de Y (figura 1.4). Esta estructura consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos ligeras y dos pesadas, unidas entre sí por puentes disulfuro. Los dos brazos del anticuerpo son idénticos y están implicados en la unión del antígeno, por lo que son conocidos como fragmentos Fab (*Fragment antigen binding*). Por otra parte, se ha visto que el tallo del anticuerpo puede cristalizar y por eso se le ha dado el nombre de fragmento Fc (*Fragment crystallizable*). Las secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal tanto de la cadena ligera, VL, como de la pesada, VH, muestran un grado excepcional de variabilidad y constituyen la porción más pequeña del anticuerpo necesaria para la unión con el antígeno. Sin embargo, la región C-terminal es constante y característica de cada especie y tipo de inmunoglobulina.

El primer inmunoensayo cuantitativo fue publicado en 1959 por Yalow y Berson, que analizaron insulina humana en muestras de sangre a concentraciones de picogramos usando un radioinmunoensayo (RIA). A pesar de la peligrosidad del uso de materiales radiactivos, que exigía un equipamiento adecuado, el desarrollo de los

radioinmunoensayos abrió la posibilidad de que la reacción antígeno-anticuerpo pudiera ser utilizada como base para el desarrollo de nuevos métodos analíticos; únicamente era necesario encontrar otro tipo de marcaje. La intensa búsqueda culminó a mediados de la década de los 60, cuando se demostró que tanto los anticuerpos como los antígenos podían ser acoplados a enzimas (Avrameas y Uriel, 1966; Nakane y Pierce, 1996). Asimismo, la observación de que estos inmunorreactivos podían ser inmovilizados sobre un soporte sólido (Engvall y Perlmann, 1971; Van Weemen y Schuurs, 1971), hizo posible el desarrollo de una nueva técnica conocida como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

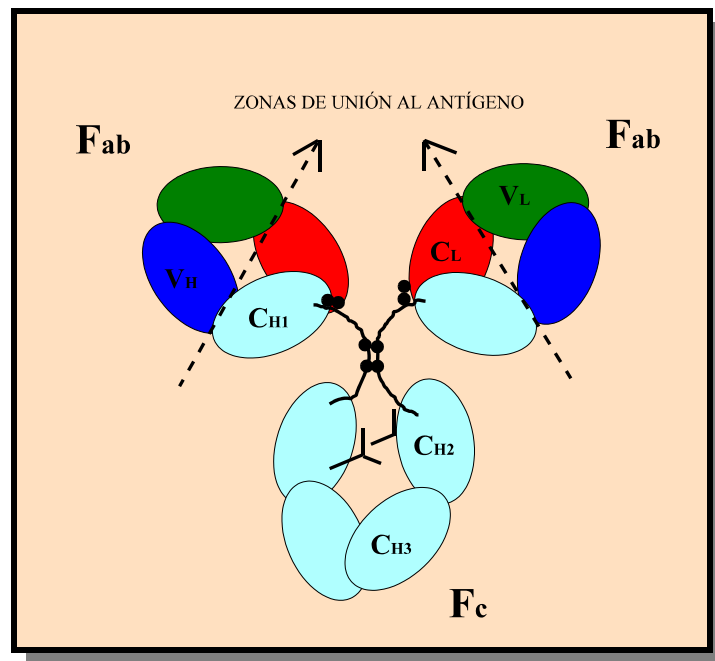


Figura 1.4. Estructura general de un anticuerpo. Fab, fragmento de unión al antígeno. Fc, fragmento cristalizable. V_H, secuencia variable de la cadena pesada. V_L, secuencia variable de la cadena ligera. C_L, región constante de la cadena ligera. C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, dominios constantes de la cadena pesada.

Todos los inmunoensayos desarrollados hasta ese momento tuvieron gran importancia como método de análisis de macromoléculas y pequeñas moléculas orgánicas en el campo de la medicina. Aunque el DDT y el malathion fueron los primeros plaguicidas para los que se obtuvieron anticuerpos (Haas y Guardia, 1968; Centeno *et al.*, 1970), no fue hasta 1975 cuando Langone y Van Vunakis desarrollaron el primer inmunoensayo aplicado a la determinación de plaguicidas, concretamente para el aldrín

y el dieldrín. A este radioinmunoensayo siguieron otros para el piretroide S-bioallethin (Wing *et al.*, 1978), el paraquat (Fatori y Hunter, 1980), los ácidos 2,4-diclorofenoxiacético y 2,4,5-triclorofenoxiacético (Rinder y Fleeker, 1981), el benomyl (Newsome y Shields, 1981) y el parathion (Ercegovich *et al.*, 1981). No obstante, fueron las investigaciones llevadas a cabo por el grupo del Dr. Hammock las que sentaron las bases del desarrollo de inmunoensayos enzimáticos para plaguicidas. Los primeros ELISAs aplicados a la determinación de un plaguicida fueron desarrollados para el diflobenzuron y el paraoxon (Wie y Hammock, 1982; Hunter y Lenz, 1982). En los años siguientes, el número de ELISAs creció de forma espectacular, como demuestran algunas de las revisiones publicadas en los últimos años (Niessner, 1993; Meulenberg *et al.*, 1995; Hennion y Barceló, 1998). Actualmente la comunidad científica y las agencias reguladoras empiezan a reconocer el gran potencial que pueden ofrecer los inmunoensayos en el ámbito medioambiental. De hecho, la EPA (*Environmental Protection Agency*), está trabajando con otras agencias gubernamentales en EEUU para evaluar algunos inmunoensayos desarrollados y de esta forma incorporarlos como métodos oficiales (<http://www.epa.gov/ORD/SITE>).

3.2.1. Aplicación de los inmunoensayos al análisis de N-metilcarbamatos.

El carbaryl y el carbofuran son los dos N-metilcarbamatos para los que más IAs se han descrito. Con respecto al carbaryl, el primer IA descrito es de tipo ELISA y está basado en anticuerpos policlonales (Marco *et al.*, 1993). El mismo grupo desarrolló un ELISA para la determinación de 1-naftol, el principal metabolito del carbaryl (Krämer *et al.*, 1994). Estudios posteriores demostraron la aplicabilidad de estos IAs en el análisis de muestras de agua (Marco *et al.*, 1995). Asimismo, el ELISA para carbaryl fue utilizado en el análisis de extractos de frutas y vegetales (Nunes *et al.*, 1998 b). En 1993, Itak *et al.* publicaron el estudio de validación de un ELISA basado en partículas paramagnéticas para la cuantificación de carbaryl en muestras de agua. Este inmunoensayo mostró ser 40 veces más sensible que el sistema de HPLC propuesto por la EPA para la determinación de N-metilcarbamatos, manteniéndose una excelente correlación entre ambos métodos.

Con respecto al carbofuran, se han descrito inmunoensayos de tipo ELISA basados también en anticuerpos policlonales, que se han utilizado para determinar este analito en alimentos y en muestras de hígado (Lehotay y Argauer, 1993; Nam y King, 1994), así como en agua y suelo (Jourdan *et al.*, 1995).

La contribución de nuestro grupo al análisis de N-metilcarbamatos mediante inmunoensayos incluye el desarrollo de ELISAs basados en anticuerpos monoclonales para el carbaryl (Abad y Montoya, 1994; Abad *et al.*, 1997 a), propoxur (Moreno *et al.*,

2001) y bendiocarb (en preparación). El primero de ellos ha sido aplicado a la determinación de carbaryl en zumos (Abad y Montoya, 1995) y en aguas (Abad y Montoya, 1997), con excelentes resultados. Asimismo, los anticuerpos monoclonales frente a carbaryl producidos en nuestro laboratorio se han utilizado recientemente en el desarrollo de un inmunosensor para el análisis de este compuesto en aguas (González-Martínez *et al.*, 1997).

3.2.2. Ventajas e inconvenientes de los inmunoensayos.

Ya se ha comentado anteriormente que el principal problema del análisis de residuos de plaguicidas por métodos cromatográficos reside en el coste y en el tiempo invertido en el análisis. En este sentido, los inmunoensayos han sido reconocidos como los métodos más prometedores para solucionar este inconveniente. Entre las **ventajas** que aportan los IA (Hammock y Mumma, 1980; Seiber *et al.*, 1990), cabe citar:

Bajos límites de detección. Se pueden detectar concentraciones de hasta picogramos-nanogramos de analito por mililitro de muestra.

Alta especificidad. El analito se puede detectar en presencia de otros plaguicidas y derivados.

Rapidez. En una hora se pueden analizar más de 100 muestras en comparación con las 5-10 que lo son por GC o por HPLC. Esto es posible gracias al análisis en paralelo que puede llevarse a cabo mediante el inmunoensayo.

Bajo coste. El coste se reduce notablemente porque no precisa equipos sofisticados, ni un elevado consumo de material.

Aplicabilidad. Los inmunoensayos pueden ser aplicados a la determinación de cualquier clase de analito, resultando especialmente ventajosos para el análisis de compuestos polares y/o lábiles, los cuales no pueden ser analizados fácilmente por GC o HPLC.

A pesar de estas características, las técnicas cromatográficas continúan siendo las más utilizadas en el análisis de residuos de plaguicidas. Esto es debido a una serie de **inconvenientes** inherentes a los inmunoensayos (Seiber *et al.*, 1990; Niessner, 1993):

Tiempo de desarrollo. Mientras que un nuevo método basado en GC o HPLC puede desarrollarse en menos de un mes, un inmunoensayo puede tardar desde varios meses a varios años debido a la laboriosidad del proceso. El compromiso de los investigadores académicos, o el desarrollo de estudios colaborativos en las universidades o en las agencias como la EPA o la USDA (*U. S. Department of Agriculture*), podrían disminuir la importancia de este problema. Por otra parte, cuanta más experiencia se adquiere, aumenta la posibilidad de seguir procedimientos más directos para la síntesis de inmunógenos, la obtención de anticuerpos, y la optimización y la validación de nuevos inmunoensayos. También hay que tener en cuenta que el coste y el tiempo necesario para desarrollar un inmunoensayo para un plaguicida disminuye a medida que aumenta el número de inmunoensayos previamente desarrollados para compuestos similares.

Gran especificidad. Esta característica, una de las mayores ventajas que aportan los inmunoensayos, paradójicamente se argumenta como su principal inconveniente. Para su aplicación en los programas de vigilancia y control de residuos, en los que interesa determinar simultáneamente la presencia en la muestra de un elevado número de plaguicidas, resultan más adecuadas las técnicas instrumentales. Un inmunoensayo está más adaptado a la determinación de un único analito, o de unos pocos si son muy parecidos estructuralmente. Sin embargo, la GC, la HPLC y particularmente la GC/MS pueden medir docenas de analitos por muestra en un único análisis.

Efectos matriz. Otra desventaja de los IAs es que la interacción analito-anticuerpo está gobernada por interacciones moleculares débiles, que pueden verse afectadas por las interferencias inespecíficas producidas por la matriz. En un determinado IA los efectos matriz dependen, en gran medida, de la naturaleza de la muestra que está siendo

analizada. Por este motivo, es necesario validar el IA para cada matriz una vez haya sido desarrollado y optimizado.

En cualquier caso cada técnica tiene sus ventajas y sus inconvenientes, que la hacen más adecuada para unas determinadas aplicaciones y no para otras. En este sentido, se puede enumerar una serie de usos apropiados e inapropiados de los IAs, que deben tenerse en cuenta antes de adaptar el inmunoensayo a una determinada aplicación (Mihaliak y Berberich, 1995; Hennion y Barceló, 1998):

Usos apropiados:

- T En la cuantificación/criba de muestras con residuos en estudios de impacto medioambiental y en ensayos de rutina.
- T Cuando la sensibilidad requerida no se puede o es muy difícil de obtener por otros métodos.
- T Por razones de coste, ya que los inmunoensayos son más económicos.
- T Cuando el análisis se deba realizar en el lugar de recogida de las muestras.
- T Como soporte a los métodos tradicionales.

Usos inapropiados:

- X En los programas de control de residuos de plaguicidas.
- X Cuando el volumen de muestra es pequeño (menos de 10) y hay métodos alternativos disponibles.
- X Cuando la matriz no es tratable por métodos inmunoquímicos.
- X Cuando la especificidad y la sensibilidad del método son inadecuadas.
- X Cuando se quiera identificar nuevos metabolitos o productos de degradación.

3.3. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA INMUNOQUÍMICA.

Las etapas más importantes que se deben seguir en el desarrollo de un inmunoensayo son:

- T Preparación de inmunógenos.
- T Producción de anticuerpos.
- T Diseño y optimización del ensayo.
- T Validación del ensayo.

3.3.1. Preparación de inmunógenos.

Los plaguicidas son considerados haptenos, es decir, moléculas de pequeño tamaño (menos de 10.000 daltons) que por sí solas son incapaces de inducir una respuesta inmunitaria. Para ello, deben unirse directamente o como derivados a moléculas de mayor peso molecular, generalmente proteínas. Cuando estos conjugados se inyectan en un animal, éste desencadenará una respuesta inmunitaria, como consecuencia de la cual se producirán anticuerpos capaces de reconocer tanto al hapteno como a la proteína.

Para poder acoplar covalentemente un plaguicida a una proteína, es necesario que el primero disponga de grupos funcionales tales como -COOH, -NH₂, -OH y -SH, susceptibles de reaccionar con los grupos funcionales de las proteínas. Desgraciadamente, la mayor parte de los plaguicidas carecen de estos grupos. Asimismo, para favorecer la presentación del hapteno al sistema inmunológico, es necesario que en el conjugado hapteno-proteína el primero esté separado espacialmente de la segunda. Así pues, la primera etapa en el desarrollo de un inmunoensayo es la síntesis de haptenos cuya estructura sea lo más parecida posible a la del plaguicida y posea un brazo espaciador acabado en un grupo funcional que permita su acoplamiento a la proteína. Aunque en algunas ocasiones la funcionalización del plaguicida es relativamente sencilla, en la mayoría de los casos se convierte en la etapa más laboriosa del desarrollo de IAs. Además, la especificidad y la afinidad de los anticuerpos obtenidos dependen de la estructura sintetizada y del grado de similitud de estas moléculas con el plaguicida, de ahí el carácter crítico que tiene esta etapa en el desarrollo de inmunoensayos para plaguicidas. Aunque se trata de una etapa fundamentalmente empírica, en la que la idoneidad del hapteno sintetizado es difícil de predecir, existen algunas reglas de carácter orientativo (Jung *et al.*, 1989; Harrison *et al.*, 1990):

- T Que posea una estructura semejante a la del plaguicida, con sus mismas propiedades geométricas, electrónicas e hidrofóbicas.
- T Que la longitud del brazo espaciador esté comprendida entre 3 y 6 átomos de carbono.
- T Que el brazo espaciador no contenga grupos de fuerte carácter antigénico, como anillos aromáticos, dobles enlaces o heteroátomos, para minimizar la producción de anticuerpos específicos del brazo espaciador.
- T Que el brazo espaciador esté alejado de un determinante hapténico importante para facilitar al anticuerpo su reconocimiento.
- T Que el hapteno sea fácil de sintetizar.
- T Que el hapteno sea estable bajo las condiciones de conjugación e inmunización.

En este contexto, se han publicado recientemente trabajos que muestran la posibilidad de intentar optimizar *a priori* la calidad de los anticuerpos mediante el estudio de modelos moleculares de las conformaciones, geometría y distribuciones electrónicas del analito y el hapteno inmunizante (Ballesteros *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

Una vez que se han sintetizado los haptenos, el siguiente paso es su acoplamiento covalente a proteínas. Las más utilizadas para la conjugación son la albúmina del suero bovino (BSA), la albúmina de suero humano (HSA), la ovoalbúmina (OVA) y la *keyhole limpet hemocyanin* (KLH). Difieren entre ellas en su inmunogenicidad, su solubilidad y sus posibilidades de conjugación, y no existe un acuerdo unánime sobre cuál de ellas proporciona los mejores resultados. La unión del hapteno a la proteína ocurre a través de los grupos reactivos de las proteínas: α -y ϵ -amino (pK_a 10 y 8 respectivamente), fenoles, sulfidrilos (pK_a 9), imidazoles (pK_a 7) y carboxilos (pK_a 2-4) (Tijssen, 1985a; Burrin y Newman, 1991). El pK_a determina el cambio de la reactividad de estos grupos con el pH, ya que las formas no protonadas de los grupos nucleofílicos son reactivas, si bien su reactividad depende del microambiente del residuo.

Se han descrito diferentes procedimientos para unir un hapteno a una proteína, en función del grupo funcional del hapteno. Todos los haptenos utilizados en este trabajo contienen un grupo carboxilo terminal, el cual se conjuga con un resto amino libre de la proteína mediante la formación de un enlace amida, utilizando dos procedimientos (Tijssen, 1985a; Burrin y Newman, 1991; Szurdoki *et al.*, 1995). Uno de ellos es el método del anhídrido mixto, mediante el cual el grupo carboxilo del hapteno es convertido en anhídrido antes de la conjugación a la proteína. Se suelen utilizar para ello cloroformatos de alquilo. El otro, el método del éster activo, se caracteriza por la formación de ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) en presencia de una carbodiimida (DCC).

La verificación y la cuantificación de la conjugación del hapteno a la proteína, es decir, el número de moléculas de hapteno unidas por molécula de proteína, o relación molar (RM), puede hacerse por diferentes procedimientos: mediante espectrofotometría UV-visible y fluorescente, por la medida de la radiactividad del hapteno previamente marcado, o por la medida de los grupos amino de los residuos de lisina antes y después de la conjugación. Recientes avances en técnicas de espectrometría de masas ofrecen una nueva posibilidad para determinar la densidad de hapteno en los conjugados de proteína (Szurdoki *et al.*, 1995). No hay un consenso sobre cual es la relación molar óptima para inducir la respuesta de anticuerpos más adecuada, ya que se han obtenido buenos resultados tanto con relaciones molares bajas como con altas. Podría depender de la proteína utilizada, de la naturaleza del hapteno o del protocolo de inmunización. En estas

circunstancias, es la mayor o menor dificultad en la conjugación lo que determina la relación molar de los conjugados hapténicos utilizados como inmunógenos (Sherry, 1992). Así, para el caso de la BSA, se obtienen normalmente RMs entre 15 y 30, mientras que con proteínas de bajo peso molecular como la OVA se obtienen RMs menores (Burrin y Newman, 1991).

3.3.2. Producción de anticuerpos.

El siguiente paso en el desarrollo de un inmunoensayo consiste en la obtención de anticuerpos a partir de animales inmunizados con el conjugado seleccionado. La inmunización es en su mayor parte empírica y la respuesta inducida en el animal depende del inmunógeno, de la especie y del sistema inmune de animal, así como de la vía y pauta de la inmunización. Los animales que con mayor frecuencia se utilizan para la obtención de anticuerpos son los ratones y los conejos. Los primeros se suelen utilizar para la producción de anticuerpos monoclonales, mientras que los segundos se emplean cuando se quiere obtener anticuerpos policlonales. En este caso, también se utilizan cabras y ovejas cuando la cantidad requerida es elevada, o incluso gallinas cuando se pretende obtener inmunoglobulinas a partir del huevo.

Cuando un animal es inmunizado, se produce la estimulación de los linfocitos B, que empiezan a multiplicarse y a sintetizar anticuerpos con diferentes afinidades y especificidades hacia el antígeno. Se obtiene, por tanto, una mezcla heterogénea de anticuerpos, llamada también antisuero policlonal. Es posible seleccionar la afinidad de un antisuero mediante su purificación en columnas de afinidad que llevan anclado el antígeno. Sin embargo, no fue hasta 1975 cuando la tecnología de hibridomas permitió establecer líneas celulares capaces de producir indefinidamente un único anticuerpo *in vitro*, con una única afinidad y especificidad definida (anticuerpo monoclonal). Se han desarrollado numerosos inmunoensayos con bajos límites de detección para plaguicidas, tanto con anticuerpos monoclonales como con policlonales, y a pesar de que se hayan argumentado una serie de razones a favor o en contra de la aplicación de unos u otros, la elección se realizará en función de los análisis requeridos (Hammock *et al.*, 1990; Niessner, 1993). Así, para el desarrollo rápido de inmunoensayos para plaguicidas que presentan una determinada problemática temporal, es suficiente la obtención de anticuerpos policlonales. En cambio, para plaguicidas que presentan una mayor relevancia internacional, es recomendable la producción de anticuerpos monoclonales para facilitar la estandarización del inmunoensayo o su posible comercialización.

En los últimos años, la aplicación de las técnicas de ingeniería genética a la producción de anticuerpos ha supuesto un gran avance. Estas técnicas consisten en aislar genes que codifican anticuerpos, purificarlos, modificarlos y expresarlos en otros

organismos tanto eucariotas como procariotas. Los anticuerpos obtenidos de esta manera pueden presentar modificaciones puntuales en el sitio de unión al antígeno, o ser en realidad fragmentos de anticuerpo, anticuerpos quimera con enzimas marcadoras o anticuerpos bifuncionales (Choudary *et al.*, 1995). Originalmente se clonaban genes procedentes de hibridomas. Sin embargo, los rápidos avances conseguidos en este campo permiten ya la clonación de genes procedentes de linfocitos de animales que han sido, o no, previamente inmunizados. Los linfocitos se han convertido de esta manera en la primera fuente de genes que codifican anticuerpos. Esta capacidad, junto con el uso de *primers* universales y de la técnica de amplificación del DNA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han conducido a la conceptualización y al desarrollo de las bibliotecas genómicas de anticuerpos, que permiten la síntesis de éstos sin intermediación de animal alguno. En este sentido, Hoogenboom (1997), publicó una revisión acerca de las bibliotecas genómicas basadas en fagos. En los últimos años, las técnicas de ingeniería genética se han aplicado en la obtención de anticuerpos para plaguicidas con resultados excelentes (Longstaff *et al.*, 1998; Strachan *et al.*, 1998; Grant *et al.*, 1999; Alcocer *et al.*, 2000; Strachan *et al.*, 2000).

Todos los inmunoensayos desarrollados en este trabajo están basados en anticuerpos monoclonales. Por este motivo, su producción se describe a continuación con detalle.

3.3.2.1. Producción de anticuerpos monoclonales.

De acuerdo con la teoría de la selección clonal, cada linfocito B es capaz de producir un tipo determinado de anticuerpo. Si los linfocitos que responden a la presencia de un antígeno fuesen extraídos del bazo del ratón inmunizado, aislados y cultivados *in vitro*, el sobrenadante de cultivo contendría una mezcla homogénea de las moléculas de anticuerpo que reconocen ese antígeno con una determinada afinidad y especificidad. Sin embargo, los linfocitos son incapaces de crecer *in vitro*. Este problema se puede solucionar de dos formas, bien por transformación de los linfocitos B, por ejemplo mediante virus oncogénicos, o mediante la fusión de los linfocitos con líneas celulares de mieloma. Esta última aproximación, conocida como tecnología de hibridomas, fue desarrollada por Köhler y Milstein (1975) y es la que más se utiliza. El procedimiento seguido lo podemos dividir en las siguientes etapas: fusión, ensayo de sobrenadantes de cultivo, clonación y expansión (figura 1.5), cuyo fundamento se comenta a continuación.

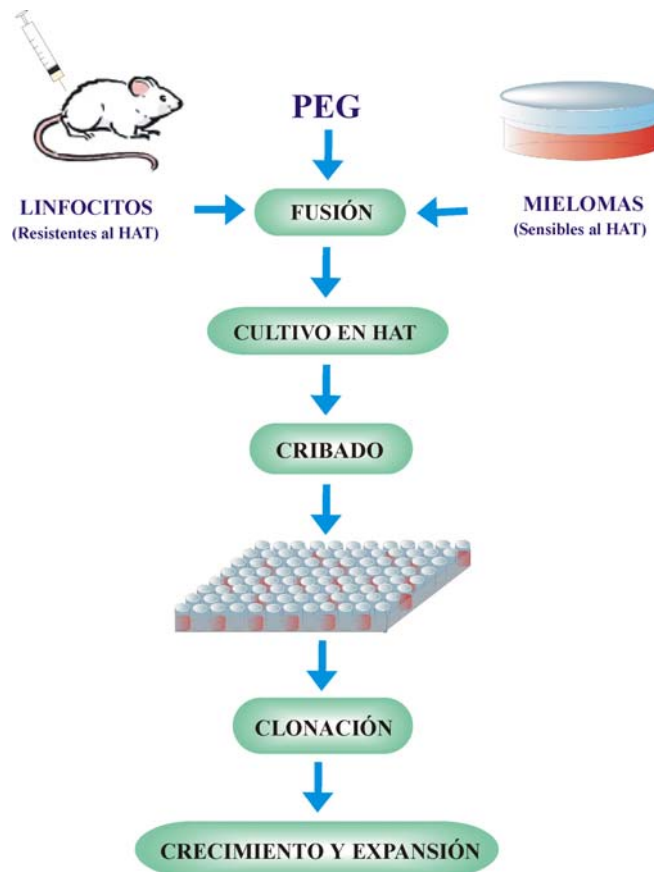


Figura 1.5: Procedimiento seguido para la producción de anticuerpos monoclonales.

Después de que el animal ha sido inmunizado con el antígeno, se produce la diferenciación de los linfocitos que segregan anticuerpos con diferentes afinidades y especificidades hacia el antígeno. Posteriormente, estas células son extraídas del bazo del animal y mezcladas con células de mieloma en presencia de un agente químico, el polietilenglicol (PEG), que disuelve la membranas de las células adyacentes permitiendo la fusión en una única célula. La reorganización del material genético de las dos células parentales dará lugar finalmente al hibridoma. La principal limitación de la producción de hibridomas es que, bajo estas circunstancias, la fusión tiene lugar de una forma casual, pudiéndose encontrar, además de los hibridomas propiamente dichos, células no fusionadas, o fusiones no deseadas como las que se dan entre linfocitos y mielomas entre sí. Dado que únicamente interesan los híbridos de linfocito y mieloma, es necesario un procedimiento que permita seleccionarlos. La aproximación más utilizada para conseguir este propósito es el empleo de un medio de cultivo selectivo.

Las líneas celulares de mieloma más frecuentemente utilizadas en la fusión son las que tienen una mutación en el gen que codifica la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGTP), o en el que codifica la enzima timidina kinasa (TK). Estas enzimas están implicadas en una de las dos vías metabólicas que poseen las células animales para la síntesis de los nucleótidos de purina, la denominada ruta salvaje. Como consecuencia de las mutaciones mencionadas, las células de mieloma no poseen estas enzimas y por tanto, son incapaces de utilizar esta vía metabólica. La ruta alternativa, denominada *de novo*, es la que utilizan las células habitualmente y se puede bloquear en un medio que contenga antagonistas del ácido fólico (aminopterina, ametofterina, o metilametofterina). En este medio, las células de mieloma mueren porque no pueden sintetizar los precursores de los ácidos nucleicos por ninguna de las vías.

Los linfocitos, incapaces de crecer *in vitro*, poseen sin embargo enzimas para sintetizar los precursores de los ácidos nucleicos por ambas rutas. Mediante la fusión, el mieloma dota al hibridoma de la capacidad de reproducirse *in vitro*, mientras que el linfocito le proporciona las enzimas implicadas en la ruta salvaje y por tanto, la capacidad de crecer en un medio con aminopterina. Para estimular esta vía metabólica, el medio de cultivo debe ser complementado con hipoxantina y timidina (medio HAT). Al cabo de unos 8 días, tiempo suficiente para que se haya producido la selección, los hibridomas se cultivan en medio HT, sin aminopterina, de manera que las células ya pueden utilizar la ruta habitual.

Otro inconveniente de que la fusión se produzca al azar es que también se originan hibridomas procedentes de linfocitos que no producen el anticuerpo con la afinidad deseada hacia el antígeno. Por lo tanto, posteriormente es necesario ensayar los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA, con la finalidad de seleccionar aquellas células que segregan el anticuerpo de interés. Para facilitar este proceso, la mezcla de hibridomas procedente de la fusión se distribuye en varias placas de cultivo de 96 pocillos. En aquellos pocillos en los que el ensayo da positivo, no todos los clones de hibridomas son productores del anticuerpo que tiene afinidad por el antígeno, y muy posiblemente sea sólo uno de ellos el responsable de la respuesta. Por tanto, para tener la seguridad de que el anticuerpo finalmente producido sea monoclonal, es necesario separar este clon del resto. Esta etapa se conoce con el nombre de clonación y el procedimiento que generalmente se emplea es el denominado de dilución límite. Este proceso consiste en recoger una muestra de las células existentes en el pocillo seleccionado y diluirlas convenientemente de manera que al dispensarlas sobre nuevas placas de cultivo, estadísticamente se siembre una en cada uno de los pocillos. Cuando la célula origina un clon de un tamaño suficiente, se vuelven a ensayar los sobrenadantes con objeto de

identificar los pocillos positivos. Normalmente, son necesarios varios ciclos de clonación y ensayo de sobrenadantes para asegurar que el anticuerpo producido es monoclonal.

Según hemos visto, el desarrollo de un proceso de cribado (*screening*) eficiente que permita seleccionar las líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales de alta calidad constituye una etapa crítica en la obtención de anticuerpos monoclonales. También se ha descrito la posibilidad de seleccionar los hibridomas mediante lechos magnéticos (Hock *et al.*, 1995).

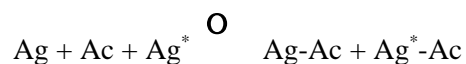
Una vez identificado el clon, se procede a su expansión, que consiste en obtener un mayor número de células. Llegados a este punto las células se congelan y se almacenan en nitrógeno líquido, y el medio de cultivo se emplea como fuente de anticuerpos.

3.3.3. Diseño y optimización del inmunoensayo.

El diseño consiste en la selección de los reactivos y el protocolo según el cual se consigue el objetivo principal del ensayo, es decir, determinar con la mayor exactitud y el menor tiempo posible, la concentración de analito en una muestra determinada. La optimización hace referencia al estudio de las condiciones del medio en las que debe realizarse el ensayo, así como de las concentraciones óptimas de los inmunoreactivos, para conseguir una mayor sensibilidad.

3.3.3.1. Diseño del inmunoensayo.

Una vez se dispone de los anticuerpos adecuados, la etapa siguiente es el desarrollo de los inmunoensayos propiamente dichos. El principio de un inmunoensayo competitivo para moléculas pequeñas como los plaguicidas puede ilustrarse con la siguiente ecuación química:



en la que **Ag** es el analito que va a ser medido, **Ac** es el anticuerpo que se une específicamente al analito, y **Ag*** es el hapteno unido covalentemente a una proteína que puede o no ser una enzima. El fundamento de la detección es la competición que se establece entre el analito y el hapteno conjugado por su unión a una cantidad limitante de anticuerpo. La extensión de la unión del hapteno conjugado depende de la concentración de analito, es decir, la medida de la unión anticuerpo-hapteno conjugado genera una señal inversamente proporcional a la cantidad de analito. Por tanto, menores concentraciones de plaguicida generan señales mayores y viceversa, lo que da lugar a curvas de

calibración (patrón) decrecientes que son de tipo sigmoide cuando se representan en escala semilogarítmica (figura 1.6).

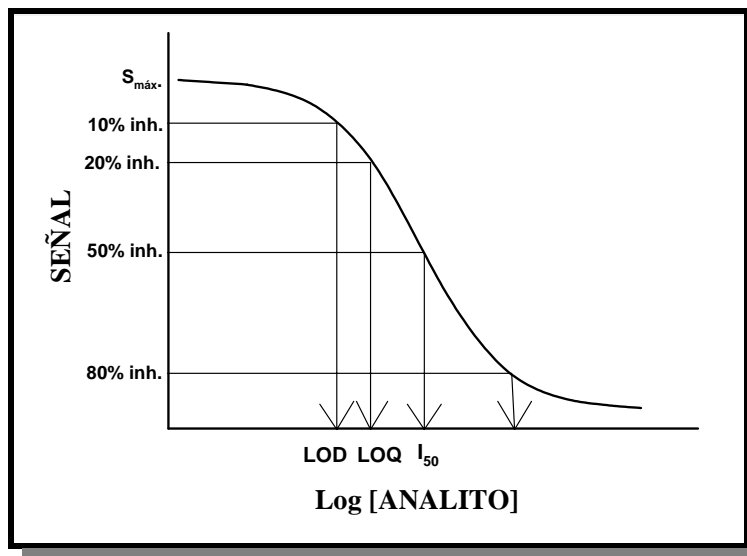


Figura 1.6. Curva patrón representativa de los IAs competitivos y representación de la I_{50} y de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Se han propuesto varias aproximaciones para evaluar la sensibilidad de un inmunoensayo. Por ejemplo, la estimación de la cantidad más baja que puede detectar el inmunoensayo (detectabilidad), o a partir de la precisión del blanco, o la determinación de aquellas concentraciones de analito que producen una cierta reducción de la señal máxima (Brady, 1995). Esta última es la que más se suele utilizar, siendo el valor de inhibición más habitual el 50% porque la precisión del ensayo es mayor en la parte central de la curva estándar. La concentración de analito que reduce la señal máxima un 50% se conoce como I_{50} del ensayo y también se suele utilizar como una estimación indirecta de la afinidad del anticuerpo por el analito. Otros parámetros de interés son el límite de detección (LOD) y el rango de cuantificación. El primero se define como la concentración de analito que reduce la señal máxima un 10%. Por otra parte, el rango de cuantificación o de trabajo comprende aquellas concentraciones de analito cuyas medidas son de una precisión suficiente como para satisfacer las necesidades particulares del analista. La concentración más baja del mismo se denomina límite de cuantificación (LOQ). En general suele asumirse un rango definido por las concentraciones de analito que reducen la señal máxima el 20% y el 80%.

Prácticamente todos los inmunoensayos descritos son heterogéneos, es decir, intervienen dos fases (líquida y sólida) para permitir la separación de las especies que han

interaccionado de las que no lo han hecho. Asimismo, pueden ser de diversos tipos y formatos, en función de cuál es la marca que se utiliza en la detección y de cuál es la especie del complejo anticuerpo-hapteno conjugado que se detecta.

Sistema de detección. Todos los inmunoensayos considerados en esta tesis son de tipo ELISA, lo que significa que la señal obtenida es generada por la acción de una enzima acoplada a una de las especies participantes en la reacción inmunoquímica, así como también que una de las especies citadas ha de estar inmovilizada en un soporte. Las enzimas empleadas en los inmunoensayos deben cumplir una serie de requisitos que, dependiendo de las propuestas particulares, serán más importantes que otros. Entre estos criterios cabría destacar los siguientes (Tijssen, 1985b; Johannsson, 1991):

- T Poseer una elevada actividad específica.
- T Que sea estable en disolución.
- T Disponer de un sustrato estable que origine un producto fácilmente detectable.
- T Que sea compatible con un amplio rango de medios de reacción y condiciones del ensayo (pH, fuerza iónica, detergentes,...).
- T Estar disponible a bajo coste y que sea fácilmente conjugable.
- T Poseer una baja unión inespecífica al anticuerpo y a la fase sólida.

Aunque un gran número de enzimas han sido utilizadas en los IAs, las más comunes son la HRP (*horseradish peroxidasa*) y la fosfatasa alcalina. Para la realización de esta tesis se ha utilizado la HRP, una glicoproteína de masa molecular 44.000 daltons. Contiene 308 aminoácidos, cuatro de los cuales son lisinas con grupos amino disponibles para la conjugación sin pérdida de actividad. Los residuos carbohidratos también se pueden utilizar en la conjugación a haptenos o anticuerpos. Esta enzima, con la participación de aceptores de electrones como el H_2O_2 , cataliza la oxidación de un sustrato cuya forma oxidada absorbe en el espectro visible. Como ya se ha comentado antes, la intensidad de color es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra, ya que el analito libre y la forma marcada del mismo compiten por los sitios de unión de una cantidad limitante de anticuerpo. Los sustratos más comunes de la peroxidasa son: el ABTS (ácido 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) que absorbe a 415 nm, la OPD (*o*-fenilendiamina) que absorbe a 492 nm en medio ácido, y el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) que absorbe a 450 nm en medio ácido. Existe cierta controversia centrada en el TMB y la OPD, acerca de cuál de estos sustratos es el más adecuado para los inmunoensayos (Tijssen, 1985b; Johannsson, 1991). Para el desarrollo del presente trabajo se ha utilizado la OPD.

Formatos de ELISA. El soporte que más se utiliza para inmovilizar tanto el anticuerpo como el conjugado hapteno-proteína es la placa de poliestireno de 96 pocillos, y la forma más difundida debido a su sencillez y buenos resultados es por adsorción pasiva. Existe un acuerdo en el hecho de que el formato de ELISA influye sobre la sensibilidad del ensayo, pero no está claro qué formato proporciona el inmunoensayo más sensible. Los dos formatos de ELISA más utilizados se diferencian fundamentalmente en el componente, anticuerpo o hapteno, que se detecta, lo cual está relacionado a su vez con que sea el hapteno o el anticuerpo, respectivamente, la especie que se inmoviliza en la placa.

Formato de conjugado inmovilizado (formato CI). En este formato, cuyo fundamento se muestra en la figura 1.7, el hapteno se acopla covalentemente a una proteína y el conjugado resultante es inmovilizado en la placa. A continuación se añaden la muestra o el estándar que contiene el analito, y el anticuerpo a una concentración predeterminada. La unión entre el analito y el anticuerpo es reversible, y se considera que la reacción alcanza el equilibrio en un tiempo comprendido entre 15 y 30 minutos (Vanderlaan *et al.*, 1990). La cantidad de anticuerpo específico unido a la fase sólida se puede detectar ópticamente de forma directa, acoplando previamente este anticuerpo a una enzima y utilizando un sustrato cromogénico. Sin embargo, el marcaje del anticuerpo específico resulta laborioso y puede afectar a la afinidad del anticuerpo. Por este motivo, se suelen utilizar anticuerpos secundarios acoplados a una enzima, disponibles comercialmente y que van dirigidos hacia los anticuerpos específicos de una determinada especie. La señal se genera de forma similar a la anterior y también es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

Formato de anticuerpo inmovilizado (formato AI). En este formato, representado esquemáticamente en la figura 1.8, la especie que se inmoviliza en la placa es el anticuerpo específico, bien mediante un anticuerpo de captura o bien directamente, aunque esta última forma es la más habitual. Por otro lado, el hapteno se conjuga a una enzima marcadora formando un trazador enzimático. La cantidad de trazador que se une al anticuerpo inmovilizado se mide espectrofotométricamente al igual que en el formato anterior.

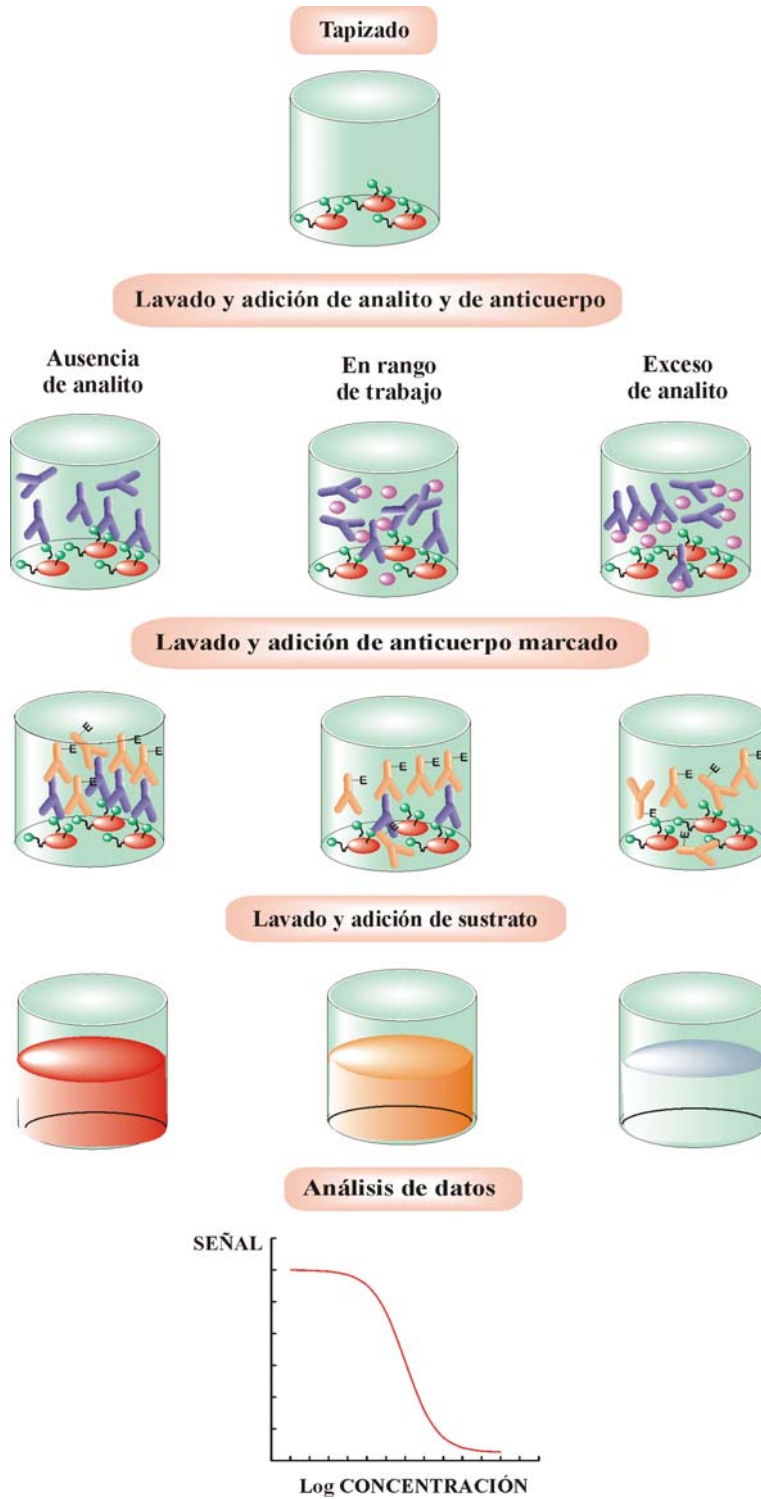


Figura 1.7. Representación esquemática del formato de ELISA con conjugado inmovilizado (formato CI).

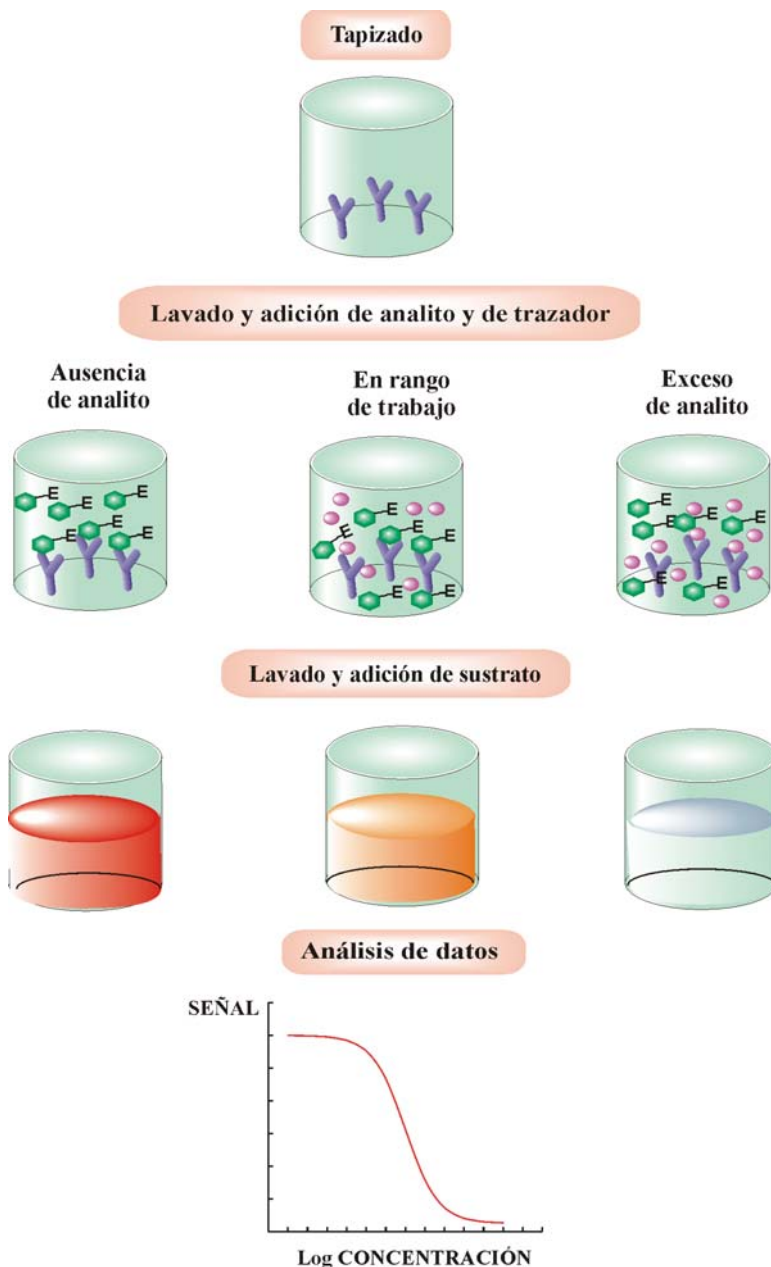


Figura 1.8. Representación esquemática del formato de ELISA con anticuerpo inmovilizado (formato AI).

-  Conjugado hapteno-proteína.  Anticuerpo específico.
-  Analito.  Anticuerpo marcado.  Trazador enzimático.

Hapteno de ensayo. Otra etapa importante en el diseño de un inmunoensayo es la elección del hapteno conjugado que se va a utilizar en el ensayo. Se denomina ensayo homólogo a aquel en el que el hapteno utilizado para obtener los anticuerpos y el empleado en el inmunoensayo son el mismo. Por el contrario, un ensayo heterólogo es aquel en el que el hapteno utilizado en el inmunoensayo es distinto del que sirvió para obtener el anticuerpo. Muchas veces en los ensayos homólogos no se dan las condiciones idóneas para la competición debido a que el anticuerpo reconoce mejor al conjugado que al analito. Por este motivo, es bastante habitual recurrir a la utilización de la heterología de haptenos. La razón de utilizar para el ensayo un hapteno distinto del que sirvió para obtener el anticuerpo hay que buscarla en el propio fundamento de la técnica. La sensibilidad de un inmunoensayo competitivo, estimada a partir de la I_{50} , es el resultado de la relación de afinidades del anticuerpo hacia el plaguicida libre y hacia el hapteno (figura 1.9). Así pues, lo que se pretende es utilizar para el ensayo un conjugado para el cual la afinidad del anticuerpo sea ligeramente menor que la que presenta el mismo anticuerpo hacia el conjugado homólogo, de manera que la afinidad aparente del anticuerpo hacia el plaguicida libre aumente, con la consiguiente mejora en la sensibilidad del ensayo. Aunque se pueden desarrollar excelentes inmunoensayos homólogos (Abad y Montoya, 1994; Manclús y Montoya, 1995; Manclús y Montoya, 1996 b; Abad *et al.*, 1997 b; Mercader y Montoya, 1997; Parnell y Hall, 1998; Simon *et al.*, 1998; Wengatz *et al.*, 1998; Shan *et al.*, 1999), especialmente con anticuerpos monoclonales, la utilización de haptenos heterólogos resulta ser casi siempre una valiosa aproximación para aumentar la sensibilidad de los inmunoensayos. Por este motivo es muy recomendable sintetizar varios haptenos para un mismo plaguicida, de forma que difieran entre sí en su grado de similitud estructural con el plaguicida, en la posición utilizada para la funcionalización y/o en el tipo y longitud del brazo espaciador (Goodrow *et al.*, 1995; Szurdoki *et al.*, 1995; Lee y Kennedy, 2001).

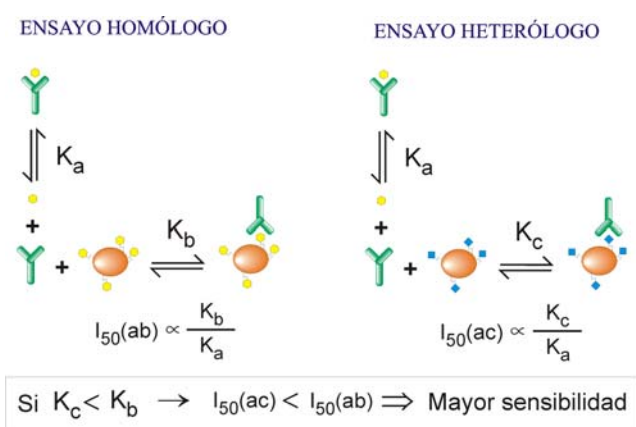


Figura 1.9. Representación esquemática del principio teórico según el cual es posible obtener ensayos más sensibles mediante el empleo de conjugados heterólogos.

3.3.3.2. Optimización del inmunoensayo.

Durante el proceso de desarrollo de un inmunoensayo es necesario optimizar los siguientes componentes y factores:

- T Material y equipos utilizados.
- T Concentración de los reactivos en el ensayo.
- T Composición del tampón utilizado: pH, fuerza iónica, detergentes.
- T Tolerancia a disolventes miscibles con agua.
- T Temperatura y tiempos de incubación.

Algunos de estos factores pueden afectar directamente al anticuerpo o modificar la interacción entre el anticuerpo y el hapteno conjugado que se haya utilizado en el ensayo (Hammock *et al.*, 1990; Meulenberg, 1997). El principal objetivo que se pretende alcanzar en esta etapa es estandarizar las características del ELISA (especificidad, sensibilidad, precisión, linealidad y exactitud) y las interferencias inespecíficas, comúnmente denominadas efectos matriz (Schneider *et al.*, 1995). Estas interferencias se deben de tener especialmente en cuenta cuando se pretende adaptar el ELISA a una aplicación determinada, en cuyo caso puede ser necesario tratar la muestra para minimizarlas. En este sentido, las muestras acuosas podrán ser analizadas directamente o aplicando una simple dilución. Otro tipo de muestras tales como suelos, sedimentos o alimentos requieren procedimientos particulares, desde la extracción con disolventes miscibles con agua, hasta etapas de purificación propiamente dichas, dependiendo de la complejidad de la matriz. En este caso, los disolventes pueden interferir en el ensayo por lo que deben mantenerse en bajas proporciones.

3.3.4. Validación del inmunoensayo.

El desarrollo y la aplicación de un nuevo método, en nuestro caso de un inmunoensayo para el análisis de plaguicidas, requiere una etapa de evaluación para consolidar su aceptación e implementación. En este sentido, varias instituciones tales como la EPA, USDA, AEIC (*Analytical Environmental Immunochemical Consortium*) y AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) en EE UU, o el *German Immunoassay Study Group* y el SCA (*Standing Committee of Analyst*) en el Reino Unido, están trabajando en la elaboración de directrices para evaluar los inmunoensayos para plaguicidas. La evaluación de un inmunoensayo, al igual que la de cualquier técnica analítica, incluye una serie de etapas (Van Emon, 1990; Meulenberg *et al.*, 1995; Mihaliak y Berberich, 1995):

T El adecuado control de calidad.

T El estudio de la estabilidad de los materiales y equipos.

T La definición de las características del ELISA, como el rango de trabajo, la sensibilidad, la precisión y el límite de detección.

T El estudio de las posibles interferencias específicas e inespecíficas de cada matriz.

T La comparación con los métodos convencionales ya establecidos y a ser posible con la participación de varios laboratorios.

Es recomendable que la evaluación se lleve a cabo con muestras reales en las que se sospeche la presencia del analito, aunque en su defecto se pueden utilizar muestras fortificadas con cantidades determinadas de analito. En este caso, las muestras que se utilicen serán lo más parecidas posible, en cuanto a cantidades de analito e interferencias, a las muestras reales.

4. APLICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS AL ANÁLISIS MULTIRRESIDUO.

A pesar de la especificidad inherente a la mayoría de los inmunoensayos, en algunas ocasiones los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, reconocen otros compuestos relacionados estructuralmente con el analito. Esta característica, que se denomina reactividad cruzada, supone en general un inconveniente porque no permite al analista distinguir entre la señal debida a la presencia de un único analito o a la de varios para los que el anticuerpo muestra diferentes afinidades. Una alternativa para paliar las limitaciones prácticas y teóricas de la especificidad de un anticuerpo es el uso del patrón de reactividades cruzadas característico y reproducible de dos o más anticuerpos para identificar y cuantificar los analitos presentes en una muestra. Esta aproximación ha sido utilizada por algunos grupos de investigación para adaptar el inmunoensayo al análisis multirresiduo de plaguicidas pertenecientes a una misma familia, como es el caso de las triazinas. Se requiere al menos tantos anticuerpos como componentes potenciales tenga la mezcla. Si el número de plaguicidas que hay que determinar es elevado, el análisis de la mezcla puede resultar dificultoso debido a la cantidad de anticuerpos y curvas estándar que pueden estar involucrados. Por este motivo, no se suele cuantificar de forma simultánea mezclas que contienen más de cuatro analitos. El método, propuesto por Roche en 1992 y aplicado al análisis de una mezcla ternaria de triazinas (Muldoon *et al.*, 1993), consiste en la aplicación lineal de la ecuación sigmoide de cuatro parámetros. La cuantificación de cada analito en la muestra se puede hacer utilizando los coeficientes de reactividad cruzada del analito para cada anticuerpo y resolviendo un sistema de n ecuaciones (una por anticuerpo) con n incógnitas (una por analito). El problema que presenta este método es que no tiene en cuenta las posibles diferencias que existen entre las pendientes de las curvas estándar de los analitos, pudiendo proporcionar resultados erróneos particularmente para aquellos que no han sido seleccionados como referencia. Por este motivo, Jones *et al.* (1994) han optado por un método de análisis un poco más complejo que tiene en cuenta estas diferencias. Esta aproximación ha sido aplicada al análisis de mezclas ternarias y cuaternarias de triazinas (Wortberg *et al.*, 1995). También se han sugerido una serie de métodos estadísticos para procesar la información procedente del ELISA multianalito. Entre ellos se pueden citar (Cheung *et al.*, 1993; Karu *et al.*, 1994): MEV (*Minimum Estimate Variability*), KNN (*K-Nearest Neighbors*), PCA (*Principal Component Analysis*), Discriminant Analysis, MLE (*Maximum Likelihood Estimates*), CART (*Classification And Regression Techniques*) y NN (*Computational Neural Networks*). No obstante, esta aproximación matemática resulta más compleja que la anterior.

Frente a la estrategia de utilizar anticuerpos con reactividades cruzadas variables, una alternativa muy atractiva es sin duda la posibilidad de realizar un análisis simultáneo de varios analitos mediante anticuerpos que sean realmente específicos. Esta estrategia ha sido demostrada especialmente en el campo de la medicina, hecho que no nos debe de extrañar debido a la gran implantación de los inmunoensayos en este campo. Estos inmunoensayos se pueden clasificar conforme al principio fundamental que se ha incluido en su diseño (Brecht y Abuknesha, 1995, figura 1.10). De todos ellos, los ensayos basados en marcaje múltiple o en resolución espacial son los más utilizados. A este último tipo de ensayo pertenece el ELISA multianalito desarrollado en este trabajo, cuyo fundamento aparece esquematizado en la figura 1.11.

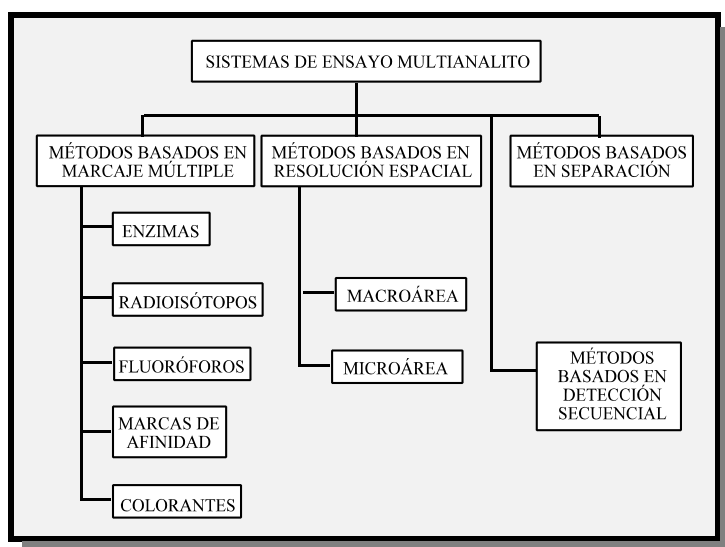


Figura 1.10. Clasificación de los ensayos multianalito.

Ensayos basados en marcaje múltiple. Una aproximación al ensayo multianalito consiste en la combinación de dos o tres ensayos diferentes en el mismo sistema de reacción, mediante el marcaje del reactivo clave en cada ensayo con una marca diferente. Los ensayos multianalito basados en el marcaje múltiple se pueden clasificar conforme a la naturaleza de la especie marcadora. Los más importantes son los que están basados en el marcaje enzimático o fluorescente y los menos interesantes en cuanto a uso, pero no por ello menos ingeniosos, son los que utilizan como especie marcadora colorantes o isótopos radioactivos con características espectrales distintivas muy definidas.

Ensayos basados en resolución espacial. Consisten en la inmovilización de haptenos o de anticuerpos específicos en diferentes áreas de una superficie, en cada una

de las cuales se determinará el analito correspondiente. En este caso se suele utilizar una mezcla de anticuerpos específicos o de trazadores, en función de la especie inmovilizada en el soporte. Un punto muy importante que debe tenerse en cuenta es la correcta elección de los haptenos conjugados que van a formar parte del ensayo multianalito (Schuetz *et al.*, 1999). Éstos sólo deben ser reconocidos por sus anticuerpos específicos. El efecto que se produce en el caso contrario fue acuñado por Bezofsky y Schecher como *reactividad compartida*. Esta expresión se utiliza normalmente cuando se habla de antisuero policlonal, pero una mezcla de anticuerpos monoclonales puede ser considerada como un suero policlonal sintético.

Se han descrito numerosos inmunoensayos multianalito basados en el principio de resolución espacial para detectar hormonas (Kakabakos *et al.*, 1992), drogas (Parsons *et al.*, 1993), explosivos (Narang *et al.*, 1998), proteínas (Plowman *et al.*, 1999), o incluso analitos de diferente naturaleza como pueden ser bacterias, virus y proteínas, de forma simultánea (Rowe *et al.*, 1999). Todos estos inmunoensayos utilizan un sistema de detección fluorescente excepto el desarrollado por Parsons y colaboradores que se caracteriza por la aparición de un precipitado en ausencia de analito. También se han descrito ensayos multianalito en los que cada reacción específica tiene lugar en una microárea del orden de μm^2 . Los principios fundamentales incluidos en este tipo de ensayos fueron discutidos por el grupo del doctor Ekins (Ekins *et al.*, 1990; Ekins y Chu, 1995) y aplicados a la construcción de un inmunosensor quimioluminiscente (Weller *et al.*, 1999), o al desarrollo de un inmunoensayo que utiliza como soporte un disco compacto (Kido *et al.*, 2000), para la detección de contaminantes ambientales como los plaguicidas y los compuestos nitroaromáticos.

Aunque en teoría estos principios permitirían analizar un número ilimitado de analitos, hay que tener en cuenta algunos problemas prácticos. Por una parte, los anticuerpos únicamente deben reconocer a sus analitos y conjugados correspondientes. Por otra, es difícil optimizar el rango de ensayo para todos los analitos debido a que la dilución de la muestra es la misma para todos los analitos que contenga (Kakabakos *et al.*, 1992). Así pues, en la práctica el número de analitos suele reducirse hasta un máximo de tres o cuatro, y en todo caso resulta imprescindible llevar a cabo un riguroso proceso de optimización que permita integrar los distintos inmunoensayos individuales en un ensayo multianalito único y viable.

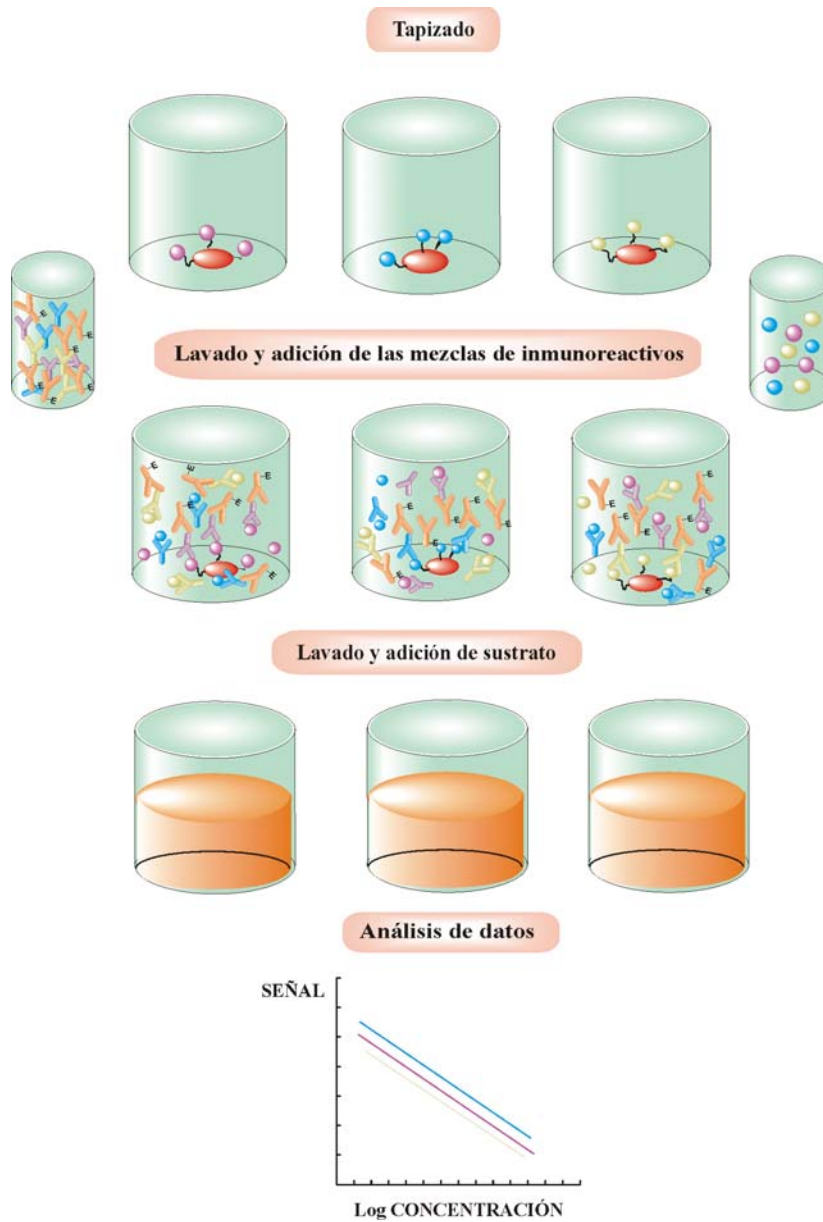
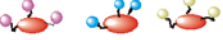





Figura 1.11: Representación esquemática del fundamento del ensayo multianalito en el formato de ELISA con conjugado inmovilizado.

-  Conjugados de los haptenos A, B y C a OVA.
-  Anticuerpos específicos de los analitos A, B y C.
-  Analitos A, B y C.  Anticuerpos marcado enzimáticamente.

5. OBJETIVOS DE LA TESIS.

A lo largo de esta introducción se ha puesto de manifiesto en primer lugar la necesidad del uso de plaguicidas para combatir las plagas que afectan a las cosechas. También se ha considerado el problema que acarrea la presencia de residuos ampliamente distribuidos en el entorno natural, debido al uso masivo de plaguicidas. Por este motivo, el análisis de los residuos de plaguicidas se ha convertido en una tarea de suma importancia para los laboratorios analíticos. Esta tarea se lleva a cabo normalmente mediante el uso de técnicas cromatográficas tales como la HPLC o la GC. No obstante, la aplicación de los inmunoensayos como instrumento de análisis está adquiriendo una importancia cada vez mayor.

En la presente tesis se ha querido dar un paso más dentro de la aplicación de los inmunoensayos al análisis de plaguicidas, mediante el desarrollo de un ensayo multianalito. La consecución de este objetivo global pasa por el cumplimiento de tres objetivos generales:

1. Desarrollo y optimización de inmunoensayos individuales para los plaguicidas *N*-metilcarbamatos methiocarb y carbofuran.
2. Validación de los ELISAs individuales de methiocarb, carbofuran y carbaryl, previamente desarrollado en este laboratorio, frente a HPLC.
3. Integración de los inmunoensayos para methiocarb y carbofuran junto con el de carbaryl, en un ensayo multianalito.

Estos objetivos se particularizan en otros más concretos. Así, dentro del objetivo 1 se contempla:

- L La síntesis de haptenos y preparación de conjugados.
- L La producción y caracterización de anticuerpos monoclonales.
- L El desarrollo y optimización de ELISAs específicos de alta sensibilidad.
- L El estudio del comportamiento de estos ELISAs en muestras reales de frutas y hortalizas mediante el análisis de muestras fortificadas.

Para la realización del objetivo 2, se contará con la colaboración del Laboratorio Agroalimentario de la Comunidad Valenciana, el cual dispone tanto de la capacidad de proporcionar muestras reales de frutas y hortalizas contaminadas con distintos plaguicidas, como del sistema de HPLC con derivatización post-columna y detección fluorescente para el análisis de *N*-metilcarbamatos.

Finalmente, para la realización del objetivo 3 se consideran los siguientes puntos:

L Conseguir una mezcla controlada de varios anticuerpos monoclonales (anticuerpo multiclonal), cada uno de ellos específico para un determinado plaguicida y conjugado hapténico.

L Desarrollar el ELISA multianalito en el formato de conjugado inmovilizado en una sola etapa, mediante la incubación simultánea del analito, del anticuerpo específico y del anticuerpo marcado.

L Adaptación del ELISA multianalito al análisis de muestras reales de frutas y hortalizas.

PARTE II:
MATERIALES Y MÉTODOS.

1. REACTIVOS E INSTRUMENTOS.

Los plaguicidas y metabolitos utilizados, de grado estándar analítico (99.9%), fueron suministrados por Reidel-de Haën (Seelze, Alemania) y Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemania). Todos estos compuestos se disolvieron en *N,N*-dimetilformamida seca (DMF) a una concentración de 100 mM y fueron conservados a -20 °C.

Los reactivos y disolventes utilizados en la síntesis de los haptenos y en las reacciones de conjugación hapteno-proteína, se obtuvieron de Fluka-Aldrich Química (Madrid). El 2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ol fue proporcionado por AgrEvo (Cambridge, Inglaterra).

La ovoalbúmina (OVA), los adyuvantes de Freund completo e incompleto, el Tween 20 y la *o*-fenilendiamina (OPD) fueron proporcionados por Sigma Química (Madrid). La seroalbúmina bovina (BSA), la peroxidasa de rábano picante (HRP, actividad específica 1000 U/mg) y el polietilenglicol 1500 (PEG) se obtuvieron de Boehringer Mannheim (Barcelona). Las inmunoglobulinas de conejo anti-ratón marcadas con peroxidasa y las inmunoglobulinas de cabra anti-ratón fueron adquiridas a Dako (Glostrup, Dinamarca). El medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM), el suero bovino fetal y los suplementos fueron proporcionados por GibcoBRL (Paisley, Escocia). La línea celular de mieloma P3-X63-Ag8.653 fue suministrada por la American Tissue Type Culture Collection (Rockville, USA). El material plástico para cultivos fue adquirido a Bibby Sterilin Ltd (Stone, Inglaterra).

Las placas de ELISA de poliestireno fueron de Costar (Cambridge, USA). Para lavar las placas se utilizó un lavador automático de 96 pocillos Ultrawash II de Dynatech (Sussex, Inglaterra) y un 96PW de SLT (Salzburg, Austria). Las absorbancias se leyeron a 490 nm utilizando 650 nm como longitud de onda de referencia, mediante un lector de placas ELISA Emax controlado por el programa Softmax Pro versión 1.2.0 de Molecular Devices (Sunnyvale, USA). Los datos se procesaron usando el programa Sigmaplot de Jandel Scientific (San Rafael, USA).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y de ¹³C de todos los compuestos sintetizados, se realizaron con un espectrómetro Varian Gemini 300 (Sunnyvale, USA) que opera a 300 MHz para el espectro de ¹H y a 75 MHz para el espectro de ¹³C. Los análisis se realizaron utilizando acetona-*d*₆ como disolvente. Las señales obtenidas están referidas a la del tetrametilsilano utilizado como patrón interno. Los espectros de masas (LSI-MS) se obtuvieron con un aparato VG Autospec (Kioto,

Japón) que utiliza como matriz el alcohol 3-nitrobenzílico, y los espectros ultravioleta (UV) con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Kioto, Japón).

La producción de anticuerpos monoclonales específicos de carbaryl, así como la síntesis y preparación de conjugados con OVA, fue llevada a cabo en nuestro laboratorio como se ha indicado en el trabajo de Abad *et al.*, 1997a.

El metanol y el acetonitrilo de grado HPLC y el diclorometano, la acetona, y el hexano para análisis de residuos de plaguicidas, fueron suministrados por Scharlau (Barcelona). El agua para el análisis por HPLC se produjo utilizando un sistema de purificación Nanopure II de Barnstead (Dubuque, USA). El *o*-ftaldialdehído (OPA), el 2-mercaptoetanol, el hidróxido sódico y el tetraborato sódico decahidratado se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

El reactivo OPA se preparó diariamente disolviendo 50 mg de *o*-ftaldialdehído en 5 ml de metanol. Esta disolución se transfirió a un matraz aforado de 500 ml y se diluyó con borato sódico 0.05 M. Después de filtrar y desgasificar la disolución, se añadió 25 : 1 de 2-mercaptoetanol.

Las disoluciones estándar de carbaryl, carbofuran y methiocarb conteniendo 20 ppm de cada analito en metanol, se prepararon por dilución del stock a 100 mM de cada analito en DMF. Estas disoluciones se almacenaron a -20 °C y se utilizaron diariamente para preparar las disoluciones patrón para la determinación por ELISA y HPLC, así como para fortificar las muestras.

Todo el equipo para el análisis por HPLC fue proporcionado por Waters (Mildford, USA). Consta de un sistema para el análisis de carbamatos (que incluye una bomba analítica cuaternaria, el serpentín de reacción, y el horno requerido para la hidrólisis y derivatización post-columna de los N-metilcarbamatos) equipado con un sistema controlador 600E, un inyector de volumen variable 715 y un sistema de toma de muestra automático, dos bombas que introducen las soluciones de OPA y NaOH en el serpentín donde tiene lugar la reacción post-columna, un sistema desgasificador y un detector de fluorescencia 474. La adquisición de datos y el procesamiento de la señal tuvo lugar usando el programa Waters Millenium, versión 2.15.2.

2. SÍNTESIS DE LOS HAPTENOS DE METHIOCARB.

Los haptenos de methiocarb se sintetizaron mediante la introducción, en el grupo hidroxilo del precursor fenólico, de una cadena alquílica acabada en un grupo ácido. En el caso de las series de haptenos MXN*, MCN*, DPN*, MPN* y PN* (figura 2.1), el precursor se trató previamente con fosgeno para posteriormente formar el grupo carbamato, mientras que la síntesis de la serie MXO* se realizó directamente mediante una reacción de O-alkilación del precursor (figura 2.2).

2.1. SÍNTESIS DE LAS SERIES MXN*, MCN*, DPN*, MPN*, PN*.

Ácido 6-[[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)carbonil]amino]hexanoico (MXNH). A una disolución de 14.3 g (85.2 mmol) de 4-(metiltio)-3,5-xilenol en 100 ml de hidróxido sódico 2.5 M, se añadió 50 ml de una disolución de fosgeno en tolueno al 20% (96.5 mmol). El fosgeno es un gas altamente tóxico por lo que se debe manipular en vitrina y extremando las precauciones. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética durante cuatro horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la fase orgánica se separó y el disolvente se eliminó a baja presión en un baño de agua mantenida a 50 °C, obteniéndose un aceite de color amarillo que pesó 18.21 g, de los cuales 15.48 g (78.8%), fueron indentificados por CG como cloroformato. Este producto fue utilizado sin purificar en la siguiente etapa: 2.96 g de ácido aminohexanoico (22.6 mmol) se disolvieron en 4 ml de hidróxido sódico 4 M, y la disolución se enfrió a 4 °C. Tres gramos de 1-[4-(metiltio)-3,5-xilil]cloroformato (11.3 mmol) se disolvieron en 4 ml de 1,4-dioxano y se enfrió a 4 °C. La disolución de cloroformato, junto con 1.5 ml de hidróxido sódico 4 M, se añadió lentamente a la de ácido aminohexanoico en 2 porciones iguales, dejando transcurrir unos 5 minutos aproximadamente entre cada adición. La reacción se mantuvo en un baño de hielo con agitación durante 1.5 horas. Después de la acidificación hasta pH 4 con HCl concentrado, el derivado carboxílico fue extraído con acetato de etilo (tres porciones de 50 ml). La fase orgánica se lavó varias veces con HCl diluido y fue extraída con una disolución de bicarbonato sódico 1 M (dos porciones de 50 ml). La fase acuosa se acidificó de nuevo con HCl concentrado, se extrajo con acetato de etilo y se secó con sulfato sódico anhidro. Una vez eliminado el disolvente, se obtuvieron 1.19 g del producto en forma de aceite que se cristalizó con una mezcla de hexano/acetato de etilo (70:30) para obtener 840 mg del hapteno puro (22.9%).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 1.38-1.70 (m, 6 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.20 (s 3 H, S-CH₃), 2.32 (t, 2 H, CH₂-COOH), 2.52 (s, 6 H, 2 CH₃), 3.21 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.90 (s, 2 H, anillo aromático).

^{13}C RMN (acetona- d_6) * 18.32, 21.84, 25.30, 26.95, 34.07, 41.52, 121.97, 131.80, 144.55, 152.05, 155.05, 174.63.

LSI-MS, m/z (intensidad relativa) 325 (90, M), 168 (100).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\lambda_{\text{max}} = 262$ nm.

hapteno	n	R ₁	R ₂	R ₃
MXNP	2	CH ₃	CH ₃	SCH ₃
MXNB	3	CH ₃	CH ₃	SCH ₃
MXNH	5	CH ₃	CH ₃	SCH ₃
DPNP	2	CH ₃	CH ₃	H
DPNB	3	CH ₃	CH ₃	H
DPNH	5	CH ₃	CH ₃	H
MCNP	2	H	CH ₃	SCH ₃
MCNB	3	H	CH ₃	SCH ₃
MCNH	5	H	CH ₃	SCH ₃
MPNP	2	H	H	SCH ₃
MPNB	3	H	H	SCH ₃
MPNH	5	H	H	SCH ₃
PNP	2	H	H	H
PNB	3	H	H	H
PNH	5	H	H	H

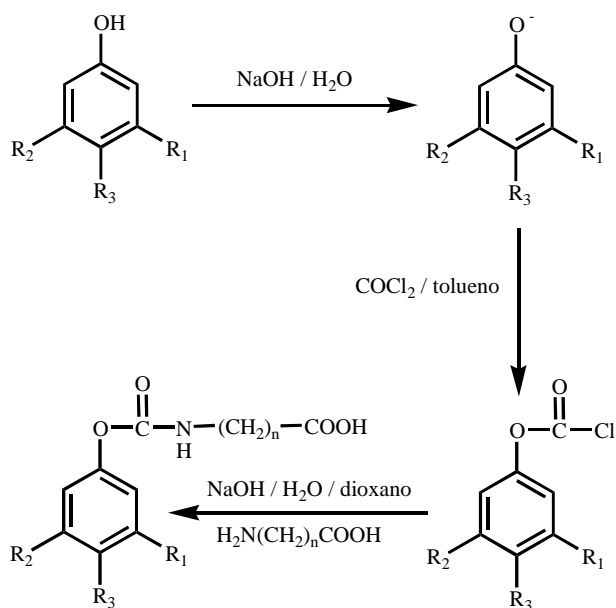


Figura 2.1. Esquema de síntesis de los haptenos de las series MXN*, MCN*, DPN*, MPN* y PN*.

A partir de los aminoácidos y de los precursores fenólicos adecuados, se sintetizaron los siguientes compuestos utilizando el mismo procedimiento, y obteniéndose rendimientos similares.

Ácido 3-[[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)carbonil]amino]propanoico (MXNP).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 2.20 (s, 3 H, S-CH₃), 2.52 (s, 6 H, 2 CH₃), 2.60 (t, 2 H, CH₂-COOH), 3.46 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.90 (s, 2 H, anillo aromático).

¹³C RMN (acetona-*d*₆) * 18.32, 21.84, 34.45, 37.73, 121.94, 131.86, 144.60, 152.05, 155.05, 173.10.

LSI-MS, *m/z* (intensidad relativa) 283 (100 M), 168 (95).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) δ_{\max} = 262 nm.

Ácido 4-[[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)carbonil]amino]butanoico (MXNB).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 1.86 (m, 2 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.20 (s, 3 H, S-CH₃), 2.40 (t, 2 H, CH₂-COOH), 2.52 (s, 6 H, 2 CH₃), 3.26 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.91 (s, 2 H, anillo aromático).

¹³C RMN (acetona-*d*₆) * 18.33, 21.85, 25.84, 31.37, 41.10, 122.00, 131.86, 144.58, 152.15, 155.20, 174.40.

LSI-MS, *m/z* (intensidad relativa) 297 (100, M), 168 (80).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) δ_{\max} = 263 nm.

Ácido 3-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]propanoico (DPNP).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 2.25 (s, 6 H, 2 CH₃), 2.60 (t, 2 H, CH₂-COOH), 3.45 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.71-6.81 (m, 3 H, anillo aromático).

¹³C RMN (acetona-*d*₆) * 21.09, 34.44, 37.66, 120.07, 127.12, 139.46, 152.33, 155.33, 173.12.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) δ_{\max} = 260 nm.

Ácido 4-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]butanoico (DPNB).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 1.84 (m, 2 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.25 (s, 6 H, 2 CH₃), 2.40 (t, 2 H, CH₂-COOH), 3.25 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.71-6.81 (m, 3 H, anillo aromático).

¹³C RMN (acetona-*d*₆) * 21.14, 25.86, 31.37, 41.03, 120.13, 127.10, 139.45, 152.44, 155.52, 174.43.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) δ_{\max} = 260 nm.

Ácido 6-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]hexanoico (DPNH).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 1.35-1.70 (m, 6 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.25 (s, 6 H, 2 CH₃), 2.30 (t, 2 H, CH₂-COOH), 3.19 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.70-6.80 (m, 3 H, anillo aromático).

¹³C RMN (acetona-*d*₆) * 21.14, 25.28, 26.94, 34.07, 41.49, 120.13, 127.04, 139.43, 152.43, 155.55, 174.66.

LSI-MS; *m/z* (intensidad relativa) 279 (100, M), 123 (50).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{\max} = 260 nm.

Ácido 3-[[1-(4-(metiltio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]propanoico (MCNP).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 2.27 (s, 3 H, CH₃), 2.44 (s, 3 H, S-CH₃), 2.60 (t, 2 H, CH₂-COOH), 3.45 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.94 (m, 2 H, anillo aromático), 7.17 (m, 1 H, anillo aromático).

¹³C RMN (acetona-*d*₆) * 15.45, 19.93, 34.42, 37.69, 120.62, 123.87, 126.74, 134.58, 137.39, 149.81, 155.28, 173.10.

LSI-MS; *m/z* (intensidad relativa) 270 (100, M), 154 (65).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{\max} = 250 nm.

Ácido 4-[[1-(4-(metiltio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]butanoico (MCNB).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 1.86 (m, 2 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.29 (s, 3 H, S-CH₃), 2.41 (t, 2 H, CH₂-COOH), 2.46 (s, 3 H, S-CH₃), 3.26 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.96 (m, 2 H, anillo aromático), 7.20 (m, 1 H, anillo aromático).

¹³C RMN (acetona-*d*₆) * 21.14, 25.86, 31.37, 120.13, 127.10, 139.45, 152.44, 155.52, 174.43.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{\max} = 250 nm.

Ácido 6-[[1-(4-(metiltio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]hexanoico (MCNH).

¹H RMN (acetona-*d*₆) * 1.35-1.70 (m, 6 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.29 (s, 3 H, CH₃), 2.32 (t, 2 H, CH₂-COOH), 2.45 (s, 3 H, S-CH₃), 3.20 (q, 2 H, CH₂-NH), 6.95 (m, 2 H, anillo aromático), 7.19 (m, 1 H, anillo aromático).

¹³C RMN (acetona-*d*₆) * 15.59, 19.93, 25.24, 26.91, 34.00, 41.36, 120.68, 123.90, 126.78, 134.40, 137.39, 149.96, 155.28, 174.56.

LSI-MS; *m/z* (intensidad relativa) 311 (100, M).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{\max} = 250 nm.

Ácido 3-[[1-(4-(metiltio)feniloxi)carbonil]amino]propanoico (MPNP).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 2.47 (s, 3 H, S-CH₃), 2.60 (t, 2 H, CH₂-COOH), 3.45 (q, 2 H, CH₂-NH), 7.08 (m, 2 H, anillo aromático), 7.25 (m, 2 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 16.65, 34.91, 38.20, 123.60, 128.77, 135.95, 150.63, 155.70, 173.60.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{max} = 253 nm.

Ácido 4-[[1-(4-(metiltio)feniloxi)carbonil]amino]butanoico (MPNB).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 1.84 (m, 2 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.40 (t, 2 H, CH₂-COOH), 2.46 (s, 3 H, S-CH₃), 3.25 (q, 2 H, CH₂-NH), 7.08 (m, 2 H, anillo aromático), 7.25 (m, 2 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 16.69, 26.29, 31.83, 41.56, 123.64, 128.79, 135.85, 150.72, 155.83, 174.91.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{max} = 253 nm.

Ácido 6-[[1-(4-(metiltio)feniloxi)carbonil]amino]hexanoico (MPNH).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 1.35-1.70 (m, 6 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.30 (t, 2 H, CH₂-COOH), 2.46 (s, 3 H, S-CH₃), 3.19 (q, 2 H, CH₂-NH), 7.08 (m, 2 H, anillo aromático), 7.25 (m, 2 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 16.70, 25.76, 27.40, 30.71, 34.53, 42.00, 123.61, 128.80, 135.77, 150.76, 155.73, 175.14.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{max} = 253 nm.

Ácido 3-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]propanoico (PNP).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 2.61 (t, 2 H, CH₂-COOH), 3.46 (q, 2 H, CH₂-NH), 7.09-7.37 (m, 5 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 34.69, 37.69, 122.46, 125.62, 129.86, 152.45, 155.21, 173.10.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{max} = 250 nm.

Ácido 4-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]butanoico (PNB).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 1.88 (m, 2 H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.40 (t, 2 H, CH₂-COOH), 3.26 (q, 2 H, CH₂-NH), 7.09-7.37 (m, 5 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 25.80, 31.34, 41.04, 122.50, 125.54, 129.85, 152.52, 155.37, 174.42.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{\max} = 250 nm.

Ácido 6-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]hexanoico (PNH).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 1.36-1.68 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.30 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.20 (q, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 7.09-7.37 (m, 5 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 25.42, 26.91, 30.20, 34.01, 41.34, 41.48, 122.49, 125.48, 129.83, 152.57, 155.30, 174.62.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{\max} = 260 nm.

2.2. SÍNTESIS DE LA SERIE MXO*.

Ácido 6-[1-(4-(metiltio)-3,5-xililoxi)]hexanoico (MXOH). A 50 ml de acetona seca se añadieron cantidades estequiométricas (20 mmol) de 4-(metiltio)-3,5-xilenol, carbonato potásico y 6-bromohexanoato de etilo. Después de mantener la reacción a reflujo durante 12 horas, la mezcla fue filtrada y el disolvente eliminado. El residuo se disolvió en 50 ml de acetato de etilo, posteriormente se lavó con agua (2 × 50 ml), con una disolución de NaOH 1 M (2 × 50 ml), y con NaCl 4 M (2 × 50 ml). Finalmente el producto crudo se secó con Na_2SO_4 y mediante un análisis por GC se confirmó que el 43% era 6-[1-(4-(metiltio)-3,5-xililoxi)]hexanoato de etilo. Después de la evaporación del disolvente, se añadió 50 ml de NaOH 1 M al residuo, que pesó 4.91 g. La reacción se mantuvo con agitación y a reflujo durante 1.5 horas. La disolución se acidificó con HCl concentrado, se extrajo con acetato de etilo y se secó con Na_2SO_4 . El producto aceitoso que se obtuvo después de la eliminación del disolvente pesó 1.55 g (27%), y fue cristalizado con hexano para obtener 640 mg de hapteno puro.

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 1.40-1.80 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.15 (s 3 H, S- CH_3), 2.33 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 2.49 (s, 6 H, 2 CH_3), 3.40 (t, 2 H, O- CH_2), 6.72 (s, 2 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 18.60, 21.97, 25.34, 26.29, 34.06, 68.12, 114.89, 126.59, 144.82, 159.76, 174.61.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) λ_{\max} = 250 nm.

A partir de los espaciadores adecuados, se sintetizaron los siguientes compuestos también por O-alquilación del 4-(metiltio)-3,5-xilenol.

Ácido 2-[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)]acético (**MXOA**).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 2.16 (s 3 H, S- CH_3), 2.50 (s, 6 H, 2 CH_3), 4.70 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 6.75 (s, 2 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 18.51, 21.98, 65.04, 114.93, 127.62, 144.94, 158.66, 170.07.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\delta_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$.

Ácido 4-[1-(4(Metiltio)-3,5-xililoxi)]butanoico (**MXOB**).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 2.04 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.15 (s 3 H, S- CH_3), 2.49 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 2.49 (s, 6 H, 2 CH_3), 4.02 (t, 2 H, O- CH_2), 6.74 (s, 2 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 18.58, 21.97, 25.34, 67.30, 114.90, 126.79, 144.86, 159.58, 174.32.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\delta_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$.

hapteno	n	X
MXOA	1	Cl
MXOB	3	Br
MXOH	5	Br

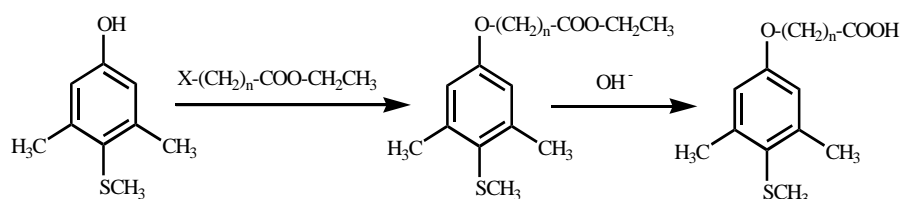


Figura 2.2. Esquema de la síntesis de los haptenos de la serie MXO*.

3. SÍNTESIS DE LOS HAPTENOS DE CARBOFURAN.

Los haptenos de carbofuran se prepararon de la misma manera que los de methiocarb. Así, la serie BFN* y el hapteno BDNH se obtuvieron mediante la introducción de un brazo espaciador acabado en un grupo ácido carboxílico en el grupo hidroxilo del precursor fenólico, después de hacerlo reaccionar con fosgeno para formar el grupo carbamato (figura 2.3). Los haptenos BFOH y BDOH se obtuvieron introduciendo el brazo espaciador directamente, mediante una reacción de O-alkilación del precursor fenólico (figura 2.4).

3.1. SÍNTESIS DE LA SERIE BFN*Y BDNH.

Ácido 3-[[*(2,3-Dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi)carbonil*]-amino]propanoico (**BFNP**). 4.54 ml (30.4 mmol) de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol, fueron añadidos a 26 ml de hidróxido sódico 2.5 M. A continuación, se añadió lentamente 25 ml de una disolución de fosgeno en tolueno al 20% (48.3 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética durante cuatro horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió agua y diclorometano, la fase orgánica se separó y el disolvente se eliminó a baja presión en un baño de agua mantenida a 50 °C. El producto obtenido se analizó por GC, confirmándose que el 88.9% (5.14 g) correspondían al 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil cloroformato. Este producto fue utilizado sin purificar en la siguiente etapa. Dos gramos de ácido aminopropanoico (22.6 mmol) se disolvieron en 4 ml de hidróxido sódico 4 M, la disolución se conservó a 4 °C. Por otra parte, 2.57 g del cloroformato (11.3 mmol) se disolvieron en 4 ml de 1,4-dioxano y se enfriaron a 4 °C. La disolución de cloroformato, junto con 1.5 ml de hidróxido sódico 4 M, se añadió lentamente a la de ácido aminopropanoico en 2 porciones iguales, dejando transcurrir unos 5 minutos aproximadamente entre cada adición. La reacción se mantuvo en un baño de hielo con agitación durante 1.5 horas. Después de la acidificación hasta pH 4 con HCl concentrado, el derivado carboxílico fue extraído con acetato de etilo (tres porciones de 35 ml). La fase orgánica se lavó varias veces con HCl diluido y fue extraída con una disolución de bicarbonato sódico 1 M (tres porciones de 50 ml). La fase acuosa se acidificó de nuevo con HCl concentrado y el producto precipitado se recogió, se lavó con agua y se secó, obteniéndose 1.4 g de BFNP, que cristalizó con una mezcla de hexano/acetato de etilo (70:30), obteniéndose 313.6 mg del hapteno puro (22.4%).

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 1.43 (s, 6 H, 2 CH_3), 2.62 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.05 (s, 2 H, CH_2), 3.45 (q, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 6.72-6.99 (m, 3 H, anillo aromático).

^{13}C RMN (acetona- d_6) * 28.18, 29.05, 34.39, 37.79, 43.43, 88.46, 120.55, 122.60, 130.37, 173.00.

LSI-MS; m/z (intensidad relativa) 280 (100, M), 164 (76.78).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\delta_{\text{max}} = 277$ nm.

HAPTENO	n	X
BFNP	2	CH_2
BFNB	3	CH_2
BFNH	5	CH_2
BDNH	5	O

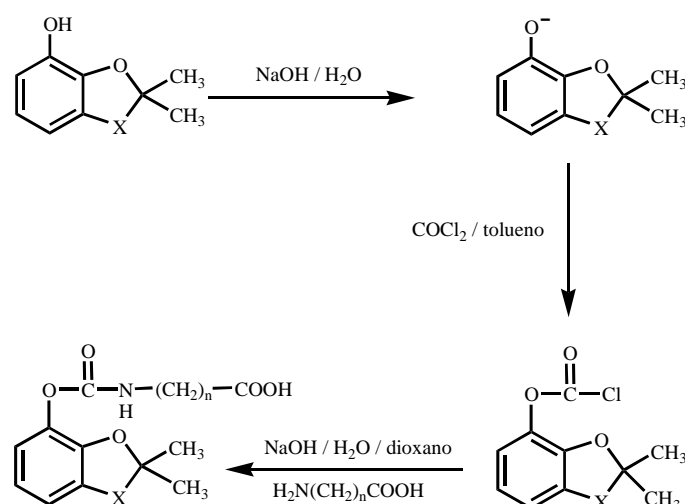


Figura2.3. Esquema de la síntesis de los haptenos BFNP, BFNB, BFNH y BDNH.

Ácido 4-[[[(2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi)carbonil]-amino]butanoico (**BFNB**). Este compuesto fue sintetizado esencialmente como se ha descrito para BFNP, excepto que se utilizó ácido 4-aminobutanoico como brazo espaciador en lugar de ácido 3-aminopropanoico. Después de la cristalización con hexano/acetato de etilo (70:30), se obtuvo 1.59 gramos del hapteno puro.

^1H RMN (acetona- d_6) * 1.43 (s, 6 H, 2 CH_3), 1.86 (m, 2 H, CH_2), 2.42 (t, 2 H, CH_2 -COOH), 3.05 (s, 2 H, CH_2), 3.26 (q, 2 H, CH_2 -NH), 6.72-6.99 (m, 3 H, anillo aromático).

^{13}C RMN (acetona- d_6) * 25.96, 28.03, 28.17, 31.30, 41.06, 43.44, 88.44, 120.53, 122.52, 130.30, 154.92, 174.41.

LSI-MS; m/z (intensidad relativa) 294 (100, M), 164 (76.7).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\lambda_{\text{max}} = 279$ nm.

Ácido 6-[[*(2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi)carbonil*]-amino]hexanoico (**BFNH**). Este compuesto fue sintetizado como los anteriores, pero el brazo espaciador que se utilizó en este caso fue el ácido 6-aminohexanoico.

^1H RMN (acetona- d_6) * 1.43 (s, 6 H, 2 CH_3), 1.41-1.68 (m 6 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.32 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.05 (s, 2 H, CH_2), 3.20 (q, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 6.72-6.99 (m, 3 H, anillo aromático).

LSI-MS; m/z (intensidad relativa) 322 (97.86, M), 164 (100).

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\lambda_{\text{max}} = 277$ nm

Ácido 6-[[*(2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-oxi)carbonil*]-amino]hexanoico (**BDNH**). Este compuesto fue sintetizado como los anteriores, excepto que el 2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ol fue utilizado como precursor fenólico. El brazo espaciador que se utilizó fue el ácido 6-aminohexanoico. Después de la cristalización a partir de una disolución de hexano/acetato de etilo (40:60), se obtuvo 590 mg de hapteno puro.

^1H RMN (acetona- d_6) * 1.44 (m, 2 H, CH_2), 1.61 (m, 4 H, 2 CH_2), 1.63 (s, 6 H, 2 CH_3), 2.30 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.20 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 6.58-6.76 (m, 3 H, anillo aromático).

^{13}C RMN (acetona- d_6) * 25.25, 25.75, 26.87, 29.03, 34.03, 41.47, 106.07, 116.97, 119.55, 121.39, 149.78, 154.29, 174.56.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\lambda_{\text{max}} = 277$ nm

3.2. SÍNTESIS DE BFOH Y BDOH.

Ácido 6-(*2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi*)hexanoico (**BFOH**). A 60 ml de acetona seca se añadieron cantidades estequiométricas (20 mmol) de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol, carbonato potásico y 6-bromohexanoato de etilo. Después de mantener la reacción a reflujo durante 12 horas, la mezcla fue filtrada y el disolvente eliminado. El residuo se disolvió en 50 ml de acetato de etilo, posteriormente se lavó con agua (2×50 ml), con una disolución de NaOH 1 M (4×50 ml), y con NaCl 4 M (2×50 ml). Finalmente el producto crudo se secó con Na_2SO_4 , comprobándose mediante análisis por CG que el 87% era 6-(*2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi*)hexanoato de etilo. Después de la evaporación del disolvente, se añadió 50 ml de NaOH 1 M al residuo, que pesó 4.32 g. La reacción se mantuvo con agitación y a reflujo durante

1.5 horas. La disolución se acidificó con HCl concentrado y se extrajo con acetato de etilo (2×50 ml). La fase orgánica fue extraída con NaOH 1 M, y la solución acuosa se acidificó con HCl concentrado, produciéndose la precipitación de un sólido de color blanco cuyo peso fue 1.81 g. Posteriormente, se cristalizó a partir de hexano para obtener 1.19 g de hapteno puro.

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 1.46 (s, 6 H, 2 CH_3), 1.54-1.79 (m 6 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.36 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.02 (s, 2 H, CH_2), 4.04 (t, 2 H, O-CH_2), 6.72-6.81 (m, 3 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 25.41, 26.30, 28.30, 34.12, 43.66, 69.49, 87.24, 114.53, 118.37, 121.05, 129.29, 174.60.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\delta_{\text{max}} = 278$ nm

Acido 6-(2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-oxi)hexanoico (BDOH). Este compuesto se sintetizó siguiendo el procedimiento anterior, excepto que el 2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ol fue utilizado como precursor fenólico. Después de la cristalización a partir de una mezcla de hexano/acetato de etilo (30:70), se obtuvo 130 mg de hapteno puro.

$^1\text{H RMN}$ (acetona- d_6) * 1.45-1.55 (m, 2 H, CH_2), 1.60-1.80 (m, 4 H, 2 CH_2), 1.63 (s, 6H, 2 CH_3), 2.32 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 4.06 (t, 2 H, O-CH_2), 6.39-6.72 (m, 3 H, anillo aromático).

$^{13}\text{C RMN}$ (acetona- d_6) * 25.37, 29.03, 34.07, 69.79, 102.75, 109.53, 122.03, 174.00.

UV (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4) $\delta_{\text{max}} = 274$ nm.

HAPTENO	X
BFOH	CH_2
BDOH	O

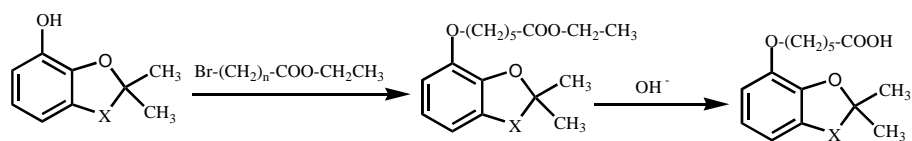


Figura 2.4. Esquema de la síntesis de los haptenos de carbofuran BFOH y BDOH.

4. PREPARACIÓN DE LOS CONJUGADOS PROTEICOS Y ENZIMÁTICOS.

4.1. PREPARACIÓN DE LOS CONJUGADOS DE INMUNIZACIÓN.

Los haptenos de methiocarb MXNP, MXNB y MXNH y los de carbofuran BFNP, BFNB y BFNH, fueron unidos covalentemente a BSA siguiendo el método del éster activo (Langone y Van Vunakis, 1982). Según este procedimiento, 25 : moles de hapteno se incubaron con cantidades estequiométricas de *N*-hidroxisuccinimida y dicitclohexilcarbodiimida en 0.5 ml de DMF. La reacción de activación tuvo lugar durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación magnética. Después de centrifugar la mezcla de reacción durante 15 minutos a $1000 \times g$ para eliminar el precipitado de dicitclohexilurea, 400 : 1 de sobrenadante conteniendo el éster activo se añadieron lentamente a 2 ml de una disolución de BSA de 15 mg/ml en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas con agitación magnética. Finalmente, el conjugado fue purificado por cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex G-50, utilizando como eluyente tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4. La estimación del número de moléculas de hapteno acopladas por molécula de BSA se realizó por espectroscopía UV asumiendo que los coeficientes de extinción de las especies participantes no cambian apreciablemente como consecuencia de la conjugación. La relación molar hapteno/BSA fue de 27, 16 y 18 para los haptenos de methiocarb MXNP, MXNB y MXNH y de 18, 13 y 14 para los de carbofuran BFNP, BFNB y BFNH, respectivamente.

4.2. PREPARACIÓN DE LOS CONJUGADOS DE TAPIZADO.

Todos los haptenos sintetizados se acoplaron covalentemente a OVA siguiendo el procedimiento del anhídrido mixto (Rajkowski *et al.*, 1977). Según este método, 18 : moles de hapteno se dejaron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente con cantidades estequiométricas de tri-*n*-butilamina y cloroformato de isobutilo en 200 : 1 de DMF. 100 : 1 del hapteno activado se añadieron a una disolución de 30 mg de OVA en 2 ml de tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. La reacción de conjugación se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 horas con agitación magnética. Los conjugados obtenidos se purificaron de la misma forma que los inmunógenos. La relación molar hapteno/OVA se determinó por espectroscopía UV, resultando ser 5, 5, 6, 9, 8, 8, 2, 4, 4, 2, 2, 4, 9, 6, 2, 2, 4 y 6 para los haptenos de methiocarb MXNP, MXNB, MXNH, DPNP, DPNB, DPNH, MCNP, MCNB, MCNH, MPNP, MPNB, MPNH, PNP, PNB, PNH,

MXOA, MXOB Y MXOH y 4, 5, 5, 4, 6 y 3 para los haptenos de carbofuran BFNP, BFNB, BFNH, BFOH, BDNH y BDOH, respectivamente.

4.3. PREPARACIÓN DE LOS CONJUGADOS ENZIMÁTICOS.

El método del anhídrido mixto también se empleó para unir covalentemente los haptenos a HRP. Así, 2.9 : 1 de tributilamina (12.2 : mol) y 1.6 : 1 de cloroformato de isobutilo (12.3 : mol) se añadieron a 13.3 : moles de hapteno en 200 : 1 de DMF. La mezcla se mantuvo con agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la adición de 1.8 ml de DMF, se tomaron 100 : 1 de la disolución diluida de hapteno activado y se incubaron con 1 ml de una disolución de HRP 2.2 mg/ml en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6 durante 2 horas a temperatura ambiente. Los conjugados se purificaron por cromatografía de exclusión molecular, como se ha indicado anteriormente, y las relaciones molares hapteno/HRP se estimaron por espectrofotometría UV, resultando ser 1.7, 3.0, 4.6, 11.5, 11.3, 11.5, 2.3, 1.4, 3.2, 1.7, 3.4 y 1.5 para los haptenos de methiocarb MXNP, MXNB, MXNH, DPNP, DPNB, DPNH, MCNP, MCNB, MCNH, MXOA, MXOB y MXOH y de 1.5, 1.2, 2.0, 1.9, 2.1 y 4.2 para los haptenos de carbofuran BFNP, BFNB, BFNH, BFOH, BDNH y BDOH, respectivamente.

5. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

5.1. INMUNIZACIÓN DE RATONES.

Ratones BALB/c hembra de entre 8 y 10 semanas de edad fueron inmunizados mediante inyección intraperitoneal con los conjugados de methiocarb BSA-MXNP, BSA-MXNB, y BSA-MXNH y los de carbofuran BSA-BFNP, BSA-BFNB y BSA-BFNH. La primera dosis administrada consistió en 200 : 1 de una emulsión 1:1 (v/v) de adyuvante completo de Freund y de 30 : g de inmunógeno en PBS (tampón fosfato salino, 10 mM fosfato sódico, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4). Los animales recibieron 2-3 inyecciones más a intervalos de 3 semanas, emulsionadas en adyuvante incompleto de Freund. Transcurridas 3 semanas desde la última dosis, se les administró 100 : g de conjugado en 200 : 1 de PBS 4 días antes de la fusión celular.

5.2. FUSIÓN CELULAR.

El procedimiento seguido en la fusión celular fue semejante al descrito por Nowinski *et al.* (1979). La línea celular del mieloma de ratón P3-X63/Ag 8.653 (ATCC, Rockville, MD) se cultivó en medio DMEM suplementado con glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales 1 mM, gentamicina (25 : g/ml), y suero bovino fetal (15%), en adelante referido como medio s-DMEM. La población de linfocitos B se obtuvo por homogeneización del bazo del animal inmunizado. Los eritrocitos contenidos en la suspensión celular se lisaron por resuspensión en un tampón de baja fuerza iónica (NH₄Cl 0.155 M, Na₂EDTA 0.1 mM, KHCO₃ 0.01 M) e incubación durante 1 minuto en un baño de hielo. Posteriormente, la población de linfocitos se lavó tres veces con s-DMEM, siendo el último lavado con medio exento de suero, ya que las proteínas del suero interfieren en la fusión. Por otra parte, células de mieloma cultivadas en placas Petri y en fase exponencial de crecimiento, se recogieron y lavaron 2 veces con medio s-DMEM sin suero. Las 2 poblaciones celulares así obtenidas se mezclaron en una proporción 5:1 (linfocito:mieloma) y se fusionaron mediante la adición de 1.0 ml de PEG 1500. Al cabo de 1 minuto, la mezcla celular se diluyó lentamente (5 minutos) con s-DMEM y se distribuyó en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de $(2-5) \times 10^5$ células por pocillo, empleando 100 : 1 por pocillo. Un día después, a cada pocillo se añadieron 100 : 1 de medio de selección HAT (medio s-DMEM suplementado con 100 : M hipoxantina, 0.4 : M aminopterin a y 16 : M timidina). En el caso de las fusiones procedentes de los ratones inmunizados con haptenos del carbofuran, este medio contenía además un 2% de HFCS (v/v). Cuatro días después de la fusión, 100 : 1 de cada pocillo se sustituyeron por

medio HAT fresco y ocho días después de la fusión, otros 100 : 1 fueron reemplazados por medio HT (medio HAT sin aminopterin a).

5.3. SELECCIÓN DE HIBRIDOMAS Y CLONACIÓN.

Aproximadamente 11 días después de la fusión, los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante un “ELISA diferencial” para detectar la presencia de anticuerpos capaces de reconocer al analito correspondiente. Este procedimiento consiste en realizar, en pocillos adyacentes de una placa ELISA, un ensayo no competitivo y otro competitivo para probar, respectivamente, la capacidad de los anticuerpos de reconocer al conjugado de ensayo inmovilizado y al analito en disolución. Para cada sobrenadante de cultivo, la señal obtenida en condiciones no competitivas fue comparada con la obtenida en el ensayo competitivo, de forma que la relación de ambas absorbancias se usó como criterio para seleccionar los hibridomas que producían anticuerpos específicos de methiocarb y carbofuran: sólo aquellos pocillos cuya señal en el ensayo no competitivo se reducía un 50% en presencia de una concentración de analito de 1 : M fueron caracterizados en mayor profundidad. Los hibridomas finalmente seleccionados se clonaron siguiendo el procedimiento conocido como de la dilución límite. En el caso de las células productoras de anticuerpos anti-methiocarb se utilizó una capa acondicionadora (*feeder-layer*) de timocitos y de macrófagos peritoneales para favorecer el crecimiento de los hibridomas. En el caso de las células híbridas productoras de anticuerpos anti-carbofuran, se utilizó un medio HT complementado con un 2% de HFCS (v/v) como promotor del crecimiento celular. La clonación se efectuó a densidades celulares decrecientes (50, 10 y 2 células/pocillo). Una vez los cultivos mostraron un crecimiento celular aceptable, los sobrenadantes se ensayaron de nuevo mediante ELISA diferencial. Cuando se identificó en un pocillo un único clon positivo, éste se expandió hasta obtener células suficientes para almacenar en nitrógeno líquido y producir una cantidad aceptable de anticuerpo monoclonal.

5.4. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos se purificaron directamente a partir de los sobrenadantes de cultivo (100-200 ml). El primer paso consistió en una precipitación salina de los sobrenadantes mediante la adición de una disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado (1:1, v/v). La suspensión así obtenida se centrifugó durante 30 minutos a $1500 \times g$. En el caso de los anticuerpos de methiocarb, el precipitado obtenido se redisolvió en PBS, se dializó frente a tampón fosfato 5mM, NaCl 40 mM, pH 7.0 y a continuación se sometió a cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sepharose (18.5×2.5 cm) a un flujo de 1 ml/minuto, utilizando como eluyente un gradiente de NaCl (0-1 M) en tampón fosfato sódico 5 mM,

pH 7.0. Los anticuerpos de carbofuran, tras la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se sometieron a cromatografía de afinidad sobre proteína-G-Sepharose (columnas de 5 ml HiTrap de Amersham Pharmacia Biotech). Los anticuerpos purificados, tanto de carbofuran como de methiocarb, se precipitaron de nuevo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se conservaron a 4 °C. En estas condiciones, las inmunoglobulinas son estables durante varios años (Montoya y Castell, 1987).

6. INMUNOENSAYOS.

6.1. CONDICIONES GENERALES.

Independientemente del formato utilizado, todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y utilizando un volumen total de ensayo de 100 : 1. Las placas se tapizaron mediante la adición de 100 : 1 por pocillo de determinadas concentraciones de conjugado de OVA (formato CI) o de anticuerpo (formato AI), en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. Posteriormente, las placas se incubaron durante toda la noche. Las disoluciones estándar se prepararon mediante dilución seriada en PBS a partir de stocks en DMF, utilizando tubos de vidrio de borosilicato. Después de cada etapa, las placas se lavaron 4 veces con solución de lavado (NaCl 0.15 M con un 0.05% de Tween 20). La actividad de la peroxidasa unida a los pocillos de la placa de ELISA en la última etapa de cada ensayo, se reveló mediante la adición de 100 : 1 por pocillo de una disolución de OPD 2 mg/ml en tampón de revelado (citrato sódico 25 mM, fosfato sódico 62 mM, pH 5.4) con un 0.012% v/v de H₂O₂. La reacción enzimática se paró a los 10 minutos mediante la adición a cada pocillo de 100 : 1 de ácido sulfúrico 2.5 M, determinándose la absorbancia a 490 nm con el lector de placas de ELISA.

6.2. ELISA DE CONJUGADO INMOVILIZADO (FORMATO CI).

Para llevar a cabo los inmunoensayos competitivos, las placas se tapizaron a una concentración de 1 : g/ml para los conjugados de methiocarb y con una concentración de 0.01-0.1 : g/ml para los conjugados de carbofuran. Tras lavar, se añadieron a cada pocillo 50 : 1 de diferentes concentraciones de analito en PBS y 50 : 1 de la concentración apropiada de anticuerpo monoclonal en PBS-B (tampón PBS con un 0.1% de BSA). Tras 1 hora de incubación, las placas se lavaron y se añadió a cada pocillo 100 : 1 de una disolución 1/2000 de anticuerpo de conejo anti-ratón marcado con HRP, en PBS-T (tampón PBS con un 0.05% de Tween 20). La reacción se incubó durante 1 hora y, tras lavar de nuevo las placas, el ensayo se reveló como se ha indicado anteriormente. Estas condiciones de ensayo se utilizaron para caracterizar los anticuerpos en términos de afinidad y especificidad.

En los ensayos no competitivos, las etapas fueron las mismas, exceptuando que en la primera incubación no se añadió analito.

6.3. ELISA DE ANTICUERPO INMOVILIZADO (FORMATO AI).

Las placas se tapizaron con los anticuerpos de methiocarb o de carbofuran a una concentración de 1 : g/ml. A cada pocillo de la placa se añadieron 50 : 1 de diferentes concentraciones del analito en PBS y 50 : 1 de una concentración previamente determinada de trazador enzimático en PBS-B, estableciéndose la etapa de competición. Después de 1 hora de incubación, se midió la actividad enzimática como se ha indicado anteriormente.

6.4. ELISA DE ANTICUERPO INMOVILIZADO INDIRECTAMENTE (FORMATO AII).

La mejora que este formato podría aportar al desarrollo del inmunoensayo en el formato de anticuerpo inmovilizado únicamente se estudió para el methiocarb. La diferencia con el formato anterior consiste en el tapizado previo de las placas con un anticuerpo de cabra anti-ratón, a 2 : g/ml en tampón carbonato, seguido por una incubación de dos horas con el anticuerpo específico a 1 : g/ml en PBS-T.

7. OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO.

Se optimizaron dos tipos de inmunoensayos competitivos para methiocarb y carbofuran, un ELISA indirecto de conjugado inmovilizado (formato CI) y un ELISA directo de anticuerpo inmovilizado (formato AI). En el formato CI se utilizaron como conjugados de tapizado OVA-DPNH y OVA-BFNH y como anticuerpos específicos LIB-MXNB31 y LIB-BFNB67 para methiocarb y carbofuran, respectivamente. En el formato AI, los anticuerpos que se inmovilizaron en el soporte fueron también LIB-MXNB31 y LIB-BFNB67 y los conjugados enzimáticos utilizados fueron HRP-MCNH y HRP-BFNH, respectivamente. Para llevar a cabo la optimización, se estudió el efecto de las concentraciones de los inmunorreactivos y la influencia de factores externos como el tampón utilizado, el pH, la fuerza iónica y la presencia de disolventes orgánicos, sobre los parámetros analíticos de las curvas competitivas, con la finalidad de conseguir ELISAs de alta sensibilidad o, lo que es lo mismo, de baja I_{50} .

7.1. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS INMUNORREACTIVOS.

Mediante ELISAs no competitivos bidimensionales, en los que se variaban tanto la concentración de los conjugados de ensayo como la de los anticuerpos monoclonales, se estudió la afinidad del anticuerpo LIB-MXNB31 por el conjugado de tapizado OVA-DPNH y la del anticuerpo LIB-BFNB67 por el conjugado OVA-BFNH (formato CI), y la afinidad de esos mismos anticuerpos por los conjugados enzimáticos HRP-MCNH y HRP-BFNH, respectivamente (formato AI). De estas combinaciones se eligieron las concentraciones que producían una absorbancia entre 1 y 1.5, y se ensayaron en los correspondientes ELISAs competitivos.

7.2. INFLUENCIA DE LOS FACTORES EXTERNOS.

Estudio de la fuerza iónica. Para evaluar el efecto de la concentración salina del medio de reacción sobre los parámetros de la curva estándar de cada ensayo, las disoluciones estándar de los analitos para las curvas competitivas se prepararon en agua, mientras que los anticuerpos monoclonales (formato CI) y los trazadores enzimáticos (formato AI) se disolvieron en tampones de diferente fuerza iónica, manteniendo constante el pH (7.4). Para cubrir un amplio rango de fuerza iónica, estos tampones se prepararon diluyendo un tampón PBS 16×, que contenía un 0.1% de BSA, con agua que también contenía BSA a la misma proporción.

Estudio del pH. Para estudiar la influencia del pH sobre los inmunoensayos, las disoluciones estándar de los analitos para las curvas competitivas se prepararon en agua, mientras que los anticuerpos monoclonales y los conjugados enzimáticos se diluyeron en tampones de diferente pH. Se preparó un tampón citrato sódico 150 mM, Tris 150 mM e hidrogenofosfato disódico 150 mM con BSA al 0.1%, pH 10. Alícuotas de 200 ml se ajustaron a diferentes pH con HCl concentrado, y la fuerza iónica se ajustó al mismo valor en todos los tampones ($I = 1487$ mM) mediante la adición de NaCl 4 M con 0.1% de BSA. Después de la confirmación del pH, cada alícuota se diluyó 1/2 con agua que contenía un 0.1% de BSA para conseguir tampones con una fuerza iónica similar a la del PBS 4×.

7.3. PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGÁNICOS.

Se determinó el efecto sobre los ensayos de methiocarb y carbofuran de varios disolventes polares habitualmente utilizados en la preparación de muestras para el análisis cromatográfico de plaguicidas: metanol, etanol, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano y 2-propanol. Las disoluciones estándar de analito para las curvas competitivas se prepararon en tampón PBS 2× y los anticuerpos monoclonales y los trazadores enzimáticos en tampón PBS-B 2× (tampón PBS 2× con 0.1% BSA) con diferentes cantidades de estos disolventes (0 - 40%).

8. ESTIMACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS.

8.1. PARÁMETROS DE LA CURVA ESTÁNDAR.

Las curvas estándar se obtuvieron por triplicado, procesándose los valores medios de absorbancia para cada concentración de analito. Estas curvas se ajustaron a la siguiente ecuación de cuatro parámetros (Raab, 1983):

$$y = (A-D) / [1 + (x / C)^B] + D$$

donde A es el valor de la asíntota máxima, B es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, C es la concentración de analito en el punto de inflexión, que produce una inhibición aproximadamente igual al 50% de la señal máxima (I_{50}) y D es el valor de la asíntota mínima. Como ya se mencionó en el apartado 3.3.3.1 de la introducción a esta memoria, la I_{50} es una estimación tanto de la afinidad del anticuerpo hacia el analito como de la sensibilidad del método, de manera que cuanto más sensible sea un inmunoensayo, menor será su I_{50} .

En algunos casos las señales se normalizaron expresándolas como el porcentaje de la señal máxima ($A/A_{\max} \times 100$) para cada concentración de analito.

8.2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA.

La especificidad es un aspecto crucial en un inmunoensayo y depende tanto del anticuerpo como del trazador o del conjugado de tapizado. La especificidad de los inmunoensayos de carbofuran y methiocarb se evaluó estimando la capacidad de los anticuerpos monoclonales LIB-MXNB31 y LIB-BFNB67 de reconocer a sus metabolitos y a otros compuestos relacionados en mayor o menor medida con estos plaguicidas. Para ello, se llevaron a cabo ensayos competitivos utilizando estos compuestos para la preparación de curvas estándar. Las curvas de inhibición, obtenidas por triplicado, se ajustaron a la ecuación sigmoide de cuatro parámetros, determinándose la I_{50} para cada uno de los analitos. La reactividad cruzada (RC) se calculó como sigue:

$$RC = (I_{50} \text{ methiocarb o carbofuran}) / (I_{50} \text{ analito}) \times 100$$

9. APLICACIÓN DE LOS ELISAs DE CARBARYL, CARBOFURAN Y METHIOCARB AL ANÁLISIS DE FRUTAS Y HORTALIZAS. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN Y VALIDACIÓN.

9.1. FORTIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.

Estas tareas se realizaron en el Laboratorio Agroalimentario de la Comunidad Valenciana. Diferentes frutas (naranja, fresón y manzana) y hortalizas (tomate, pepino, pimiento y patata) adquiridas en supermercados locales, fueron analizadas por HPLC para comprobar la presencia de residuos de carbaryl, carbofuran y methiocarb. Ninguno de estos analitos fue detectado. Se preparó una mezcla de los tres *N*-metilcarbamatos, cada uno de ellos a 200 ppb en diclorometano, a partir de stocks a 20 ppm. Esta mezcla se diluyó con diclorometano para obtener disoluciones de fortificación a 2, 10 y 40 ppb. 75 ml de estas mezclas se añadieron a 15 g de las matrices vegetales previamente trituradas, obteniéndose muestras fortificadas a 10, 50 y 200 ppb (muestras de concentración conocida). De forma similar se prepararon otras muestras cuya concentración de plaguicida nos era desconocida (muestras ciegas), y que fueron utilizadas en los estudios de validación. Después de 10 minutos de contacto entre la disolución de fortificación y la muestra, el disolvente orgánico fue eliminado a baja presión en un baño de agua a 30 °C. El proceso de extracción y purificación fue llevado a cabo según el método descrito por de Kok y Hiemstra, 1992. Las muestras fortificadas se homogeneizaron con 30 ml de acetona con un Ultra-Turrax T-25 durante 30 segundos. A continuación se añadieron 30 ml de diclorometano y 30 ml de hexano y la mezcla se homogeneizó durante 60 segundos. Después, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm y la fase orgánica se transfirió a una probeta para determinar el volumen recuperado. Dos porciones de 20 ml fueron transferidas a matraces cónicos y el disolvente se evaporó a baja presión en un baño de agua a 30-35 °C. Una de las alícuotas se redisolvió en 10 ml de agua a pH 3, mientras que la otra fue redisoluelta en 10 ml de diclorometano y purificada sobre una columna BondElut-NH₂ de 1 g, previamente acondicionada con 10 ml de diclorometano. Los plaguicidas se eluyeron con 5 ml de diclorometano y 10 ml de una mezcla etanol-diclorometano 1:99. Aunque este tipo de columna es muy eficiente para limpiar la muestra de los componentes de la matriz, los *N*-metilcarbamatos no son del todo retenidos bajo estas condiciones. Así pues, para evitar pérdidas en esta etapa, el eluyente se empezó a recoger al mismo tiempo que la muestra fue introducida en la columna. El eluido se concentró a sequedad en el rotavapor, y después el residuo se disolvió con 10 ml de agua a pH 3, conteniendo un 10 % de metanol, y se filtró utilizando

filtros GELMAN Acrodisc GHP 13 mm, 0.45 : m. Los extractos en agua (muestras no purificadas) fueron determinados únicamente por ELISA, mientras que los extractos purificados se analizaron por ELISA y HPLC. Ambos tipos de muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

9.2. DETERMINACIONES POR ELISA.

Todas las incubaciones tuvieron lugar a temperatura ambiente. Después de cada etapa, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado.

Formato de conjugado inmovilizado (CI). Las placas se tapizaron con 100 : l/pocillo de los siguientes conjugados para los ensayos de carbaryl, carbofuran y methiocarb, respectivamente: OVA-CNA11 a 1 : g/ml, OVA-BFNH a 0.01 : g/ml y OVA-DPNH a 1 : g/ml, en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. Después de incubar las placas durante toda la noche, se añadió a cada pocillo 50 : l de las muestras o de las disoluciones patrón preparados en tampón F (tampón 100 mM fosfato sódico, 137 mM NaCl, pH 7.2) y 50 : l de las disoluciones de los anticuerpos monoclonales frente a carbaryl (LIB-CNH45 a 0.04 : g/ml), carbofuran (LIB-BFNB67 a 0.05 : g/ml) y methiocarb (LIB-MXNB31 a 0.04 : g/ml), preparadas en tampón FB (tampón F que contiene 0.1% BSA y 0.02% thimerosal). La reacción se incubó durante una hora. Transcurrido este tiempo, se añadió una disolución 1/2000 de anticuerpo marcado preparada en tampón PBST. Al cabo de una hora, la actividad enzimática que quedó unida a la placa se determinó como se ha indicado anteriormente.

Formato de anticuerpo inmovilizado (AI). Las placas se tapizaron con 100 : l/pocillo de los anticuerpos LIB-CNH45 a 1.5 : g/ml, LIB-BFNB67 a 1 : g/ml y LIB-MXNB31 a 0.75 : g/ml, preparados en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. Después de incubar las placas toda la noche, se añadió a cada pocillo 50 : l de las disoluciones patrón o del extracto de muestra, adecuadamente diluidos en tampón F, seguido por 50 : l de las disoluciones de los trazadores enzimáticos HRP-CPNU a 0.07 : g/ml, HRP-BFNH a 0.1 : g/ml y HRP-MCNH a 0.4 : g/ml respectivamente, preparadas en tampón de ensayo FB. Al cabo de una hora, la actividad enzimática que quedó unida a la placa se determinó como se ha indicado anteriormente.

9.3. DETERMINACIONES POR HPLC.

Esta fase del trabajo se realizó también en el Laboratorio Agroalimentario de la Comunidad Valenciana. La separación analítica de los plaguicidas tuvo lugar sobre una columna en fase reversa Waters C₁₈ (tamaño de partícula 4 : m), 150 × 3.9 mm, y fue

usada conjuntamente con una columna de guarda Waters Nova-Pak C₁₈. La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y el volumen de la muestra inyectada fue de 400 : 1. El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1.5 ml/minuto.

Los patrones de calibración de la mezcla de plaguicidas a 100, 25 y 5 ppb fueron preparados en agua a pH 3 a partir de soluciones stock individuales que se pasaron al empezar el análisis y cada diez muestras.

Las migraciones cromatográficas se obtuvieron utilizando un gradiente ternario cuyo perfil se muestra en la tabla 2.1. La temperatura del reactor post-columna se mantuvo a 80 °C. Las disoluciones de NaOH y OPA fueron introducidas, a un flujo de 0.5 ml/minuto, en la columna donde tiene lugar la hidrólisis y en el sistema de derivatización, respectivamente. La detección de los plaguicidas como derivados fluorescentes del isoindol se llevó a cabo utilizando 339 nm como longitud de onda de excitación y 445 nm como longitud de onda de emisión.

Tabla 2.1. Condiciones de gradiente para el análisis de N-metilcarbamatos por HPLC.

Tiempo (min)	Agua (%)	Metanol (%)	Acetonitrilo (%)	Curva ^a
Inicial	88	12	0	-
4.00	88	12	0	1
4.10	68	16	16	3
16.10	30	35	35	10
19.00	88	12	0	9

^aFormas de las curvas de gradiente: (1) instante de transición, (3) curva convexa, (9), (10) curva cóncava.

10. DESARROLLO DEL ELISA MULTIANALITO.

Después de desarrollar ELISAs individuales para el análisis de methiocarb y carbofuran, y disponiendo de otro para el carbaryl, se intentó igualar las sensibilidades de todos ellos con la finalidad de integrarlos en un ensayo multiresiduo que permitiera la detección simultánea de estos tres plaguicidas. Como el ensayo menos sensible fue el de carbofuran, se buscaron aquellas combinaciones de inmunorreactivos que proporcionaban I_{50} mayores, similares a la del ELISA de carbofuran, en los ELISAs de carbaryl y methiocarb.

El ELISA multianalito se intentó desarrollar desde un principio en el formato CI, tapizando diferentes pocillos de la placa ELISA con los conjugados específicos de cada analito, y con posterior incubación simultánea de una mezcla patrón de los tres analitos, y de una mezcla de los tres anticuerpos específicos y del segundo anticuerpo marcado, lo que permitiría reducir el ensayo a una única etapa.

Un requerimiento fundamental en este formato de ensayo multianalito, es la ausencia de reconocimientos cruzados entre un anticuerpo monoclonal determinado y los conjugados de ensayo correspondientes a los otros analitos. Para establecer la compatibilidad de los inmunorreactivos se utilizaron tanto ELISAs no competitivos como competitivos.

ELISAs no competitivos. La finalidad de estos ensayos fue determinar la especificidad de cada anticuerpo seleccionado hacia los haptenos conjugados de OVA de los otros dos analitos, evitándose de esta forma posibles interferencias posteriores.

ELISAs competitivos. Una vez escogidas mediante ELISAs no competitivos las parejas de inmunorreactivos compatibles más adecuadas, los ELISAs competitivos se utilizaron para determinar sus concentraciones óptimas en el ensayo multianalito. Además, se utilizaron también para confirmar la ausencia de reconocimientos cruzados anticuerpo-conjugado. Para llevar a cabo este estudio se diseñaron dos tipos de experiencias.

En la primera de ellas, se tapizaron diferentes regiones de tres placas con los conjugados seleccionados, y en cada placa se ensayó la curva estándar de la mezcla de los tres analitos con un anticuerpo. De este modo debían de hacerse evidentes aquellos casos no deseables en los que pudieran aparecer curvas competitivas asociadas a la

combinación de un determinado anticuerpo con conjugados de ensayo distintos al de su correspondiente analito.

En la segunda experiencia se tapizaron tres placas, una con cada uno de los conjugados seleccionados. En cada placa se ensayaron cuatro combinaciones posibles: la curva estándar del analito correspondiente al tapizado con su anticuerpo, la curva estándar de ese analito con una mezcla de los tres anticuerpos, la curva estándar de una mezcla de los tres analitos con el anticuerpo correspondiente al tapizado y la curva estándar de una mezcla de los tres analitos con una mezcla de los tres anticuerpos.

Las condiciones generales tanto de los ELISAs competitivos como de los no competitivos son básicamente las mismas que las descritas en el apartado 9.2 de este capítulo, excepto que el medio de dilución de los anticuerpos es el tampón FT, en el que se ha sustituido la BSA del tampón FB por Tween 20, para paliar las interferencias inespecíficas producidas por la adición del anticuerpo marcado a la etapa de competición. Tanto el tampón FT como el tampón de dilución de los analitos (tampón F) se prepararon a una concentración $5\times$ y se diluyeron 5 veces con agua destilada en el momento de su uso.

11. APLICACIÓN DEL ENSAYO MULTIANALITO. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

La evaluación de la capacidad del ensayo multianalito para determinar cada plaguicida individualmente, incluso en presencia de los otros dos, se llevó a cabo sobre 14 muestras de tampón F fortificadas con diferentes concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb, a partir de stocks a 100 y a 2 ppm preparados en DMF.

Por otra parte, el ensayo multianalito también se aplicó al análisis de las muestras que se utilizaron en la validación de los ensayos individuales, y cuya preparación ya se ha descrito en el apartado 9.1 de esta sección.

Las medidas se obtuvieron interpolando las absorbancias sobre una recta de calibración formada por tres puntos, correspondiente a la parte central de las curvas sigmoides del ensayo competitivo. En cada ensayo se incluyó siempre un blanco de ausencia de analito.

Condiciones del ELISA. La placa se tapizó con 100 : l/pocillo de los conjugados OVA-2NAH (para carbaryl), OVA-BFNH (para carbofuran) y OVA-MCNP (para methiocarb) a 2, 0.1 y 4 : g/ml respectivamente, en tampón carbonato pH 9.6. Después de incubar toda la noche a temperatura ambiente, las placas se lavaron cuatro veces. A continuación, se añadió 50 : l/pocillo de las muestras a diferentes diluciones y de los patrones de calibración diluídos 1/250 en tampón F. Los patrones de calibración se preparaban diariamente en tampón F a partir de un stock 50 ppm de carbaryl y methiocarb y 200 ppm de carbofuran en DMF, y contenían las siguientes concentraciones de analitos:

- ST1: 500 ppb de carbaryl y methiocarb y 2000 ppb de carbofuran.
- ST2: 100 ppb de carbaryl y methiocarb y 400 ppb de carbofuran.
- ST3: 25 ppb de carbaryl y methiocarb y 100 ppb de carbofuran.

Seguidamente, se añadió a cada pocillo 50 : l de la mezcla de anticuerpos monoclonales diluída 1/100 en tampón FT que contenía el anticuerpo marcado a una dilución 1/500. Esta mezcla estaba formada por los anticuerpos monoclonales LIB-CNH45, LIB-BFNB67 y LIB-MXNH14 a 14, 8 y 40 : g/ml, respectivamente. Después de incubar la reacción una hora a temperatura ambiente, y lavar las placas cuatro veces, la actividad peroxidasa unida a los pocillos se determinó tal como se ha descrito.

PARTE III:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS PARA EL METHIOCARB.

1.1. SÍNTESIS DE HAPTENOS.

La etapa inicial, quizás la más crítica en el desarrollo de inmunoensayos para plaguicidas, consiste en el diseño y la síntesis del hapteno apropiado que se va a utilizar en la preparación de los conjugados inmunogénicos. La gran importancia que se le atribuye a esta etapa radica en el hecho de que la especificidad y la afinidad de los anticuerpos están fundamentalmente determinadas por la estructura de dicho hapteno (Harrison *et al.*, 1990; Goodrow *et al.*, 1995). En este sentido, y tal como se expuso en el apartado 3.3.1 de la *Introducción*, un hapteno inmunizante debería de tener una estructura lo más parecida posible a la del plaguicida y las mismas propiedades geométricas, electrónicas e hidrofóbicas. Además, el brazo espaciador no debería de tener grupos de fuerte carácter antigénico como anillos aromáticos, dobles enlaces o heteroátomos, y debería de estar separado de un determinante hapténico importante para facilitar su reconocimiento. No obstante, la incertidumbre sobre el diseño de haptenos es de tal magnitud que el criterio más extendido de conservar al máximo la estructura del analito presenta notables excepciones. Así, Schlaeppli *et al.* (1992), Mercader *et al.* (1995), Queffelec *et al.*, (1998) y Simon *et al.*, (1998) han descrito la producción de anticuerpos para triasulfuron, azinphos-methyl, deltamethrin y metsulfuron-methyl, respectivamente, a partir de haptenos consistentes únicamente en una parte de la estructura completa del plaguicida.

Siguiendo la aproximación química que se utilizó para sintetizar los haptenos de carbaryl (Abad y Montoya, 1994), se han obtenido tres haptenos inmunizantes para methiocarb: MXNP, MXNB y MXNH (figura 3.1.1), mediante la introducción directa, a través del grupo carbamato, de un brazo espaciador de diferente longitud. Los haptenos sintetizados de esta manera, es decir, mediante la elongación de una cadena alifática presente en el analito, apenas modifican la estructura y la distribución electrónica de la molécula de methiocarb, por lo que pueden ser considerados como muy adecuados para la producción de anticuerpos frente a esta molécula. Además de los haptenos inmunizantes, se han sintetizado otros para ser utilizados como haptenos de ensayo, que presentan heterología estructural y de brazo espaciador con respecto al inmunizante. La síntesis de este tipo de haptenos puede ser una valiosa aproximación para aumentar la sensibilidad de los inmunoensayos que se vayan a desarrollar. En nuestro caso, se ha sintetizado un panel de 15 haptenos heterólogos agrupados en 5 series (figura 3.1.1), que difieren de los haptenos inmunizantes en el número de sustituyentes en el anillo (MCN*,

DPN*, MPN* y PN*) o en el tipo de brazo espaciador (serie MXO*). Además, los haptenos de la misma serie difieren entre sí en la longitud del brazo espaciador. Así, el hapteno MXOA tienen un brazo espaciador derivado del cloroacetato de etilo, los haptenos *P tienen un brazo espaciador derivado del ácido aminopropanoico, los haptenos *B tienen un brazo espaciador derivado del ácido aminobutírico o del 4-bromobutirato de etilo y los haptenos *H tienen un brazo espaciador derivado del ácido aminohexanoico o del 6-bromohexanoato de etilo.

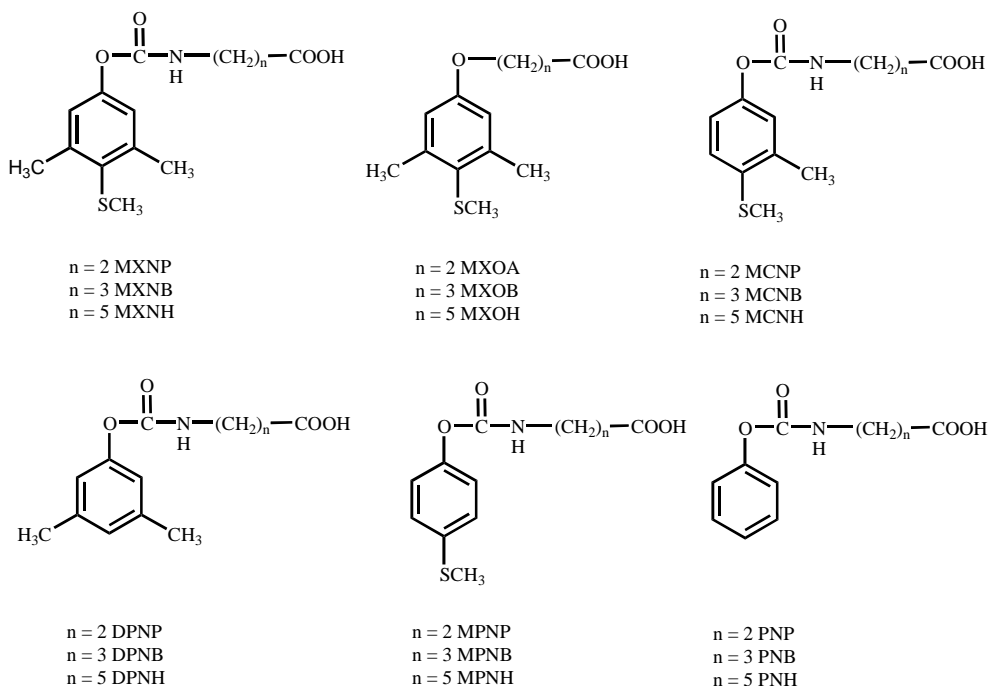


Figura 3.1.1. Estructuras de los haptenos sintetizados para methiocarb.

1.2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A METHIOCARB.

1.2.1. Caracterización de los antisueros de ratón.

Para evaluar si los inmunógenos preparados eran adecuados para inducir la producción de anticuerpos que reconocieran al methiocarb, se inmunizaron tres ratones con cada uno de los haptenos de la serie MXN* conjugados a BSA. Una semana después de la tercera inyección, se obtuvo suero de cada ratón para evaluar la concentración de anticuerpos capaces de reconocer a los haptenos inmunizantes conjugados a OVA, mediante un ELISA no competitivo, y su capacidad de unirse al methiocarb, representada por los valores de I_{50} , en un ELISA competitivo. Todos los sueros ensayados reconocieron a sus correspondientes conjugados homólogos con diluciones alrededor de 1×10^5 (tabla 3.1.1). Además, se unían competitivamente al methiocarb con valores de I_{50} comprendidos entre 121 y 1128 nM. Según estos resultados, los tres haptenos parecen ser válidos para la producción de anticuerpos monoclonales frente al methiocarb, ya que no se observó una influencia clara de la longitud del brazo espaciador del hapteno.

Tabla 3.1.1. Resumen de la fusión celular y de los resultados de la selección de hibridomas.

hapteno inmunizante	no. de ratón	I_{50} del suero ^a (nM)	no. de pocillos			no. de hibridomas ^d clonados
			sembrados	positivos ^b (conjugado)	competitivos ^c (analito)	
MXNP	1	329	288	22	2	2 ^e
	2	121	288	46	46	2
	3	428	288	150	0	0
MXNB	1	618	288	14	1	1 ^e
	2	156	288	4	0	0
	3	1128	384	177	16	2
MXNH	1	273	384	150	12	4
	2	713	288	141	20	4
	3	694	288	4	0	0

^aLas placas ELISA se tapizaron con el conjugado homólogo a $1 : \text{g/ml}$ y la dilución del antisuero se determinó previamente para obtener una señal máxima alrededor de 1. ^bPocillos con anticuerpos que reconocieron los haptenos homólogos conjugados a OVA en un ELISA indirecto (absorbancia > 0.5). ^cPocillos que reconocieron $0.1 : \text{M}$ de methiocarb (inhibición $> 50\%$). ^dSólo los hibridomas que secretaron los anticuerpos de mayor afinidad hacia methiocarb fueron estabilizados y clonados. ^eEstos hibridomas se abandonaron durante el proceso de clonación debido a que se obtuvieron mejores anticuerpos.

1.2.2. Producción de anticuerpos monoclonales.

La respuesta policlonal producida frente a un antígeno es una mezcla compleja de anticuerpos que muestran diferente especificidad y afinidad hacia dicho antígeno. Una de las ventajas de la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales es que permite seleccionar aquellas células productoras de los anticuerpos de mayor afinidad. Por tanto, es posible encontrar anticuerpos monoclonales con una afinidad hacia el analito de hasta 3 ó 4 órdenes de magnitud mayor que la del antisuero del ratón a partir del cual dichos anticuerpos fueron producidos (Abad y Montoya, 1994; Jones *et al.*, 1995). Para el methiocarb se realizaron nueve fusiones, tres por cada inmunógeno. Los resultados de los hibridomas obtenidos y de su posterior selección se presentan en la tabla 3.1.1. En líneas generales, todas las fusiones rindieron pocillos con anticuerpos que reconocían el correspondiente conjugado homólogo, pero sólo unos pocos resultaron competitivos con una concentración de methiocarb 0.1 : M. De todos ellos, solamente se clonaron y expandieron los 12 hibridomas que presentaban la máxima afinidad hacia methiocarb: 2 hibridomas procedían de ratones inmunizados con el hapteno de brazo espaciador más corto (MXNP), otros 2 hibridomas procedían de los que habían sido inmunizados con el hapteno de brazo espaciador intermedio (MXNB) y los 8 restantes habían sido producidos con el hapteno de brazo espaciador más largo (MXNH). El hecho de que el mayor número de hibridomas derivara de MXNH no debería ser atribuido necesariamente a la longitud del brazo espaciador, sino a la alta variabilidad que entraña el proceso de la fusión celular (Harlow y Lane, 1988).

Los anticuerpos monoclonales obtenidos fueron purificados a partir de los sobrenadantes de cultivo para proceder a su caracterización. La afinidad de estos anticuerpos hacia el methiocarb fue estimada a partir de las curvas de inhibición en el formato de ELISA homólogo con conjugado inmovilizado (formato CI). En estas condiciones, se obtuvieron valores de I_{50} entre 1 y 10 nM, lo cual significa un aumento de 2 órdenes de magnitud con respecto a la afinidad mostrada por los antisueros de ratón evaluados en las mismas condiciones.

1.3. DISEÑO DE INMUNOENSAYOS PARA METHIOCARB.

Los 6 anticuerpos monoclonales que mostraron el menor valor de I_{50} en el ELISA homólogo de conjugado inmovilizado, se utilizaron para el diseño de los inmunoensayos de methiocarb en los formatos CI y AI.

1.3.1. Ensayos en el formato de conjugado inmovilizado.

En primer lugar se evaluó, mediante ELISAs no competitivos, el número de conjugados heterólogos y la extensión en la que eran reconocidos por los anticuerpos seleccionados. Los resultados obtenidos (tabla 3.1.2) muestran un patrón de reconocimiento de los conjugados de OVA diferente para cada anticuerpo. Así, mientras LIB-MXNP22 reconoció solamente tres conjugados, LIB-MXNH31 reconoció 12 de los 18 conjugados. Como era de esperar, los conjugados mejor reconocidos por todos los anticuerpos son los derivados de los haptenos pertenecientes a la serie MXN*, la misma que fue utilizada para inmunizar los ratones y que solo difieren en la longitud del brazo espaciador. Por otra parte, los conjugados provenientes de los haptenos de la serie PN*, que no tiene ningún sustituyente en el anillo, no fueron reconocidos por ninguno de los anticuerpos, y los que proceden de la serie MPN*, con un único sustituyente en el anillo, sólo fueron bien reconocidos por LIB-MXNB31, al igual que los procedentes de la serie MXO*, que se caracterizan por tener el brazo espaciador directamente unido al átomo de oxígeno del precursor fenólico, por lo que este anticuerpo puede ser considerado como el menos susceptible a los cambios producidos en la estructura del hapteno de ensayo. Se encontró una situación intermedia para los conjugados inmovilizados derivados de los haptenos de las series MCN* y DPN*, ambas con dos sustituyentes en el anillo. Estos conjugados, especialmente los que tienen un brazo espaciador de 4 y 6 átomos de carbono, fueron reconocidos con un alto título por casi todos los anticuerpos. El hecho de que los haptenos MXO*, que carecen del grupo carbamato, solamente fueron reconocidos por LIB-MXNB31, hace reflexionar sobre la aproximación química seguida para obtener haptenos heterólogos para esta clase de plaguicidas, y evidencia la importancia del grupo carbamato en el reconocimiento de los haptenos heterólogos por parte de los anticuerpos.

En cualquier caso, estos resultados confirman que la relación entre la estructura del hapteno y su utilidad como hapteno de ensayo depende del anticuerpo. Por tanto, es esencial disponer de un amplio panel de anticuerpos y haptenos para el desarrollo de un inmunoensayo.

Tabla 3.1.2. Reconocimiento de los haptenos conjugados a OVA por los anticuerpos de methiocarb en el formato CI^a.

Hapteno conjugado	Anticuerpos Monoclonales					
	LIB-MXNP22	LIB-MXNB31	LIB-MXNB33	LIB-MXNH14	LIB-MXNH15	LIB-MXNH22
MXNP	+	+	+	+	+	+
MXNB	+	+	+	+	+	+
MXNH	+	+	+	+	+	+
MCNP		+	+/-	+/-	+/-	
MCNB		+	+	+	+	+/-
MCNH		+	+	+	+	+/-
DPNP				+/-		
DPNB		+	+/-	+	+/-	
DPNH		+		+	+	
MPNP						
MPNB		+				
MPNH		+		+/-		
PNP						
PNB						
PNH						
MXOA		+		+/-		
MXOB		+	+			
MXOH		+				

^aLas placas ELISA se tapizaron con los conjugados de OVA a 1 : g/ml. Los símbolos indican la concentración de anticuerpo que proporciona una absorbancia de 1 en las condiciones establecidas: < 0.02 : g/ml (+); entre 0.02 y 0.3 : g/ml (+/-); >0.3 : g/ml (sin símbolo). Las combinaciones homólogas están destacadas con un círculo.

Tras evaluar el patrón de reconocimiento de cada anticuerpo hacia los conjugados de OVA, se obtuvieron curvas de inhibición utilizando methiocarb como competidor. Casi todos los anticuerpos incrementaron su afinidad aparente hacia methiocarb por el uso de conjugados heterólogos, con disminuciones en los valores de I_{50} de hasta un orden de magnitud (tabla 3.1.3, formato CI). En este sentido, la I_{50} del anticuerpo monoclonal LIB-MXNB31 cambió de 1.65 nM con OVA-MXNB (hapteno homólogo) a 0.12 nM con el conjugado OVA-DPNH. También se observaron aumentos de sensibilidad de 4-6 veces con los anticuerpos LIB-MXNB33, -MXNH14, y -MXNH15. Sin embargo, no se observaron mejoras significativas con los anticuerpos LIB-MXNP22 y -MXNH22 (datos no mostrados). En la figura 3.1.2 se muestran las curvas competitivas de los 4 anticuerpos monoclonales que incrementaron su afinidad aparente hacia methiocarb por el uso de conjugados heterólogos. En líneas generales, se puede afirmar que los haptenos de ensayo pertenecientes a la misma serie, es decir, que sólo se diferencian en la longitud del brazo espaciador, proporcionaron ensayos con valores de I_{50} muy similares. Por consiguiente,

aunque los haptenos con heterología de longitud de brazo espaciador son fáciles de preparar, no se debería esperar, siguiendo esta estrategia, grandes mejoras en la sensibilidad.

Tabla 3.1.3. Estudio de la influencia del formato de ELISA y de la heterología de hapteno para los 4 anticuerpos de methiocarb seleccionados ^a.

hapteno conjugado		LIB-MXNB31			LIB-MXNB33			LIB-MXNH14			LIB-MXNH15		
		formato ^b			formato			formato			formato		
		CI	AI	AII	CI	AI	AII	CI	AI	AII	CI	AI	AII
MXNB	I ₅₀	1.65		0.53	0.92	0.62	0.80	0.85		0.47	0.46		
	A _{max}	0.86		1.44	1.13	0.87	1.10	1.22		0.84	1.34		
MXNH	I ₅₀	1.13	0.39	0.92	0.93	0.89	1.43	0.91		0.63	0.69	0.61	0.81
	A _{max}	1.04	0.48	1.90	1.26	1.02	1.19	1.32		0.95	1.39	0.68	0.87
MCNH	I ₅₀	0.21	0.11	0.60	0.22	0.39	0.69	0.14	0.20	0.47	0.14	0.30	0.53
	A _{max}	1.41	0.76	2.26	0.83	0.85	1.14	1.44	0.76	1.21	1.15	1.03	1.14
DPNH	I ₅₀	0.12		0.33			0.53	0.22	0.19	0.32	0.14	0.23	0.31
	A _{max}	1.13		0.93			0.84	1.22	0.90	1.19	0.97	0.81	1.01

^aLos valores de I₅₀ están expresados en nM, A_{max} fue medida a 490 nm, y las combinaciones homólogas están indicadas en negrita. Las casillas vacías indican que estas combinaciones no se ensayaron porque no proporcionaron suficiente señal máxima en ausencia de analito. ^bCI, formato de conjugado inmovilizado; AI, formato de anticuerpo inmovilizado; AII, formato de anticuerpo inmovilizado indirectamente. Los conjugados de OVA se utilizaron a 1 : g/ml. La concentración de los conjugados de HRP varió de 0.06-1 : g/ml dependiendo del trazador utilizado y de si el anticuerpo se inmovilizaba directamente a la placa (formato AI) o a través de un anticuerpo de captura (formato AII). La concentración de los anticuerpos específicos inmovilizados fue 1 : g/ml y en ensayo varió entre 0.015-0.03 : g/ml dependiendo del conjugado de OVA utilizado. Los anticuerpos de captura se utilizaron a 2 : g/ml.

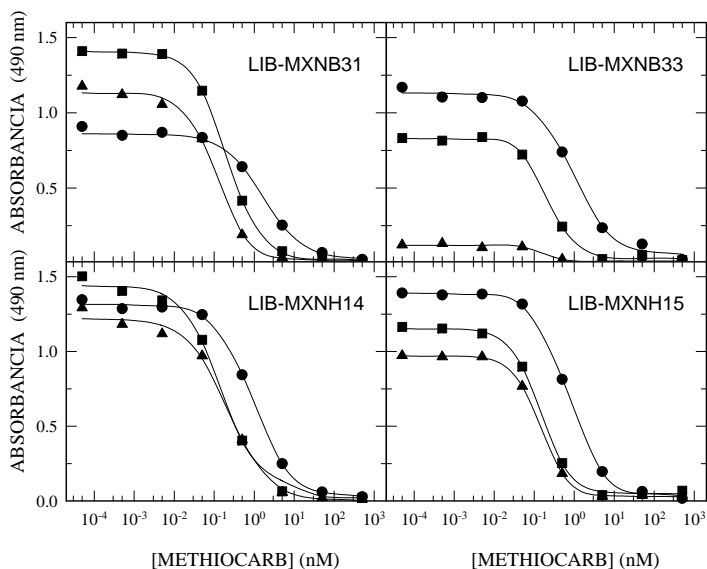


Figura 3.1.2. Ensayos competitivos de methiocarb en el formato CI. Se han utilizado los AcM indicados en las gráficas, y los haptenos: (□) homólogo, (△) MCNH y (●) DPNH conjugados a OVA, a una concentración de 1 : g/ml.

1.3.2. Ensayos en el formato de anticuerpo inmovilizado.

De la misma manera que se hizo en el formato CI, se llevaron a cabo experiencias no competitivas antes de los ensayos de inhibición para ver qué conjugados enzimáticos y en qué medida eran reconocidos en los formatos AI y AII. Se ensayaron concentraciones de los haptenos conjugados a HRP (trazadores enzimáticos) desde 1 ng/ml a 1 : g/ml, en placas tapizadas con 1 : g/ml de anticuerpo unido directamente a la placa. Sólomente los conjugados enzimáticos derivados de los haptenos MXNB, MXNH, MCNH y DPNH fueron reconocidos y no por todos los anticuerpos. De hecho, LIB-MXNP22 y LIB-MXNH22 no reconocieron a ninguno de los 12 conjugados ensayados, LIB-MXNB31 y LIB-MXNH14 reconocieron 2 conjugados y LIB-MXNH15 y LIB-MXNB33 sólo reconocieron 3. Hay dos hechos que llaman especialmente la atención. Por una parte, el anticuerpo LIB-MXNB31, que es el que más conjugados a OVA reconocía, no es el que se une a más trazadores. Por otra parte, LIB-MXNH14 y LIB-MXNB31 sólo reconocieron trazadores heterólogos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en este campo, los cuales indican que el número de haptenos acoplados a HRP reconocidos por un anticuerpo es siempre menor que el

número de haptenos conjugados a OVA (Manclús y Montoya, 1996a; Manclús *et al.*, 1996; Abad *et al.*, 1997 a,b). Más aun, es poco probable que un anticuerpo determinado reconozca un trazador enzimático si el mismo hapteno conjugado a OVA no es reconocido en el formato CI. El hecho de que ninguno de los haptenos con el brazo espaciador derivado del ácido aminopropanoico (haptenos *P), y que sólo uno de los que poseen el brazo espaciador derivado del ácido aminobutírico (MXNB) fuera reconocido por los anticuerpos inmovilizados, está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores, que indican que los haptenos con brazos espaciadores cortos son menos apropiados para formar conjugados enzimáticos, probablemente debido a impedimentos estéricos (Skerrit *et al.*, 1992; Bekheit *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1994).

Las combinaciones anticuerpo monoclonal-trazador que proporcionaron suficiente señal, se utilizaron en ensayos competitivos frente a methiocarb. Los valores de I_{50} , comprendidos entre 0.1 y 0.9 nM, fueron muy similares a los encontrados en el formato CI (tabla 3.1.3). La sensibilidad del ensayo también mejoró por el uso de trazadores heterólogos con respecto a los homólogos, aunque esta mejoría no fue tan acusada como la que se encontró en el formato CI. No obstante, la I_{50} del anticuerpo LIB-MXNH15 disminuyó 3 veces con el conjugado HRP-DPNH. En la figura 3.1.3 se muestran las curvas competitivas de los 4 anticuerpos monoclonales que reconocieron a los conjugados heterólogos HRP-MCNH y HRP-DPNH.

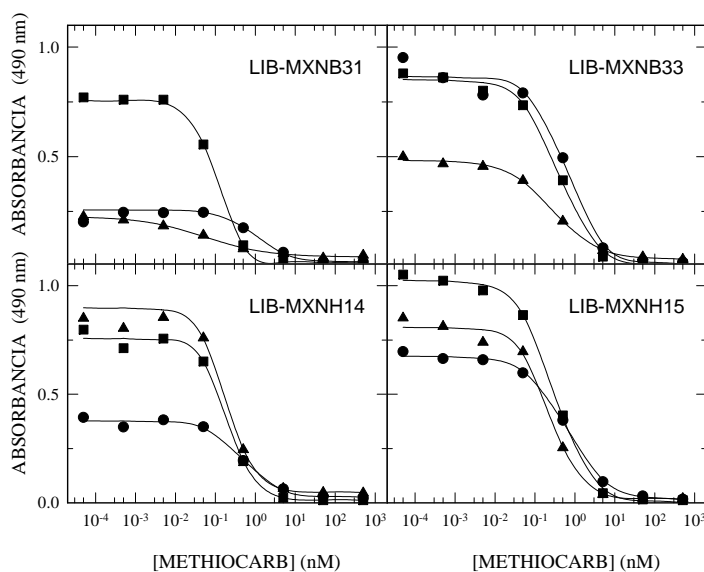


Figura 3.1.3. Ensayos competitivos de methiocarb en el formato AI. Se han utilizado los AcM indicados en las gráficas a 1 : g/ml y los haptenos: () homólogo, () MCNH y (•) DPNH conjugados a HRP.

Una vez determinado el patrón de reconocimiento hacia los diferentes conjugados enzimáticos por parte de los anticuerpos inmovilizados en la placa, se estudió si dicho patrón resultaba afectado por la utilización de una etapa de pretapizado con inmunoglobulina de cabra anti-ratón (formato de anticuerpo inmovilizado indirecto, formato AII). Este procedimiento ha mejorado la sensibilidad de muchos ELISAs con anticuerpo inmovilizado directamente en la placa y necesita unas concentraciones más bajas de inmunorreactivos (Schneider y Hammock, 1992; Giersch, 1993; Manclús *et al.*, 1996; Abad *et al.*, 1997a,b). Esta aproximación resultó ser especialmente acertada para los anticuerpos monoclonales LIB-MXNB31 y LIB-MXNH14, que no sólo reconocieron a los 4 conjugados enzimáticos mediante esta aproximación, sino que también aumentaron su afinidad hacia los trazadores enzimáticos previamente reconocidos. Con respecto a la sensibilidad del ensayo, los valores de I_{50} fueron en muchos casos muy similares a los encontrados en los otros dos formatos (tabla 3.1.3). En este sentido, es interesante puntualizar que sólo se observaron pequeñas diferencias, como se muestra en la figura 3.1.4.

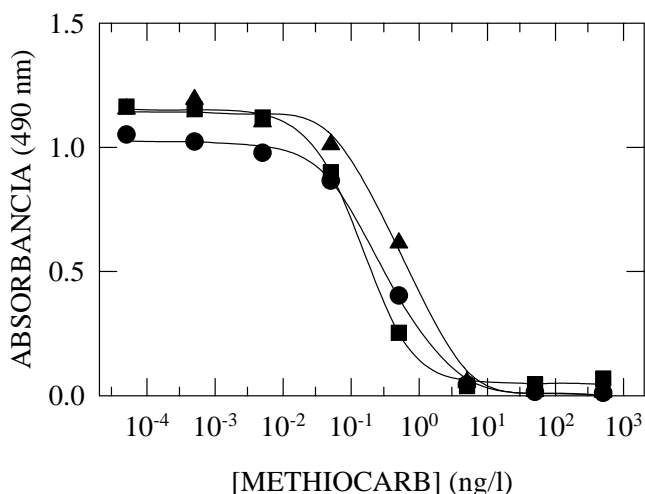


Figura 3.1.4. Curvas competitivas de methiocarb obtenidas con el anticuerpo LIB-MXNH15 en combinación con el hapteno heterólogo MCNH en los tres formatos ensayados: (□) formato CI, (△) formato AI, (●) formato de anticuerpo inmovilizado indirecto

1.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS ENSAYOS.

En el apartado anterior se ha descrito la obtención de inmunoensayos de alta afinidad hacia el methiocarb. De todos ellos se seleccionaron los de menor I_{50} para estimar la capacidad del anticuerpo para reconocer compuestos relacionados con el methiocarb

(especificidad del ensayo) y para optimizar tanto las concentraciones de los componentes específicos, como los factores físico-químicos del medio de reacción, con la finalidad de obtener ensayos más sensibles. Estos ensayos están constituidos por el anticuerpo monoclonal LIB-MXNB31 y el conjugado OVA-DPNH en el formato CI, y por este mismo anticuerpo y el trazador HRP-MCNH, en el formato AI.

1.4.1. Optimización de las concentraciones de los inmunorreactivos.

En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración de los inmunorreactivos sobre los parámetros analíticos de las curvas competitivas. A diferencia de los ELISAs no competitivos, en los que la detectabilidad del ensayo se puede incrementar mediante el empleo de un exceso de reactivos, la sensibilidad de los ensayos competitivos aumenta a medida que disminuyen las concentraciones de los reactivos. Sin embargo, estas concentraciones no pueden disminuirse indefinidamente ya que llegaría un momento en que la señal máxima del ensayo se perdería o sería insuficiente; en otras palabras, no existiría ensayo. Por tanto, es necesario que las concentraciones sean bajas, pero no tanto como para no obtener señal en ausencia de analito.

Formato de conjugado inmovilizado.

Las concentraciones subsaturantes de OVA-DPNH y LIB-MXNB31 se determinaron mediante titulaciones bidimensionales no competitivas. De ellas se seleccionaron las que daban una absorbancia alrededor de 1, y se utilizaron para obtener curvas de inhibición para methiocarb, cuyos parámetros se muestran en la tabla 3.1.4. Como era de esperar, para una concentración determinada de conjugado, cantidades crecientes de anticuerpo proporcionaban ensayos menos sensibles. No obstante, todas las combinaciones dieron valores de I_{50} muy similares, entre 0.08 y 0.25 nM. Así pues, si bien el ensayo que se seleccionó (destacado en negrita en la tabla, 1 : g/ml de OVA-DPNH y 0.02 : g/ml de LIB-MXNB31) no es el más sensible, sí es el que mejores parámetros analíticos ofrecía con un menor consumo de anticuerpo marcado.

Formato de anticuerpo inmovilizado.

Para seleccionar las concentraciones óptimas de los inmunorreactivos en el ensayo, se examinaron 3 combinaciones de anticuerpo y de trazador. De acuerdo con los parámetros de las curvas competitivas expuestos en la tabla 3.1.4, se puede observar una disminución de la sensibilidad a medida que se aumenta la concentración de tapizado. El ensayo más sensible ($I_{50} = 0.128$ nM) se obtuvo con 0.75 : g/ml del anticuerpo LIB-MXNB31 y 0.2 : g/ml del trazador HRP-MCNH.

Tabla 3.1.4. Características de las curvas competitivas de methiocarb obtenidas con diferentes concentraciones de los inmunorreactivos específicos.

FORMATO CI					
OVA-DPNH (: g/ml)	LIB-MXNB31 ^a (: g/ml)	Dilución del anticuerpo marcado	Parámetros		
			A _{max}	I ₅₀ (nM)	pendiente
1.0	0.02	1/2000	1.10	0.13	1.00
	0.015	1/1000	1.18	0.10	0.90
	0.01	1/1000	0.79	0.08	0.80
0.3	0.07	1/2000	1.40	0.25	1.39
	0.05	1/1000	1.58	0.15	1.28
	0.035	1/1000	1.15	0.10	1.12
FORMATO AI					
LIB-MXNB31 (: g/ml)	HRP-MCNH ^a (: g/ml)	Parámetros			
		A _{max}	I ₅₀ (nM)	pendiente	
0.75	0.20	0.83	0.13	1.15	
2.00	0.10	1.02	0.22	1.22	
4.00	0.03	0.91	0.55	1.37	

^aConcentraciones en ensayo. Los datos se han obtenido a partir de la ecuación de cuatro parámetros, promediando curvas realizadas por triplicado en la misma placa.

1.4.2. Influencia de la fuerza iónica.

La A_{max}, que representa la unión del anticuerpo al hapteno conjugado a OVA (formato CI) o al trazador enzimático (formato AI) en ausencia de analito, y la I₅₀, que representa la afinidad del anticuerpo hacia methiocarb, se determinaron y se representaron en función de la concentración salina en el medio (figura 3.1.5). Como se muestra en las gráficas A y B, el aumento de la concentración del tampón hasta un valor PBS 2× repercute en un aumento del reconocimiento de los correspondientes conjugados. Sin embargo, la variación de la I₅₀ no es la misma en ambos formatos. Así, mientras que en el formato CI la afinidad por el methiocarb aumenta (el valor de I₅₀ disminuye) con la fuerza iónica hasta una concentración PBS 2×, en el formato AI la I₅₀ no cambia apreciablemente.

También se representó el cociente A_{max}/I₅₀ en función de la concentración de sal (gráfica C). Éste es un parámetro útil para estimar la sensibilidad del ensayo, de modo que cuánto mayor sea esta relación, mayor es la sensibilidad. En ambos formatos, este cociente es máximo a un valor PBS 2×. Por tanto, se escogió esta concentración para preparar el tampón de la etapa competitiva del ensayo.

La naturaleza apolar del methiocarb podría explicar el comportamiento observado. Generalmente las interacciones proteína-ligando, en las que las fuerzas hidrofóbicas juegan un papel importante, están favorecidas en ambientes de mayor fuerza iónica (Jefferis y Deverill, 1991). Así pues, una hipótesis podría ser que la interacción entre el anticuerpo y un analito hidrofóbico está favorecida en ambientes polares, y viceversa, ya que la cavidad del anticuerpo constituye un ambiente menos agresivo. Por tanto, los cambios en la polaridad del medio pueden ser una herramienta útil para modular la sensibilidad de un inmunoensayo. También se ha observado una tendencia similar en estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio con otros plaguicidas hidrofóbicos tales como clorpirifos, carbaryl y azinfos-metil (Manclús y Montoya, 1996 c; Abad y Montoya, 1997; Mercader y Montoya, 1999), mientras que con el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), principal metabolito del clorpirifos y de naturaleza polar, se observó el efecto opuesto (Manclús y Montoya, 1996 b).

1.4.3. Influencia del pH.

Es un hecho bien documentado que el pH del tampón en el que tiene lugar la inmunorreacción competitiva influye tanto en la sensibilidad como en la señal máxima de los inmunoensayos para plaguicidas (Jung *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1991; Krämer *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Manclús y Montoya, 1996 b,c; Wortberg *et al.*, 1996; Abad y Montoya, 1997; Mercader y Montoya, 1999).

Se estimaron la A_{\max} y la I_{50} a partir de las curvas competitivas obtenidas para cada valor de pH. La variación de estos parámetros en función del pH, tanto en el formato CI como en el formato AI, está representada en las gráficas A y B de la figura 3.1.6. La influencia del pH sobre los parámetros del ensayo es diferente en cada formato. Mientras que en el formato CI la afinidad del anticuerpo hacia el methiocarb no se ve afectada por el pH y la A_{\max} alcanza su valor máximo a pHs entre 6 y 8, en el formato AI la I_{50} llega a su valor mínimo a pHs comprendidos entre 6.5 y 8, mientras que la A_{\max} aumenta hasta un pH 9.

Al igual que en el caso de la concentración de sal, el cálculo de la relación A_{\max}/I_{50} también fue representado en función del pH (gráfica C de la figura 3.1.6). En ambos formatos la variación fue muy similar, alcanzando su máximo a un pH entre 7 y 8. Por tanto, se escogió un pH ligeramente básico (7.4) para preparar el tampón de ensayo en los dos formatos.

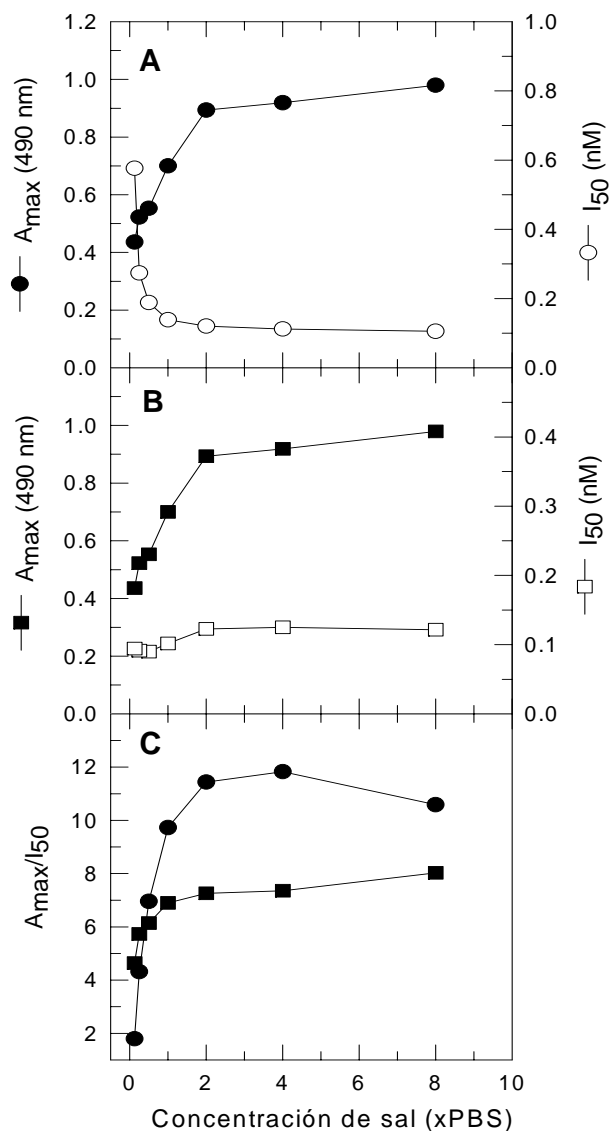


Figura 3.1.5. Influencia de la concentración de sal sobre la A_{max} y la I_{50} de los inmunoensayos de methiocarb. En la etapa de competición, los patrones se prepararon en agua destilada y el anticuerpo monoclonal o el trazador se diluyó en el doble de la concentración de PBS ensayada, pH 7.4, conteniendo BSA al 0.1% . Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. **A** Formato CI (OVA-DPNH, 1 : g/ml; LIB-MXNB31, 0.02 : g/ml). **B** Formato AI (LIB-MXNB31, 0.75 : g/ml; HRP-MCNH, 0.2 : g/ml). **C** Representación del valor A_{max}/I_{50} para cada formato.

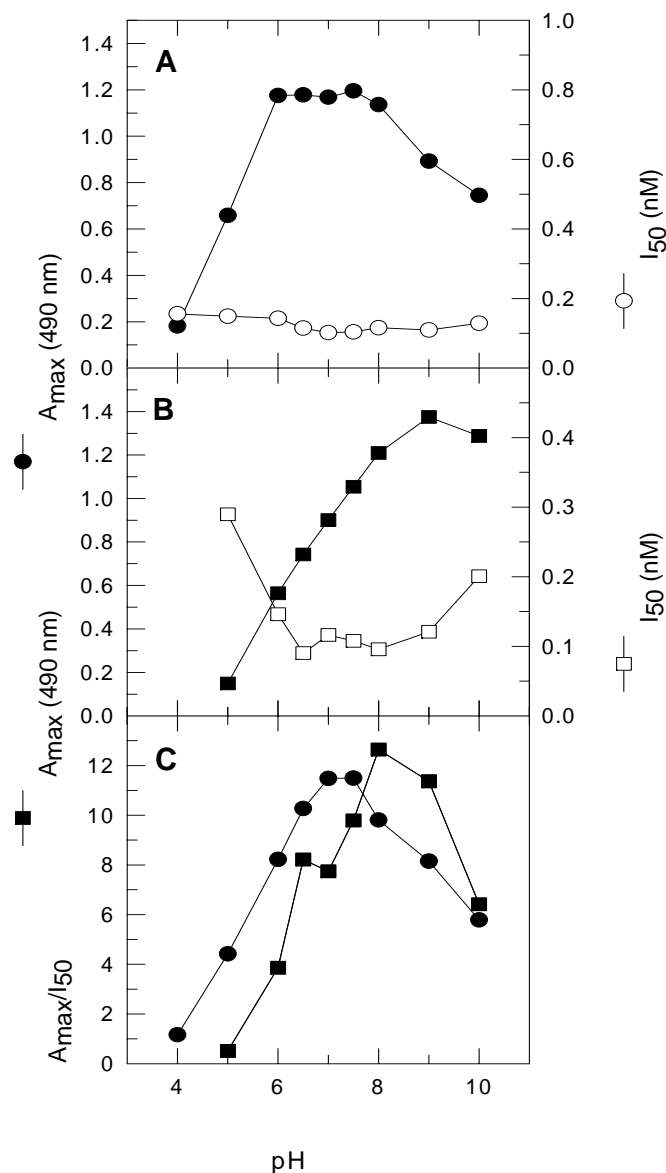


Figura 3.1.6. Influencia del pH sobre la A_{max} y la I_{50} de los inmunoensayos de methiocarb. En la etapa de competición, los patrones se prepararon en agua destilada y el anticuerpo monoclonal o el trazador se diluyó en un tampón de fuerza iónica 744 nM conteniendo BSA al 0.1%, al pH ensayado. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. **A** Formato CI (OVA-DPNH, 1 : g/ml; LIB-MXNB31, 0.02 : g/ml). **B** Formato AI (LIB-MXNB31, 0.75 : g/ml; HRP-MCNH, 0.2 : g/ml). **C** Representación del valor A_{max}/I_{50} para cada formato.

1.4.4. Tolerancia de los inmunoensayos a los disolventes orgánicos.

Muestras tales como suelos, sedimentos y productos alimentarios, están normalmente sujetas a una etapa de extracción previa a la determinación de residuos de plaguicidas. Los disolventes orgánicos influyen negativamente en el inmunoensayo, por lo que deberían mantenerse a niveles bajos (Meulenberg, 1997). La aproximación más sencilla para determinar la tolerancia de un inmunoensayo a los disolventes orgánicos es evaluar su influencia sobre los parámetros de la curva de calibración. Se han observado diferentes efectos de los disolventes sobre los inmunorreactivos, como los hallados acerca de desorciones del anticuerpo, de la unión conjugado-anticuerpo, del aumento o disminución de la afinidad del anticuerpo o del aumento de la estabilidad de la enzima, que podrían alterar la especificidad del anticuerpo por otros analitos (Stöcklein *et al.*, 1997).

La figura 3.1.7 muestra la influencia de varias concentraciones de algunos de los disolventes ensayados sobre las características analíticas de los inmunoensayos para methiocarb. Otros disolventes también ensayados (acetona, acetonitrilo y tetrahidrofurano) no se han representado, ya que a muy bajas proporciones produjeron grandes interferencias en los ELISAs. En ambos formatos se observa una clara disminución de la señal máxima y de la sensibilidad del ensayo cuando cantidades crecientes de disolventes fueron añadidas al tampón. El metanol es el disolvente mejor tolerado, hasta un 5% en el formato CI. A esta concentración, tanto la A_{\max} como la I_{50} apenas se ven afectadas. Por el contrario, en el formato AI la A_{\max} disminuye un 40% por la presencia de una concentración de metanol del 5%, aunque la sensibilidad del ensayo no varía apreciablemente.

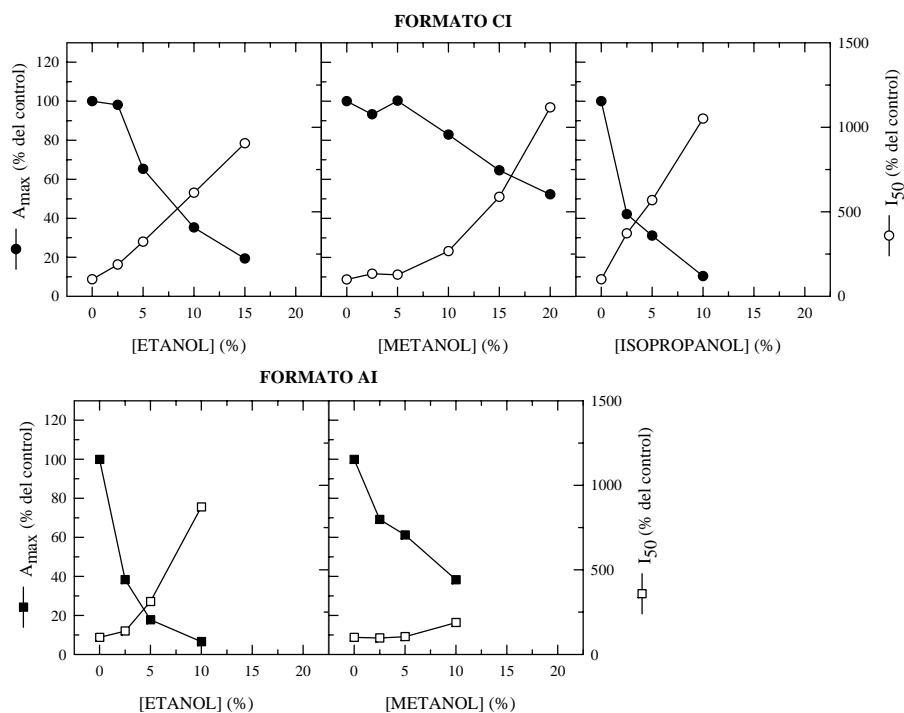
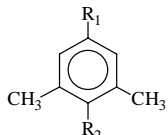
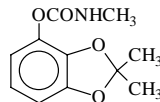
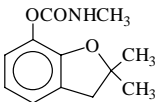
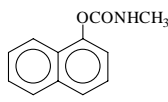
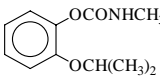
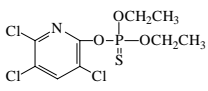
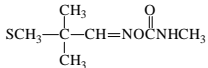
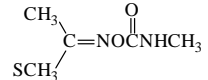


Figura 3.1.7. Efecto de la concentración del disolvente orgánico en el ensayo sobre la A_{\max} y la I_{50} de las curvas estándar del methiocarb. En la etapa de competición, la curva patrón se preparó en tampón PBS 2× y el anticuerpo monoclonal o el trazador se diluyó en tampón PBS 2× conteniendo BSA al 0.1%, a la concentración de disolvente ensayada. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. **A** Formato CI (OVA-DPNH, 1 : g/ml; LIB-MXNB31, 0.02 : g/ml). **B** Formato AI (LIB-MXNB31, 0.75 : g/ml; HRP-MCNH, 0.2 : g/ml). Algunos valores de la I_{50} y de la A_{\max} no se han considerado porque los datos experimentales no se ajustaron a la curva de cuatro parámetros.

1.4.5. Estudio de la especificidad de los inmunoensayos.

La especificidad del anticuerpo LIB-MXNB31 se examinó tanto en el formato CI como en el formato AI. En la tabla 3.1.5 se presentan los datos de reactividad cruzada de algunos plaguicidas relacionados con el methiocarb, así como de los metabolitos del methiocarb. Estos valores se calcularon a partir de la I_{50} del ensayo para cada uno de los compuestos que aparecen en la tabla, y constituyen una medida de la afinidad del anticuerpo hacia ellos con respecto a la obtenida para methiocarb. Los resultados obtenidos demuestran que los inmunoensayos desarrollados son muy específicos del methiocarb, puesto que ninguno de los plaguicidas y metabolitos ensayados fue reconocido significativamente.

Tabla 3.1.5. Reconocimiento de varios compuestos por el anticuerpo de methiocarb LIB-MXNB31 en los formatos CI y AI.

ESTRUCTURA QUÍMICA	COMPUESTO	REACTIVIDAD CRUZADA (%)	
		FORMATO CI	FORMATO AI
$R_1 = \text{OCONHCH}_3;$ $R_2 = \text{SCH}_3$	Methiocarb	100	100
	4-mercapto-3,5-dimetil-fenol	0.014	0.03
$R_1 = \text{OCONHCH}_3;$ $R_2 = \text{SOCH}_3$	Methiocarb sulfóxido	0.009	0.02
$R_1 = \text{OCONHCH}_3;$ $R_2 = \text{SO}_2\text{CH}_3$	methiocarb sulfona	0.002	0.003
	Bendiocarb	< 0.001	< 0.001
	Carbofuran	< 0.001	< 0.001
	Carbaryl	0.004	0.007
	Propoxur	< 0.001	< 0.001
	Chlorpyrifos	< 0.001	< 0.001
	Aldicarb	< 0.001	< 0.001
	Methomyl	< 0.001	< 0.001

Las placas ELISA fueron tapizadas con OVA-DPNH a 1 : g/ml en el caso del formato CI y con LIB-MXNB31 a 0.75 : g/ml en el caso del formato AI. El valor de la reactividad cruzada se calculó según la ecuación: $R = (I_{50} \text{ de methiocarb} / I_{50} \text{ de otro analito}) \times 100$.

1.4.6. Características de los ensayos optimizados.

Las curvas patrón de los ELISAs que aparecen en la figura 3.1.8 fueron obtenidas promediando 24 curvas individuales que se normalizaron expresando la absorbancia como el porcentaje de la señal máxima. La tabla 3.1.6 resume las características de los ensayos optimizados para el methiocarb, estimados a partir de dichas curvas patrón. El rango de trabajo del ensayo, calculado como la concentración de analito que inhibe la señal máxima un 20-80%, fue ligeramente mayor en el formato CI (5-125 ng/l) que en el formato AI (15-120 ng/l), debido a que la pendiente de la curva competitiva fue menor. El límite de detección, calculado como la concentración de analito que produce una inhibición de la señal máxima del 10% (I_{90}) fue mayor en el formato AI (8.9 ng/l) que en el formato CI (1.8 ng/l). El ensayo más sensible lo proporcionó el formato CI con un valor de I_{50} alrededor de 24 ng/l, mientras que el valor de la I_{50} en el formato AI fue aproximadamente 40 ng/l.

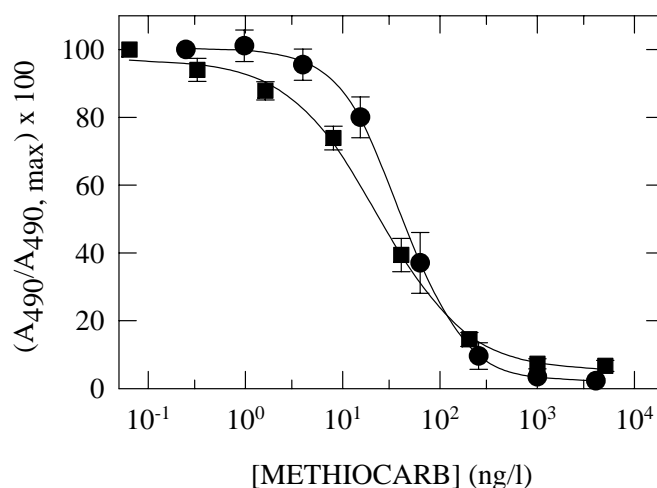


Figura 3.1.8. Curvas patrón normalizadas para el methiocarb, obtenidas bajo las condiciones de los ensayos optimizados que se indican en la tabla 3.1.6: (\square) formato CI, (\circ) formato AI. Cada curva representa la media de 24 curvas realizadas por triplicado. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Tabla 3.1.6. Resumen de las características del inmunoensayo de methiocarb.

	Formato	
	CI	AI
Concentraciones de inmunorreactivos		
[OVA-DPNH] (: g/ml)	1	na ^a
[LIB-MXNB31] (: g/ml)	0.02	0.75
[HRP-MCNH] (: g/ml)	na	0.2
Características del tampón		
% BSA	0.1	
concentración de sal	100 mM fosfato, 137 mM NaCl	
pH	7.4	
% thimerosal	0.01	
tolerancia al disolvente (metanol)	5%	< 2%
Características analíticas de la curva estándar ^b		
A _{max}	1.30	1.70
A _{min}	0.07	0.03
I ₅₀ (ng/l)	23.7	40
pendiente	1.00	1.40
concentración que proporciona:		
20-80% inhibición (ng/l)	5 - 125	15 - 120
10% inhibición (ng/l)	1.8	8.9
Tiempo de ensayo		
tapizado	toda la noche	
reacción de competición	1 h	
reacción con el anticuerpo marcado	1 h	na
desarrollo de color	10 min	

^aNo aplicable. ^bDatos promediados a partir de 24 curvas realizadas por triplicado en cada formato.

2. DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS PARA EL CARBOFURAN.

2.1. SÍNTESIS DE HAPTENOS.

La síntesis de los haptenos inmunizantes BFNP, BFNB y BFNH, al igual que los del methiocarb, consistió en la introducción de un brazo espaciador de diferente longitud en el grupo carbamato, característico de esta familia de plaguicidas. Como resultado de esta síntesis se ha conseguido la elongación de una cadena alifática presente en el analito, de manera que tanto la estructura como la distribución electrónica de la molécula de carbofuran apenas se ven modificadas.

Además de los haptenos requeridos para la producción de anticuerpos, también se sintetizaron varios haptenos que presentan heterología de estructura y de brazo espaciador, para estudiar su influencia sobre la sensibilidad del inmunoensayo en las etapas posteriores del desarrollo del ELISA. En la figura 3.2.1 se muestran las estructuras de los haptenos sintetizados. BDNH difiere de los haptenos inmunizantes en la estructura del anillo. Fue obtenido siguiendo la misma aproximación química, pero utilizando el 2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ol, que es el precursor en la síntesis industrial del bendiocarb, otro plaguicida *N*-metilcarbamato. BFOH y BDOH se obtuvieron directamente mediante una reacción de O-alkilación del 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol y 2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ol, respectivamente, con el ácido etilbromohexanoico.

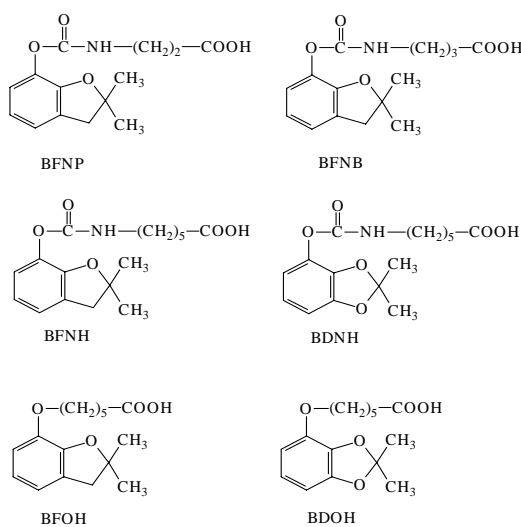


Figura 3.2.1. Estructuras de los haptenos sintetizados para carbofuran.

2.2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A CARBOFURAN.

Se realizaron un total de 18 fusiones, 6 a partir de ratones inmunizados con el inmunógeno BSA-BFNP, otras 6 a partir de ratones inmunizados con BSA-BFNB y 6 a partir de ratones inmunizados con BSA-BFNH. En la tabla 3.2.1 se muestra un resumen de los hibridomas obtenidos y de su posterior selección.

Tabla 3.2.1. Resumen de la fusión celular y de los resultados de la selección de hibridomas.

hapteno inmunizante	no. de fusión	no. de pocillos			no. de hibridomas clonados
		sembrados	positivos ^a (conjugado)	competitivos ^b (analito)	
BFNP	2	192	86	20	2
	6	480	55	3	2
BFNB	5	768	81	14	2
	6	960	193	32	4

Las placas ELISA se tapizaron con el conjugado homólogo a 1 y 0.1 : g/ml. Los hibridomas que dieron una $A_{490} > 3.0$ se ensayaron de nuevo diluyendo los sobrenadantes de cultivo para asegurar que los anticuerpos no estuvieran en exceso.

^aPocillos con anticuerpos que reconocieron los haptenos homólogos conjugados a OVA en un ELISA indirecto. ^bPocillos que reconocieron una concentración 1 : M de carbofuran (inhibición > 80%).

Mediante el ensayo de los sobrenadantes de fusión se seleccionaron aquellos pocillos que daban una inhibición de la señal mayor que el 80%, con respecto a la obtenida en ausencia de analito, en presencia de una concentración 1 : M de carbofuran. Se consideró que estos pocillos contenían clones productores de anticuerpos de alta afinidad. Según este criterio, de las primeras 9 fusiones (tres con cada hapteno) se seleccionaron dos hibridomas a partir de la segunda fusión con el hapteno BFNP. Pese al bajo número de hibridomas obtenidos, la posibilidad de haber utilizado un hapteno inmunizante inapropiado se consideró poco probable, debido a que previamente se había obtenido un elevado número de excelentes anticuerpos monoclonales frente a carbaryl (Abad y Montoya, 1994; Abad *et al.*, 1997a) y methiocarb siguiendo la misma aproximación química. Se pensó en cambio que esta circunstancia podría más bien atribuirse a que las condiciones utilizadas en el ensayo de los sobrenadantes de cultivo no fueran las más adecuadas para este caso. En concreto, se pensó que estos anticuerpos podían tener una gran afinidad hacia el conjugado inmovilizado. De ser así, una disminución de la concentración de tapizado en los ensayos de los sobrenadantes de cultivo debería aumentar el número de hibridomas que mostraran inhibición frente a carbofuran. De acuerdo con esta idea, los sobrenadantes de cultivo de las 9 fusiones posteriores se ensayaron en placas ELISA tapizadas con las concentraciones 0.1 y 1 : g/ml del conjugado homólogo correspondiente. Es más, los hibridomas que dieron una

A_{490} mayor o igual que 3.0, se volvieron a ensayar diluyendo el sobrenadante de cultivo para asegurarnos que los anticuerpos no estuvieran en exceso. Aunque muchos hibridomas no se comportaron competitivamente ni siquiera bajo estas nuevas condiciones de análisis, un bajo pero significativo número de ellos reconocieron carbofuran con gran afinidad cuando se ensayaron en placas de ELISA tapizadas con una concentración 0.1 : g/ml del conjugado homólogo. En concreto, se seleccionaron 8 hibridomas que secretaron anticuerpos con una gran afinidad hacia el carbofuran. Dos hibridomas procedían de la inmunización con el hapteno BFNP y 6 se obtuvieron a partir de la inmunización con el hapteno BFNB. De forma similar a lo comentado anteriormente para las fusiones de methiocarb, el hecho de que no se obtuvieran hibridomas a partir del hapteno BFNH no debería ser necesariamente atribuido a la longitud del brazo espaciador sino a la gran variabilidad que entraña el proceso de la fusión celular. De hecho, el uso de haptenos con un brazo espaciador de 5 átomos de carbono han rendido excelentes anticuerpos monoclonales para el carbaryl (Abad y Montoya, 1994; Abad *et al.*, 1997a) y como ya se ha visto con anterioridad, también para el methiocarb.

2.3. DISEÑO DE INMUNOENSAYOS PARA CARBOFURAN.

Los 10 anticuerpos monoclonales obtenidos fueron purificados a partir de los sobrenadantes de cultivo y se ensayaron mediante ELISAs homólogos competitivos en el formato CI. La afinidad de estos anticuerpos hacia carbofuran varió entre 1 y 59 nM (datos no mostrados). Los 4 anticuerpos que mostraron una mayor afinidad hacia el carbofuran se utilizaron en la evaluación de los formatos CI y AI usando tanto haptenos homólogos como heterólogos. Estos anticuerpos son: LIB-BFNP21, LIB-BFNB52, LIB-BFNB62 y LIB-BFNB67.

2.3.1. Evaluación del formato de conjugado inmovilizado.

Se realizaron en primer lugar ELISAs no competitivos de titulación bidimensional para determinar las concentraciones óptimas de los inmunorreactivos. Las curvas resultantes mostraron que en general todos los haptenos conjugados a OVA fueron reconocidos por los anticuerpos monoclonales. El grado de reconocimiento, estimado como la concentración de anticuerpo necesaria para producir una absorbancia de aproximadamente 1, dependía fuertemente de la concentración de conjugado utilizada. El anticuerpo monoclonal LIB-BFNB52 (figura 3.2.2) fue el más influenciado por las concentraciones de los conjugados ensayados, siendo necesarias cantidades de anticuerpo mayores (de hasta 2 órdenes de magnitud) cuando se emplearon las concentraciones de tapizado más bajas.

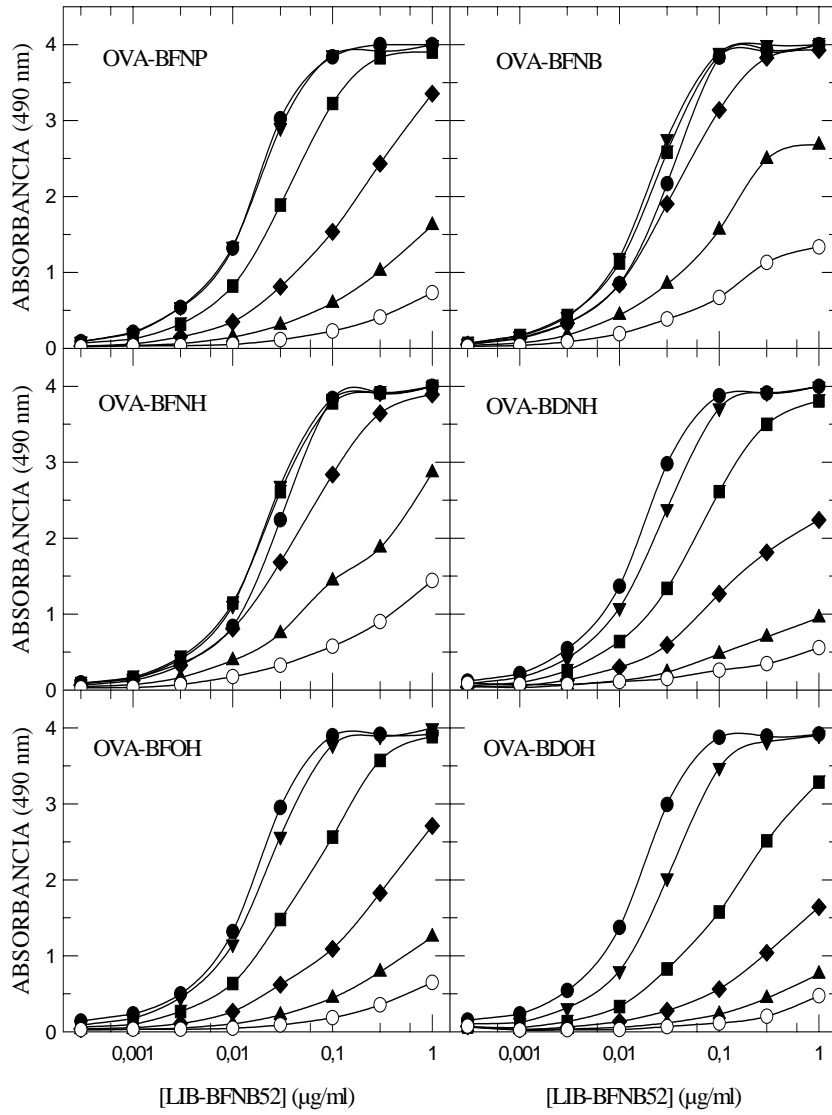


Figura 3.2.2. Ensayos bidimensionales no competitivos del anticuerpo LIB-BFNB52 en el formato CI con los conjugados indicados a las concentraciones: (○) 1.5 : g/ml, (—) 0.5 : g/ml, (◻) 0.15 : g/ml, (→) 0.05 : g/ml, (•) 0.015 : g/ml, (◊) 0.005 : g/ml.

En la figura 3.2.3 se muestran los resultados de una experiencia representativa que ilustra el efecto de la concentración de conjugado sobre el inmunoensayo competitivo de carbofuran en este formato. En esta experiencia se utilizaron dos concentraciones del anticuerpo monoclonal LIB-BFNB67 y cinco del conjugado de ensayo OVA-BFNH. Se puede observar que concentraciones de conjugado superiores a 0.05 : g/ml no produjeron un aumento apreciable en la señal máxima, mientras que provocaron una fuerte subida del valor de la I_{50} del ensayo. Por tanto, concentraciones bajas de OVA-BFNH (alrededor de 0.01 : g/ml) debían permitir obtener la máxima sensibilidad, como era de esperar a partir de la información proporcionada por los ensayos de los sobrenadantes de fusión.

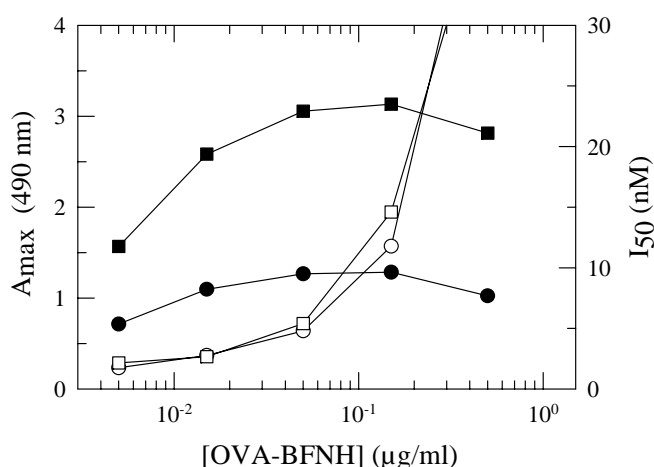


Figura 3.2.3. Efecto de la concentración de OVA-BFNH sobre la A_{\max} (símbolos negros) y la I_{50} (símbolos blancos) en el formato CI competitivo. El anticuerpo LIB-BFNB67 se ha utilizado a 0.01 : g/ml (círculos) y a 0.03 : g/ml (cuadrados).

En cualquier caso, todas las combinaciones de anticuerpo y conjugado que proporcionaron una señal suficiente, aproximadamente 1, fueron ensayadas mediante ELISAs competitivos. Los valores de I_{50} de estas combinaciones se muestran en la tabla 3.2.2. El anticuerpo que mostró una afinidad menor hacia el carbofuran en las combinaciones homólogas fue LIB-BFNB52 ($I_{50} = 10.2$ nM), mientras que los otros tres anticuerpos mostraron una afinidad muy similar ($I_{50} = 1.4-1.8$ nM). Sin embargo, fue LIB-BFNB52 el único anticuerpo que experimentó un aumento en la sensibilidad por el uso de haptenos heterólogos. Seleccionando los conjugados de OVA más adecuados, se obtuvieron valores de I_{50} muy similares con los cuatro anticuerpos.

Tabla 3.2.2. Valores de I_{50} (nM) determinados en los formatos CI y AI, de los mejores anticuerpos monoclonales obtenidos frente a carbofuran.

	LIB-BFNP21	LIB-BFNB52	LIB-BFNB62	LIB-BFNB67
conjugado de tapizado	formato de ELISA de conjugado inmovilizado			
OVA-BFNP	1.75	5.50	1.39	1.19
OVA-BFNB	1.98	10.20	1.56	1.39
OVA-BFNH	1.90	5.77	1.41	1.68
OVA-BDNH	1.65	2.76	1.52	1.59
OVA-BFOH	2.02	3.19	2.08	1.48
OVA-BDOH	1.95	4.35	1.59	1.15
trazador enzimático	formato de ELISA de anticuerpo inmovilizado			
HRP-BFNH	2.37	5.76	2.43	1.56

Las combinaciones homólogas se muestran en negrita. Las concentraciones de los inmunorreactivos fueron las adecuadas para obtener una absorbancia de aproximadamente 1. Los datos se obtuvieron a partir de curvas realizadas por triplicado.

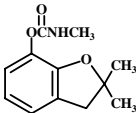
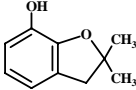
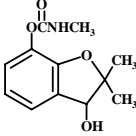
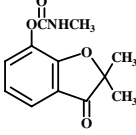
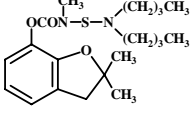
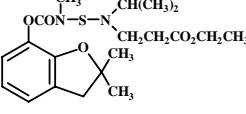
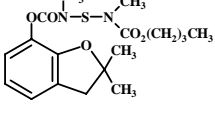
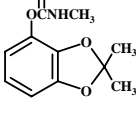
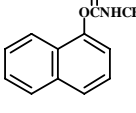
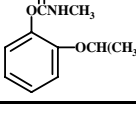
2.3.2. Evaluación del formato de anticuerpo inmovilizado.

Al igual que se hizo en el formato de conjugado inmovilizado, se realizaron en primer lugar ELISAs bidimensionales no competitivos para determinar las concentraciones subsaturante del anticuerpo inmovilizado y del trazador enzimático. Quizás, el aspecto más remarcable de esta experiencia es que solamente uno de los 6 trazadores sintetizados (HRP-BFNH) fue reconocido con la extensión suficiente como para desarrollar un inmunoensayo en este formato. Estos resultados están en la misma línea que los obtenidos para el methiocarb. Por tanto, confirman de nuevo la teoría según la cual el número de haptenos conjugados a peroxidasa reconocidos por un anticuerpo inmovilizado es siempre menor que el número de haptenos conjugados a OVA reconocidos en el formato CI por el mismo anticuerpo. Por otra parte, el hapteno BFNH es el que tiene el brazo espaciador más largo, lo cual también está de acuerdo con los resultados obtenidos para el methiocarb, que indican que los haptenos de brazo espaciador corto son menos apropiados para formar conjugados enzimáticos, probablemente debido a impedimentos estéricos. Tras seleccionar las condiciones óptimas para la competición, se obtuvieron curvas de inhibición para carbofuran con los cuatro anticuerpos y el trazador HRP-BFNH. Los valores de I_{50} de estos ensayos fueron muy similares a los encontrados en el formato CI, tal y como se muestra en la tabla 3.2.2. El ensayo más sensible se obtuvo con el anticuerpo LIB-BFNB67.

2.3.3. Estudio de la especificidad de los inmunoensayos.

Se evaluó la especificidad de los anticuerpos monoclonales LIB-BFNP21, LIB-BFNB52, LIBBFNB62 y LIB-BFNB67, mediante la realización de ensayos competitivos, utilizando varios compuestos como competidores. Los valores de I_{50} obtenidos se utilizaron para calcular la reactividad cruzada. Los compuestos ensayados incluyen otros plaguicidas *N*-metilcarbamatos (carbaryl, methiocarb, propoxur, y bendiocarb), *N*-metilcarbamoiloximas (aldicarb y methomyl), metabolitos del carbofuran (carbofuran-fenol, carbofuran-hidroxi y carbofuran-ceto), y los plaguicidas estructuralmente relacionados con el carbofuran (carbosulfan, benfuracarb y furathiocarb). El estudio fue llevado a cabo en los dos formatos desarrollados. Los resultados de reactividad cruzada calculados a partir de cuatro experiencias realizadas en días diferentes fueron muy similares en ambos formatos (tablas 3.2.3 y 3.2.4). Como se puede observar, el único metabolito reconocido por todos los anticuerpos, excepto por LIB-BFNB52, fue el carbofuran-hidroxi. Los valores de reactividad cruzada para benfuracarb, furathiocarb y carbosulfan estuvieron entre aproximadamente el 13-19%, el 32-43% y el 3-5%, respectivamente. Estos compuestos tienen en común que son plaguicidas carbamatos cuyo principal producto de degradación es el carbofuran. De hecho, la transformación de estos productos en carbofuran ocurre fácilmente en medio ácido (Rouchaud *et al.*, 1990), característica que ha sido utilizada algunas veces para analizar estos carbamatos como equivalentes de carbofuran. Los *N*-metilcarbamatos y *N*-metilcarbamoiloximas ensayados no fueron significativamente reconocidos por estos anticuerpos. La única excepción fue bendiocarb, con una reactividad cruzada entre el 10-25% en ambos formatos. Este plaguicida está estrechamente relacionado con la estructura del carbofuran, pero apenas se utiliza en el campo.

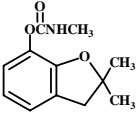
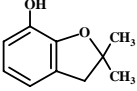
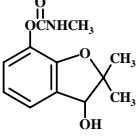
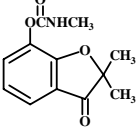
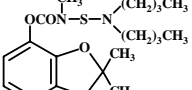
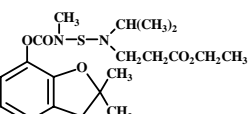
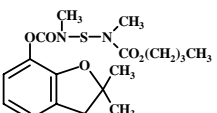
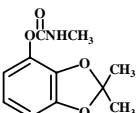
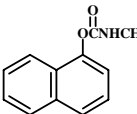
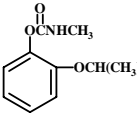
Tabla 3.2.3. Reconocimiento de varios compuestos por los anticuerpos de carbofuran LIB-BFN21, LIB-BFN52, LIB-BFN62 y LIB-BFN67 en el formato CI^a.

Estructura química	Compuesto	Reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal ^b (%)			
		LIB-BFN21	LIB-BFN52	LIB-BFN62	LIB-BFN67
	carbofuran	100	100	100	100
	carbofuran-phenol	0.02	5.2	0.01	0.02
	carbofuran-hidroxi	18.5	0.2	16.8	25.2
	carbofuran-ceto	0.6	3.1	0.3	0.4
	carbosulfan	2.9	4.5	2.7	3.1
	benfuracarb	13.2	14.4	17.1	18.6
	furathiocarb	37.0	43.1	31.8	36.5
	bendiocarb	21.2	10.5	19.8	25.0
	carbaryl	0.1	0.1	0.2	0.2
	propoxur	0.7	0.1	0.8	1.0

^aLa concentración de OVA-BFNH fue 0.01 : g/ml. La concentración de cada anticuerpo en el ensayo fue 0.04 : g/ml.

^bPorcentaje de reactividad cruzada = $(I_{50} \text{ de carbofuran} / I_{50} \text{ de otros compuestos}) \times 100$. Los valores de reactividad cruzada para los insecticidas carbamatos methiocarb, aldicarb y methomyl fueron < 0.01%.

Tabla 3.2.4. Reconocimiento de varios compuestos por los anticuerpos de carbofuran LIB-BFN21, LIB-BFN52, LIB-BFN62 y LIB-BFN67 en el formato AI^a.

Estructura química	Compuesto	Reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal ^b (%)			
		LIB-BFN21	LIB-BFN52	LIB-BFN62	LIB-BFN67
	carbofuran	100	100	100	100
	carbofuran-phenol	0.02	2.0	0.02	0.02
	carbofuran-hidroxi	18.5	0.3	16.3	17.0
	carbofuran-ceto	0.3	4.0	0.3	0.3
	carbosulfan	2.5	5.0	2.4	2.8
	benfuracarb	12.6	17.0	15.4	16.3
	furathiocarb	42.5	40.6	36.2	38.7
	bendiocarb	22.2	9.4	23.7	17.0
	carbaryl	0.1	0.1	0.3	0.2
	propoxur	1.3	0.1	0.9	1.0

^aLa concentración de cada anticuerpo fue 1 : g/ml excepto la de LIB-BFN52 que fue 5 : g/ml. La concentración de HRP-BFNH en el ensayo fue 0.1 : g/ml. ^bPorcentaje de reactividad cruzada = $(I_{50} \text{ de carbofuran} / I_{50} \text{ de otros compuestos}) \times 100$. Los valores de reactividad cruzada para los insecticidas carbamatos methiocarb, aldicarb y methomyl fueron < 0.01%.

2.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS ENSAYOS.

Un inmunoensayo no se puede considerar totalmente desarrollado hasta que no se haya estudiado el efecto que una serie de factores físico-químicos, tales como el pH, la fuerza iónica o la presencia de disolventes orgánicos, puede ejercer sobre su funcionamiento (Meulenberg *et al.*, 1995). Estos factores pueden alterar la sensibilidad del ensayo al modificar la forma en la que el analito se presenta al anticuerpo o al cambiar la interacción del anticuerpo con el conjugado hapténico utilizado en el ensayo.

A partir de los datos de afinidad y especificidad presentados en el apartado anterior, en combinación con las características de cultivo de los hibridomas tales como su crecimiento y su capacidad de producción de anticuerpos, decidimos utilizar el anticuerpo monoclonal LIB-BFNB67 para la optimización de inmunoensayos para carbofuran. El anticuerpo se utilizó con OVA-BFNH en el formato de conjugado inmovilizado y con HRP-BFNH en el formato de anticuerpo inmovilizado.

2.4.1. Efecto de la fuerza iónica.

Para examinar la influencia de la fuerza iónica sobre el ensayo, se obtuvieron curvas competitivas para carbofuran utilizando tampones preparados a partir de PBS 16×, para cubrir el rango de la concentración de sal indicado en la figura 3.2.4. Como se puede observar, la variación de los parámetros A_{max} e I_{50} con la fuerza iónica fue diferente en cada formato. Así, el reconocimiento del correspondiente conjugado hapténico (A_{max}), disminuía o aumentaba con el aumento de la concentración de sal según se tratara del formato CI o AI, respectivamente. Sin embargo, el reconocimiento de carbofuran (I_{50}) no cambió significativamente debido al aumento de la concentración de sal en el formato AI, mientras que aumentó considerablemente en el formato CI (I_{50} más baja).

La representación del cociente A_{max}/I_{50} frente a la concentración de sal resultó de nuevo útil para la elección de la concentración óptima del tampón. En ambos formatos esta relación aumentó apreciablemente con la concentración de sal hasta un valor PBS 2×. Por tanto, se escogió esta concentración para preparar el tampón de la etapa competitiva del ensayo en los dos formatos. Esta tendencia fue muy similar a la observada en los inmunoensayos de methiocarb. El carácter hidrofóbico del carbofuran y, por tanto, la naturaleza de su interacción con el anticuerpo, principalmente hidrofóbica, podría explicar este comportamiento.

2.4.2 Efecto del pH.

Para estudiar el efecto del pH sobre la A_{\max} y la I_{50} del ensayo, se obtuvieron curvas competitivas para cada valor de pH. En la figura 3.2.5 se muestra la variación de estos parámetros en función del pH. En ambos formatos la influencia del pH sobre los parámetros del ensayo fue muy similar. Por una parte, el reconocimiento de los conjugados hapténicos (OVA-BFNH y HRP-BFNH), representado por la respuesta en ausencia del analito (A_{\max}), fue máximo a un pH entre 6 y 7. Por la otra, la afinidad del anticuerpo hacia carbofuran mostraba una ligera tendencia a aumentar (menor I_{50}) a medida que el pH aumentaba.

También en este caso se consideró la variación del cociente A_{\max}/I_{50} en función del pH como un método para estimar el pH óptimo para los inmunoensayos de carbofuran. A partir de las curvas representadas en la figura 3.2.5 C, se desprende que un pH ligeramente básico, 7.4, podría ser escogido para preparar el tampón de la etapa de competición.

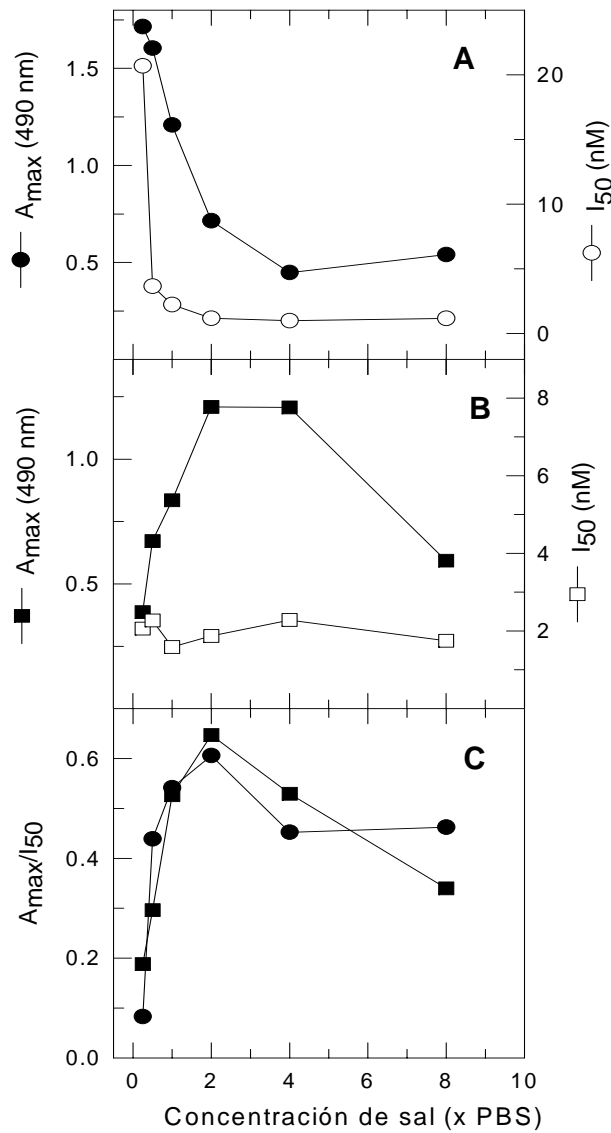


Figura 3.2.4. Influencia de la concentración de sal sobre la A_{max} y la I_{50} de los inmunoensayos de carbofuran. En la etapa de competición, los patrones se prepararon en agua destilada y el anticuerpo monoclonal o el trazador se diluyó en el doble de la concentración de PBS ensayada, pH 7.4, conteniendo BSA al 0.1%. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. **A** Formato CI (OVA-BFNH, 0.005 : g/ml; LIB-BFNB67, 0.03 : g/ml). **B** Formato AI (LIB-BFNB67, 1 : g/ml; HRP-BFNH, 0.1 : g/ml). **C** Representación del valor A_{max}/I_{50} para cada formato.

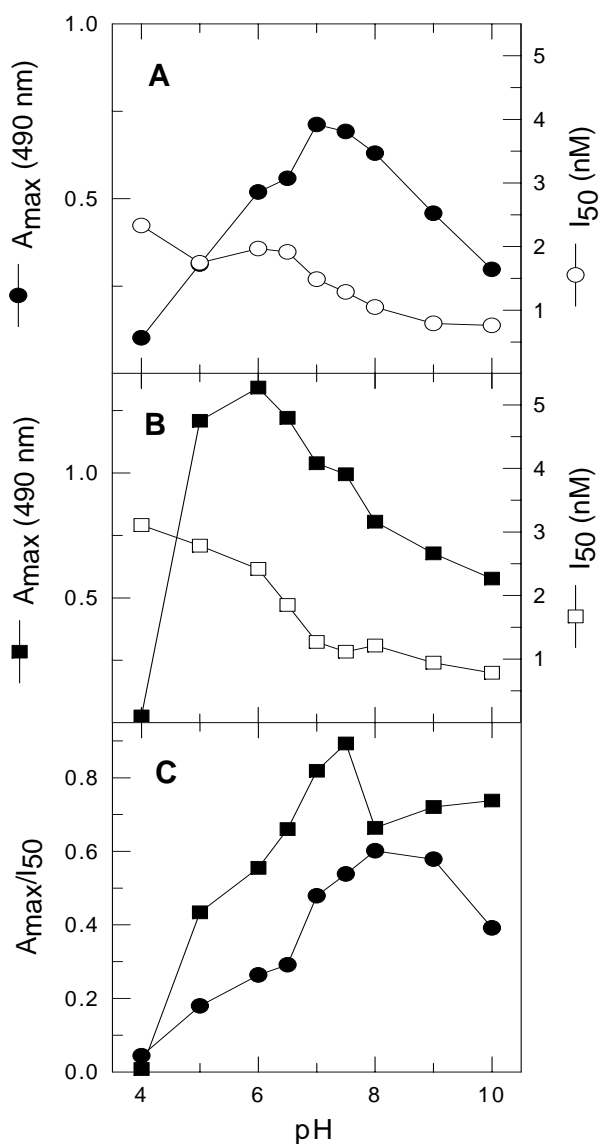


Figura 3.2.5.

Influencia del pH sobre la A_{max} y la I_{50} de los inmunoensayos de carbofuran. En la etapa de competición, los patrones se prepararon en agua destilada y el anticuerpo monoclonal o el trazador se diluyó en un tampón de fuerza iónica 744 nM conteniendo BSA al 0.1%, al pH ensayado. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. **A** Formato CI (OVA-BFNH, 0.005 : g/ml; LIB-BFNB67, 0.03 : g/ml). **B** Formato AI (LIB-BFNB67, 1 : g/ml; HRP-BFNH, 0.1 : g/ml). **C** Representación del valor A_{max}/I_{50} para cada formato.

2.4.3. Tolerancia de los inmunoensayos a los disolventes orgánicos.

Se estudió el efecto de varias concentraciones de metanol, acetona e isopropanol sobre los inmunoensayos de carbofuran (figura 3.2.6). Como se puede observar, el formato CI toleró mejor que el formato AI la presencia de acetona e isopropanol en el tampón de ensayo, como lo demuestra la brusca disminución de la A_{max} en el formato AI a medida que aumenta el porcentaje del disolvente en el tampón. Sin embargo, la pérdida de sensibilidad hace que el formato CI tampoco sea aplicable al análisis de carbofuran en presencia de acetona e isopropanol, aunque se obtuvo una señal máxima suficiente con una proporción de estos disolventes del 15%. Por otra parte, la A_{max} no se vio muy afectada por el metanol en el rango de concentraciones ensayadas, y la I_{50} del ensayo no cambió en el formato AI y únicamente experimentó un ligero aumento en el formato CI. Por tanto, ambos formatos toleran muy bien el metanol hasta un porcentaje del 15%, lo cual podría ser de gran importancia para la aplicación de estos inmunoensayos al análisis de carbofuran en alimentos y suelos, donde el empleo de este disolvente es muy habitual.

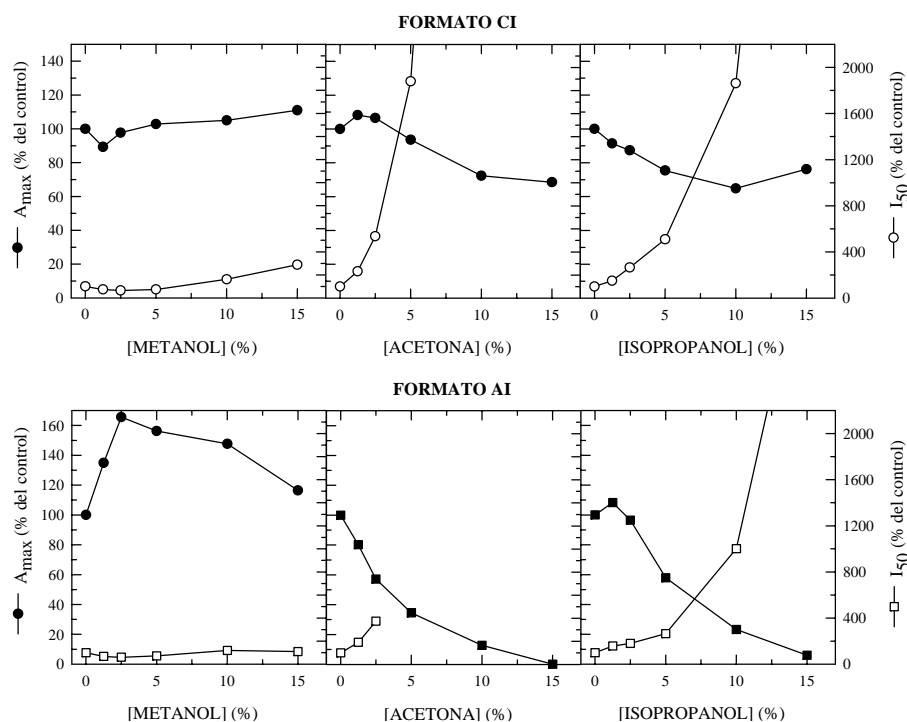


Figura 3.2.6. Efecto de la concentración del disolvente orgánico en el ensayo sobre la A_{max} y la I_{50} de las curvas estándar del carbofuran. En la etapa de competición, la curva patrón se preparó en tampón PBS 2× y el anticuerpo monoclonal o el trazador se diluyó en tampón PBS 2× conteniendo BSA al 0.1%, a la concentración de disolvente ensayada. Algunos valores de la I_{50} y de la A_{max} no se han considerado porque no se ajustaron a la curva de cuatro parámetros. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. **A** Formato CI (OVA-BFNH, 0.005 : g/ml; LIB-BFNH67, 0.03 : g/ml). **B** Formato AI (LIB-BFNH67, 1 : g/ml; HRP-BFNH, 0.01 : g/ml). **C** Representación del valor A_{max}/I_{50} para cada formato.

2.4.4. Características de los ensayos optimizados.

Las características analíticas de la curva estándar se evaluaron a partir del promedio de 40 curvas obtenidas por triplicado. En la figura 3.2.7 se muestran las curvas normalizadas de los dos formatos de ELISA que resultan una vez optimizadas las condiciones del ensayo. La tabla 3.2.5 muestra un resumen de las características de los ensayos optimizados para el carbofuran, estimados a partir de las curvas estándar de la figura 3.2.7. El límite de detección (concentración de analito que inhibe la señal máxima un 10%) y el rango de trabajo del ensayo (concentración de analito que proporciona un 20-80% de inhibición de la A_{max}) fueron muy similares en ambos formatos, como se observa claramente en la figura, donde las curvas de inhibición en los formatos CI y AI son prácticamente indistinguibles. Los valores de I_{50} para el carbofuran fueron 660 y 770 ng/l en los formatos CI y AI respectivamente, comparables con la sensibilidad del único inmunoensayo para el carbofuran descrito en la literatura ($I_{50} = 820$ ng/l; Jourdan *et al.*, 1995).

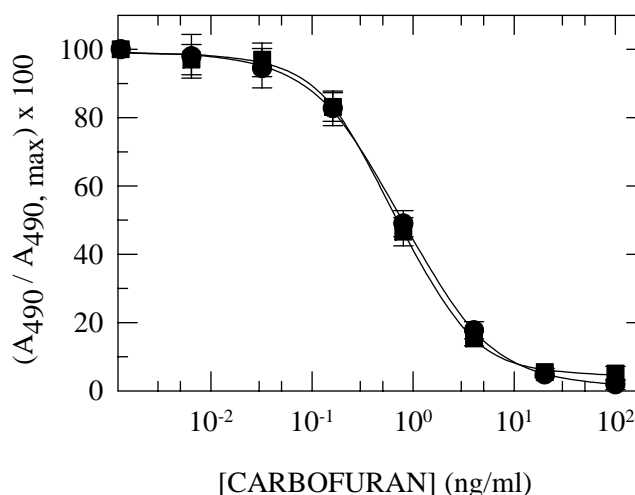


Figura 3.2.7. Curvas patrón normalizadas para el carbofuran, obtenidas bajo las condiciones de los ensayos optimizados que se indican en la tabla 3.2.5: () formato CI, () formato AI. Cada curva representa la media de 40 curvas estándar de carbofuran hechas por triplicado. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Tabla 3.2.5. Resumen de las características del inmunoensayo de carbofuran.

	Formato	
	CI	AI
Concentraciones de inmunorreactivos		
[OVA-BFNH] (: g/ml)	0.01	na ^a
[LIB-BFNB67] (: g/ml)	0.025	1.0
[HRP-BFNH] (: g/ml)	na	0.05
Condiciones del tampón		
% BSA	0.1	
concentración de sal	100 mM fosfato, 137 mM NaCl	
pH	7.4	
% thimerosal	0.01	
tolerancia a disolventes	15% metanol	
Características analíticas de la curva estándar ^b		
A _{max}	1.14	1.05
A _{min}	0.06	0.02
I ₅₀ (ng/l)	660	770
pendiente	1.14	0.98
concentración que proporciona:		
20-80% inhibición (ng/l)	200 - 2740	180 - 3340
10% inhibición (ng/l)	92	78
Tiempo de ensayo		
tapizado	toda la noche	
reacción de competición	1 h	
reacción con el anticuerpo marcado	1 h	na
desarrollo de color	10 min	

^aNo aplicable. ^bDatos obtenidos promediando 40 curvas realizadas por triplicado durante 5 meses.

3. APLICACIÓN DE LOS ELISAs DESARROLLADOS AL ANÁLISIS DE FRUTAS Y HORTALIZAS. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN Y VALIDACIÓN FRENTE A HPLC.

La capacidad de análisis de los ELISAs de carbofuran y methiocarb, objeto de esta tesis, junto con el de carbaryl, previamente desarrollado en el LIB, fue evaluada mediante estudios de recuperación. Asimismo, estos inmunoensayos fueron validados frente a HPLC en el análisis de frutas y hortalizas.

Para cada inmunoensayo se utilizó una placa de ELISA y cada analito se analizó en presencia de los otros dos. En cada placa se incluyó una curva estándar de 8 puntos para una estimación más exacta de la concentración de analito. La parte central de la curva ($I_{80} - I_{20}$) fue asumida como el rango operativo de trabajo del inmunoensayo. Dado que los resultados obtenidos en los formatos CI y AI fueron muy similares, solamente se han considerado para la discusión los correspondientes al formato AI. En la figura 3.3.1 se muestran las curvas estándar representativas de los ELISAs de carbaryl, carbofuran y methiocarb en este formato. Estas curvas se han obtenido promediando 24 curvas de inhibición previamente normalizadas.

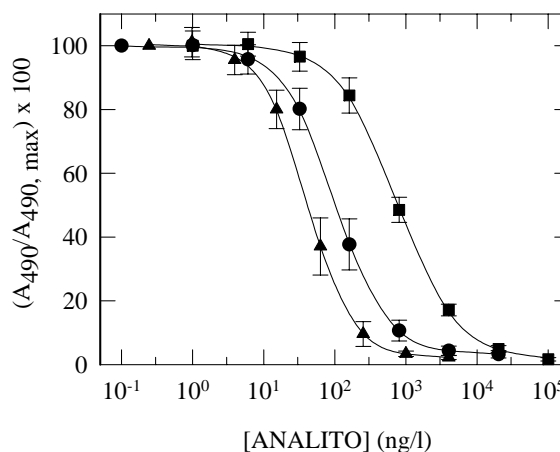


Figura 3.3.1

Curvas estándar representativas para los ELISAs individuales de carbaryl (▲), carbofuran (●) y methiocarb (■), en el formato AI. Cada una de ellas representa la media de 24 curvas estándar realizadas por triplicado. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Las características analíticas de estas curvas se muestran en la tabla 3.3.1.

Tabla 3.3.1. Características analíticas de las curvas estándar de carbaryl, carbofuran y methiocarb en el formato AI.

	CARBARYL	CARBOFURAN	METHIOCARB
A_{\max}	1.32 ± 0.41	1.17 ± 0.34	1.70 ± 0.11
I_{50} (ng/l)	101.0 ± 26.9	740 ± 110	40 ± 10
$I_{80} - I_{20}$ (ng/l)	31.6 - 364.0	200 - 3100	15 - 120

3.1. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

Se eligieron 7 productos hortofrutícolas (pimiento, pepino, tomate, patata, naranja, fresón y manzana) para evaluar la capacidad de análisis de estos inmunoensayos. Estos productos fueron fortificados con carbaryl, carbofuran y methiocarb a concentraciones inferiores a los LMRs de estos plaguicidas en esas matrices (0.2 - 5.0 ppm). Las concentraciones de fortificación fueron 10, 50 y 200 ppb. A partir de 6 réplicas de cada matriz se prepararon dos tipos de muestras, los extractos no purificados y los purificados, tal como se ha explicado en el apartado 9.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Los dos tipos de muestras se analizaron mediante ELISA. Las concentraciones de los inmunorreactivos, así como las diluciones de la muestra requeridas para los inmunoensayos de carbaryl, carbofuran y methiocarb, se resumen en la tabla 3.3.2.

Tabla 3.3.2. Concentraciones de los inmunorreactivos y diluciones de las muestras en los inmunoensayos de carbaryl, carbofuran y methiocarb en el formato AI.

	ELISA		
	Carbaryl	Carbofuran	Methiocarb
Concentración de anticuerpo (: g/ml)	LIB-CNH45	LIB-BFNB67	LIB-MXNB31
	1.5	1.0	0.75
Concentración de trazador (: g/ml)	HRP-CPNU	HRP-BFNH	HRP-MCNH
	0.035	0.05	0.2
Dilución de la muestra en el ensayo			
10 ppb	1 / 40	1 / 10	1 / 80
50 ppb	1 / 160	1 / 30	1 / 360
200 ppb	1 / 600	1 / 120	1 / 1500

3.1.1. Determinación de carbaryl.

Las concentraciones medias de los extractos purificados y no purificados, estimadas a partir de la curva estándar de carbaryl, se muestran en la tabla 3.3.3. Independientemente de la matriz analizada, las recuperaciones medias obtenidas en las muestras purificadas (88.1, 87.5 y 87.3% para las concentraciones 10, 50 y 200 ppb, respectivamente), fueron algo menores que las correspondientes a las muestras no purificadas (90.1, 97.1 y 114.1%, respectivamente), pero en cualquier caso las recuperaciones en ambos tipos de muestras fueron próximas al 100%. Estos resultados indican que el inmunoensayo de carbaryl se puede utilizar para el análisis de los extractos purificados y no purificados de una gran variedad de matrices. Además, la eliminación de la etapa de purificación de las muestras proporciona recuperaciones más próximas al 100%, con una precisión comparable a la de las muestras purificadas.

Teniendo en cuenta el procedimiento seguido para la extracción de la muestra, la dilución requerida en el inmunoensayo (1/40 como mínimo) y el rango operativo de la curva estándar del ELISA, se puede considerar que el límite de cuantificación del método es 3.4 ppb.

3.1.2. Determinación de carbofuran.

Las concentraciones medias de los extractos purificados y no purificados, estimadas a partir de la curva estándar de carbofuran, se muestran en la tabla 3.3.4. Como se puede observar, las recuperaciones medias obtenidas en las muestra purificadas, fortificadas a 10, 50, y 200 ppb, fueron 62.4, 77.1 y 80.7%, respectivamente. Las bajas recuperaciones observadas a 10 ppb, especialmente en tomate, patata y manzana, fueron probablemente debidas a efectos matriz como consecuencia de la dilución insuficiente de estas muestras en el tampón de ensayo. Desafortunadamente, no fue posible el uso de una dilución mayor porque las concentraciones de las muestras no entraban en el rango de trabajo de la curva estándar. Las recuperaciones de las muestras fortificadas a 50 y 200 ppb, aunque claramente menores que el 100 %, se podrían considerar aceptables con la única excepción de la manzana (53.0 y 53.8 %, respectivamente).

Como en el caso del carbaryl, las recuperaciones obtenidas en las muestras no purificadas fueron más próximas al 100% que las correspondientes a las muestras purificadas. En los extractos fortificados a 10 ppb también se observaron efectos matriz como consecuencia de una dilución insuficiente, pero en este caso el efecto fue el opuesto, es decir, el ELISA tendía a sobrestimar las concentraciones de carbofuran, especialmente en pepino, patata y naranja.

Los resultados obtenidos demuestran que la etapa de purificación de la muestra también puede ser omitida en las determinaciones de carbofuran por ELISA, proporcionando resultados más exactos con una precisión comparable.

Teniendo en cuenta el procedimiento seguido para la extracción de la muestra, la dilución requerida en el inmunoensayo (1/10 como mínimo) y el rango operativo de la curva estándar del ELISA, se puede considerar que el límite de cuantificación del método es 16 ppb.

3.1.3. Determinación de methiocarb.

Las concentraciones medias de los extractos purificados y no purificados, estimadas a partir de la curva estándar de methiocarb, se muestran en la tabla 3.3.5. Independientemente de la matriz analizada, las recuperaciones medias obtenidas en las muestras purificadas (72.9, 74.3 y 73.2% para las concentraciones 10, 50 y 200 ppb, respectivamente), también fueron menores que las correspondientes a las muestras no purificadas (89, 98.7 y 131.1%, respectivamente), como ocurría en los ELISAs de carbaryl y carbofuran. Estos resultados parecen indicar que se producen pérdidas de plaguicida cuando la muestra es sometida a una etapa de purificación. Los datos mostrados en la tabla demuestran que la etapa de purificación también puede ser omitida en los análisis de methiocarb mediante ELISA. De nuevo, esta aproximación, proporciona resultados más exactos con una precisión comparable.

Teniendo en cuenta el procedimiento seguido para la extracción de la muestra, la dilución requerida en el inmunoensayo (1/80 como mínimo) y el rango operativo de la curva estándar del ELISA, se puede considerar que el límite de cuantificación del método es 3.4 ppb.

Tabla 3.3.3. Estudios de recuperación por ELISA (formato AI) de muestras extraídas de frutas y hortalizas, purificadas y no purificadas, fortificadas con carbaryl a 10, 50 y 200 ppb.

Concent. de fortificación (ppb)	matriz	muestras purificadas			muestras no purificadas		
		media \pm SD (ppb)	recuperación (%)	CV (%)	media \pm SD (ppb)	recuperación (%)	CV (%)
10	pimiento	8.9 \pm 1.1	89.0	12.4	7.0 \pm 0.6	70.0	8.6
	pepino	9.4 \pm 0.2	94.0	2.1	10.2 \pm 0.4	102.0	3.9
	fresón	8.0 \pm 0.4	80.0	5.0	7.2 \pm 0.4	72.0	5.6
	tomate	7.9 \pm 0.6	79.0	7.6	8.2 \pm 0.7	82.0	8.5
	patata	9.6 \pm 0.6	96.0	6.3	9.3 \pm 0.5	93.0	5.4
	naranja	12.0 \pm 0.8	120.0	6.7	11.7 \pm 0.4	117.0	3.4
	manzana	5.9 \pm 0.9	59.0	15.3	9.5 \pm 0.6	95.0	6.3
	media		88.1		90.1		
50	pimiento	42.2 \pm 2.2	84.4	5.2	39.5 \pm 5.9	79.0	14.9
	pepino	43.0 \pm 2.8	86.0	6.5	49.2 \pm 1.6	98.4	3.3
	fresón	39.4 \pm 5.1	78.8	12.9	46.5 \pm 1.9	93.0	4.1
	tomate	44.0 \pm 3.3	88.0	7.5	56.1 \pm 3.3	112.2	5.9
	patata	49.4 \pm 2.6	98.8	5.3	49.5 \pm 2.9	99.0	5.9
	naranja	49.3 \pm 2.2	98.6	4.5	48.3 \pm 5.3	96.6	11.0
	manzana	39.1 \pm 1.7	78.2	4.3	50.6 \pm 2.6	101.2	5.1
	media		87.5		97.1		
200	pimiento	141.2 \pm 11.5	70.6	8.1	182.4 \pm 13.1	91.2	7.2
	pepino	172.5 \pm 13.7	86.3	7.9	215.7 \pm 13.1	107.9	6.1
	fresón	167.3 \pm 13.5	83.7	8.1	215.3 \pm 7.9	107.7	3.7
	tomate	171.1 \pm 27.8	85.6	16.2	275.4 \pm 29.0	137.7	10.5
	patata	201.5 \pm 11.2	100.8	5.6	218.7 \pm 12.0	109.4	5.5
	naranja	223.7 \pm 52.2	111.9	23.3	253.6 \pm 72.8	126.8	28.7
	manzana	144.6 \pm 19.9	72.3	13.8	236.2 \pm 18.1	118.1	7.7
	media		87.3		114.1		

Los resultados se obtuvieron a partir del análisis de 6 réplicas en 3 días consecutivos. Las muestras a 10, 50 y 200 ppb se diluyeron 1/20, 1/80 y 1/300, respectivamente (1/40, 1/160 y 1/600 en ensayo).

Tabla 3.3.4. Estudios de recuperación por ELISA (formato AI) de muestras extraídas de frutas y hortalizas, purificadas y no purificadas, fortificadas con carbofuran a 10, 50 y 200 ppb.

concent. de fortificación (ppb)	matriz	muestras purificadas			muestras no purificadas		
		media ± SD (ppb)	recuperación (%)	CV (%)	media ± SD (ppb)	recuperación (%)	CV (%)
10	pimiento	7.6 ± 0.9	76.0	11.8	11.4 ± 1.2	114.0	10.5
	pepino	8.7 ± 0.9	87.0	10.3	21.9 ± 3.5	219.0	16.0
	fresón	6.8 ± 1.3	68.0	19.1	12.1 ± 0.9	121.0	7.4
	tomate	5.7 ± 1.0	57.0	17.5	10.3 ± 2.2	103.0	21.4
	patata	5.3 ± 0.5	53.0	9.4	15.8 ± 1.0	158.0	6.3
	naranja	7.1 ± 0.5	71.0	7.0	13.4 ± 0.8	134.0	6.0
	manzana	2.5 ± 1.1	25.0	44.0	9.8 ± 1.5	98.0	15.3
media			62.4		135.3		
50	pimiento	42.4 ± 4.8	84.8	11.3	48.6 ± 8.6	97.2	17.7
	pepino	46.6 ± 1.8	93.2	3.9	61.6 ± 4.8	123.2	7.8
	fresón	40.6 ± 3.8	81.2	9.4	46.9 ± 2.6	93.8	5.5
	tomate	38.7 ± 3.7	77.4	9.6	44.8 ± 1.4	89.6	3.1
	patata	36.0 ± 1.3	72.0	3.6	54.0 ± 3.7	108.0	6.9
	naranja	39.1 ± 5.9	78.2	15.1	46.7 ± 3.6	93.4	7.7
	manzana	26.5 ± 2.0	53.0	7.6	41.1 ± 2.5	82.2	6.1
media			77.1		98.2		
200	pimiento	167.5 ± 22.0	83.8	13.1	185.1 ± 10.9	92.6	5.9
	pepino	183.5 ± 14.7	91.8	8.0	180.4 ± 8.7	90.2	4.8
	fresón	183.9 ± 14.7	92.0	8.0	198.5 ± 11.0	99.3	5.5
	tomate	151.6 ± 25.3	75.8	16.7	204.7 ± 15.1	102.4	7.4
	patata	155.9 ± 15.6	78.0	10.0	197.5 ± 11.6	98.8	5.9
	naranja	180.2 ± 18.5	90.1	10.3	200.8 ± 22.5	100.4	11.2
	manzana	107.5 ± 19.7	53.8	18.3	180.0 ± 7.9	90.0	4.4
media			80.8		96.2		

Los resultados se obtuvieron a partir del análisis de 6 réplicas en 3 días consecutivos. Las muestras 10, 50 y 200 ppb se diluyeron 1/5, 1/15 y 1/60, respectivamente (1/10, 1/30 y 1/120 en ensayo).

Tabla 3.3.5. Estudios de recuperación por ELISA (formato AI) de muestras extraídas de frutas y hortalizas, purificadas y no purificadas, fortificadas con methiocarb a 10, 50 y 200 ppb.

Concent. de fortificación (ppb)	matriz	muestras purificadas			muestras no purificadas		
		media \pm SD (ppb)	recuperación (%)	CV (%)	media \pm SD (ppb)	recuperación (%)	CV (%)
10	pimiento	6.8 \pm 0.7	68.0	10.3	6.5 \pm 1.6	65.0	24.6
	pepino	7.1 \pm 0.4	71.0	5.6	9.6 \pm 1.2	96.0	12.5
	fresón	6.0 \pm 1.0	60.0	16.7	9.7 \pm 0.9	97.0	9.3
	tomate	6.8 \pm 1.3	68.0	19.1	8.7 \pm 2.1	87.0	24.1
	patata	10.7 \pm 1.1	107.0	10.3	10.5 \pm 1.3	105.0	12.4
	naranja	8.7 \pm 0.8	87.0	9.2	8.6 \pm 1.2	86.0	14.0
	manzana	4.9 \pm 1.1	49.0	22.4	8.7 \pm 1.0	87.0	11.5
media			72.9		89.0		
50	pimiento	38.8 \pm 4.4	77.6	11.3	43.9 \pm 10.9	87.8	24.8
	pepino	31.3 \pm 4.1	62.6	13.1	55.6 \pm 2.6	111.2	4.7
	fresón	32.7 \pm 8.3	65.4	25.4	43.9 \pm 3.4	87.8	7.7
	tomate	34.8 \pm 4.7	69.6	13.5	57.8 \pm 10.8	115.6	18.7
	patata	50.8 \pm 5.5	101.6	10.8	61.2 \pm 6.5	122.4	10.6
	naranja	40.9 \pm 5.1	81.8	12.5	36.5 \pm 8.4	73.0	23.0
	manzana	30.6 \pm 4.0	61.2	13.1	46.5 \pm 3.8	93.0	8.2
media			74.3		98.7		
200	pimiento	119.7 \pm 23.5	59.9	19.6	208.6 \pm 36.0	104.3	17.3
	pepino	105.9 \pm 15.0	53.0	14.2	206.2 \pm 35.3	103.1	17.1
	fresón	137.3 \pm 15.5	68.7	11.3	251.9 \pm 30.9	126.0	12.3
	tomate	131.8 \pm 25.1	65.9	19.0	312.8 \pm 32.3	156.4	10.3
	patata	202.6 \pm 30.1	101.3	14.9	402.6 \pm 59.5	201.3	14.8
	naranja	206.5 \pm 19.0	103.3	9.2	193.2 \pm 25.8	96.6	13.4
	manzana	121.2 \pm 20.4	60.6	16.8	260.2 \pm 26.3	130.1	10.1
media			73.2		131.1		

Los resultados se obtuvieron a partir del análisis de 6 réplicas en 3 días consecutivos. Las muestras a 10, 50 y 200 ppb se diluyeron 1/40, 1/180 y 1/750, respectivamente (1/80, 1/360 y 1/1500 en ensayo).

3.2. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN FRENTE A HPLC.

Los estudios de validación de los ELISAs frente a HPLC como método de referencia se llevaron a cabo sobre un total de 45 muestras de pimiento, fresón y manzana, fortificadas con carbaryl, carbofuran y methiocarb en el Laboratorio Agroalimentario de la Comunidad Valenciana. Las concentraciones de los plaguicidas eran desconocidas para los analistas. Después de la etapa de extracción, se obtuvieron las muestras no purificadas y purificadas. Las muestras no purificadas se analizaron solamente por ELISA, mientras que los extractos purificados se analizaron por ELISA y HPLC, en laboratorios diferentes. Seis de las 45 muestras analizadas fueron negativas para los tres analitos por ambos métodos. Además, doce de las 45 muestras se situaron por debajo del límite de cuantificación del ELISA de carbofuran, por lo que no se consideraron en los análisis de correlación para esta analito.

El análisis de regresión lineal de los resultados obtenidos a partir de los extractos purificados mostró una buena correlación entre métodos, como se puede apreciar en la figura 3.3.2, con coeficientes de correlación de 0.993, 0.959 y 0.960, correspondientes a la determinación de carbaryl, carbofuran y methiocarb, respectivamente. Las pendientes de las rectas, con valores muy próximos a 1, indican que las concentraciones de los tres plaguicidas obtenidas por ambos métodos son en promedio las mismas. Sin embargo, el análisis de la variabilidad de los resultados de tres determinaciones de cada muestra en días diferentes, demostró que la HPLC, con coeficientes de variación promedio alrededor del 5%, proporcionaba medidas más precisas que el ELISA, con coeficientes de variación promedio alrededor del 12%. También se compararon los resultados del ELISA en muestras no purificadas con los de HPLC en muestras purificadas (figura 3.3.3). A pesar de que la comparación fue establecida entre muestras que habían sido sometidas a un tratamiento diferente, las medidas correlacionaron bien ($r^2 = 0.955, 0.936, 0.872$, para las determinaciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb, respectivamente). No obstante, se observó que los ELISAs tendían a proporcionar valores más altos, como lo demuestran las pendientes de las rectas de correlación, claramente superiores a 1 en las determinaciones de carbaryl y methiocarb, y la elevada ordenada en el origen en las determinaciones de carbofuran. Estos resultados podrían indicar que las muestras no purificadas contienen más plaguicida que las purificadas, hecho que ya se había observado en el análisis de los extractos de concentración conocida, y que podría ser atribuido a las posibles pérdidas de plaguicida que se producen durante las etapas de purificación, evaporación y redisolución de las mismas. Para corroborar esta hipótesis se procedió a comparar los tres grupos de determinaciones analíticas con las concentraciones de fortificación, conocidas solamente al final del estudio. Los análisis de regresión lineal demostraron que las concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb obtenidas

mediante ELISA, en muestras purificadas y no purificadas, y HPLC en muestras purificadas (figuras 3.3.4, 3.3.5 y 3.3.6, respectivamente) correlacionaron bien con los valores de fortificación. Sin embargo, las concentraciones de estos analitos determinadas por ELISA en los extractos no purificados (figura 3.3.5), fueron más similares a las de fortificación (pendientes más próximas a 1) que las obtenidas en las muestras purificadas mediante ELISA (figura 3.3.4) o HPLC (figura 3.3.6). Por lo tanto, parece confirmarse la hipótesis de pérdidas producidas durante la etapa de purificación.

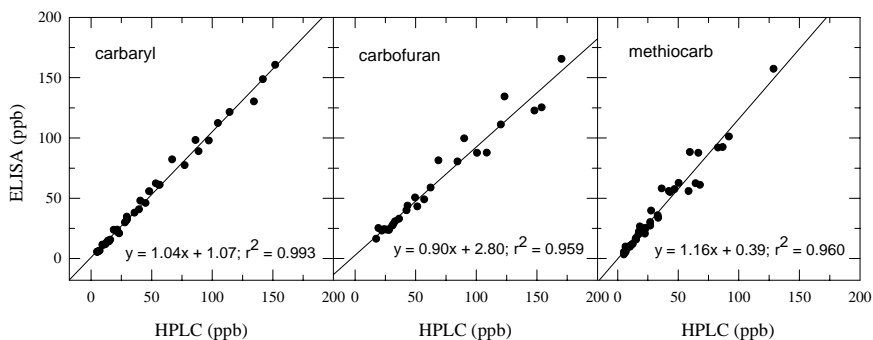


Figura 3.3.2. Correlación de las concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb en muestras purificadas obtenidas mediante el análisis por HPLC y ELISA. Los datos corresponden al análisis de tres réplicas en días consecutivos.

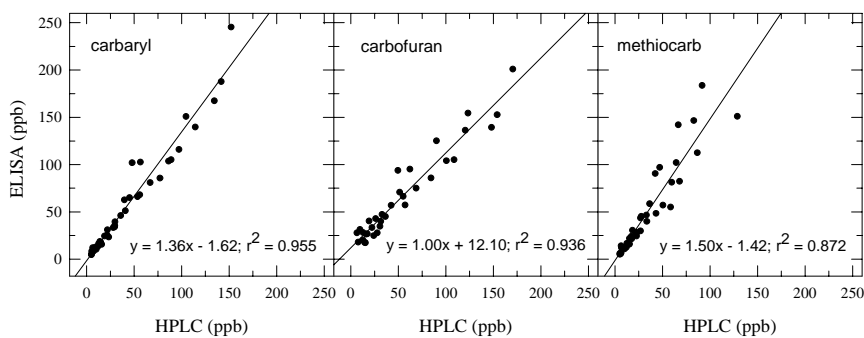


Figura 3.3.3. Correlación de las concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb obtenidas mediante HPLC en muestras purificadas y mediante ELISA en muestras no purificadas. Los datos corresponden al análisis de tres réplicas en días consecutivos.

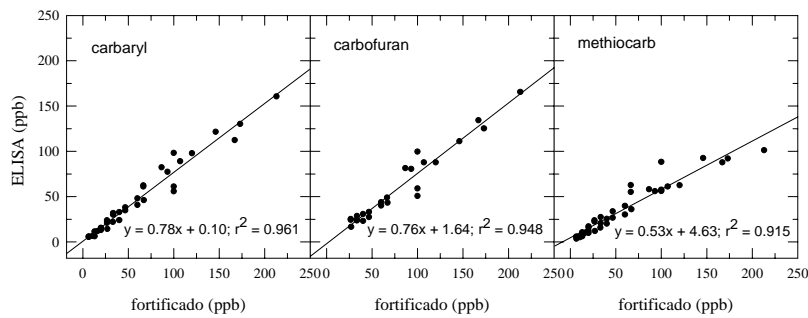


Figura 3.3.4. Análisis de correlación entre las concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb obtenidas mediante ELISA en muestras purificadas y las concentraciones de fortificación. Los datos corresponden al análisis de tres réplicas en días consecutivos.

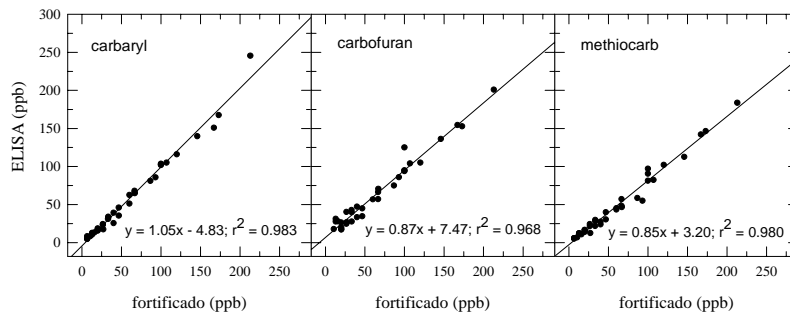


Figura 3.3.5. Análisis de correlación entre las concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb obtenidas mediante ELISA en muestras no purificadas y las concentraciones de fortificación. Los datos corresponden al análisis de tres réplicas en días consecutivos.

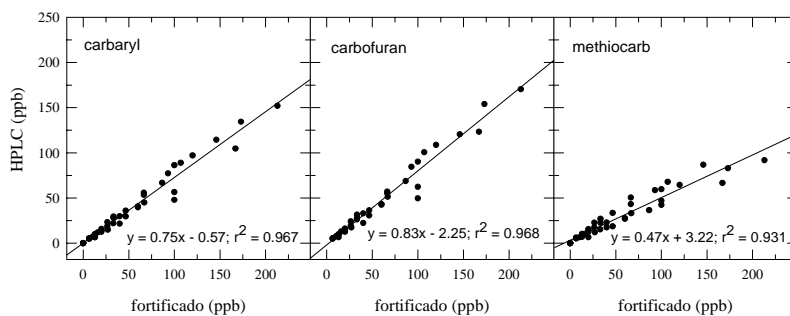


Figura 3.3.6. Análisis de correlación entre las concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb obtenidas mediante HPLC y las concentraciones de fortificación. Los datos corresponden al análisis de tres determinaciones en días consecutivos.

En definitiva, estos resultados indican que los ELISAs de carbaryl, carbofuran y methiocarb pueden ser utilizados como métodos de análisis cuantitativo en muestras de frutas y hortalizas. Además, la capacidad mostrada por estos inmunoensayos para determinar con precisión y exactitud estos analitos en muestras no purificadas, supone una indudable ventaja práctica sobre los métodos que requieren un tratamiento previo de la muestra, como es el caso de la HPLC.

4. DESARROLLO DEL ENSAYO MULTIANALITO.

Un inmunoensayo puede ser adaptado al análisis multiresiduo aprovechando el patrón de diferentes afinidades que pueden presentar determinados anticuerpos hacia un grupo de compuestos relacionados estructuralmente. Sin embargo, los analitos individuales no son fácilmente identificables mediante esta vía, por lo que en este trabajo se ha optado por una aproximación experimental diferente. Esta estrategia consiste en la inmovilización de conjugados de OVA en diferentes áreas de una placa ELISA (inmunoensayo en el formato CI), seguida por la adición de un reactivo único consistente en una mezcla controlada de anticuerpos monoclonales específicos. De esta forma, en cada área se analizará uno y sólo uno de los analitos potencialmente presentes.

4.1. CARACTERIZACIÓN DE DIFERENTES ANTICUERPOS MONOCLONALES DE METHIOCARB Y CARBARYL.

Lo que marca el carácter multianalito del inmunoensayo que se quiere desarrollar es, por lo tanto, la inmovilización de los conjugados de OVA en sitios diferentes de una placa ELISA y el empleo de una mezcla controlada de anticuerpos específicos. Desde este punto de vista, para desarrollar el ensayo multianalito (MELISA) en el formato CI se podrían utilizar los inmunorreactivos que dieron lugar a los ELISAs individuales de carbaryl, carbofuran y methiocarb, cuyas características se resumen en la tabla 3.4.1. No obstante, estos inmunoensayos tienen valores de I_{50} bastante diferentes, existiendo una diferencia de hasta un orden de magnitud entre el ensayo más sensible (el de methiocarb) y el menos sensible (el de carbofuran). Este hecho, que en principio no es importante, se pensó que podría dificultar la interpretación visual de los resultados, en el caso de que no se dispusiera de un lector adecuado.

Tabla 3.4.1. Características de los ensayos individuales de carbaryl, carbofuran y methiocarb.

Analito	Inmunorreactivos (: g/ml)		Parámetros		
	conjugado	anticuerpo	A_{max}	I_{50} (ng/ml)	pendiente
carbaryl	OVA-CNA	LIB-CNH45			
	1	0.02	1.6	0.06	1.03
carbofuran	OVA-BFNH	LIB-BFNB67			
	0.01	0.025	1.14	0.66	1.14
methiocarb	OVA-DPNH	LIB-MXNB31			
	1	0.02	0.96	0.02	1.22

Como consecuencia de ello, y teniendo en cuenta que el ELISA menos sensible es el de carbofuran, se decidió igualar las I_{50} de los tres ensayos individuales a expensas de perder sensibilidad en los ensayos de carbaryl y methiocarb, manteniendo fijos los inmunorreactivos de carbofuran. Para ello, se seleccionaron aquellas combinaciones anticuerpo monoclonal-hapteno conjugado que, ensayadas con el analito correspondiente, proporcionaban los ELISAs menos sensibles en las primeras experiencias de caracterización. Estas combinaciones de inmunorreactivos se volvieron a evaluar mediante ELISAs competitivos frente a carbaryl o methiocarb. Los resultados de las características de los ensayos menos sensibles, así como las concentraciones de los inmunorreactivos que se utilizaron, se muestran en las tablas 3.4.2 y 3.4.3.

Tabla 3.4.2. Características de las curvas competitivas de methiocarb, obtenidas con diferentes inmunorreactivos específicos.

Inmunorreactivos (: g/ml)		Parámetros		
Conjugado	Anticuerpo	A_{max}	I_{50} (nM)	Pendiente
OVA-MXNH	MXNH-14			
4	0.04	1.05	1.85	0.84
OVA-MXNH	MXNH-13			
2		1.17	1.03	0.85
4	0.02	1.06	2.14	0.89
OVA-MXNH	MXNB-33			
2		1.02	1.47	1
4	0.03	1.12	3.23	0.98
OVA-MXNH	MXNB-31			
2		1.17	1.17	0.86
4		0.99	2.4	0.92
OVA-MXNB	0.03			
2		1.08	1.65	1.92
4		0.89	3.43	0.94

Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

Tabla 3.4.3. Características de las curvas competitivas de carbaryl obtenidas con diferentes inmunorreactivos específicos.

Inmunorreactivos (: g/ml)		Parámetros		
Conjugado	Anticuerpo	A_{max}	I_{50} (nM)	Pendiente
OVA-CPNU	LIB-CNH-45			
1	0.04	1.79	1.67	0.97
2		1.66	3.12	0.9
OVA-1NA	LIB-CNA-36			
0.3	0.02	1.52	2.27	1.08

Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

De acuerdo con los datos mostrados en la tabla 3.4.2, se seleccionaron el anticuerpo monoclonal de methiocarb LIB-MXNB33 (utilizado a 0.03 : g/ml) y el conjugado OVA-MXNH (utilizado a 4 : g/ml), como los inmunorreactivos específicos de methiocarb más adecuados para su integración en un ELISA multianalito. En cuanto al ensayo de carbaryl (tabla 3.4.3), se seleccionaron el anticuerpo LIB-CNA36 y el conjugado OVA-1NA, aunque el ensayo menos sensible ($I_{50} = 3.12$) se obtuvo con el anticuerpo LIB-CNH45 (0.04 : g/ml) y el conjugado OVA-CPNU (2 : g/ml). Sin embargo, este último requirió concentraciones de inmunorreactivos algo más elevadas.

Las características de los ELISAs individuales que conformarían el ELISA multianalito son por lo tanto las que aparecen resumidas en la tabla 3.4.4.

Tabla 3.4.4. Características de los ensayos individuales de carbaryl, carbofuran y methiocarb que podrían formar parte del ELISA multianalito.

Analito	Inmunorreactivos (: g/ml)		Parámetros		
	conjugado	anticuerpo	A_{max}	I_{50} (ng/ml)	pendiente
carbaryl	OVA-1NA	LIB-CNA36			
	0.3	0.02	1.52	0.46	1.08
carbofuran	OVA-BFNH	LIB-BFNB67			
	0.01	0.025	1.14	0.66	1.14
methiocarb	OVA-MXNH	LIB-MXNB33			
	4	0.03	1.12	0.73	0.98

Una vez que se seleccionaron los inmunorreactivos que constituirían el ELISA multianalito de carbaryl, carbofuran y methiocarb, se diseñó una experiencia para confirmar que cada anticuerpo reconocía a su analito correspondiente en presencia de los otros dos. Con esta finalidad, se ensayó para cada anticuerpo la curva estándar del analito correspondiente y la curva estándar de la mezcla de los tres analitos. El resultado de esta experiencia se muestra en la figura 3.4.1. Como era de esperar, los anticuerpos fueron muy específicos de sus analitos correspondientes. El siguiente paso fue confirmar la ausencia de reconocimientos cruzados anticuerpo-conjugado. Para llevar a cabo este estudio se diseñó la siguiente experiencia. Se tapizaron diferentes regiones de tres placas ELISA con los conjugados seleccionados, y en cada placa se ensayó la curva estándar de la mezcla de los tres analitos con un anticuerpo. De este modo debía de hacer evidente la posible *reactividad compartida* de estos anticuerpos. Este efecto ocurre cuando los haptenos conjugados a OVA no son únicamente reconocidos por sus anticuerpos específicos. Normalmente el término *reactividad compartida* se refiere a un antisuero policlonal, aunque también se puede aplicar en este caso porque la mezcla de anticuerpos monoclonales se puede considerar como un suero policlonal sintético (Schuetz *et al.*, 1999).

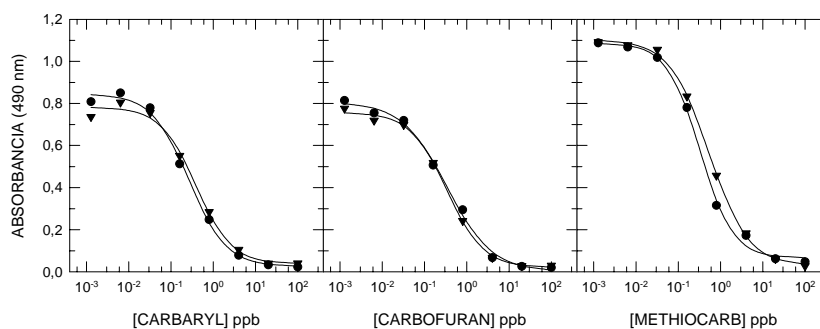


Figura 3.4.1. Curvas estándar de carbaryl, carbofuran y methiocarb resultantes de la adición de cada analito individualmente (●) o de la mezcla de los tres analitos (■). Los haptenos conjugados se inmovilizaron en diferentes áreas de una placa ELISA. En cada una de ellas se ensayó un anticuerpo con la curva estándar del analito correspondiente y la curva estándar de la mezcla de los tres analitos.

Las curvas que resultaron de esta experiencia están representadas en la figura 3.4.2. Como puede observarse, el anticuerpo de methiocarb LIB-MXNB33 únicamente reconoció a su conjugado (OVA-MXNH). Sin embargo, el anticuerpo de carbofuran (LIB-BFNB67) y el de carbaryl (LIB-CNA36) además de reconocer cada uno de ellos a

su propio conjugado, también reconocieron al conjugado de methiocarb. Es más, el anticuerpo de carbaryl también reconoció al conjugado de carbofuran (OVA-BFNH). Como consecuencia de estos resultados, hubo que descartar estos inmunorreactivos de carbaryl y methiocarb para utilizarlos en el ensayo multianalito.

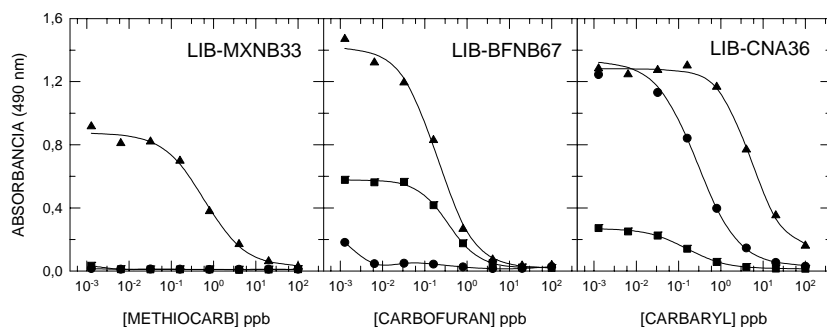


Figura 3.4.2. Estudios de reconocimiento de los conjugados de tapizado (•) OVA-MXNH, (○) OVA-BFNH, y (△) OVA-INA, por los anticuerpos monoclonales LIB-MXNB33, LIB-BFN67 y LIB-CNA36. Las curvas se han obtenido por cuadruplicado.

Para evitar más problemas de reconocimiento, se optó por una estrategia más rigurosa, aunque más lenta, consistente en establecer previamente la compatibilidad de los inmunorreactivos mediante ELISAs no competitivos y ELISAs competitivos. Al mismo tiempo que empezó a desarrollarse el ELISA multianalito, los estudios que se estaban realizando en nuestro laboratorio sobre la incubación simultánea del anticuerpo específico y el anticuerpo marcado empezaron a dar sus frutos. La idea, de nuevo, era sencilla. El principal inconveniente del formato CI con respecto al formato AI es que el primero es un ensayo indirecto y el segundo es un ensayo directo. La principal consecuencia práctica de este hecho es que el formato CI requiere una etapa más que el formato AI, ya que tradicionalmente hay que lavar la placa después de la incubación con el anticuerpo específico y antes de la adición del segundo anticuerpo marcado, lo que sin duda aumenta el tiempo de ensayo e introduce una manipulación adicional que incrementa el riesgo de error, fundamentalmente por parte de usuarios poco experimentados. Así pues, decidimos llevar a cabo una serie de experiencias encaminadas a determinar si era posible añadir, simultáneamente, la mezcla de anticuerpos monoclonales y el anticuerpo marcado, con lo que se conseguiría reducir el formato CI a una sola etapa. Los resultados obtenidos con este propósito fueron muy positivos, lo que en adelante permitió la realización de los ensayos aplicando condiciones de incubación simultánea.

4.2. ENSAYOS NO COMPETITIVOS.

La finalidad de estos ensayos fue determinar el reconocimiento de cada anticuerpo seleccionado hacia los haptenos conjugados de OVA de los otros dos analitos.

En una experiencia se determinó qué conjugados de carbofuran (OVA-BFNH) y de methiocarb (OVA-MXNP, OVA-MXNB, OVA-MXNH, OVA-MCNP, OVA-MPNH, OVA-DPNH y OVA-MPNH) no eran reconocidos por el anticuerpo de carbaryl LIB-CNH45. Los conjugados de methiocarb que se han elegido proporcionaban buenos ensayos competitivos con los anticuerpos correspondientes.

En otra experiencia se determinó qué conjugados de methiocarb (enumerados anteriormente) y de carbaryl (OVA-CNH, OVA-CPNU, OVA-CNA, OVA-1NA, OVA-1NAH, y OVA-2NAH) no eran reconocidos por el anticuerpo de carbofuran LIB-BFNB67.

Por último, se estudió si los anteriores conjugados de carbaryl y el conjugado de carbofuran OVA-BFNH eran reconocidos o no por los anticuerpos de methiocarb.

El reconocimiento de los conjugados de methiocarb y de carbofuran por el anticuerpo de carbaryl LIB-CNH45 se muestra en la figura 3.4.3. El conjugado de carbofuran OVA-BFNH no fue reconocido por el anticuerpo de carbaryl LIB-CNH45. Sin embargo, este anticuerpo reconoció en mayor o menor medida a todos los conjugados de methiocarb. El conjugado seleccionado, por ser el peor reconocido, fue OVA-MCNP, aunque faltaría determinar si a las concentraciones de este conjugado y de LIB-CNH45 que se emplearían en el ensayo, se podría producir algún tipo de interferencia.

El reconocimiento de los conjugados de methiocarb y de carbaryl por el anticuerpo de carbofuran LIB-BFNB67 se representa en las figuras 3.4.4 y 3.4.5, respectivamente. Los únicos conjugados de methiocarb no reconocidos por el anticuerpo de carbofuran fueron OVA-MCNP, OVA-MCNH y OVA-MPNH (figura 3.4.4). Como los dos últimos sí que fueron reconocidos por LIB-CNH45, fueron descartados como candidatos para formar parte del ensayo multianalito. Por lo tanto, el único conjugado de methiocarb que podía ser considerado era OVA-MCNP. Por otra parte, LIB-BFNB67 reconoció a todos los conjugados de carbaryl (figura 3.4.5). No obstante, OVA-1NA y OVA-2NAH únicamente fueron reconocidos cuando se emplearon a concentraciones elevadas de anticuerpo, por lo que este hecho podría no tener importancia a las concentraciones de inmunorreactivos empleados en el MELISA.

Llegados a este punto, sólo faltaba establecer el anticuerpo de methiocarb que sería utilizado en el ELISA multianalito. Ya se ha comentado anteriormente que OVA-

MCNP es el único conjugado de methiocarb que puede ser utilizado en el MELISA porque no es reconocido por el anticuerpo de carbofuran (LIB-BFNB67) y únicamente lo es por el de carbaryl (LIB-CNH45) cuando se utilizan concentraciones elevadas de este anticuerpo y de OVA-MCNP. De todos los anticuerpos de methiocarb ensayados con este conjugado se seleccionaron LIB-MXNB31 y LIB-MXNH14, porque proporcionaron buenas curvas competitivas en los primeros ensayos de caracterización. Una vez seleccionados los anticuerpos de methiocarb, se procedió a estudiar su reconocimiento hacia los conjugados de carbaryl y el de carbofuran. Los resultados obtenidos con LIB-MXNB31 y LIB-MXNH14 se muestran en las figuras 3.4.6 y 3.4.7, respectivamente. De ellos se deduce que sólo LIB-MXNH14 puede ser utilizado en el MELISA, puesto que no reconoció ni a OVA-BFNH (conjugado de carbofuran) ni a OVA-2NAH (conjugado de carbaryl).

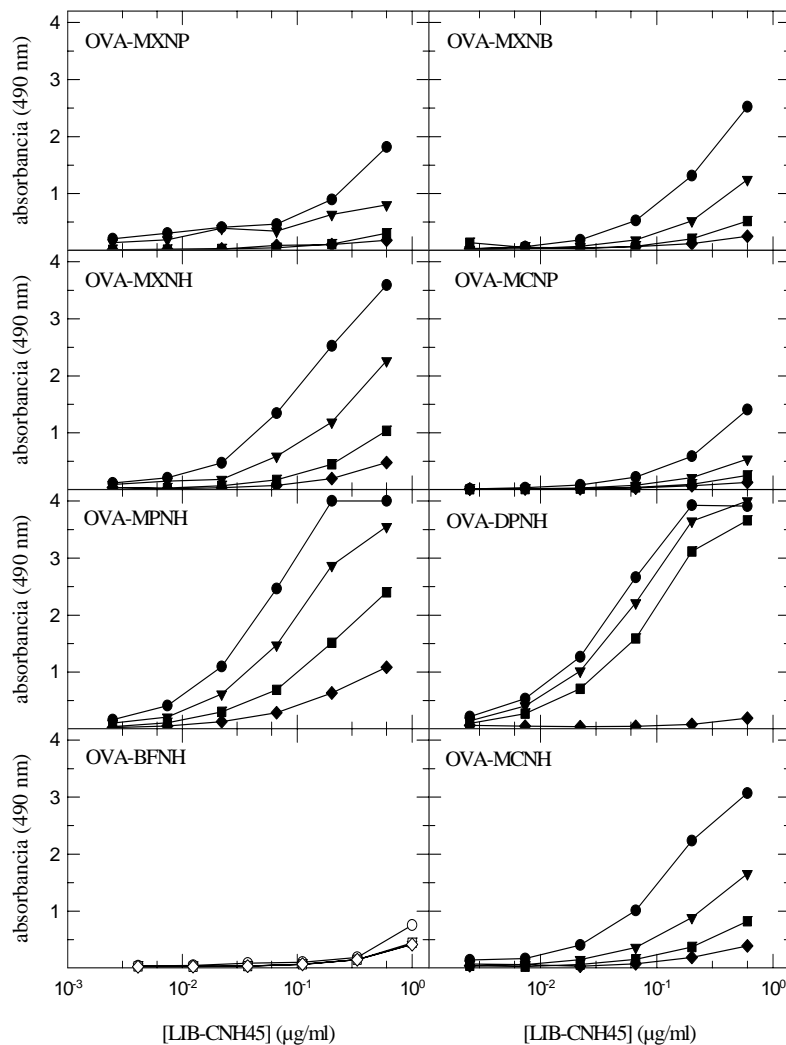


Figura 3.4.3.

Reconocimiento de los conjugado de methiocarb y OVA-BFNH por el anticuerpo de carbaryl LIB-CNH45. Los conjugados de methiocarb se utilizaron a una concentración de: (○) 4 : g/ml, (◒) 2 : g/ml, (◑) 1 : g/ml, y (◓) 0.5 : g/ml. OVA-BFNH se usó a: 4, 1, 0.5 y 0.01 : g/ml, respectivamente (símbolos blancos). Las diluciones del anticuerpo fueron preparadas mediante dilución seriada en tampón FT, a partir de una disolución 2 : g/ml que contenía anticuerpo marcado a una dilución 1/500.

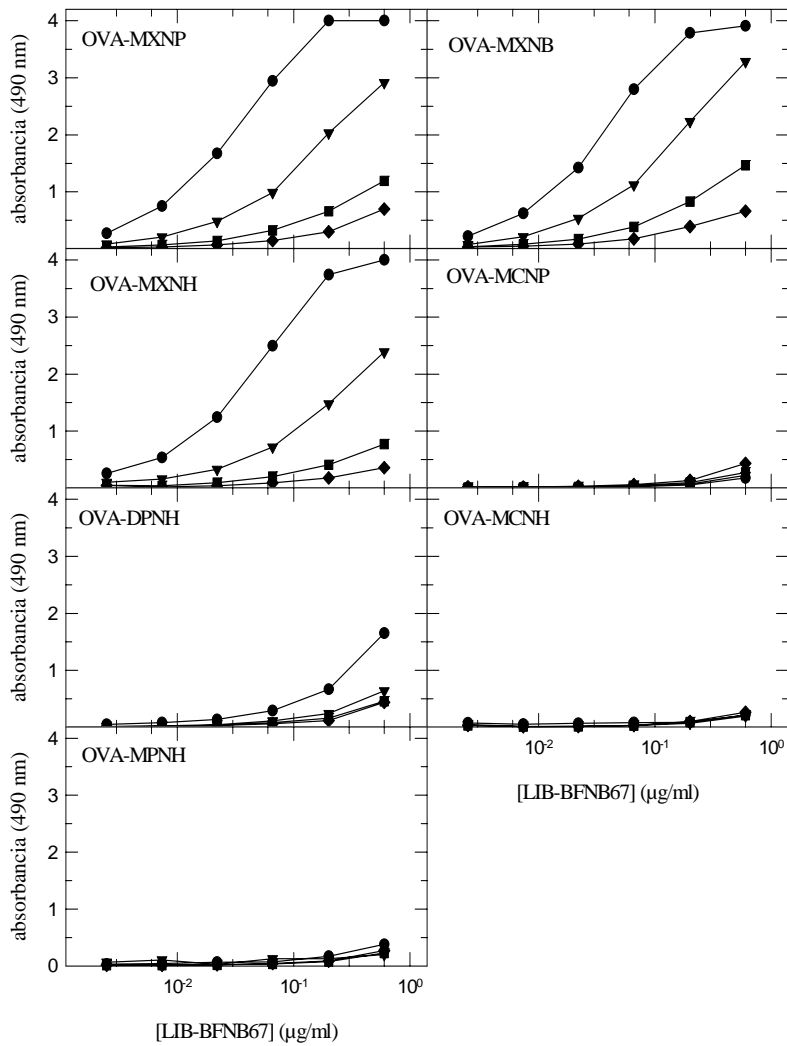


Figura 3.4.4. Reconocimiento de los conjugados de methiocarb por el anticuerpo monoclonal LIB-BFNB67. Los conjugados de tapizado indicados en las gráficas se utilizaron a una concentración de: (○) 4 : g/ml, (△) 2 : g/ml, (□) 1 : g/mL, (◇) 0.5 : g/ml. Las diluciones del anticuerpo fueron preparadas mediante dilución seriada en tampón FT, a partir de una disolución 1.2 : g/ml que contenía anticuerpo marcado a una dilución 1/500.

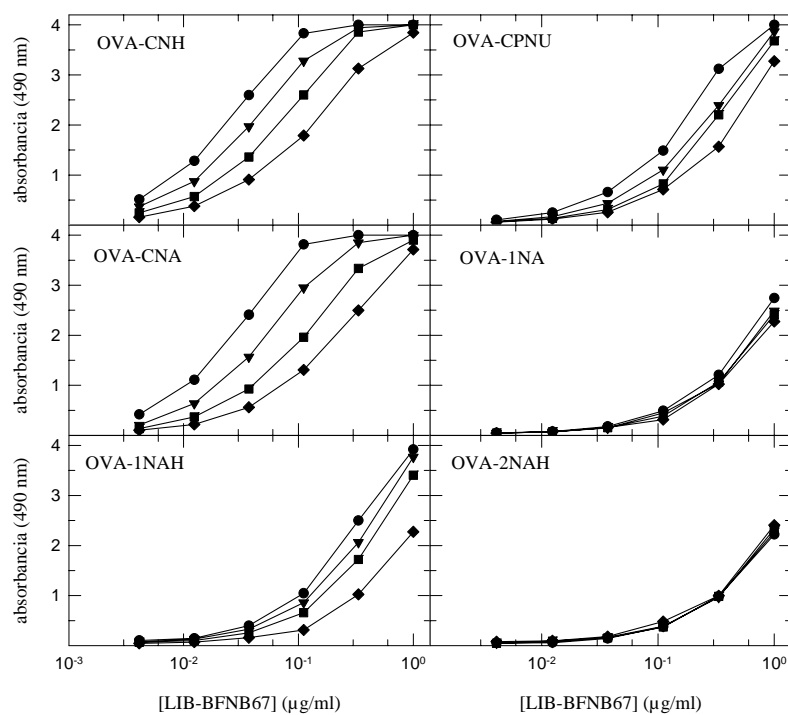


Figura 3.4.5. Reconocimiento de los conjugados de carbaryl por el anticuerpo monoclonal LIB-BFNB67. Los conjugados de tapizado indicados en las gráficas se utilizaron a una concentración de: (●) 4 : g/ml, (■) 2 : g/ml, (▲) 1 : g/ml, (◆) 0.5 : g/ml. Las diluciones del anticuerpo fueron preparadas mediante dilución seriada en tampón FT, a partir de una disolución 2 : g/ml que contenía anticuerpo marcado a una dilución 1/500.

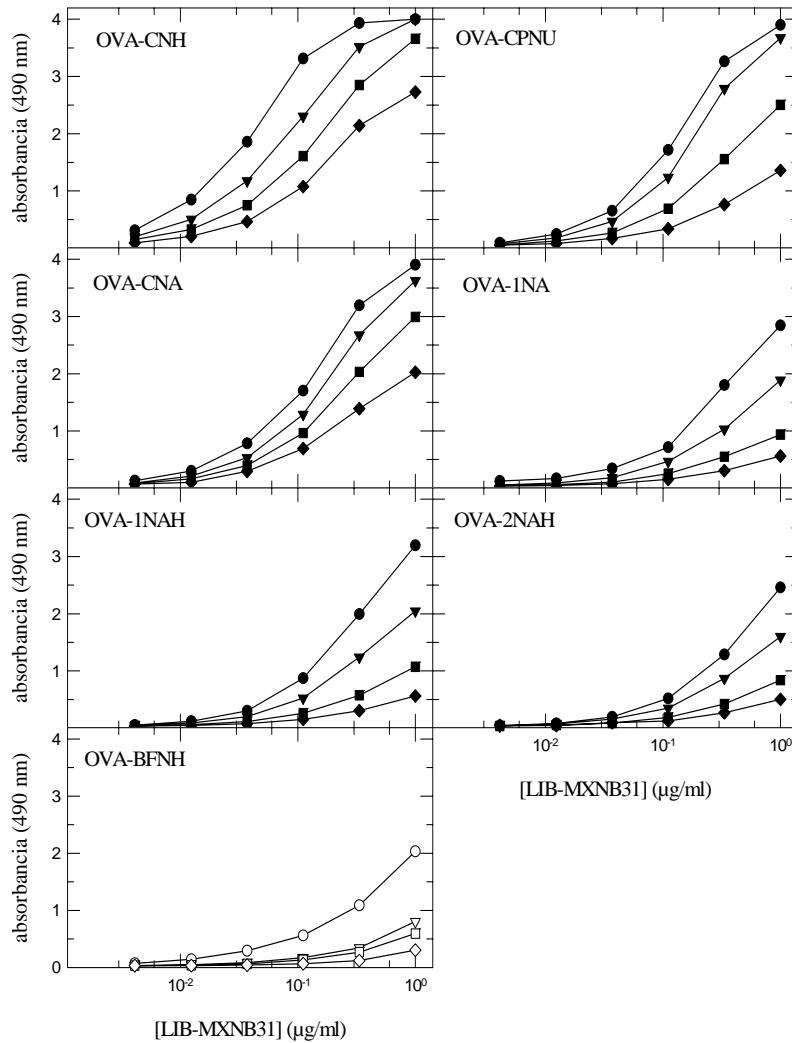


Figura 3.4.6. Reconocimiento de los conjugado de carbaryl y OVA-BFNH por el anticuerpo de methiocarb LIB-MXNB31. Los conjugados de methiocarb se utilizaron a una concentración de: (○) 4 : g/ml, (◒) 2 : g/ml, (◑) 1 : g/ml, y (◐) 0.5 : g/ml. OVA-BFNH se usó a: 4, 1, 0.5 y 0.01 : g/ml, respectivamente (símbolos blancos). Las diluciones del anticuerpo fueron preparadas mediante dilución seriada en tampón FT, a partir de una disolución 2 : g/ml que contenía anticuerpo marcado a una dilución 1/500.

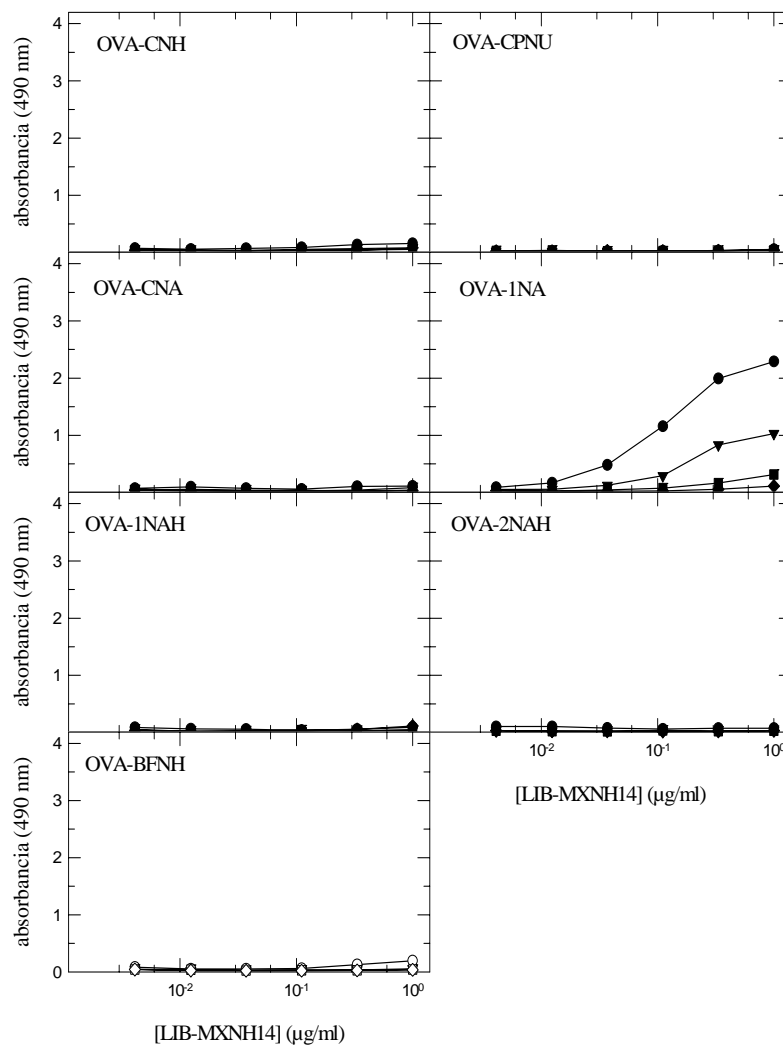


Figura 3.4.7. Reconocimiento de los conjugados de carbaryl y OVA-BFNH por el anticuerpo de methiocarb LIB-MXNH14. Los conjugados de methiocarb se utilizaron a una concentración de: (●) 4 : g/ml, (◻) 2 : g/ml, (◐) 1 : g/ml, y (◑) 0.5 : g/ml. OVA-BFNH se ha usado a: 4, 1, 0.5 y 0.01 : g/ml, respectivamente (símbolos blancos). Las diluciones del anticuerpo fueron preparadas mediante dilución seriada en tampón FT, a partir de una disolución 2 : g/ml que contenía anticuerpo marcado a una dilución 1/500.

De todas estas experiencias se concluyó que los pares de inmunorreactivos que formarían parte del ELISA multianalito serían: LIB-CNH45 y OVA-2NAH, para la determinación de carbaryl; LIB-BFNB67 y OVA-BFNH, para la determinación de carbofuran, y LIB-MXNH14 y OVA-MCNP, para la determinación de methiocarb.

4.3. ENSAYOS COMPETITIVOS.

Una vez escogidas mediante ELISAs no competitivos las parejas de inmunorreactivos compatibles más adecuados, se determinaron sus concentraciones óptimas para el ensayo multianalito mediante ELISAs competitivos. Las características analíticas de las curvas de inhibición se resumen en la tabla 3.4.5. En general, se observa un comportamiento similar en los tres inmunoensayos. Así, un aumento de la concentración de los inmunorreactivos repercute normalmente en un aumento de la absorbancia de la curva estándar, pero también de su I_{50} . Las combinaciones marcadas en negrita se seleccionaron como las más adecuadas para el ELISA multiresiduo.

4.4. ESTUDIOS DE INTERFERENCIAS.

Una vez seleccionados los inmunorreactivos y las concentraciones a las que serían utilizados en el ELISA multianalito, se confirmó la ausencia de reconocimientos cruzados posteriores mediante ELISAs competitivos. Para llevar a cabo esta tarea se diseñaron dos tipos de experiencias.

La primera de ellas (descrita en el apartado 4.1 de esta sección) consistió en tapizar diferentes regiones de tres placas con los conjugados seleccionados, y en cada placa se ensayó la curva estándar de la mezcla de los tres analitos con un anticuerpo. De este modo debían de hacerse evidentes aquellos casos no deseables en los que pudieran aparecer curvas competitivas asociadas a la combinación de un determinado anticuerpo con conjugados de ensayo distintos al de su correspondiente analito. Los resultados se muestran en la figura 3.4.8. Como era de esperar, cada anticuerpo reconoció únicamente a su conjugado.

En la segunda experiencia se tapizaron tres placas, una con cada uno de los conjugados seleccionados. En cada placa se ensayaron cuatro combinaciones posibles: la curva estándar del analito correspondiente al tapizado con su anticuerpo (control), la curva estándar de ese analito con una mezcla de los tres anticuerpos, la curva estándar de una mezcla de los tres analitos con el anticuerpo correspondiente al tapizado y la curva estándar de una mezcla de los tres analitos con una mezcla de los tres anticuerpos.

Tabla 3.4.5. Características de los ensayos competitivos de carbaryl, carbofuran y methiocarb utilizando los inmunorreactivos compatibles en el MELISA.

Analito	Inmunorreactivos (: g/ml)		Parámetros			
	conjugado	anticuerpo	A _{max}	I ₅₀ (ng/ml)	pendiente	
carbaryl	OVA-2NAH	LIB-CNH45				
		0,5	0,07	0,82	0,22	1,28
			0,1	1,45	0,28	1,43
			0,4	2,88	0,5	1,36
	2	0,07	2	0,3	1,19	
			0,1	3,1	0,41	1,24
			0,4	4	1,25	1,57
carbofuran	OVA-BFNH	LIB-BFNB67				
		0,1	0,04	1,66	0,53	1,2
			0,06	2,07	0,58	1,08
			0,08	2,66	0,72	1,09
	0,3	0,04	0,6	0,38	0,91	
			0,06	0,75	0,48	1,12
		0,08	1	0,57	1,21	
methiocarb	OVA-MCNP	LIB-MXNH14				
		0,1	0,05	0,17	0,07	1,45
			0,1	0,32	0,07	1,22
			0,2	0,7	0,14	1,41
			0,4	1,12	0,23	1,99
	0,2	0,05	0,4	0,04	1,17	
			0,1	0,74	0,08	1,13
			0,2	1,59	0,15	1,33
			0,4	2,47	0,3	2,08
	4	0,05	0,58	0,07	1,41	
			0,1	1,17	0,11	1,21
		0,2	2,33	0,18	1,44	
		0,4	3,44	0,37	2,19	

Datos calculados a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

Los resultados de esta experiencia se muestran en la figura 3.4.9. En cada una de las gráficas se observa que las absorbancias de las curvas competitivas obtenidas con cada anticuerpo específico son iguales, aunque algo mayores que las obtenidas con la mezcla de los tres anticuerpos. Donde más se acusa este efecto es en la placa tapizada con el conjugado de carbaryl OVA-2NAH. Esta diferencia en las absorbancias máximas podría ser consecuencia de que la dilución de anticuerpo marcado que se emplea es la misma en todas las combinaciones. Por lo tanto, en aquellas en las que se utiliza la mezcla de anticuerpos específicos, habría una menor cantidad relativa de anticuerpo marcado disponible para unirse a los anticuerpos monoclonales, lo que originaría una absorbancia menor. No obstante, las cuatro curvas coinciden bastante aproximadamente, lo cual indica que no se producen interferencias importantes como consecuencia de la mezcla de los analitos y de los anticuerpos específicos.

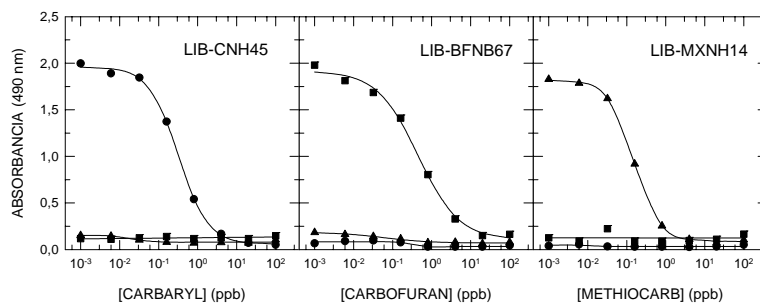


Figura 3.4.8. Estudios de reconocimiento cruzado de los conjugados de tapizado () OVA-2NAH, () OVA-BFNH, y (•) OVA-MXNH, por los anticuerpos monoclonales LIB-CNH45, LIB-BFN67 y LIB-MXNH14, en ensayos competitivos. Las curvas se han obtenido por cuadruplicado.

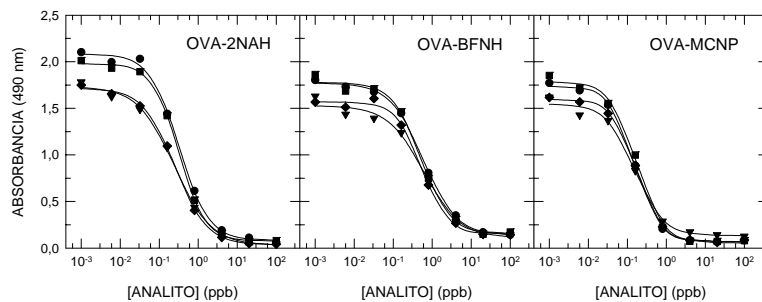


Figura 3.4.9. Estudio de las posibles interferencias debidas a la utilización de las mezclas de analitos y de anticuerpos. () curva control, realizada con un analito y su anticuerpo correspondiente, (—) curva realizada con un analito y la mezcla de los tres anticuerpos, () curva correspondiente a la mezcla de los tres analitos y un anticuerpo, (—) curva resultante de la utilización de la mezcla de los tres analitos y de los tres anticuerpos.

5. APLICACIÓN DEL ENSAYO MULTIANALITO. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

5.1. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE TAMPÓN FORTIFICADAS.

Esta experiencia se diseñó para evaluar la capacidad de análisis del MELISA en muestras sencillas, tales como las de tampón de ensayo, fortificadas con carbaryl, carbofuran y methiocarb en diferentes proporciones. Las cantidades recuperadas de cada plaguicida se obtuvieron interpolando las absorbancias del ensayo sobre las respectivas rectas de calibración. Estas rectas estaban formadas por tres puntos, correspondientes a la parte central de las curvas sigmoides del ensayo competitivo. En cada ensayo se incluyó además un blanco en ausencia de analito. En la figura 3.4.10 se muestran las rectas de calibración de carbaryl, carbofuran y methiocarb en el ELISA multianalito, resultado de promediar 20 rectas estándar normalizadas. En la tabla 3.4.6 se muestran las recuperaciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb obtenidas a partir de tres análisis. Si bien las concentraciones de carbaryl y methiocarb encontradas en las muestras en las que no había ningún otro analito resultaron ser anormalmente bajas, las recuperaciones de los tres compuestos en la gran mayoría de las muestras fueron muy próximas al 100%. Por lo tanto, puede concluirse que el MELISA desarrollado es capaz de determinar cada uno de los analitos en presencia de los otros dos, incluso cuando estos últimos se hallan a concentraciones proporcionalmente muy altas.

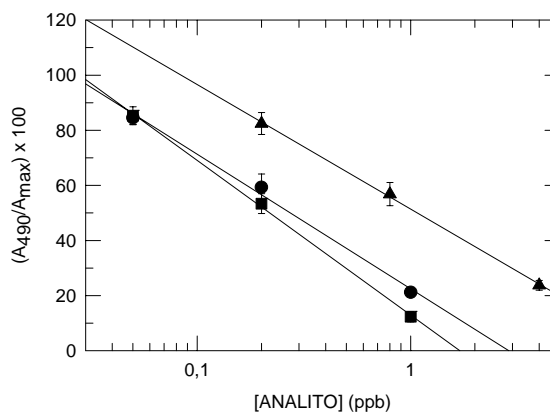


Figura 3.4.10. Rectas estándar de carbaryl (□), carbofuran (•) y methiocarb (▲) en el ELISA multianalito. Cada recta representa la media de 20 rectas de calibración. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Tabla 3.4.6. Determinación de carbaryl, carbofuran y methiocarb, mediante el ELISA multianalito, en muestras de tampón fortificadas con estos plaguicidas.

concentraciones fortificadas (ng/ml)			concentraciones recuperadas (ng/ml)		
carbaryl	carbofuran	methiocarb	carbaryl	CV (%)	recuperación (%)
-	1000	1000	-		
20	-	-	14,9	14,9	74,5
20	100	20	19,3	6,7	96,5
20	1000	1000	21	11,3	100,5
20	-	1000	17,8	14,1	89
20	1000	-	20,1	11,5	100,5
1000	100	1000	998,1	4,4	99,8
1000	1000	20	1065,8	8,1	106,6
			carbofuran	CV (%)	recuperación (%)
1000	-	1000	-		
-	100	-	105	7,4	105
20	100	20	103,1	10,9	103,1
1000	100	1000	108,7	6,8	108,7
-	100	1000	97,5	10,5	97,5
1000	100	-	99	5,3	99
20	1000	1000	839	18,8	83,9
1000	1000	20	845,7	15,3	84,6
			methiocarb	CV (%)	recuperación (%)
1000	1000	-	-		
-	-	20	12,6	11,9	63
20	100	20	21,2	6,3	106
1000	1000	20	26,7	5,2	133,5
1000	-	20	22	8,9	110
-	1000	20	25,2	7,1	126
20	1000	1000	867,2	31,6	86,7
1000	100	1000	913,3	13,4	91,3

Las muestras se ensayaron a la dilución apropiada en cada caso. Los datos se obtuvieron promediando los resultados de tres análisis.

5.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES.

El ELISA multianalito también se aplicó a la determinación de carbaryl, carbofuran y methiocarb en 45 muestras purificadas y no purificadas de fresón, manzana y pimiento, que previamente habían sido fortificadas con diferentes concentraciones (desconocidas para los analistas) de los tres plaguicidas. Estas muestras estaban conservadas a -20 °C y eran réplicas de las que se utilizaron en el estudio de validación de los ELISAs individuales para cada plaguicida. Los resultados del análisis multianalito de las muestras purificadas se compararon con las concentraciones obtenidas en su día mediante HPLC. Finalmente, y para evaluar la capacidad analítica del MELISA en extractos crudos, las concentraciones que resultaron del análisis de las muestras no purificadas se compararon con los valores de fortificación.

El análisis de regresión lineal entre el MELISA y la HPLC sobre muestras purificadas (figura 3.5.2) mostró unos buenos coeficientes de correlación (0.961, 0.904 y 0.903 para las determinaciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb, respectivamente). No obstante, el MELISA de carbofuran proporcionó concentraciones significativamente menores que la HPLC, y por lo tanto una baja pendiente de la recta de regresión (0.50). De las 45 muestras analizadas, 21 dieron una concentración de carbofuran por debajo del límite de cuantificación (16 ppb), por lo que no se consideraron en el análisis de correlación. Sin descartar la posibilidad de un error experimental en la determinación de carbofuran en estas muestras, los bajos valores obtenidos podrían también deberse a la degradación de carbofuran en estas réplicas que, aunque conservadas a -20 °C, se analizaron mediante el ensayo multianalito varios meses después de su preparación.

Los análisis de regresión lineal mostraron también (figura 3.5.3) muy buena correlación entre los resultados proporcionados por el ensayo multianalito en las muestras no purificadas y las concentraciones de fortificación ($r^2 = 0.973$, 0.916 y 0.919 para carbaryl, carbofuran y methiocarb, respectivamente). Por otra parte, la pendiente de la recta de regresión es prácticamente 1 en los análisis de carbaryl y carbofuran, aunque disminuye en el ensayo de methiocarb (0.71). En cualquier caso, estos resultados indican que las concentraciones recuperadas y las de referencia son en promedio coincidentes.

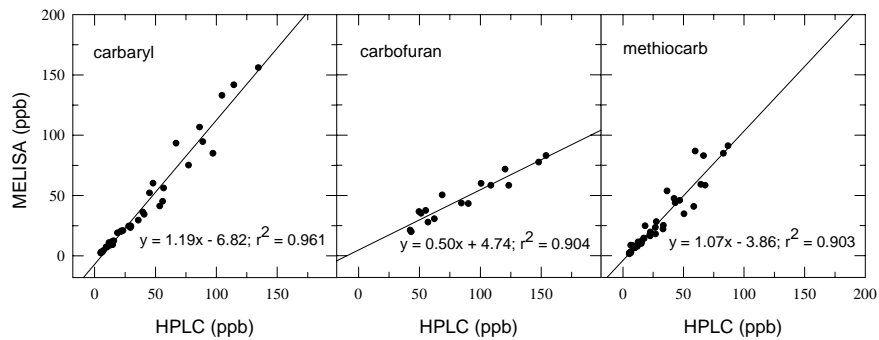


Figura 3.5.2 Análisis de correlación entre las concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb obtenidas mediante HPLC y el ensayo multianalito en muestras purificadas. Los datos correspondientes al MELISA proceden de un único análisis.

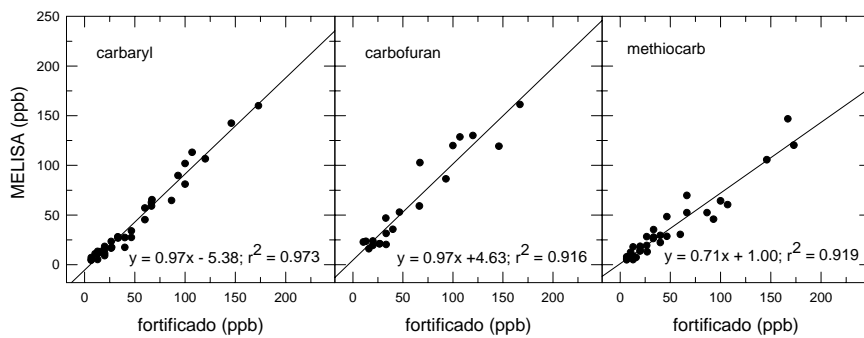


Figura 3.5.3. Análisis de correlación entre las concentraciones de carbaryl, carbofuran y methiocarb obtenidas mediante el MELISA en muestras no purificadas y las concentraciones de fortificación. Los datos corresponden a un único análisis.

De todo lo expuesto anteriormente puede deducirse que el MELISA desarrollado es aplicable a la determinación cuantitativa de carbaryl, carbofuran y methiocarb en extractos crudos de productos hortofrutícolas, aunque para consolidar su aceptación como método de rutina sería necesario llevar a cabo una evaluación más exhaustiva.

PARTE IV:
CONCLUSIONES.

- L Se ha confirmado la importancia de utilizar un hapteno inmunizante que preserve al máximo la estructura del analito, para obtener anticuerpos de alta afinidad frente a plaguicidas.
- L En el ensayo de methiocarb se ha comprobado que la relación entre la estructura de un hapteno y su idoneidad como hapteno de ensayo depende del anticuerpo. Para un anticuerpo dado, la utilización de haptenos heterólogos es una buena aproximación para mejorar la sensibilidad. Sin embargo, esta mejoría no se ha observado en el ensayo de carbofuran debido, tal vez, a que los haptenos utilizados no son suficientemente diferentes en estructura de los haptenos inmunizantes.
- L Los dos formatos de ELISA desarrollados y evaluados para cada analito proporcionan curvas competitivas con características similares. Sin embargo, el formato de conjugado inmovilizado admite más heterología de hapteno que el formato de anticuerpo inmovilizado.
- L Los inmunoensayos desarrollados para methiocarb son altamente específicos. Por su parte, los de carbofuran reconocen algunos compuestos muy similares estructuralmente. Estas características son independientes del formato utilizado.
- L Los estudios de validación frente a HPLC demuestran que tanto los ELISAs individuales de carbofuran y methiocarb, desarrollados en esta tesis, como el de carbaryl, pueden ser incorporados en los programas de control de plaguicidas *N*-metilcarbamatos como métodos alternativos o complementarios a los establecidos.
- L Asimismo, se ha demostrado la capacidad de estos ELISAs para determinar plaguicidas en extractos crudos, obteniéndose incluso mejores resultados que por HPLC. La utilización de los ELISAs permitiría reducir el tiempo y el coste de los análisis, así como el consumo de disolventes orgánicos.
- L Para el desarrollo del ELISA multianalito ha sido necesario conseguir una mezcla controlada de anticuerpos monoclonales específicos para cada plaguicida, que únicamente reconozcan a sus respectivos conjugados. Cada analito es identificado mediante la inmovilización previa de conjugados de ensayo específicos en diferentes pocillos de una placa ELISA. El ELISA multianalito se ha desarrollado en una única etapa mediante la incubación simultánea del analito, el anticuerpo específico y el anticuerpo marcado.

- L Por último, se ha demostrado la capacidad del ELISA multianálisis para determinar simultáneamente carbaryl, carbofuran y methiocarb en extractos crudos de frutas y hortalizas conteniendo mezclas de los tres plaguicidas en proporciones variables.

PARTE V:
BIBLIOGRAFÍA.

- Abad, A.; Montoya, A. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the carbamate Group. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1818-1823.
- Abad, A.; Montoya, A. Application of a Monoclonal Antibody-Based ELISA to the Determination of Carbaryl in Apple and Grape Juices. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 365-370.
- Abad, A.; Primo, J.; Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 1 Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassay Formats. *J. Agric. Food Chem.* **1997a**, *45*, 1486-1494.
- Abad, A.; Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 2. Assay Optimization and Application to the Analysis of Water Samples. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1495-1501.
- Abad, A.; Manclús, J.J.; Mojarrad, F.; Mercader, J.V.; Miranda, M.A.; Primo, J.; Guardiola, V.; Montoya, A. Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to DDT and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1997b**, *45*, 3694-3702.
- Abad, J.M.; Pariente, F.; Hernández, L.; Abruña, H.D.; Lorenzo, E. Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Using a Piezoelectric Biosensor. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2848-2855.
- Alcocer, M.J.C.; Doyen, C.; Lee, M.A.; Morgan, M.R.A. Properties of Polyclonal, Monoclonal and Recombinant Antibodies Recognizing the Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos-ethyl. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4053-4059.
- Avrameas, S.; Uriel, J. Méthode de Marquage d'Antigènes et d'Anticorps avec des Enzymes et son Application en Immuno-diffusion. *C.R. Acad. Sci. Paris* **1966**, *262*, 2543.
- Bachman, J.; Patterson, H.H. Photodecomposition of the Carbamate Pesticide Carbofuran: Kinetics and the Influence of Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 874-881.
- Baker, D.R.; Fenyes, J.G.; Moberg, W.K.; Cross, B. Overview of Agrochemical Development, En *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals*; Baker, D.R.;

- Fenyves, J.G.; Moberg, W.K.; Cross, B., Eds.; ACS Symposium Series 355; American Chemical Society: Washington DC, **1987**; pp 1-8.
- Bakowski, R.S.; Ali, M.S.; White, J.D.; Phillippo, E.T.; Ellis, R.L. Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Confirmation of ten *N*-Methylcarbamate Insecticides in Liver. *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 1568-1574.
- Ballesteros, E.; Gallego, M.; Valcárcel, M. Automatic Gas Chromatographic Determination of *N*-Methylcarbamates in Milk with Electron Capture Detection. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1773-1778.
- Ballesteros, B.; Barceló, D.; Sanchez.Baeza, F.; Camps, F.; Marco, M.P. Influence of the Hapten Design on the Development of a Competitive ELISA for the Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1051 at Trace Levels. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4004-4014.
- Baron, R.L. Carbamate Insecticides. En *Handbook of Pesticides Toxicology*, Vol. III; Academic press: London, UK, **1991**.
- Behki, R.M.; Topp, E.E.; Blackwell, B.A. Ring Hydroxylation of *N*-Methylcarbamate Insecticides by Rhodococcus TE1. *J. Agric Food Chem.* **1994**, *42*, 1375-1378.
- Bekheit, H.K.M.; Lucas, A. D.; Szurdoki, F.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. An Enzyme Immunoassay for the Environmental Monitoring of the Herbicide Bromacil. *J.Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2220-2227.
- Bou, P.; Escolá, R.; Marco, M.P.; Bayona, J.M. Development and Application of Immunoaffinity Chromatography for the Determination of the Triazinic Biocides in Seawater. *J. Chromatog. A* **2001**, *909*, 61-72.
- Brady, J.F. Interpretation of Immunoassay Data. En *Immunoanalysis of Agrochemicals*; Nelson, J.O.; Karu, A.E.; Wong, R.B., Eds; ACS Symposium Series 586; American Chemical Society: Washington, DC, **1995**, pp 266-287.
- Brecht, A.; Abuknesha, R. Multi-analyte Immunoassays Application to Environmental Analysis. *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 361-371.
- Brotons, M. La Nueva Legislación Española sobre Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas en Productos Vegetales. En *III Seminario Internacional sobre Residuos de Plaguicidas*. Valverde, A; Fernández-Alba, A.R., Eds.; Instituto de

- Estudios Almerienses, Universidad de Almería, Coexphal, Almería, **1995**; pp 13-34.
- Burrin, J.; Newman, D. Production and Assessment of Antibodies. En *Principle and Practice of Immunoassays*; Price, C.P.; Newman, D.J. Eds.; Stocton Press, New York, N.Y., USA, **1991**, pp 19-52.
- Cabras, P.; Angioni, A.; Melis, M.; Spanedda, L.; Minellim E.V. Determination and Persistence of Methiocarb in Artichokes. *Ital. J. Food Sci.*, **1996**, *4*, 317-322.
- Cantoni, C.; Comi, G. Changes in the Concentrations of Pesticide Residues in Food and in Human Tissues Between 1990 and 1996. *Outlook on Agriculture*, **1997**, *26*, 47-52.
- Centeno, E.R.; Johnson, W.J.; Sehon, A.H. Antibodies to two Common Pesticides, DDT and Malathion. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1970**, *37*, 1-13.
- Chapalamadugu, S. Chaudhry, G.R. Hydrolysis of Carbaryl by a Pseudomonas sp. and Construction of a Microbial Consortium that Completely Metabolizes Carbaryl. *App. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 744-750.
- Cheung, P.Y.K.; Kauvar, L.M.; Karu, A.E.; Ramos, L.S. Harnessing Immunochemical Cross Reactivity: Use of Pattern Recognition to Classify Molecular Analogs. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *282*, 181-192.
- Chiron, S.; Torres, J.A.; Fernández-Alba, A.; Alpendurada, M.F.; Barceló, D. Identification of Carbofuran and Methiocarb and Their Transformation Products in Estuarine Waters by On-Line Solid Phase Extraction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **1996**, *65*, 37-52.
- Choudary, P.V.; Lee, H.A.; Hammock, B.D.; Morgan, M.M.R. Recombinant Antibodies: New Tools for Immunoassays. En *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*; Kurtz, D.A., Skerritt, J.H., Stanker, L., Eds; AOAC International: Arlington, VA, **1995**; pp 171-186.
- Climent, M.J.; Miranda, M.A. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Study of Photodegradation of Carbamate Pesticides. *J. Chromatogr. A* **1996**, *738*, 255-231.

- Coscollá, R. Concepto de Residuos de plaguicidas. En *Residuo de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*; Mundi-Prensa, Madrid, **1993a**.
- Coscollá, R. Normativa Legal sobre Residuos. En *Residuo de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*; Mundi-Prensa, Madrid, **1993b**.
- De Bertrand, N.; Barceló, D. Photodegradation of the Carbamate Pesticides Aldicarb, Carbaryl and Carbofuran in Water. *Anal. Chim Acta.* **1991**, *254*, 235-244.
- De Kok, A.; Hiemstra, M. Optimization, Automation, and Validation of the Solid-Phase Extraction Cleanup and on-Line Liquid Chromatographic Determination of *N*-Methylcarbamate Pesticides in Fruits and Vegetables. *J. AOAC Int.* **1992**, *75*, 1063-1072.
- De Kok, A.; Hiemstra, M.; Brinkman, U.A.T. Low ng/l-Level Determination of 20 *N*-Methylcarbamate Pesticides and 12 of Their Polar Metabolites in Surface Water via Off-Line Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Post-column Reaction and Fluorescence Detection. *J. Chromatogr.* **1992**, *623*, 265-276.
- Díaz, T.G.; Guiberteau, A.; Salinas, F.; Ortiz, J.M. Rapid and Sensitive Determination of Carbaryl, Carbofuran and Fenobucarb by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **1996**, *19*, 2681-2690.
- Dietrich, M.; Krämer, P.M. Continuous Immunochemical Determination of Pesticides via Flow Injection Immunoanalysis Using Monoclonal Antibodies against Terbutryne Immobilized to Solid Supports. *Food Agric. Immunol.* **1995**, *7*, 203-220.
- Ekins, R.; Chu, F.; Biggart, E. Multispot, Multianalyte, Immunoassay. *Ann. Biol. Clin.* **1990**, *48*, 655-666.
- Ekins, R. P.; Chu, F.W. Miniaturized Microspot Multianalyte Immunoassay Systems. En *Immunoanalysis of Agrochemicals*; Nelson, J.O.; Karu, A.E.; Wong, R.B., Eds; ACS Symposium Series 586; American Chemical Society: Washington, DC, **1995**, pp 153-174.
- Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitation Assay to Immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871-874.

- Ercegovich, C.D. Analysis of Pesticide Residues: Immunological Techniques. En *Pesticide Identification at the Residue Level*; Biros, F.J., Ed.; Advances in Chemistry Series 104; American Chemical Society: Washington, D.C., **1971**; pp 162-177.
- Ercegovich, C.D.; Vallejo, R.P.; Gettig, R.R.; Woods, L.; Bogus, E.R.; Mumma, R.O. Development of a Radioimmunoassay for Parathion. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 559-563.
- Färber, H.; Schöler, H.F. Gas Chromatographic Determination of Carbamate Pesticides after Flash-Heater Methylation with Triethylsulfonium Hydroxide. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1006-1011.
- Fatori, D.; Hunter, W.M. Radioimmunoassay for Serum Paraquat. *Clin. Chim. Acta* **1980**, *100*, 81-90.
- Feng, X.; Ou, L.; Ogram, A. Plasmid-Mediated Mineralization of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. Strain CF08. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 1332-1337.
- Ferrer, I.; Hennion, M.C.; Barceló, D. Immunosorbents Coupled On-Line with Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry for the Part per Trillion Level Determination of Pesticides in Sediments and Natural Waters Using Low Preconcentration Volumes. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4508-4514.
- Galadi, A.; Julliard, M. Photosensitized Oxidative Degradation of Pesticides. *Chemosphere* **1996**, *33*, 1-15.
- García-Blazquez, R.M.; Perez-Arribas, L.V.; León-González, M.E.; Polo-Díez, L.M. Liquid Chromatography/particle Beam/Mass Spectrometry Determination of Carbamates in Lettuce and Apple. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **1998**, *21*, 1173-1183.
- García-Repetto, R.; Soria, M.L.; Gimenez, M.P. Menéndez, M.; Repetto, M. Deaths from Pesticide Poisoning in Spain from 1991 to 1996. *Veterinary & Human Toxicology* **1998**, *40*, 166-168.
- Giersch, T. A New Monoclonal Antibody for the Sensitive Detection of Atrazine with Immunoassay in Microtiter Plate and Dipstick Format. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1006-1011.

- González-Martínez, M.A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Abad, A.; Montoya, A. Monoclonal Antibody-Based Flow Through Immunosensor for Analysis of Carbaryl. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2812-2818.
- González-Martínez, M.A.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Manclús, J.J.; Montoya, A. Automated Immunosensing System for 3,5,6-trichloro-2-pyridinol Application to Surface Water Samples. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *392*, 113-123.
- Goodrow, M.H.; Sanborn, J.R.; Soutamik, D.W.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. Estrategies for Immunoassay Hapten Design. En *Immunoanalysis of Agrochemicals*; Nelson, J.O.; Karu, A.E.; Wong, R.B., Eds.; ACS Symposium Series 586; American Chemical Society: Washington, DC, **1995**, pp 119-139.
- Grant, S.D.; Porter, A.J.; Harris, W.J. Comparative Sensitivity of Immunoassays for Haptens Using Monomeric and Dimeric Antibody Fragments. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 340-345.
- Greenhalgh, R.; Marshall, W.D.; King, R.R. Trifluoroacetylation of Mesurol [4-Methylthio-3,5-xylol-N-methylcarbamate], its Sulfoxide, Sulfone, and Phenol Analogs for Analysis by Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 266-270.
- Haas, G.J.; Guardia, E.J. Production of Antibodies againts Insecticide-Protein Conjugates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1968**, *129*, 546-551.
- Hage, D.S. Immunoassays. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 294R-304R.
- Hammock, B.D.; Mumma, R.O. Potential of Immunochemical Technology for Pesticide Analysis. En *Pesticide Analytical Methodology*, Harvey, J., Zweig, G., Eds.; ACS Symposium Series 136. American Chemical Society: Washington, D.C., **1980**; pp 321-352.
- Hammock, B.D.; Gee, S.J.; Harrison, R.O. Jung, F.; Goodrow, M.H.; Li, Q.X.; Lucas, A.D.; Székács, A.; Sundaram, K.M.S. Immunochemical Technology in Environmental Analysis. En *Immunochemical Methods for Environmental Analysis*. Van Emon, J., Mumma, R.O. Eds.; ACS Symposium Series 442. American Chemical Society, Washington, DC **1990**; pp 112-139.

- Harlow, E.; Lane, D. In *Antibodies. A laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory, **1988**.
- Harrison, R.O.; Goodrow, M.H.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. Hapten Synthesis for Pesticide Immunoassay Development. En *Immunoassays for Trace Chemical Analysis*; Vanderlaan, M.; Stanker, L.; Watkins, B.; Roberts, D.; Eds.; ACS Symposium Series 451; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**, pp 14-27.
- Hayes, W.; Laws, J. General Principles. En *Handbook of Pesticides Toxicology*, Vol. I; Academic Press: London, U.K., **1991**.
- Haynes, H.L.; Lambrech, J.A.; Moorefield, H.H. Insecticidal Properties and Characteristics of 1-Naphthyl *N*-methylcarbamate. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **1957**, *18*, 507.
- Hennion, M.C.; Barceló, D. Strengths and Limitations of Immunoassays for Effective and Efficient use for Pesticide Analysis in Water Samples: a Review. *Anal. Chim Acta* **1998**, *362*, 3-34.
- Hiemstra, M.; De kok, A. Determination of *N*-methylcarbamate Pesticides in Environmental Water Samples Using Automated On-line Trace Enrichment with Exchangeable Cartridges and High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1994**, *667*, 155-166.
- Hock, B.; Giersch, T.; Kramer, K. Dankwardt, A. Antibody Production and Progress in Hybridoma Technology by Immunomagnetic Screening. En *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*; Kurtz, D.A., Skerritt, J.H., Stanker, L., Eds; AOAC International: Arlington, VA, **1995**, pp 149-162.
- Hoogenboom, H.R. Designing and Optimizing Library Selection Strategies for Generating High-Affinity Antibodies. *T. Biotech.* **1997**, *15*, 62-70.
- Hunter, K.W.; Lenz, D.E. Detection and Quantification of the Organophosphate Insecticide Paraoxon by Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay. *Life Sci.* **1982**, *30*, 355-361.
- Itak, J.A.; Olson, E.G.; Fleker, J.R.; Herzog, D.P. Validation of a Paramagnetic Particle-Based ELISA for the Quantitative Determination of Carbaryl in Water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1993**, *51*, 260-267.

- Jefferis, R.; Deverill, I. The Antigen Antibody Reaction. En *Principles and Practice of Immunoassays*; Price, C.P.; Newman, D.J., Eds.; Stockton Press: New York, Ny, **1991**; pp 1-18.
- Johannsson, A. Heterogeneous Enzyme Immunoassay. En *Principle and Practice of Immunoassays*; Price, C.P.; Newman, D.J. Eds.; Stocton Press, New York, N. Y., USA, **1991**, pp 295-325.
- Jones, G.; Wortberg, M.; Kreissug, S.B.; Bunch, D.S.; Gee, S.J.; Hammock, B.D.; Rocke, D.M. Extension of the Four-Parameter Logistic Model for ELISA to Multianalyte Analysis. *J. Immunol. Methods* **1994**, *177*, 1-7.
- Jones, W.T.; Harvey, D.; Jones, S.D.; Ryan, G.B.; Wynberg, H.; Hoeve, W.T.; Reynolds, P.H.S. Monoclonal Antibodies Specific for the Organophosphate Pesticide Azinphos-methyl. *Food & Agric. Immunol.* **1995**, *7*, 9-19.
- Jourdan, S.W.; Scutellaro, A.M.; Fleeker, J.R.; Herzog, D.P.; Rubio, F. Determination of Carbofuran in Water and Soil by a Rapid Magnetic Particle-based ELISA. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2784-2788.
- Jung, F.; Gee, S.J.; Harrison, O.R.; Goodrow, M.H.; Karu, A.E.; Braun, A.L.; Li, Q.X.; Hammock, B.D. Use of Immunochemical Techniques for the Analysis of Pesticides. *Pestic. Sci.* **1989**, *26*, 303-317.
- Jung, F.; Székács, A.; Li, Q.; Hammock, B.D. Immunochemical Approach to the Detection of Aminotriazoles Using Selective Amino Group Protection by Chromophores. *J.Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 129-136.
- Kakabakos, S.E.; Christopoulos, T.K.; Diamandis, E.P. Multianalyte Immunoassay Based on Spatially Distinct Fluorescent Areas Quantified by Laser-Excited Solid-Phase Time-Resolved Fluorometry. *Clin. Chem.* **1992**, *38*, 338-342.
- Karu, A.E.; Lin, T.H.; Breiman, L.; Muldoon, M.T.; Hsu, J. Use of Multivariate Statistical Methods to Identify Immunochemical Cross-Reactants. *Food and Agric. Immunol.* **1994**, *6*, 371-387.
- Kido, H.; Maquieira, A.; Hammock, B.D. Disc-Based Immunoassay Microarrays. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *411*, 1-11.

- Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
- Krämer, P.M.; Schmid, R.D. Automated Quasi-Continuous Immunoanalysis of Pesticides with a Flow Injection System. *Pestic. Sci.* **1991**, *32*, 451-462.
- Krämer, P.M.; Marco, M.P.; Hammock, B.D. Development of a Selective Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 1-Naphtol the Major Metabolite of Carbaryl (1-Naphtyl *N*-methylcarbamate). *J.Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 934-943.
- Krause, R.T. Liquid Chromatographic Determination of *N*-Methylcarbamate Insecticides and Metabolites in Crops. I. Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **1985a**, *68*, 726-733.
- Krause, R.T. Liquid Chromatographic Determination of *N*-Methylcarbamate Insecticides and Metabolites in Crops. II. Analytical Characteristics and Residue Findings. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **1985b**, *68*, 734-741.
- Langone, J.J.; Van Vunakis, H. Radioimmunoassay for Dieldrin and Aldrin. *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.* **1975**, *10*, 163-171.
- Langone, J.J.; Van Vunakis, H. Radioimmunoassay of Nicotine, Cotinine, and (-(3-Pyridyl)-(-oxo-*N*-Methylbutyramida. *Meth. Enzym.* **1982**, *84*, 628-640.
- Lawrence, J.F.; Ménard, C.; Hennion, M.C.; Pichon, V.; LeGoffic, F.; Durand, N. Evaluation of Immunoaffinity Chromatography as a Replacement for Organic Solvent Clean-up of Plant Extracts for the Determination of Triazine Herbicides by Liquid Chromatography. *J. Chromat. A* **1996**, *752*, 147-154.
- Lee, N.; Skerritt, J.H.; McAdam, D.P. Hapten Synthesis and Development of ELISAs for Detection of Endosulfan in Water and Soil. *J.Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1730-1739.
- Lee, N.A.; Kennedy, I.R. Environmental Monitoring of Pesticides by Immunoanalytical Techniques: Validation, Current Status, and Future Perspectives. *J. AOAC international* **2001**, *48*, 1393-1406.
- Lehotay, S.J.; Argauer, R.J. Detection of Adicarb Sulfone and Carbofuran in Fortified Meat and Liver with Commercial ELISA Kits after Rapid Extraction. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2006-2007.

- Li, Q.X.; Zhao, M.S.; Gee, S.J.; Kurth, M.J.; Seiber, J.N.; Hammock, B.D. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 4-Nitrophenol and Substituted 4-Nitrophenols. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1685-1692.
- Liska, I.; Slobodník, J. Comparison of Gas and Liquid Chromatography for Analysing Polar Pesticides in Water Samples. *J. Chromatogr. A* **1996**, *773*, 235-238.
- Longstaff, M.; Newell, C.A.; Boonstra, B.; Strachan, G.; Learmonth, D.; Harris, W.J.; Porter, A.J.; Hamilton, W.D.O. Expression and Characterisation of Single-chain Antibody Fragments Produced in Transgenic Plants against the Organic Herbicides Atrazine and Paraquat. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1381*, 147-160.
- Machemer, L.H.; Pickel, M. Carbamate Insecticides. *Toxicology* **1994**, *91*, 29-36.
- Maitlen, J.C. Gas-Liquid Chromatographic Determination of Residues of Methiocarb and its Toxic Metabolites with the Flame Photometric Detector after Derivatization with Methanesulfonyl Chloride. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 260-264.
- Manclús, J.J.; Montoya, A. Development of Immunoassays for the analysis of Chlorpyrifos and its Major Metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the Aquatic Environment. *Anal. Chim. Acta.* **1995**, *311*, 341-348.
- Manclús, J.J.; Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. 1. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies. *J. Agric. Food Chem.* **1996a**, *44*, 3703-3709.
- Manclús, J.J.; Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. 2. Assay Optimization and Application to Environmental Waters. *J. Agric. Food Chem.* **1996b**, *44*, 3710-3716.
- Manclús, J.J.; Primo, J.; Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Insecticide Chlorpyrifos. 1. Monoclonal Antibodies Production and Immunoassay Design. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 4052-4062.
- Manclús, J.J.; Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Insecticide Chlorpyrifos. 2. Assay Optimization and Application to Environmental Waters. *J. Agric. Food Chem.* **1996c**, *44*, 4063-4070.

- Marco, M.P.; Gee, S.J.; Cheng, H.M.; Liang, Z.Y.; Hammock, B.D. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Carbaryl. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 423-430.
- Marco, M.P.; Chiron, S.; Gascón, J.; Hammock, B.D.; Barceló, D. Validation of two Immunoassay Methods for Environmental Monitoring of Carbaryl and 1-Naphthol in Ground Water Samples. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 319-329.
- Marx, A.; Giersch, T.; Hock, B. Immunoaffinity Chromatography of *s*-Triazines. *Anal. Lett.* **1995**, *28*, 267-278.
- McGarvey, B.D. High-Performance Liquid Chromatographic Methods for the Determination of *N*-methylcarbamate Pesticides in Water, Soil, Plants and Air. *J. Chromatogr.* **1993**, *642*, 89-105.
- McGarvey, B.D. Derivatization Reactions Applicable to Pesticide Determination by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B.* **1994**, *659*, 243-257.
- Menezes, M.L.; Fèlix, G. On Line Extraction and Separation of Bendiocarb, Methomyl, Methyl-Paration, and Pentachlorophenol Pesticides from Raw Milk. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **1998**, *21*, 2863-2871.
- Mercader, J.V.; Primo, J.; Montoya, A. Production of High-Affinity Monoclonal Antibodies for Azinphos-methyl from a Hapten Containing Only the Aromatic Moiety of the Pesticide. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2789-2793.
- Mercader, J.V.; Montoya, A. A Monoclonal Antibody-Based ELISA for the Analysis of Azinphos-methyl in Fruit Juices *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 95-101.
- Mercader, J.V.; Montoya, A. Development of Monoclonal ELISAs for Azinphos-methyl. 2. Assay Optimization and Water Sample Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1285-1293.
- Metcalf, R.L.; Fukuto, T.R.; Collins, C.; Borck, K.; El-Aziz, S.A.; Muñoz, R.; Cassil, C.C. Metabolism of 2,2-Dimethyl-2.3-dihydrobenzofuranyl-7 *N*-Methylcarbamate (Furadan) in Plants, Insects, and Mammals. *J. Agric. Food Chem.* **1968**, *16*, 300-311.

- Meulenberg, E.P.; Mulder, W.H. Stocks, P.G. Immunoassays for Pesticides. *Environ. Scien. Technol.* **1995**, *29*, 553-561.
- Meulenberg, E.P. Immunochemical Detection of Environmental and Food Contaminants: Development, Validation and Application. *Food Technol. Biotechnol.* **1997**, *35*, 153-163.
- Mihaliak, C.A.; Berberich, S.A. Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticides Registration. En *Immunoanalysis of Agrochemicals*; Nelson, J.O.; Karu, A.E.; Wong, R.B., Eds; ACS Symposium Series 586; American Chemical Society: Washington, DC, **1995**, pp 288-300.
- Miller, F.K.; Kiigemagi, U.; Thomson, P.A.; Heatherbell, D.A.; Deinzer, M.L. Methiocarb Residues in Grapes and Wine and Their Fate during Vinification. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 538-545.
- Minelli, E.V. Determination of Carbamate Insecticides in Apples, Pears, and Lettuce by LC with UV Detector. *J. AOAC Internat.* **1997**, *80*, 1315-1319.
- Montoya, A.; Castell, J.V. Long-Term Storage of Peroxidase-Labelled Immunoglobulins for Use in Enzyme Immunoassay. *J. Immunol. Methods* **1987**, *99*, 13-20.
- Moreno, M.J.; Abad, A.; Montoya, A. Production of Monoclonal Antibodies to the *N*-Methylcarbamate Pesticide Propoxur. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 72-78.
- Moye, H.A.; Scherer, S.J.; St. John, P.A. Dynamic Fluorogenic Labeling of Pesticides for High Performance Liquid Chromatography: Detection of *N*-Methylcarbamates with *o*-Phthaldehyde. *Anal. Lett.* **1977**, *10*, 1049-1073.
- Mueller, H.M.; Stan, H.J. Thermal Degradation Observed with Different Injection Techniques: Quantitative Estimation by the Use of Thermolabile Carbamate Pesticides. *J. High Resolt. Chromatogr.* **1990**, *13*, 759-763.
- Mulbry, W.W.; Eaton, R.W. Purification and Characterization of the *N*-Methylcarbamate Hydrolase from Pseudomonas Strain CRL-OK. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 3679-3682.

- Muldoon, M.T.; Friese, G.F.; Nelson, J.O. Evaluation of ELISA for the Multianalyte Analysis of s-Triazines in Pesticide Waste and Rinsate. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 322-328.
- Nakane, P.K.; Pierce, G.B. Enzyme-Labelled Antibodies. Preparation and Application for the Localization of Antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **1966**, *14*, 929.
- Nam, K.S.; King, J.W. Supercritical Fluid Extraction and Enzyme Immunoassay for Pesticide Detection in Meat Products. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1469-1474.
- Narang, U.; Gauger, P.R.; Kusterbeck, A. W.; Ligler, F.S. Multianalyte Detection Using a Capillary-Based Flow Immunosensor. *Anal. Biochem.* **1998**, *255*, 13-19.
- Newsome, W.H.; Shields, J.B. A Radioimmunoassay for Benomyl and Methyl 2-Benzimidazolecarbamate on Food Crops. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 220-222.
- Niessner, R. Immunoassays in Environmental Analytical Chemistry: Some Thoughts and Trends and Status. *Anal. Meth. Instrum.* **1993**, *1*, 134-144.
- Noguer, T.; Leca B.; Jeanty, G.; Marty, J.L. Biosensors Based on Enzyme Inhibition: Detection of Organophosphorous and Carbamate Insecticides and Dithiocarbamate Fungicides. *Field. Anal. Chem Technol.* **1999**, *3*, 171-178.
- Nowinski, R.C.; Lostrom, M.E.; Tam, M.R.; Stone, M.R.; Burnette, W.N. The Isolation of Hybrid Cell Lines Producing Monoclonal Antibodies Against the p15(E) Protein of Ecotropic Murine Leukemia Viruses. *Virology* **1979**, *93*, 111-126.
- Nunes, G.S.; Ribeiro, M.L.; Polese, L.; Barceló, D. Comparison of Different Clean-up Procedures for the Determination of N-methylcarbamate Insecticides in Vegetable Matrices by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection. *J. Chromatogr. A* **1998 a**, *795*, 43-51.
- Nunes, G.S.; Marco, M.P.; Ribeiro, M.L.; Barceló, D. Validation of an Immunoassay Method for the determination of Traces of Carbaryl in Vegetable and Fruit Extracts by Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. A* **1998 b**, *823*, 109-120.

- O'Malley, M. Clinical Evaluation of Pesticide Exposure and Poisoning. *The lancet* **1997**, *349*, 1161-1166.
- Parekh, N.R.; Hartmann, A.; Charnay, M.P.; Fournier, J.C. Diversity of Carbofuran-Degrading Soil Bacteria and detection of Plasmid-Encoded Sequences Homologous to the *mcd* Gene. *FEMS Microbiology Ecology* **1995**, *17*, 149-160.
- Parnell, J.S.; Hall, J.C. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Metosulam. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 152-156.
- Parsons, R.G.; Kowal, R.; Le Blond, D.; Yue, V.T.; Nearing, L.; Bond, L.; García, D.; Slater, D.; Rogers, P. Multianalyte Assay System Developed for Drugs of Abuse. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 1899-1903.
- Plowman, T.E.; Durstchi, J.D.; Wang, H.K.; Christensen, D.A.; Herron, J.N.; Reichert, W.M. Multiple-Analyte Fluoroimmunoassay Using an Integrated Optical Waveguide Sensor. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4344-4352.
- Pogacnik, L.; Franko, M. Determination of Organophosphate and Carbamate Pesticides in Spiked Samples of Tap Water and Fruit Juices by a Biosensor with Photothermal Detection. *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, *14*, 569-578.
- Primo, E.; Carrasco, J.M. Generalidades. En *Química Agrícola 2. Plaguicidas y Fitorreguladores*; Alhambra Universidad: Madrid, **1990**.
- Primo, E. Necesidad de los Plaguicidas en el Estado Actual de la Tecnología Agrícola. En *Ecología Química. Nuevos Métodos de Lucha contra Insectos*; Banco de Crédito y Ahorro, Mundi-Prensa: Valencia, Madrid, **1991**.
- Primus, T.M.; Tawara, J.N.; Goodall, M.J.; Brooks, J.E.; Savarie, P.J.; Johnston, J.J. Determination of Propoxur Residues in Whole Body Brown Tree Snakes. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2647-2650.
- Queffelec, A.L.; Nodet, P.; Haelters, J.P.; Thouvenot, D.; Corbel, B. Hapten Synthesis for a Monoclonal Antibody Based ELISA for Deltamethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1670-1676.
- Raab, G.M. Comparison of a Logistic and a Mass-Action Curve for Radioimmunoassay Data. *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 1757-1761.

- Rajkowski, K.M.; Cittanova, N.; Desfosses, B.; Jayle, M.F. The Conjugation of Testosterone with Horseradish Peroxidase and a Sensitive Enzyme Assay for the Conjugate. *Steroids* **1977**, *29*, 701-713.
- Rawlings, N.C.; Cook, S.J.; Waldbillig, D. Effects of the Pesticides Carbofuran, Chlorpyrifos, Dimethoate, Lindane, Triallate, Trifluralin, 2,4-D, and Pentachlorophenol on the Metabolic Endocrine and Reproductive Endocrine System in Ewes. *J. Toxicol. Environ. Health, part A* **1998**, *54*, 21-36.
- Rinder, D.F.; Fleeker, J.R. A Radioimmunoassay to Screen for 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid in Surface Water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1981**, *26*, 375-380.
- Rocke, D.M. Statistical Design of Immunoassay Protocols, presented at the American Chemical Society Symposium on Emerging Pesticide Residue Analysis Techniques, San Francisco, April 1992.
- Rollag, J.G.; Beck-Westermeyer, M.; Hage, D. Analysis of Pesticide Degradation Products by Tandem High-Performance Immunoaffinity Chromatography and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3631-3637.
- Rouchaud, J.; Gustin, F.; Van de Steene, F.; Pelerents, C.; Vanparys, L.; De Proft, M.; Seutin, E.; Gillet, J.; Benoit, F.; Ceustermans, N. Comparative Plant and Soil Metabolism of Carbosulfan, Furathiocarb and Carbofuran in Brussels Sprouts, Cauliflower, and Sugar Beet Crops. *Toxicol. Environ. Chem.* **1990**, *25*, 109-124.
- Rowe, C.A.; Tender, L.M.; Feldstein, M.J.; Golden, J.P.; Scruggs, S.B.; MacCraith, B.D.; Cras, J.J. Ligler, F.S. Array Biosensor for Simultaneous Identification of Bacterial, Viral, and Protein Analytes. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3846-3852.
- Saadeh, A.M.; Farsakh, N.A.; Al-Ali, M.K. Cardiac Manifestations of Acute Carbamate and Organophosphate Poisoning. *Heart* **1997**, *77*, 461-464.
- Salau, J.S.; Honing, M.; Tauler, R.; Barceló, D. Resolution and Quantitative Determination of Coeluted Pesticide Mixtures in Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry by Multivariate Curve Resolution. *J. Chromatogr. A* **1998**, *795*, 3-12.

- Schlaeppli, J.M.A.; Meyer, W.; Ramsteiner, K.A. Determination of Triasulfuron in Soil by Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay. *J.Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1093-1098.
- Schneider, P.; Hammock, B.D. Influence of the ELISA Format and the Hapten Enzyme Conjugate on the Sensitivity of an Immunoassay for *s*-Triazine Herbicides Using monoclonal Antibodies. *J.Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 525-530.
- Schneider, P.; Goodrow, M.H.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. A Highly Sensitive and Rapid ELISA for the Arylurea Herbicides Diuron, Monuron, and Linuron. *J.Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 413-422.
- Schneider, P.; Gee, S.J.; Kreissig, S.B.; Harris, A.S.; Krämer, P.; Marco, M.P.; Lucas, A.D.; Hammock, B.D. Troubleshooting During the Development and Use of Immunoassays for Environmental Monitoring. En *New Frontiers in Agrochemical Immunoassays*; Kurtz, D.A.; Skerritt, J.H., Stanker, L., Eds; AOAC International: Arlington, VA, **1995**; pp 103-122.
- Schuetz, A.J.; Winklmaier, M.; Weller, M.G.; Niessner, R. Selection of Hapten Structures for Indirect Immunosensor Arrays. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *363*, 625-631.
- Seiber, J.N.; Li, Q.X.; Van Emon, J.M. Barriers to Adopting Immunoassays in the Pesticide Analytical Laboratory. En *Immunochemical Methods for Environmental Analysis*; Van Emon, J.M.; Mumma, R.O., Eds; ACS Symposium Series 442; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**; pp 156-167.
- Shan, G.; Stoutamire, D.W.; Wengatz, I.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. Development of an Immunoassay for the Pyrethroid Insecticide Esfenvalerate. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2145-2155.
- Sherry, J.P. Environmental Chemistry. The Immunoassay Option. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1992**, *23*, 217-300.
- Simon, E.; Knopp, D.; Bou, P.; Niessner, R. Development of an Enzyme Immunoassay for Metsulfuron-methyl. *Food and Agric. Immunol.* **1998**, *10*, 105-120.
- Skerritt, J.H.; Hill, A.S.; Beasley, H.L.; Edward, S.L.; McAdam, D.P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitation of Organophosphate Pesticides-Fenitrothion, Chlorpyrifos-methyl, and Pirimiphos-methyl in Wheat Grain and Flour-Milling Fractions. *J. AOAC Int.* **1992**, *75*, 519-528.

- Slobodník, J.; Louter, A.J.H.; Vreuls, J.J.; Liska, I.; Brinkman, U.A.Th. Monitoring of Organic Micropollutants in Surface Water by Automated On-line Trace-Enrichment Liquid and Gas Chromatographic Systems with Ultraviolet Diode-Array and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. A* **1997a**, 768, 239-258.
- Slobodník, J.; Jager, M.E.; Hoekstra-Oussoren, S.J.F.; Honing, M.; Van Baar, B.L.M.; Brinkman, U.A.Th. Identification of Carbamates by Particle Beam/Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1997b**, 32, 43-44.
- Sojo, L.E. Study of the Feasibility of the Use of Activated Carbon Membranes for the On-line Cleanup of Vegetable Extracts in the Determination of *N*-methylcarbamate Pesticides by Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, 788, 87-94.
- Spinks, C.A.; Wang, B.; Mills, E.N.C.; Morgan M.R.A. Development of an ELISA for Paraquat; Improvement of Antibody Characteristics by Reversed Affinity Chromatography. *Analyst* **1999**, 124, 847-850.
- Stöcklein, W.F.W.; Warsinke, A.; Scheller, F.W. Organic Solvent Modified Enzyme-Linked Immunoassay for the Detection of Triazine Herbicides. En *Immunochemical Technology for Environmental Applications*; Aga, D.S., Thurman E.M., Eds.; ACS Symposium Series 657; American Chemical Society: Washington, DC, **1997**, pp 372-381.
- Strachan G.; Grant, S.D.; Learmonth, D.; Longstaff, M.; Porter, A.J.; Harris, W.J. Binding Characteristics of anti-Atrazine Monoclonal Antibodies and their Fragments Synthesised in Bacteria and Plants. *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, 13, 665-673.
- Strachan, G.; Whyte, J.A.; Molloy, P.M.; Paton, G.I.; Porter, A. Development of Robust, Environmental, Immunoassay Formats for the Quantification of Pesticides in Soil. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 1603-1608.
- Szurdoki, F.; Berhert, H.K.M.; Marco, M.P.; Goodrow, M.H.; Hammock, B.D. Important Factors in Hapten Desing and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Development. En *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*; Kurtz, D.A., Skerritt, J.H., Stanker, L., Eds; AOAC International: Arlington, VA, **1995**, pp 39-63.

- Tijssen, P. Conjugation of Haptens. En *Practice and Theory of Enzyme immunoassays*; Burdon, R.H.; Van Knippenberg, P.H. Eds.; Elsevier Science Publishers B.V.; Amsterdam, The Netherlands; **1985a**, pp 279-297.
- Tijssen, P. Properties and Preparation of Enzymes Used in Enzyme-Immunoassays. En *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*; Burdon, R.H.; Van Knippenberg, P.H. Eds.; Elsevier Science Publishers B.V.; Amsterdam, The Netherlands; **1985b**, pp 173-219.
- Tomlin, C. The Pesticide Manual: A World Compendium; Tomlin, C. Ed.; The British Crop Protection Council: Farnham, Surry, U.K., **1997**.
- Torres, C.M.; Picó, Y.; Mañes, J. Determination of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables. *J. Chromatogr. A* **1996**, 754, 301-331.
- Tsumura, Y.; Ujita, K.; Nakamura, Y.; Tonogai, Y.; Ito, Y. Simultaneous Determination of Aldicarb, Ethiofencarb, Methiocarb and their Oxidized Metabolites in Grains, Fruits and Vegetables by High Performance Liquid Chromatography. *J. Food Protect.* **1994**, 57, 1001-1007.
- Vanderlaan, M.; Stanker, L.; Watkins, B. Immunochemical Techniques in Trace Residue Analysis. En *Immunoassays for Trace Chemical Analysis*; Vanderlaan, M.; Stanker, L.; Watkins, B.; Roberts, D.; Eds.; ACS Symposium Series 451; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**, pp 2-13.
- Van der Werf, H. Assessing the Impact of Pesticides on the Environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **1996**, 60, 81-96.
- Van Emon, J. Immunoassays Methods: EPA Evaluations. En *Immunochemical Methods for Environmental Analysis*. Van Emon, J.M., Mumma, R.O., Eds.; ACS Symposium Series 442; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**; pp 58-64.
- Van Weemen, B.K.; Schuurs, A.H.W.M. Immunoassay Using Antigen Enzyme Conjugates. *FEBS Lett.* **1971**, 15, 232-236.
- Varma, D.P.; Guest, I. The Bhopal Accident and Methyl Isocyanate Toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **1993**, 40, 513-529.

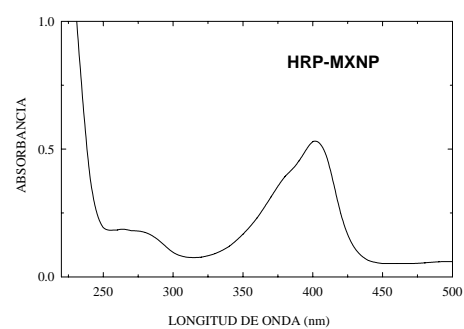
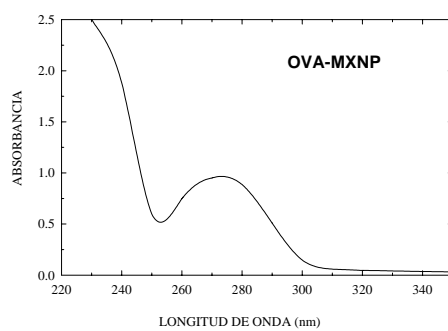
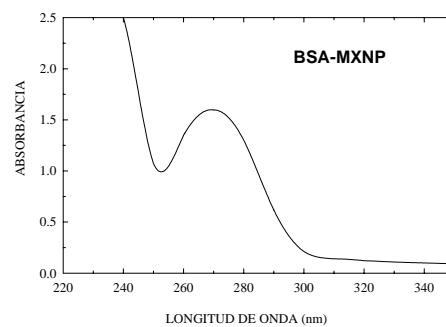
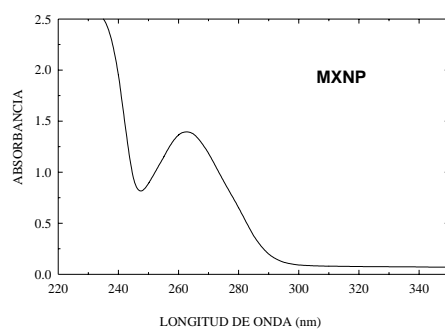
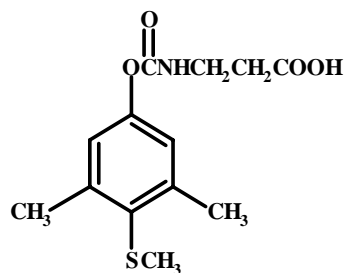
- Wang, T.C.; Chiou, J.M.; Chang, Y.L.; Hu, M.C. Genotoxicity of Propoxur and Its *N*-nitroso Derivative en Mammalian Cells. *Carcinogenesis* **1998 a**, *19*, 623-629.
- Wang, T.C.; Chiou, J.M.; Chang, Y.L.; Hu, M.C. Genetic Toxicity of *N*-methylcarbamate Insecticide and Their *N*-nitroso Derivatives. *Carcinogenesis* **1998 b**, *19*, 623-629.
- Weller, M.G.; Schuetz, A.J.; Winklmair, M.; Niessner, R. Highly Parallel Affinity Sensor for the Detection of Environmental Contaminants in Water. *Anal. Chim Acta* **1999**, *393*, 29-41.
- Wengatz, I.; Stoutamire, D.W.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Pyrethroid Insecticide Fenprothrin. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2211-2221.
- Wie, S.I.; Hammock, B.D. Development of Enzyme-linked Immunosorbent Assays for Residue Analysis of Diflufenzuron and BAY SIR 8514. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 949-957.
- Wing, K.D.; Hammock, B.D.; Wustner, D.A. Development of an S-Bioallethrin Specific Antibody. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 1328-1333.
- Wittmann, C.; Schmid, R.D. Development and Application of an Automated Quasi-Continuous Immunoflow Injection System to the Analysis of Pesticide Residues in Water and Soil. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1041-1047.
- Wortberg, M.; Kreissig, S.B.; Jones, G.; Rocke, D.M.; Hammock, B.D. An Immunoarray for the Simultaneous Determination of multiple Triazine Herbicides. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 339-352.
- Wortberg, M.; Goodrow, M.H.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. Immunoassay for Simazine and Atrazine with Low Cross-Reactivity for Propazine. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2210-2219.
- Yalow, R.S.; Berson, S.A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **1959**, *184*, 1648-1649 .

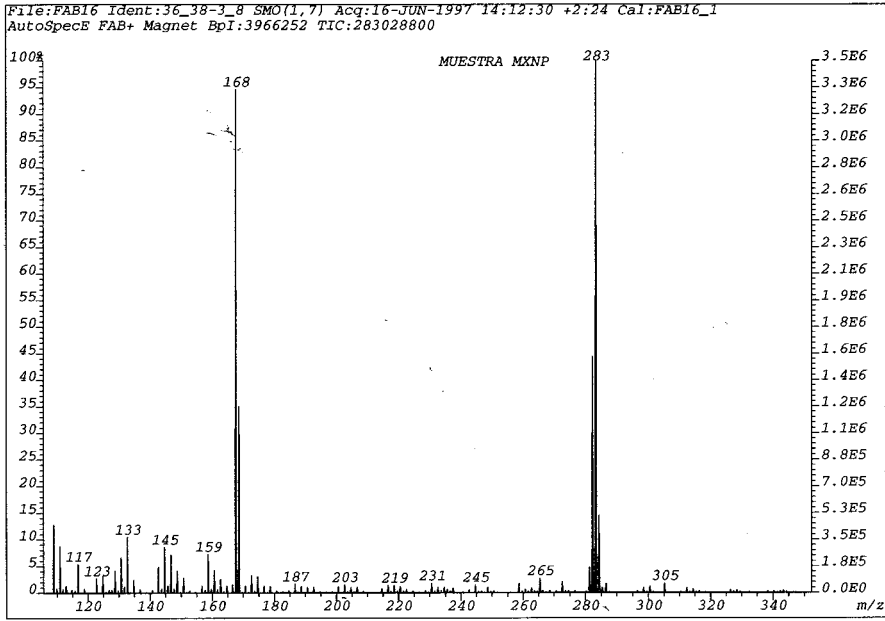
APÉNDICE I.

**ESPECTROS (UV, RMN Y MASAS) DE LOS HAPTENOS.
ESPECTROS (UV) DE LOS CONJUGADOS PROTEÍNA-HAPTENO.**

1. ESPECTROS DE LOS HAPTENOS Y DE LOS CONJUGADOS HAPTÉNICOS DEL METHIOCARB.

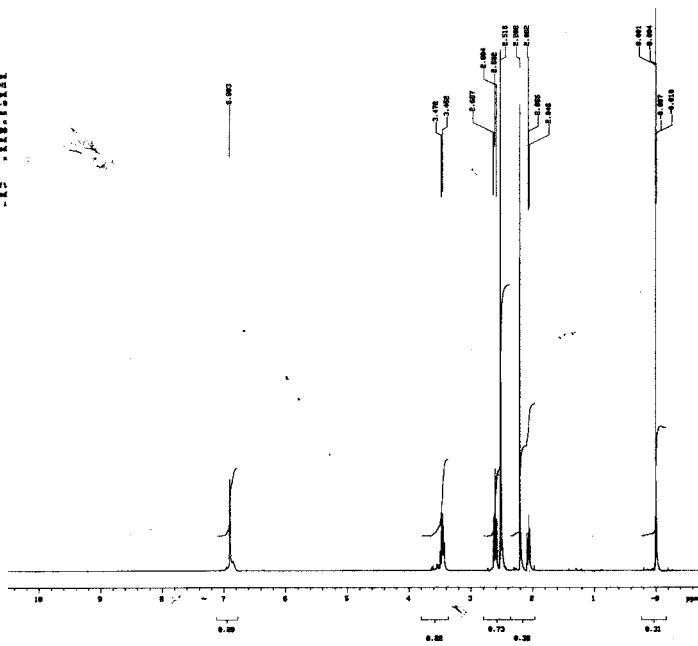
Ácido 3-[[1-(4(methyltio)-3,5-xiloxi)carbonil]amino]propanoico (MXNP).





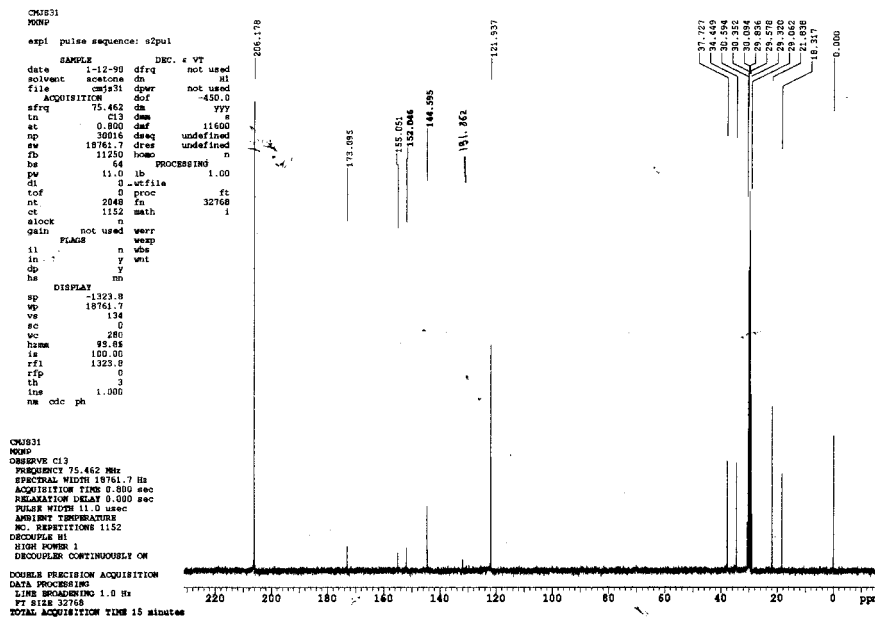
```

MUT7
PCA
-----
exp1 pulse sequence: aBp1
SAMPLE MED. & UT
data 1-42-98 afrc not used
software macintosh ds HI
file aat7 dpar not used
ACQUISITION def -400.0
afrc 396.675 ds
ta 10 ds
nt 2.460 def
ap 20000 dscc undefined
mc 4000.0 dscc undefined
fs 2000 hacc
ba 10 PROCESSING
pu 00.0 vlllla
af 0 pfm-
lef 0 fs not used
nt 00 math
ct 00
clock n user
puls not used vcomp
PLACE who
is 0 not
ap 0
ba 00
-----
DISPLAY
ap -300.0
ap 3370.3
va 300
ac 0
harm 18.85
ia 7960.47
rfi 620.0
rfp 0
ta 11
iaa 100.000
no cal: ph
    
```

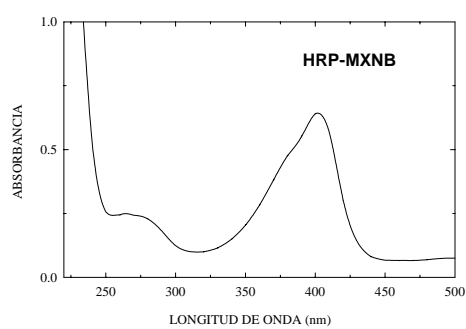
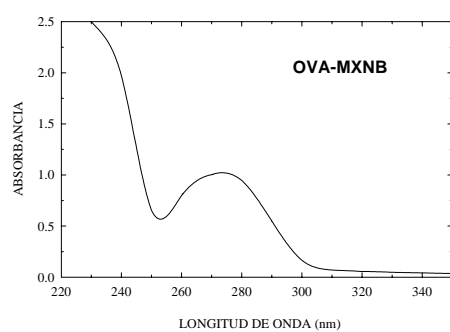
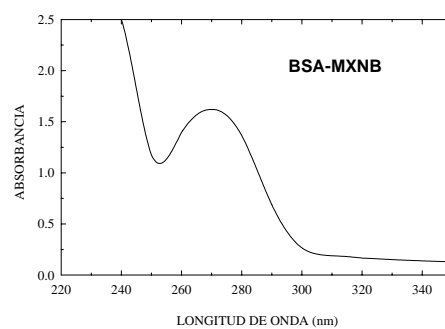
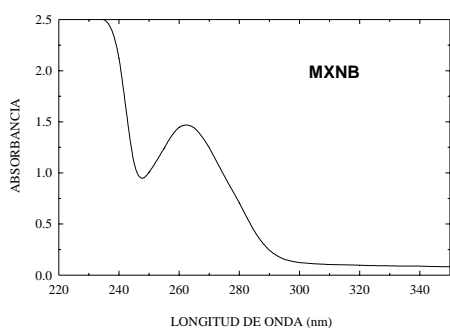
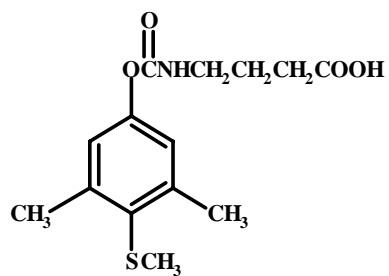


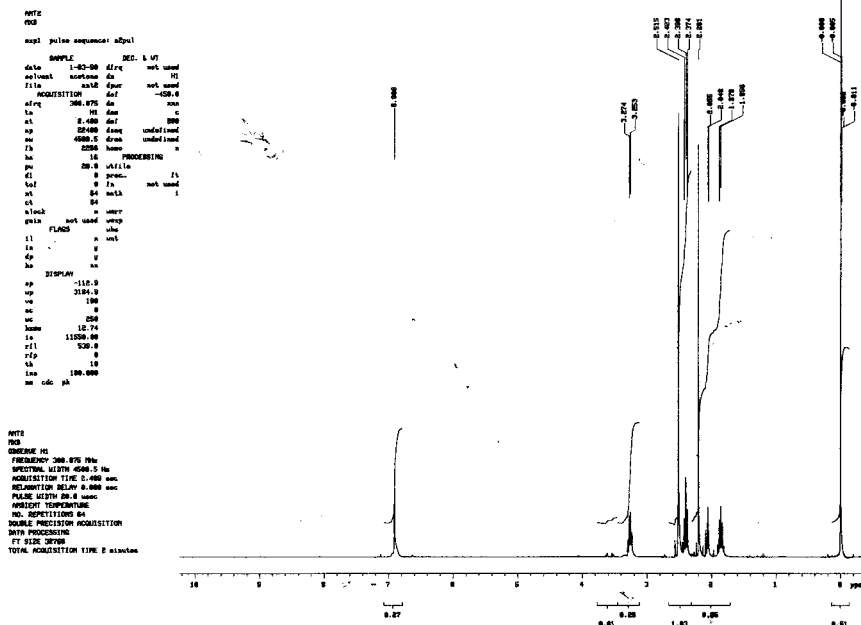
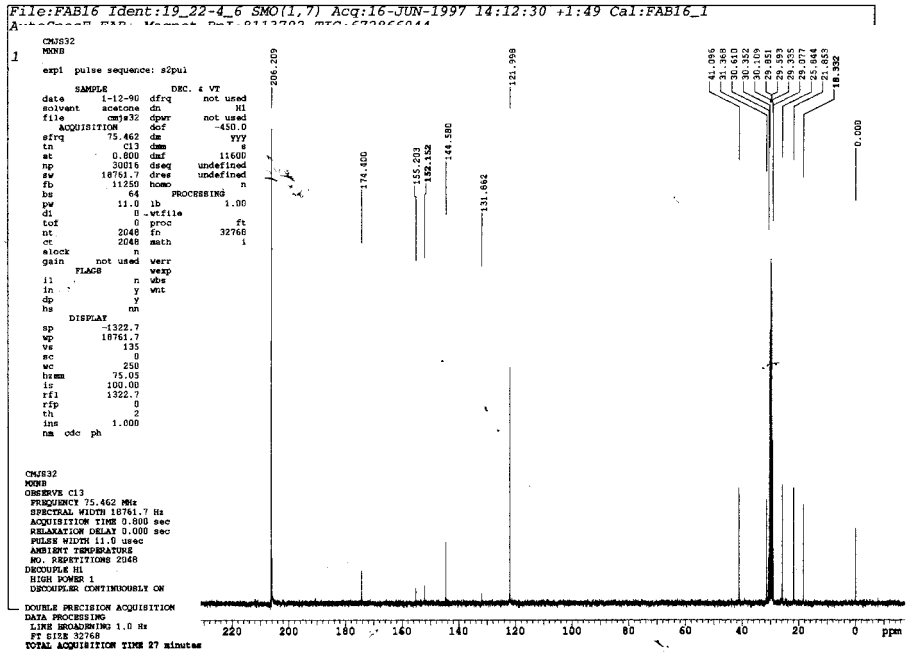
```

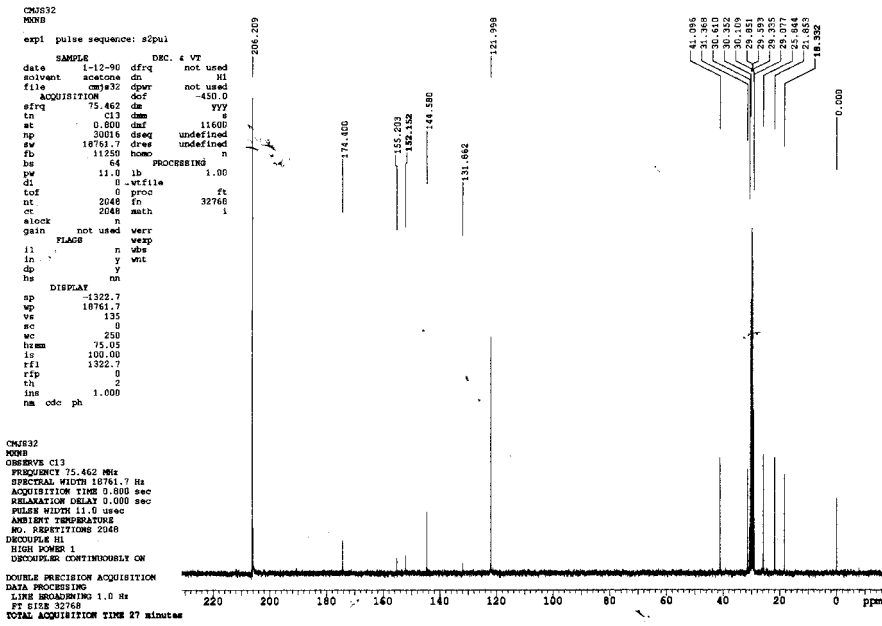
MUT7
PCA
-----
GENERATE IN
FREQUENCY 300.075 cm⁻¹
SPECTRAL WIDTH 4000.0 cm⁻¹
ACQUISITION TIME 2.460 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 90.0 nsec
PROJECT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 64
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
FT SIZE 65536
TOTAL ACQUISITION TIME 6.410000
    
```



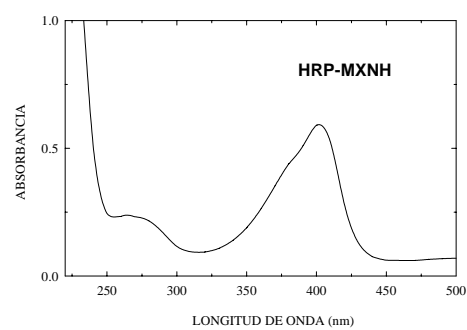
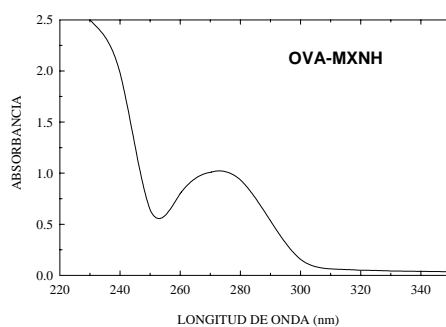
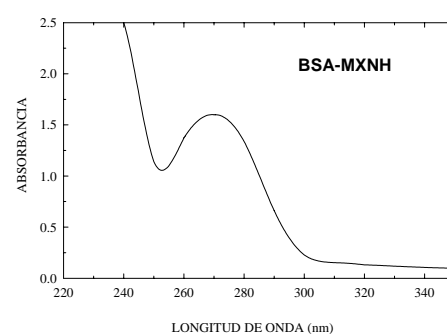
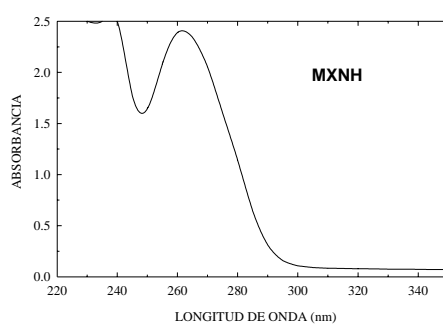
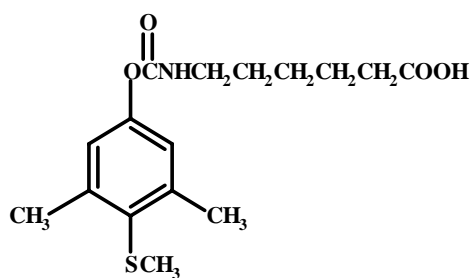
Ácido 4-[[1-(4(methyltio)-3,5-xililoxi)carbonil]amino]butanoico (MXNB).

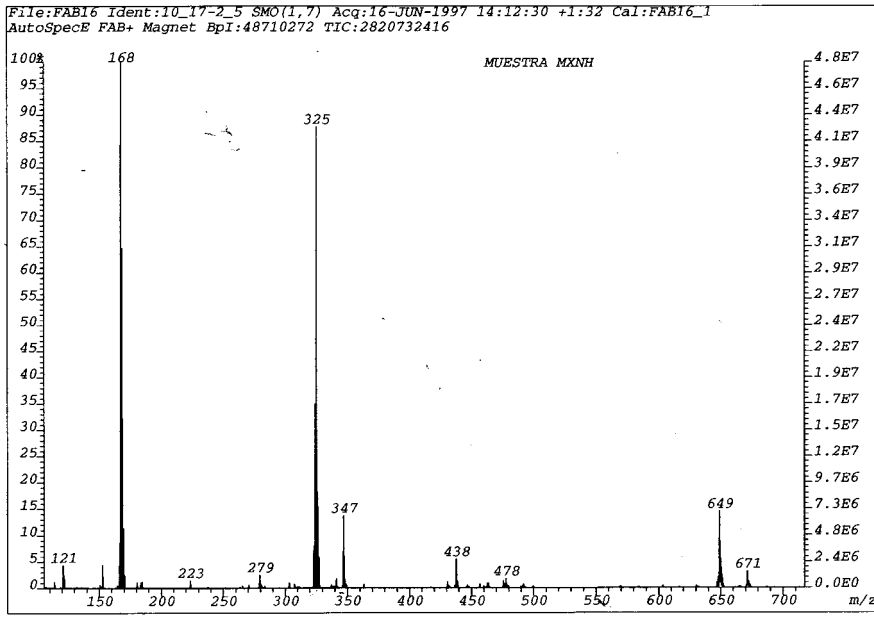






Ácido 6-[[1-(4(methyltio)-3,5-xiloxi)carbonil]amino]hexanoico (MXNH).



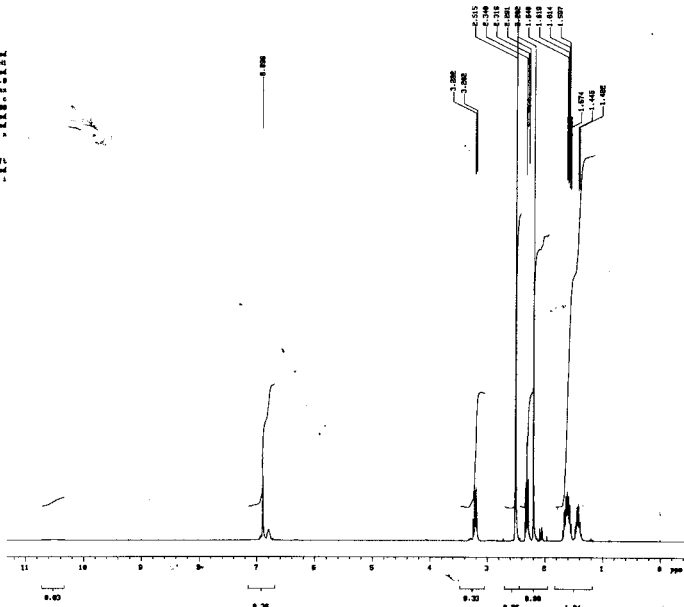


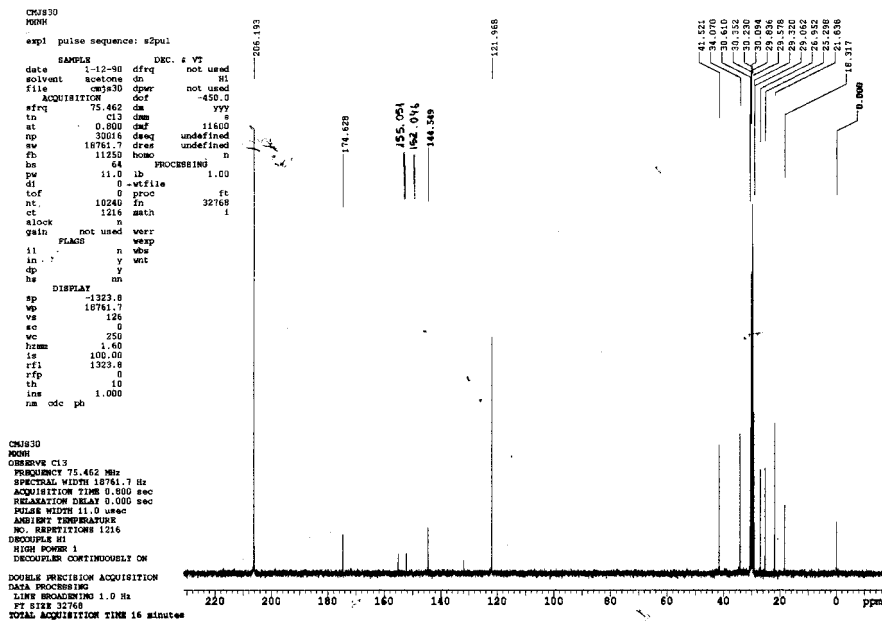
```

MUT3
PAC
mpsl pulse sequence: smpsl
data 1-02-98 dif not used
solvent acetone da HI
file 1013 dpr not used
ACQUISITION def -698.0
dfrq 300.075 da
ta HI da c
nt 2.400 def 000
sp 125000 daet undefind
sv 4000.5 drca undefind
fb 0000 hane
ba 18 PROCESING
pr 00.0 while
dl 0 proc- fl
bd 0 fa not used
st 04 math
ct 04
alock 0 user
gain not used
FLASK ube
il 0 val
ia 0 v
dp 0 v
ba DISPLAY
ep -100.1
wp 2000.5
uo 100
uo 0
uc 000
hann 14.10
ls 13200.00
rl 520.0
rfp 0
sh 10
lra 100.000
ms ph
    
```

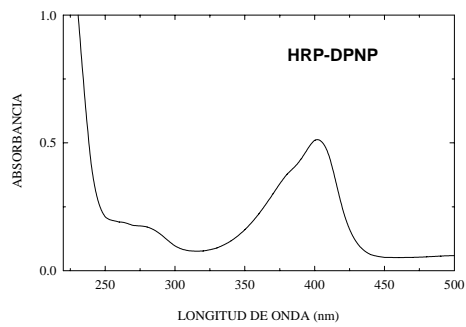
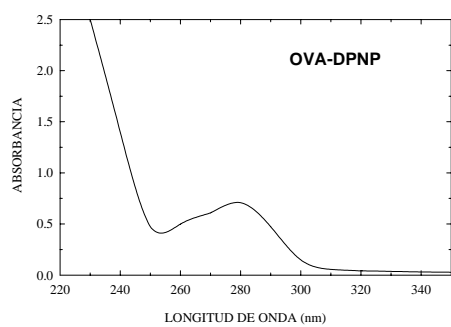
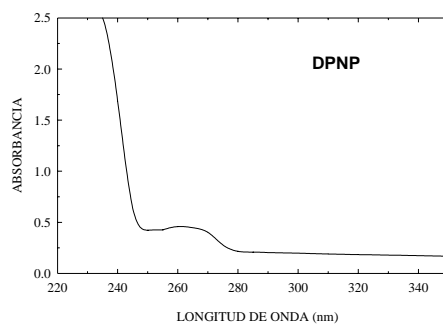
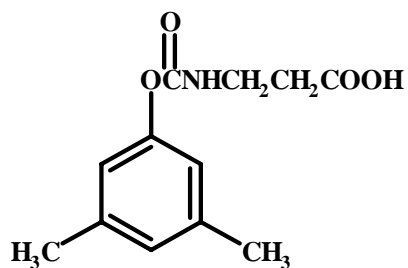
```

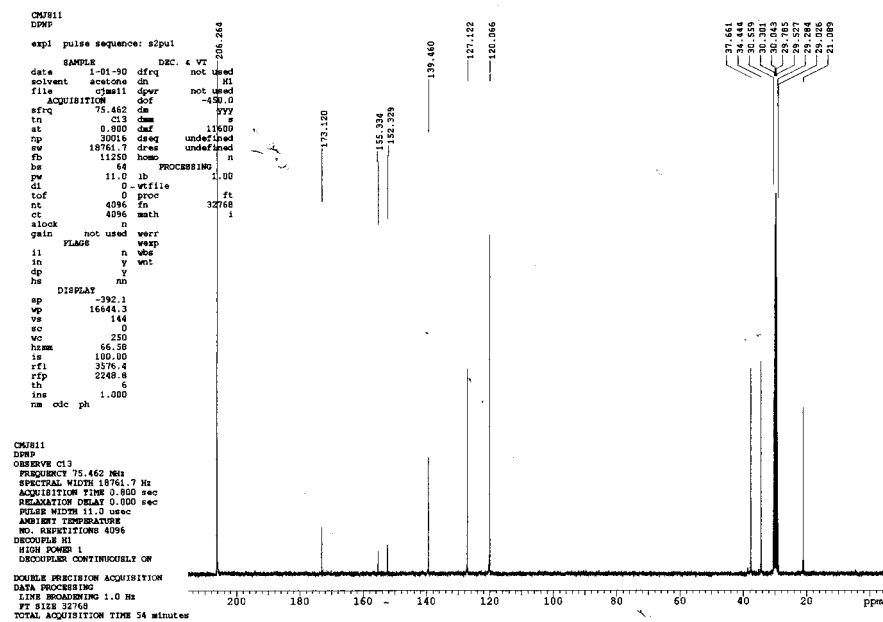
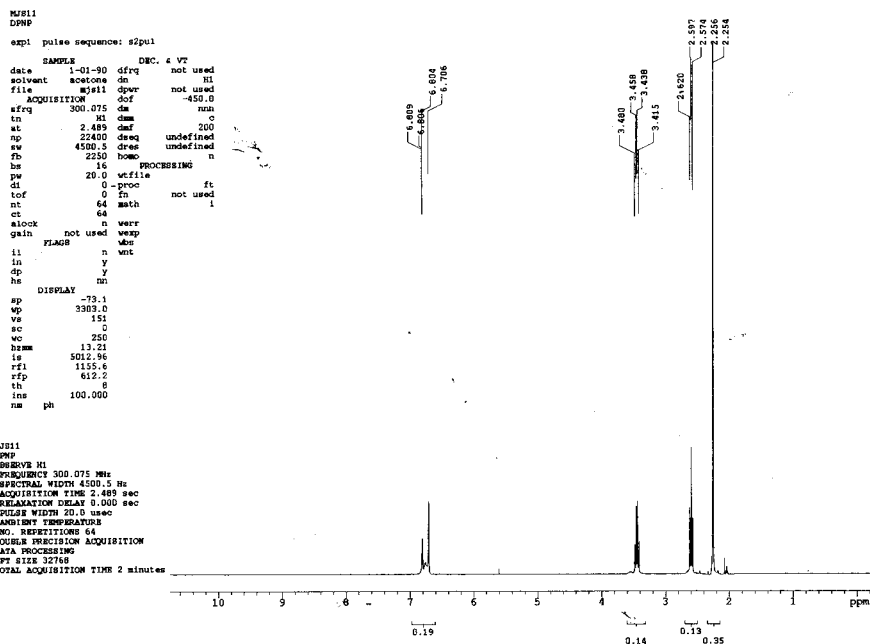
MUT3
PAC
OBSERVE HI
FREQUENCY 300.075 MHz
RESOLUTION 4000.5 Hz
ACQUISITION TIME 2.400 sec
RELAXATION DELAY 0.100 sec
PULSE WIDTH 09.0 usec
IMPLICIT TEMPERATURE
NO. REPEATS/SCAN 04
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
PT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 2 minutes
    
```



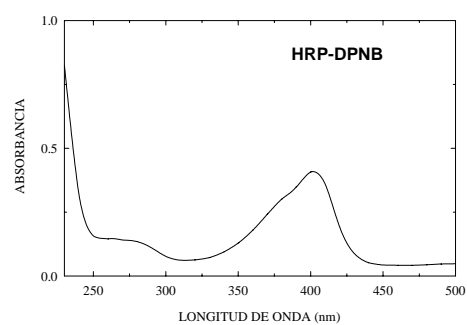
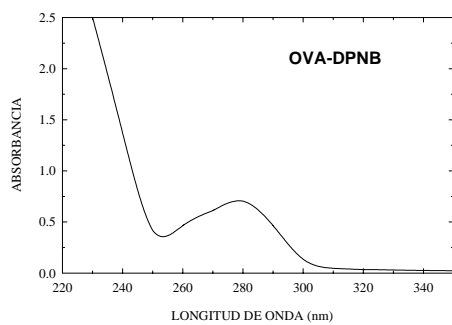
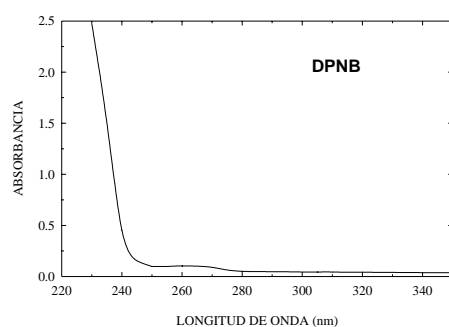
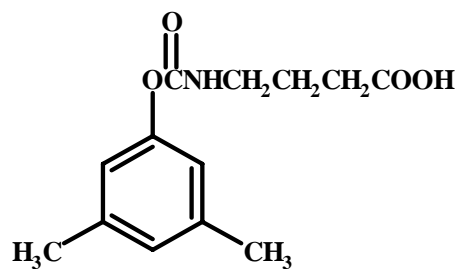


Ácido 3-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]propanoico (DPNP).



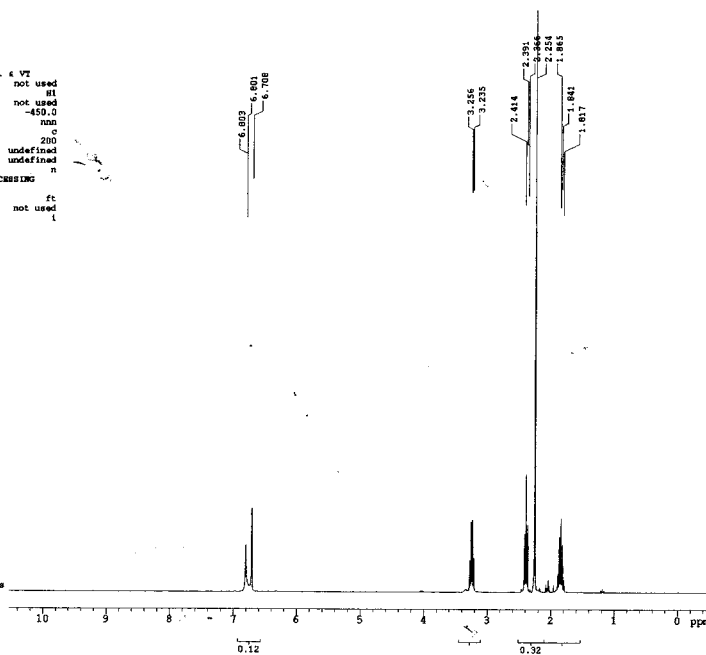


Ácido 4-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]butanoico (DPNB).




```

MJI12
DPWB
exp1 pulse sequence: s2pul
SAMPLE          DEC: 4 VT
date            1-05-90 dfrq not used
solvent         acetone d1  not used
file           mji12 dpr  not used
ACQUISITION    dof      -450.0
sfrq           300.075 dm
tn             81 dnm      c
st             2.489 dnf    200
np            22400 dseq   undefined
sw            4500.5 dres   undefined
fb            2250 homo    n
bs             16         PROCESSING
pw            20.0 -vfile  ft
dl             0         proc
tof           0         fn   not used
nt            64         math
ct            64
slock          n        werr
gain           not used wexp
FLAGS         n        wbe
il             y        wnt
in             y
cp             y
hs            nm
DISPLAY       -169.4
sp            3329.7
vs            164
sc             0
wc            250
hwm          13.32
ls            3180.27
rfl           1155.7
rfp           612.2
th            10
ins           100.000
nm            ph
    
```

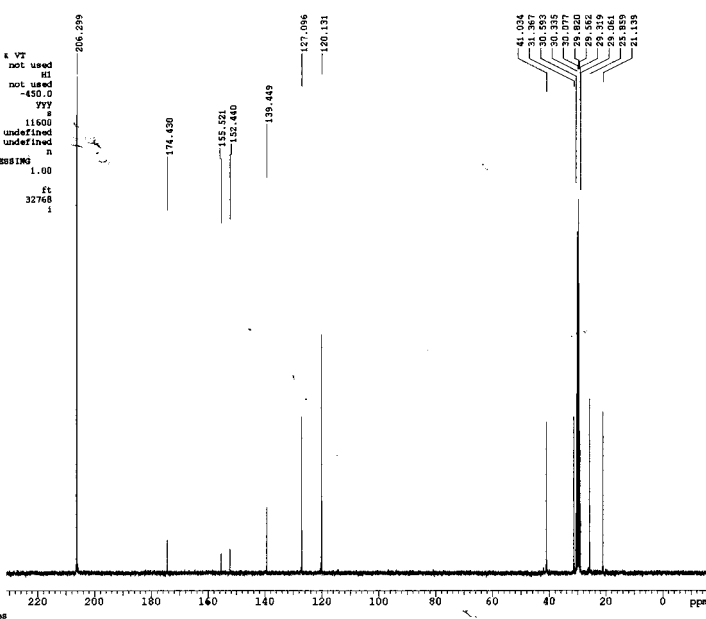


```

MJI12
DPWB
OBSERVE H1
FREQUENCY 300.075 MHz
SPECTRAL WIDTH 4500.5 Hz
ACQUISITION TIME 2.489 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 20.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 64
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 2 minutes
    
```

```

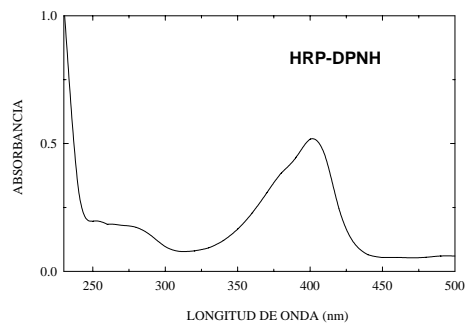
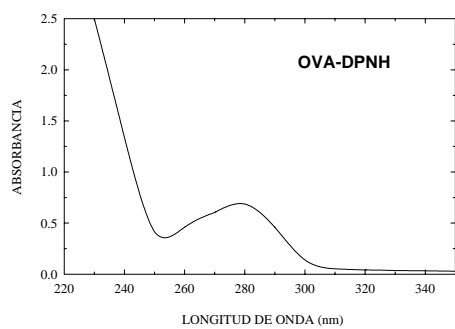
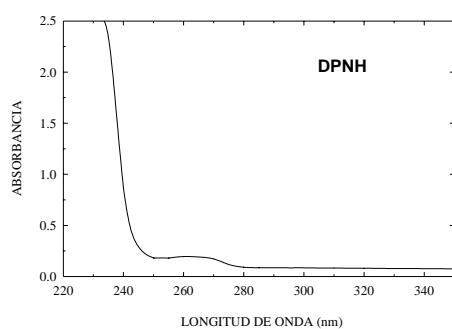
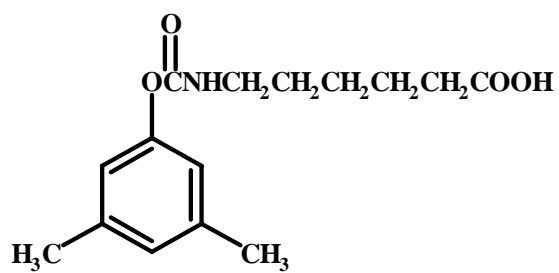
CMJ12
DPWB
exp1 pulse sequence: s2pul
SAMPLE          DEC: 4 VT
date            1-06-90 dfrq not used
solvent         acetone d1  not used
file           cmj12 dpr  not used
ACQUISITION    dof      -450.0
sfrq           75.462 dm
tn             C13 dnm      s
st             0.800 dnf    11600
np            30016 dseq   undefined
sw            18761.7 dres   undefined
fb            11250 homo    n
bs             64         PROCESSING
pw            11.0 lb      1.00
dl             0         -vfile
tof           0         proc
nt            4096         fn   32768
ct            3264         math
slock          n
gain           not used werr
FLAGS         n        wexp
il             y        wnt
in             y
cp             y
hs            nm
DISPLAY       -1325.1
sp            18761.7
vs            140
sc             0
wc            250
hwm          47.38
ls            100.00
rfl           3579.8
rfp           2248.8
th             6
ins           1.000
nm            ph
    
```

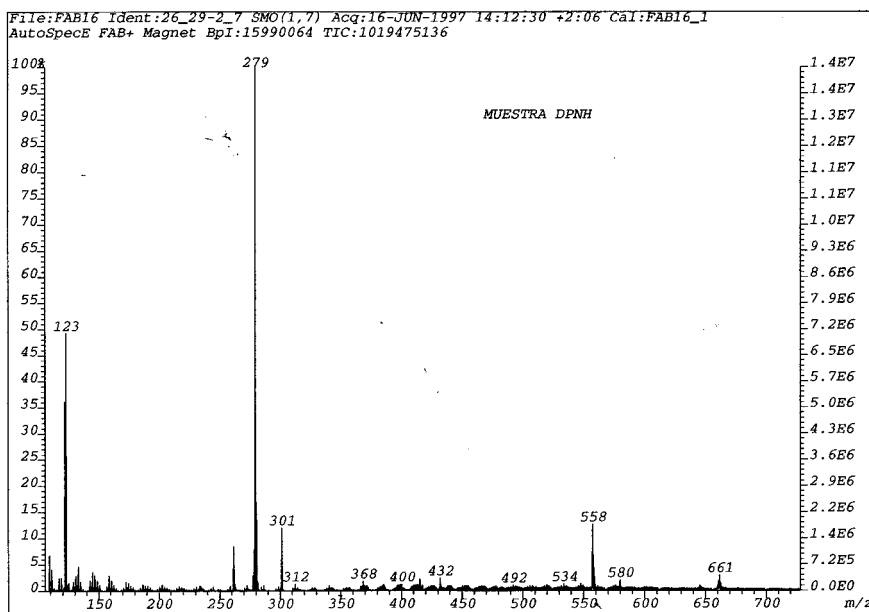


```

CMJ12
DPWB
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.462 MHz
SPECTRAL WIDTH 18761.7 Hz
ACQUISITION TIME 0.800 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 11.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 3264
DECOUPLER H1
HIGH POWER 1
DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 1.0 Hz
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 43 minutes
    
```

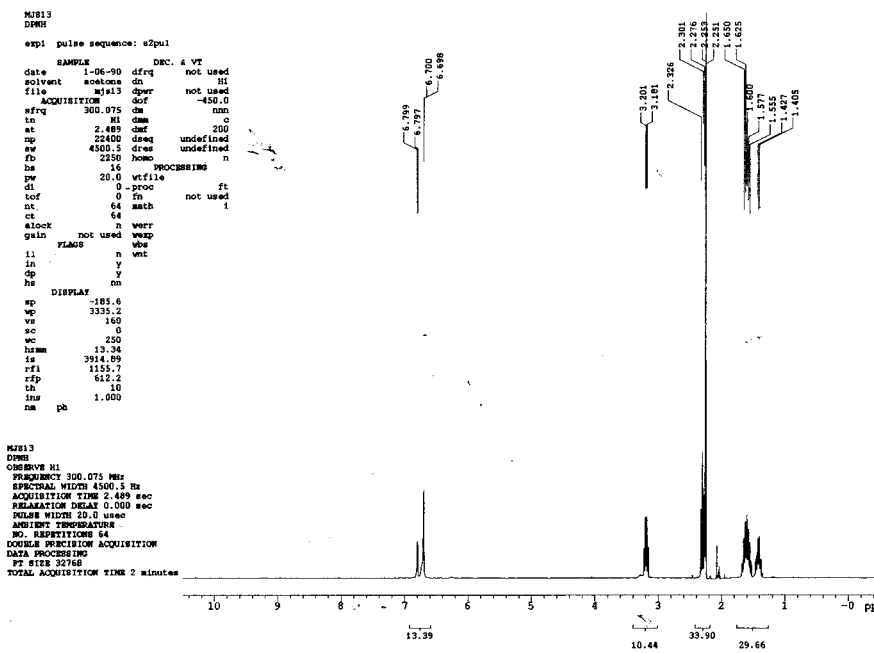
Ácido 6-[[1-(3,5-xililoxi)carbonil]amino]hexanoico (DPNH).

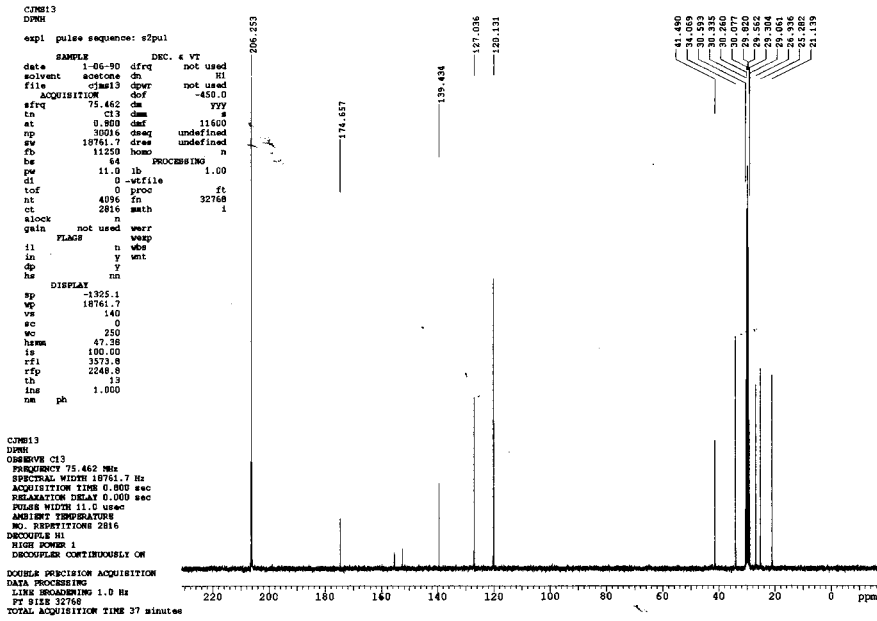




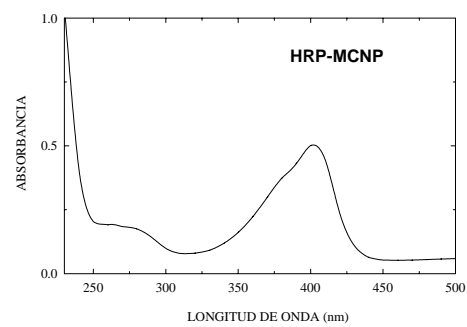
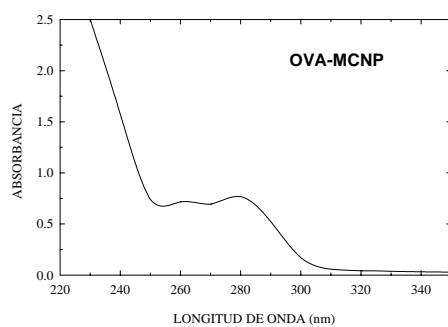
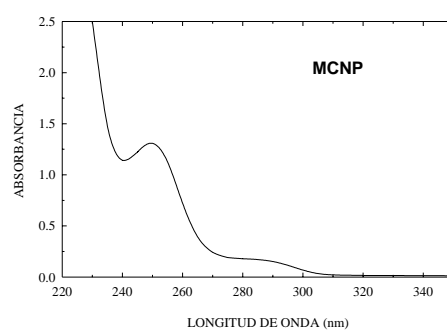
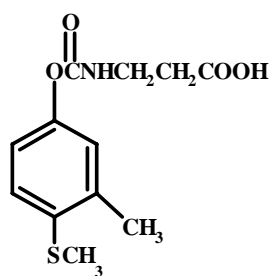
```

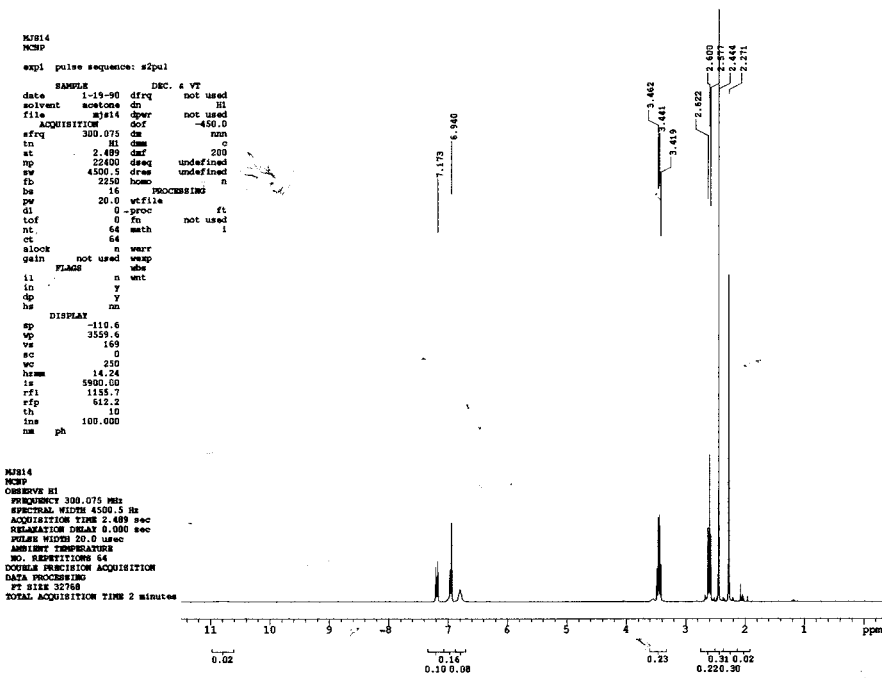
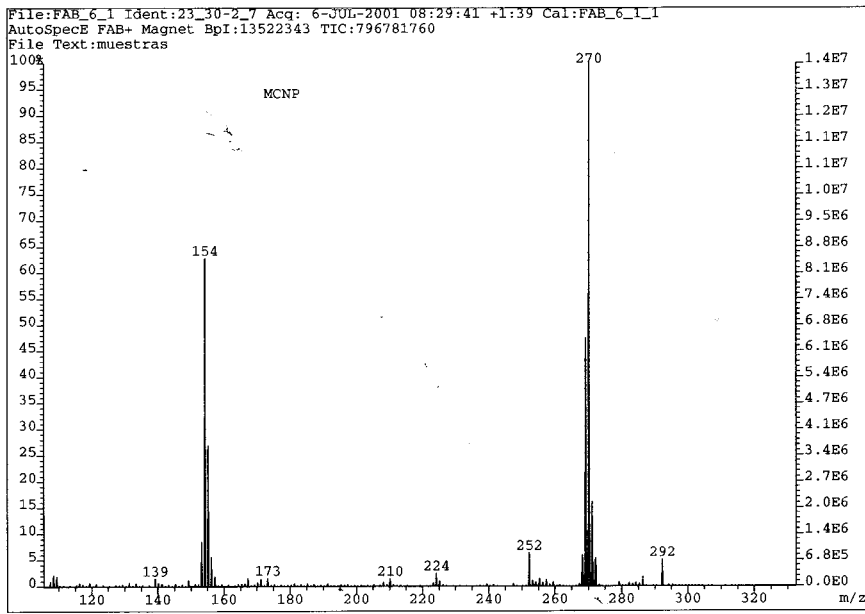
M813
DPNH
exp1 pulse sequence: s2pul
date 1-06-90 dfrq not used
solvent acetone dn HI
file m813 dper not used
ACQUISITION dcf -450.0
sfrq 300.075 dm nnn
in HI dm c
at 2.489 dmf 200
np 22400 dseq undefined
sw 4300.5 dras undefined
fb 2250 homo n
hs 16 PROCESSING
pw 20.0 wfile ft
dl 0 proc ft
tof 0 tn not used
nt 64 math i
ct 64
elock n werr
gain not used wamp
flags nbs
ll n unit
in y
op y
hs DISPLAY nm
sp -185.6
wp 3335.2
vs 160
sc 0
wc 250
hmm 13.34
is 3914.89
rfl 1155.7
rpf 612.2
ln 10
ins 1.000
na pb
    
```

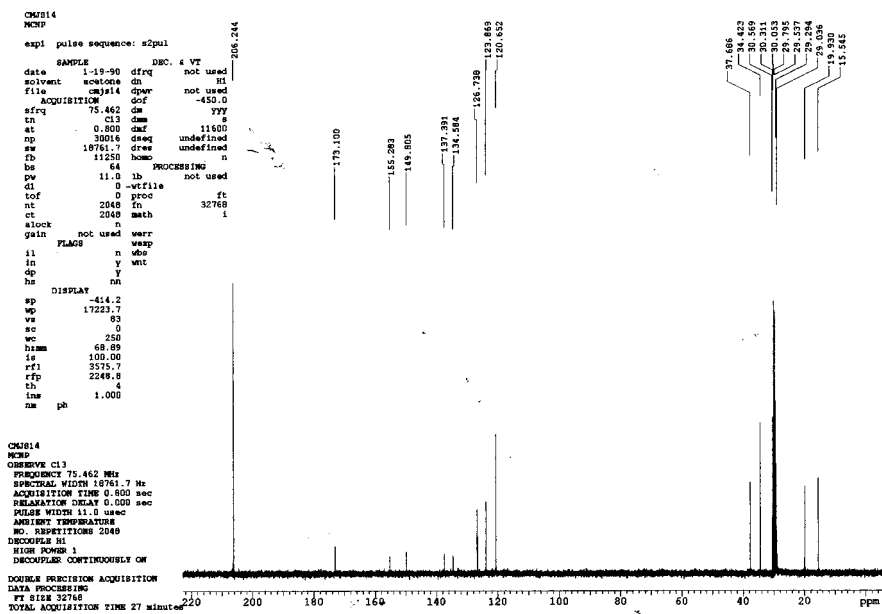




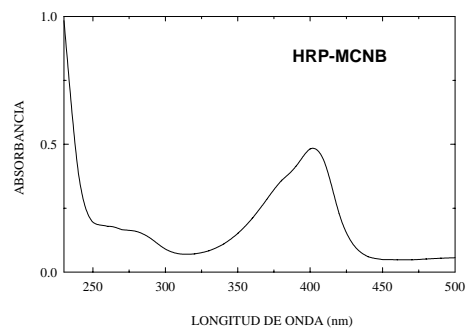
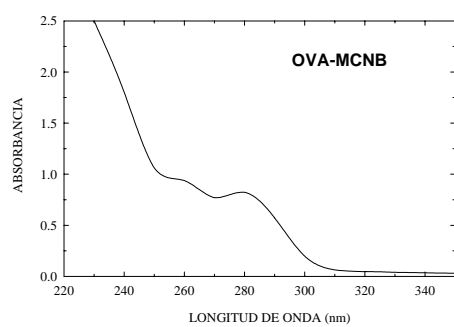
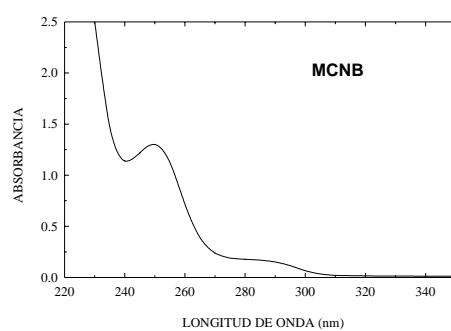
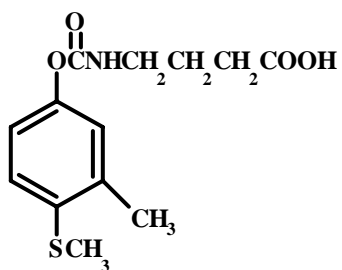
Ácido 3-[[1-(4-(metiltilio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]propanoico (MCNP).

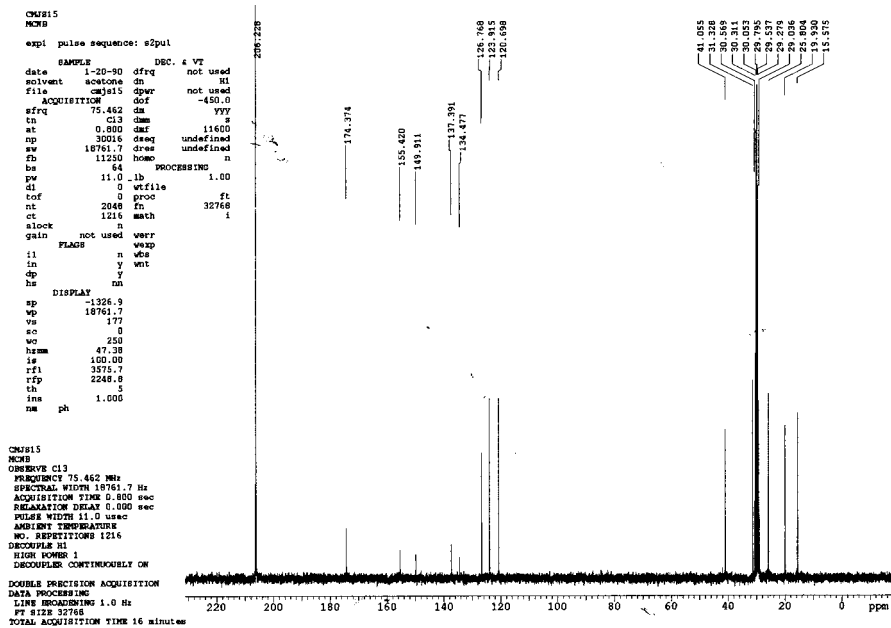
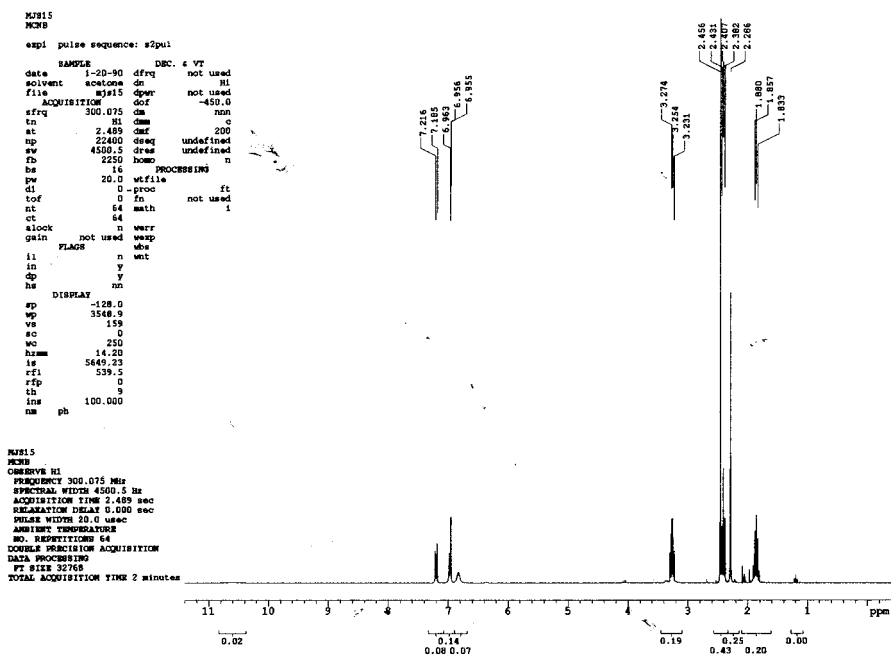




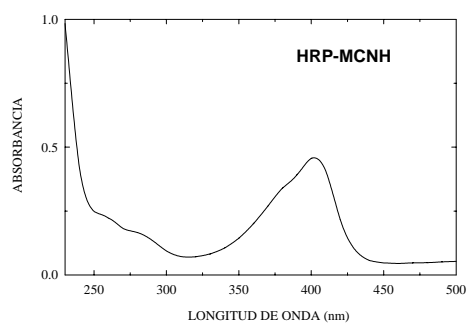
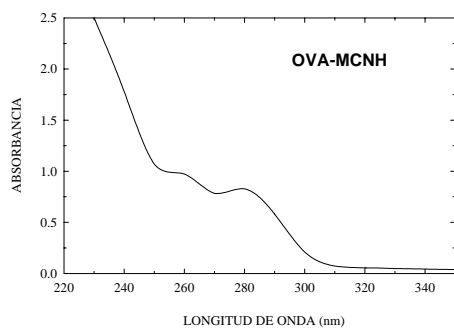
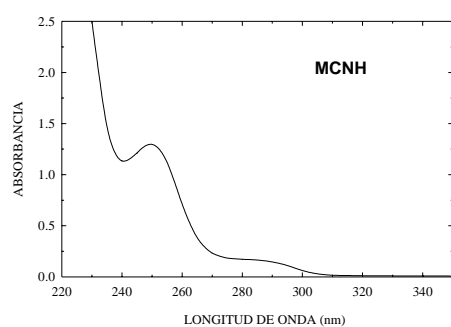
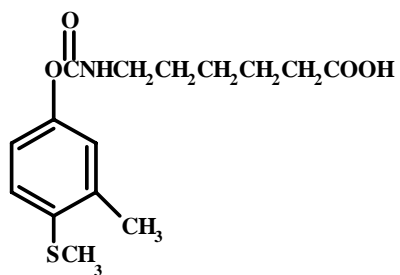


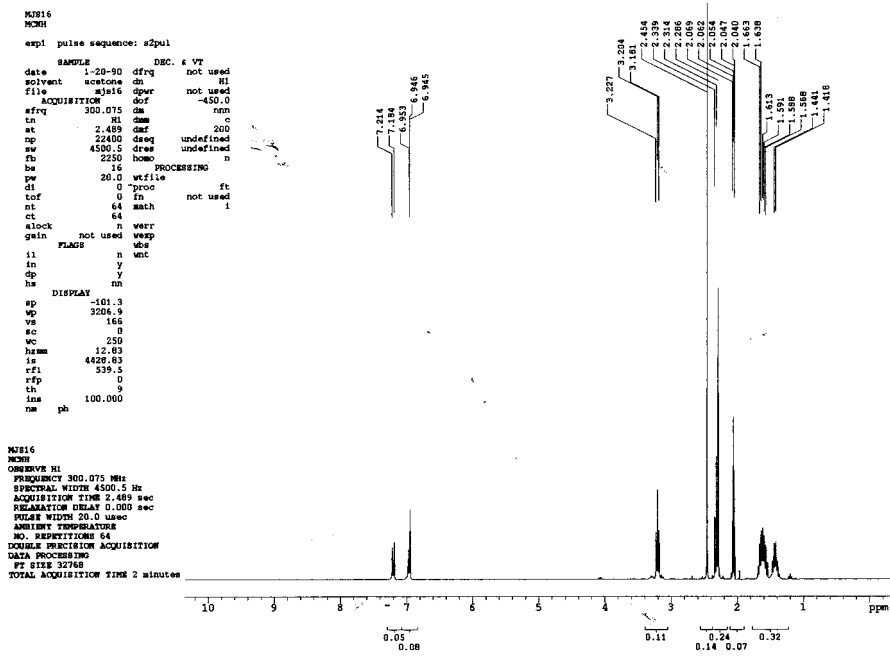
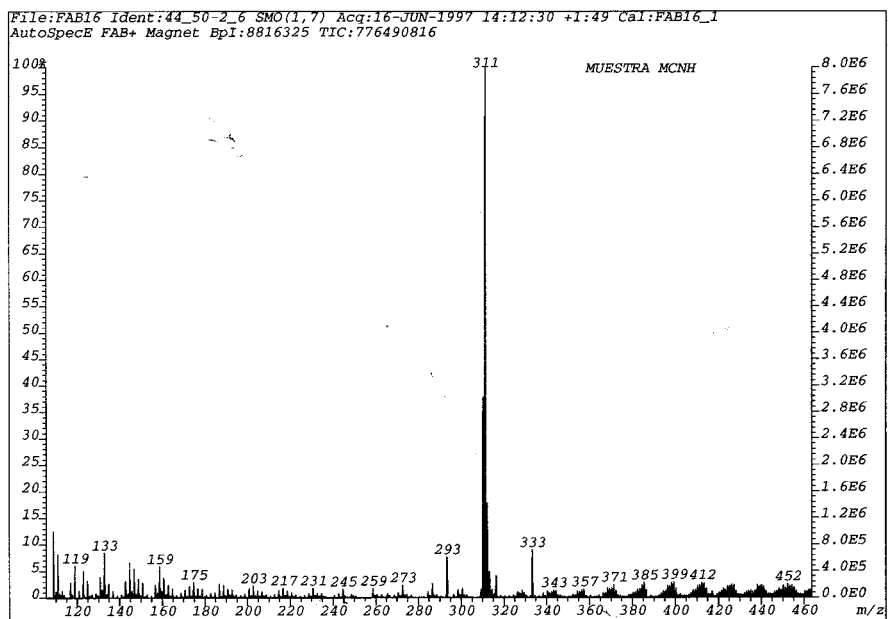
Ácido 4-[[1-(4-(metilitio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]butanoico (MCNB).

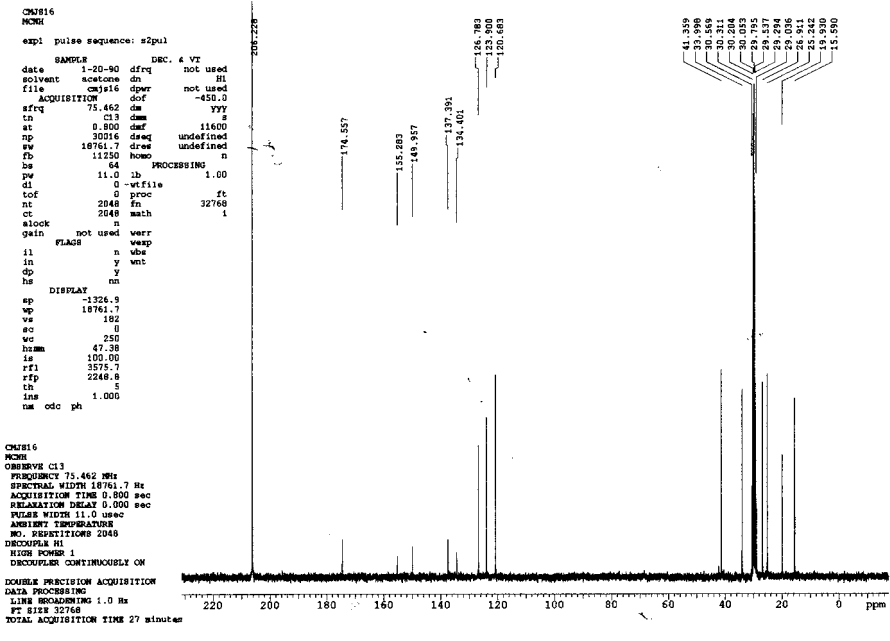




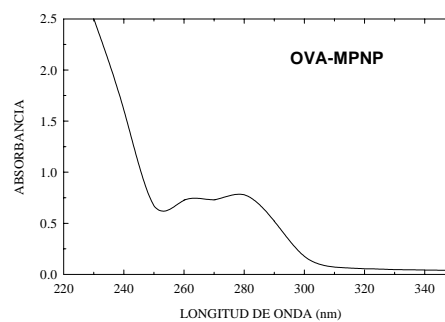
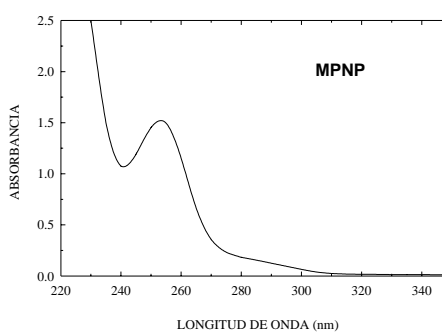
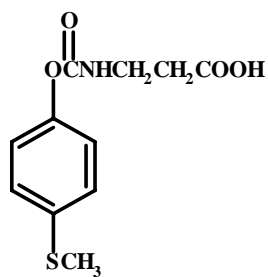
Ácido 6-[[1-(4-(metilitio)-3-cresiloxi)carbonil]amino]hexanoico (MCNH).

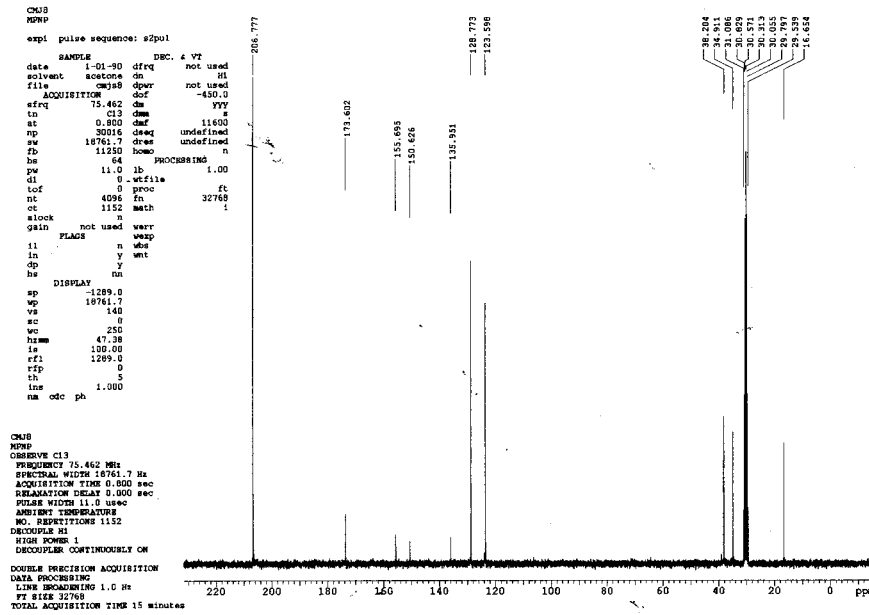
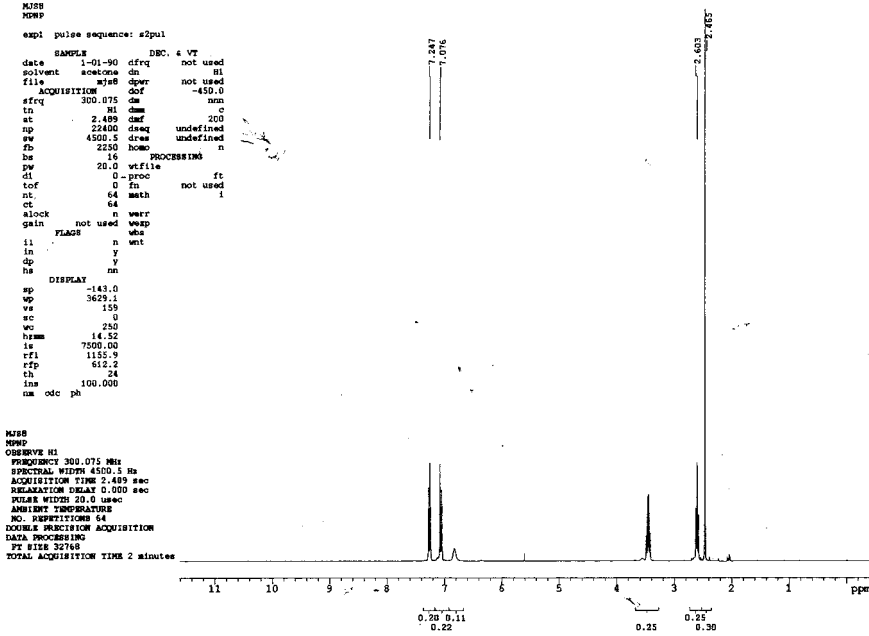




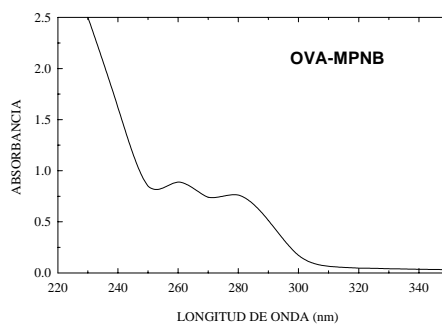
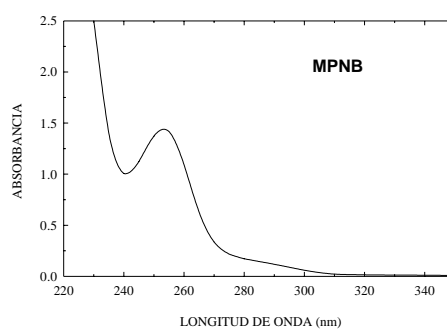
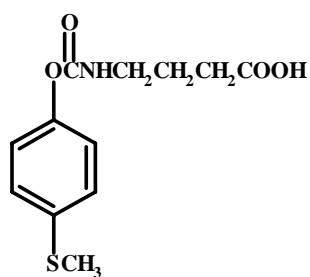


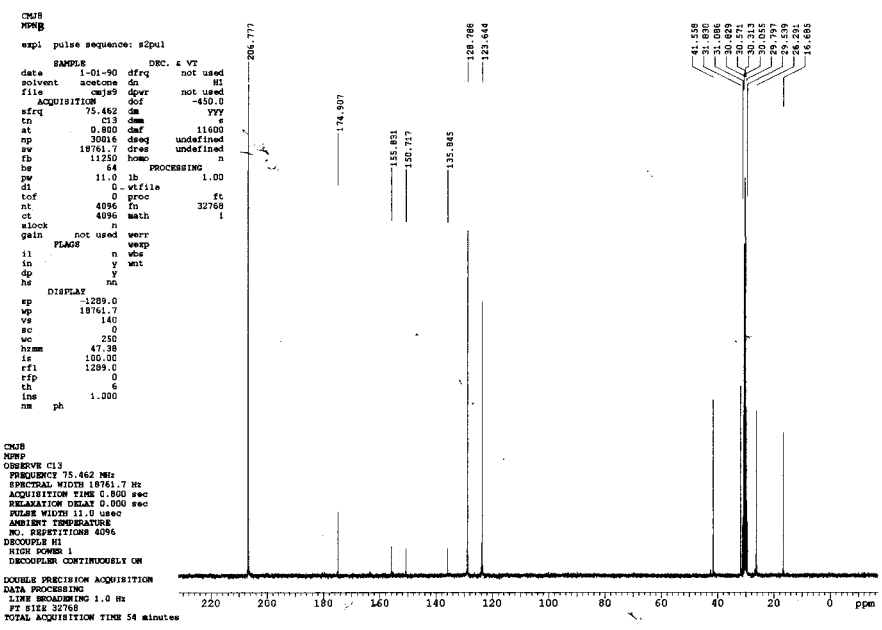
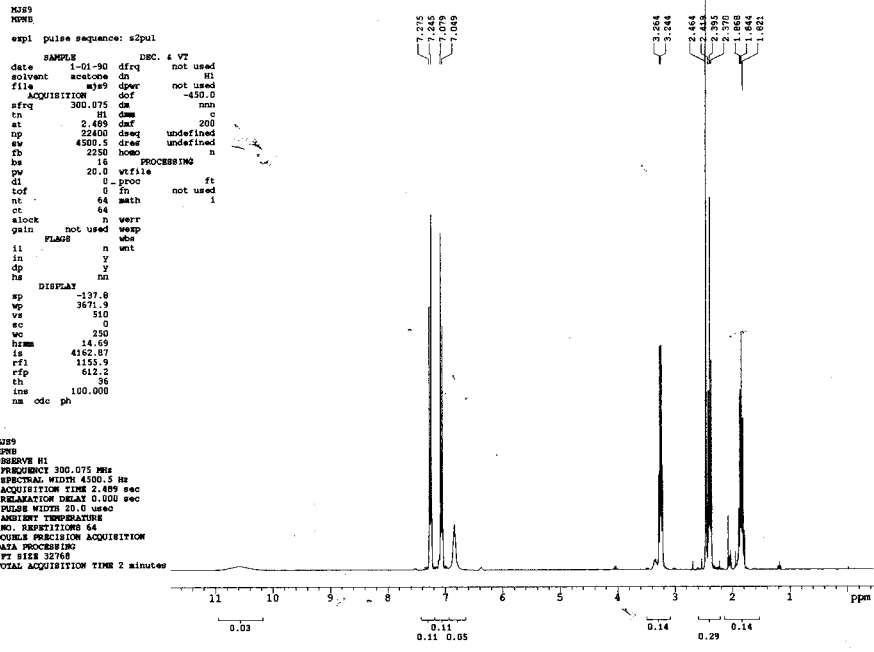
Ácido 3-[[1-(4-(metilto)feniloxi)carbonil]amino]propanoico (MPNP).



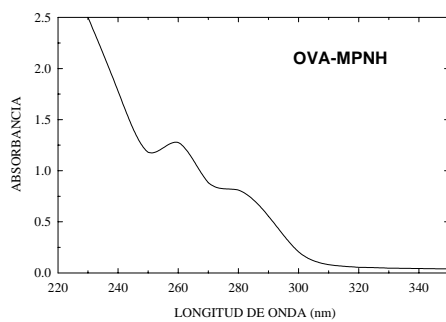
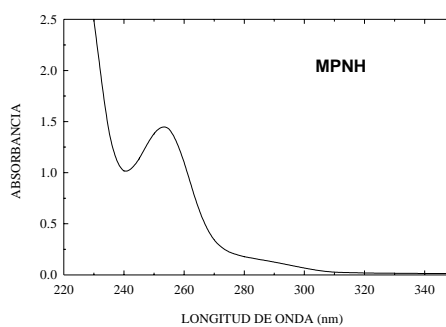
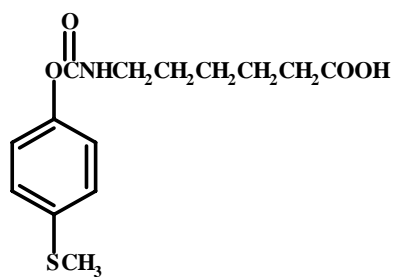


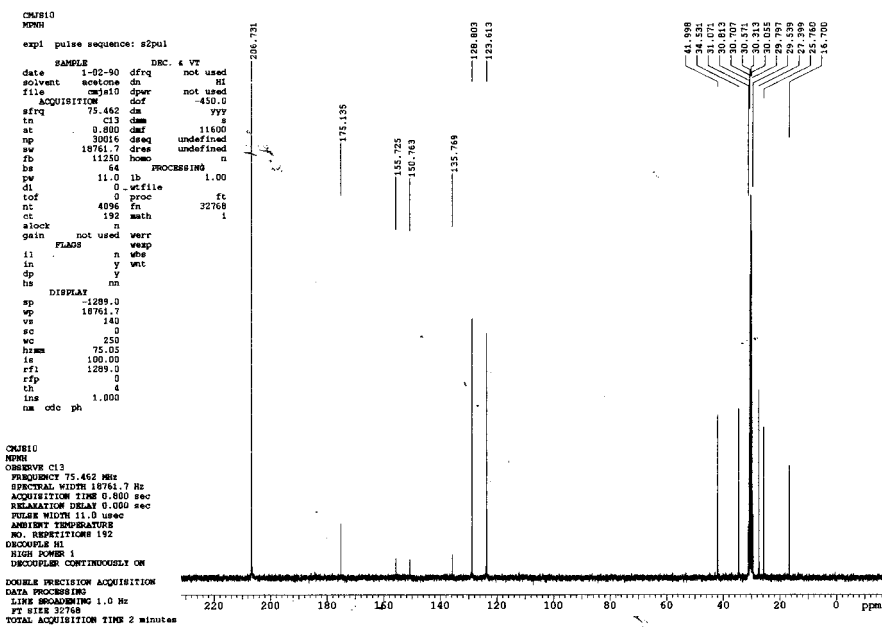
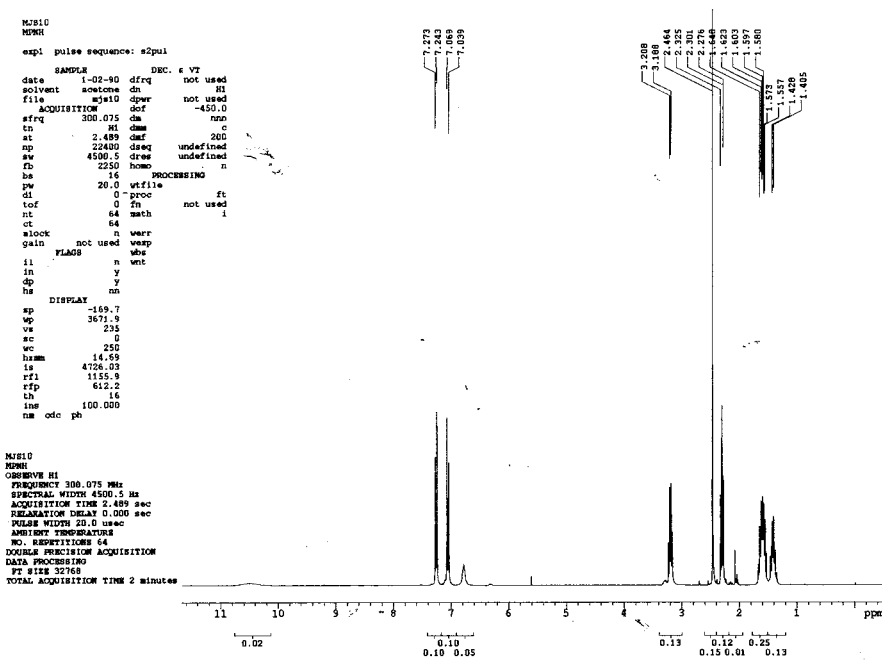
Ácido 4-[[1-(4-(metilto)feniloxi)carbonil]amino]butanoico (MPNB).



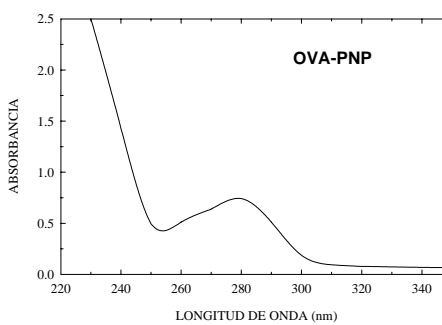
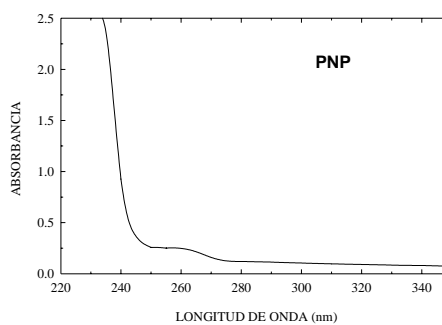
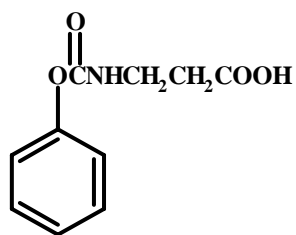


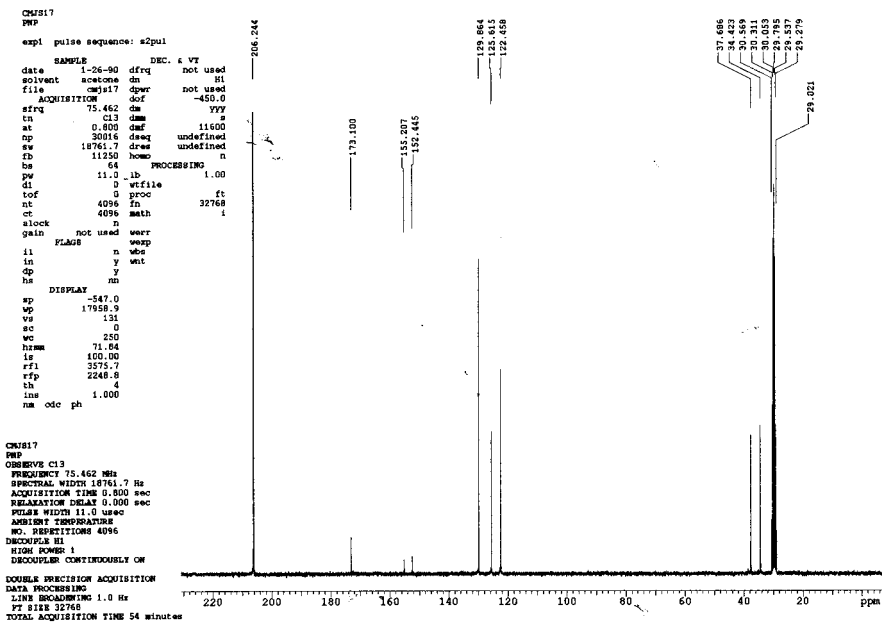
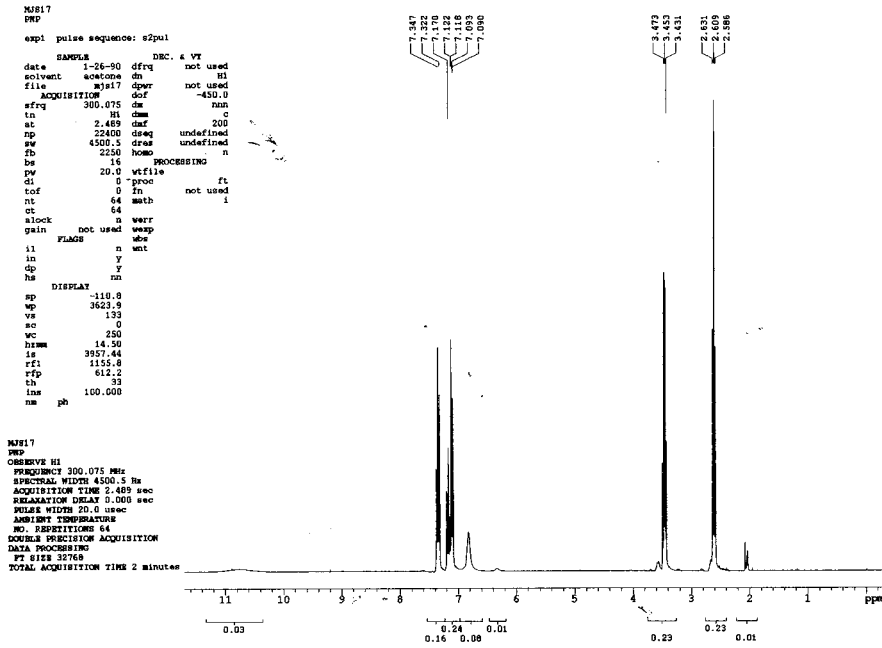
Ácido 6-[[1-(4-(metilto)fenilo)carbonil]amino]hexanoico (MPNH).



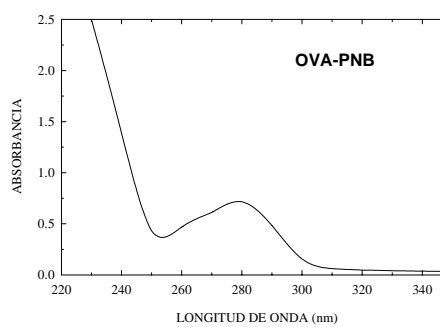
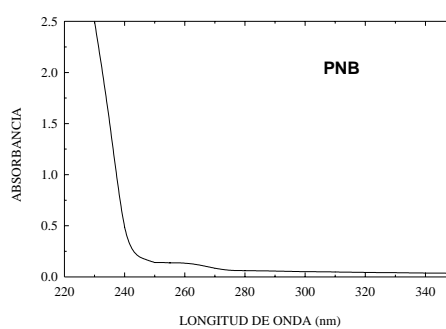
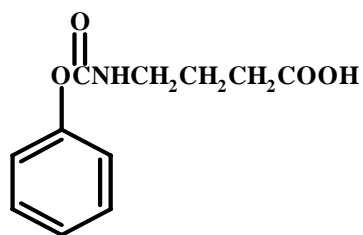


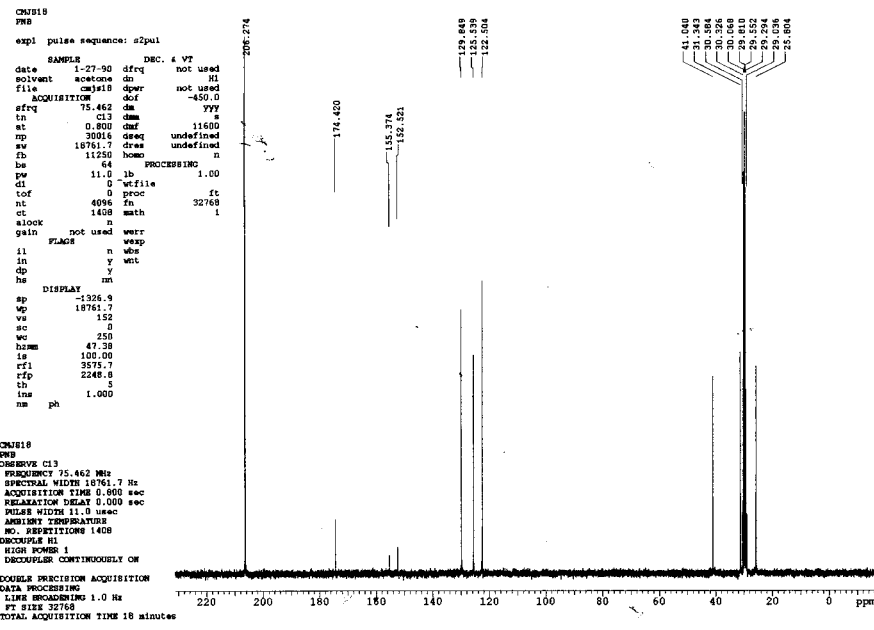
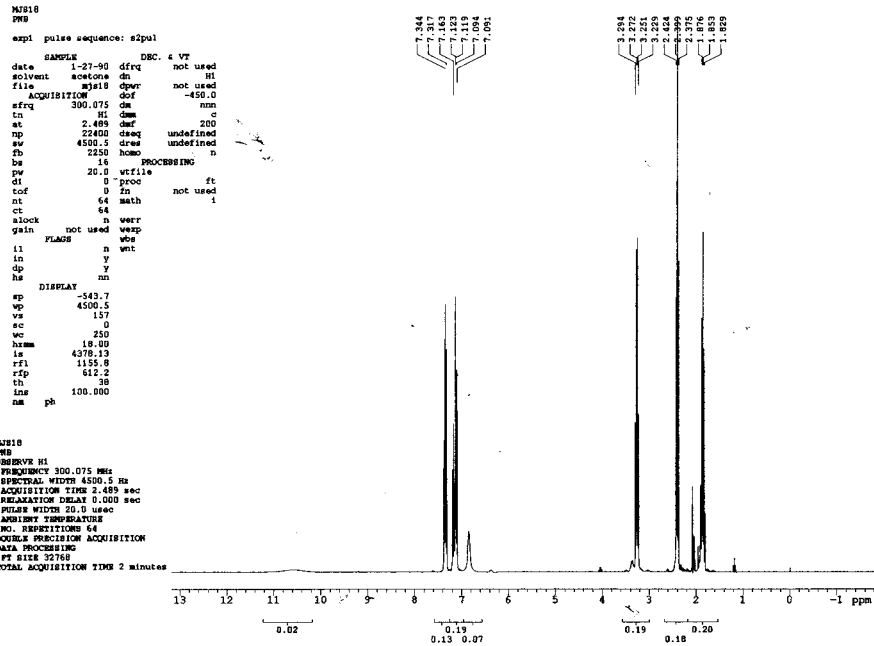
Ácido 3-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]propanoico (PNP).



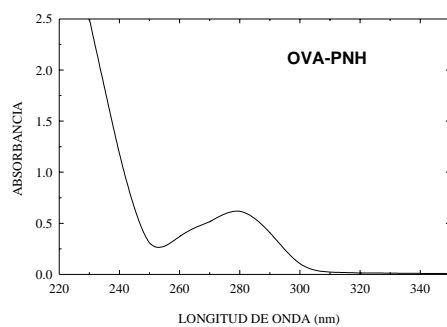
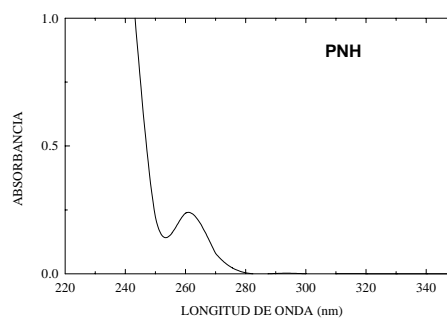
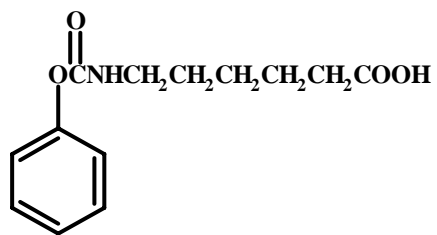


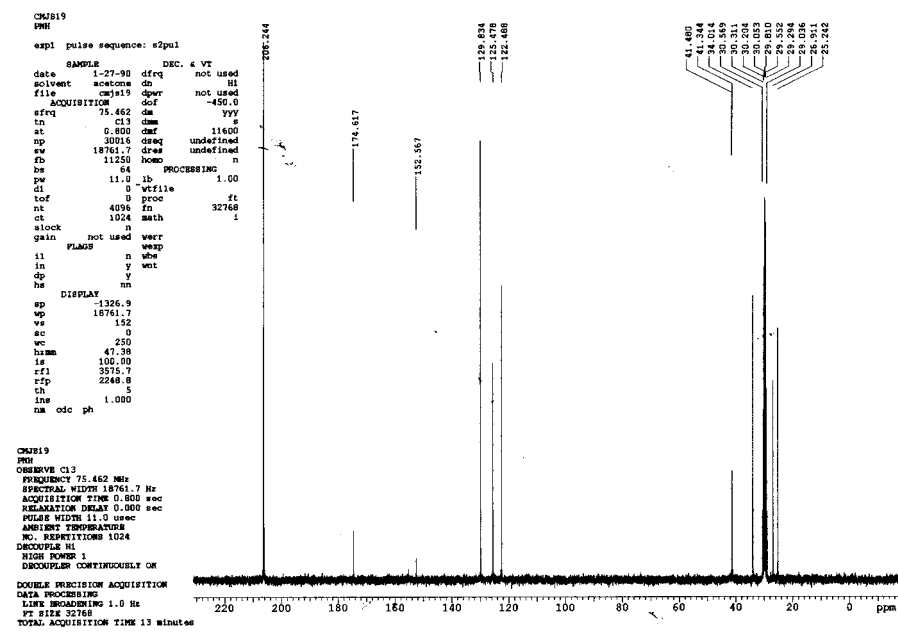
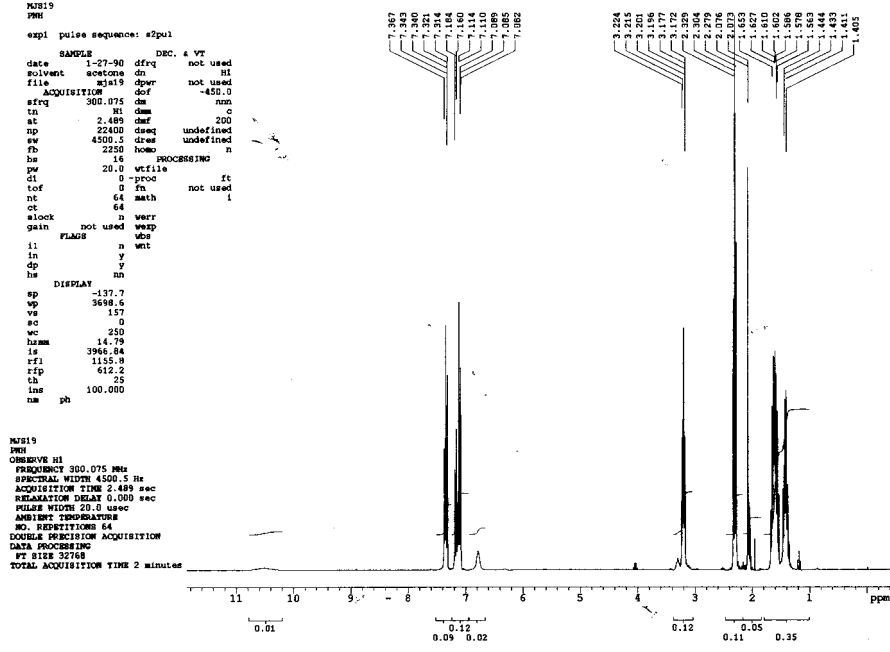
Ácido 4-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]butanoico (PNB).



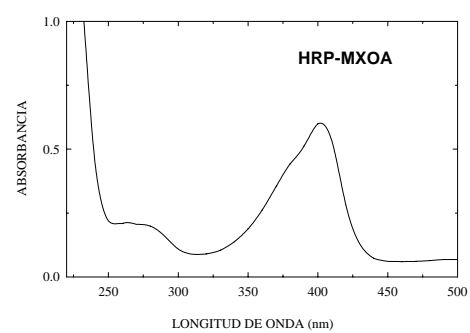
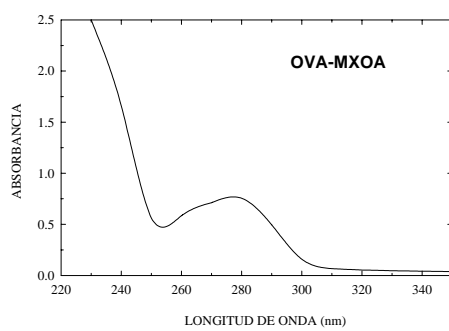
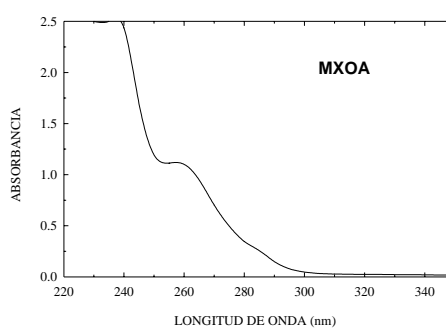
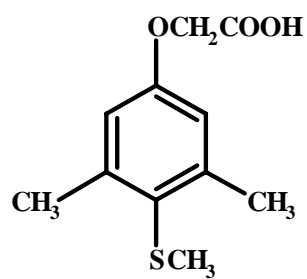


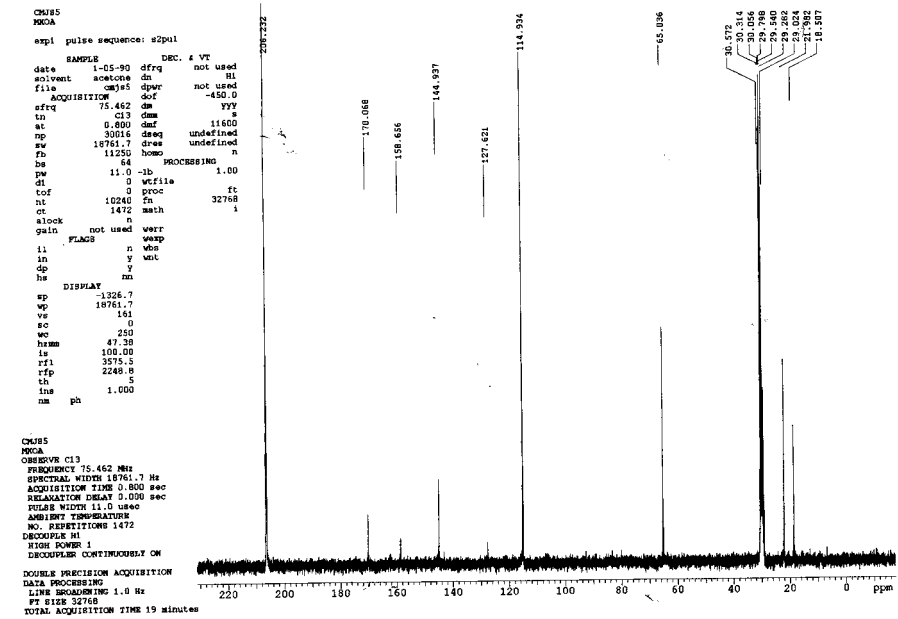
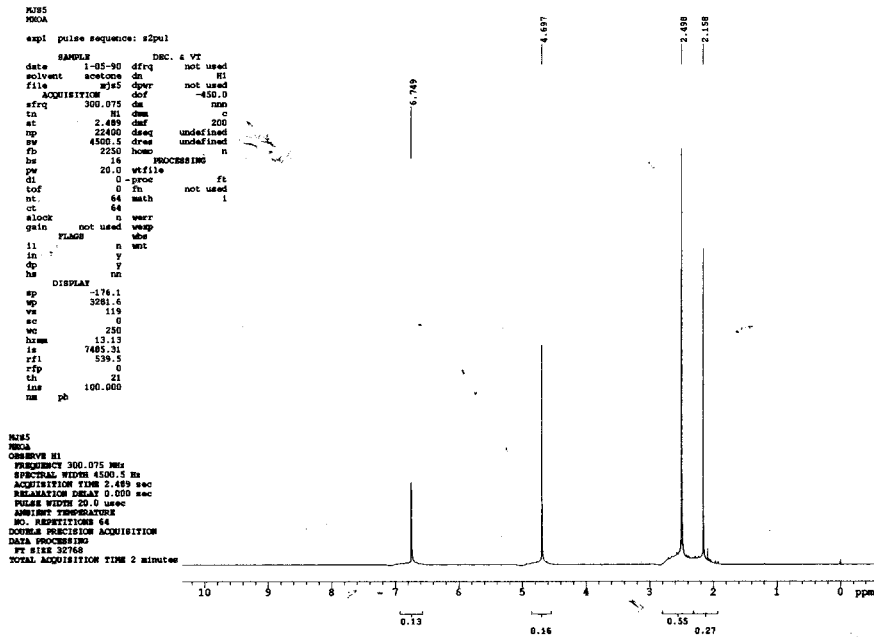
Ácido 6-[[1-(feniloxi)carbonil]amino]hexanoico (PNH).



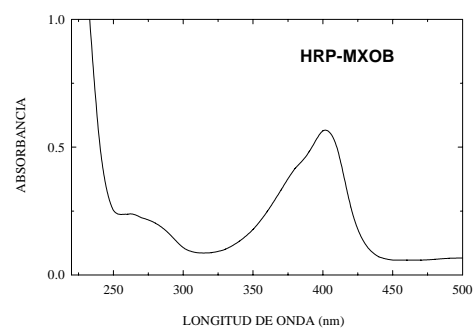
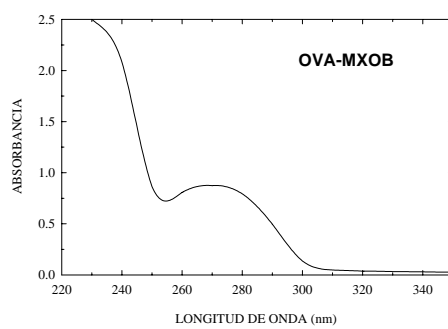
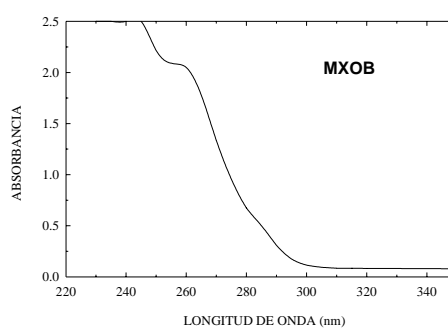
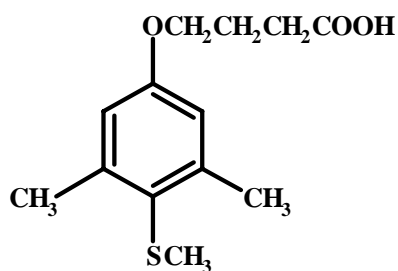


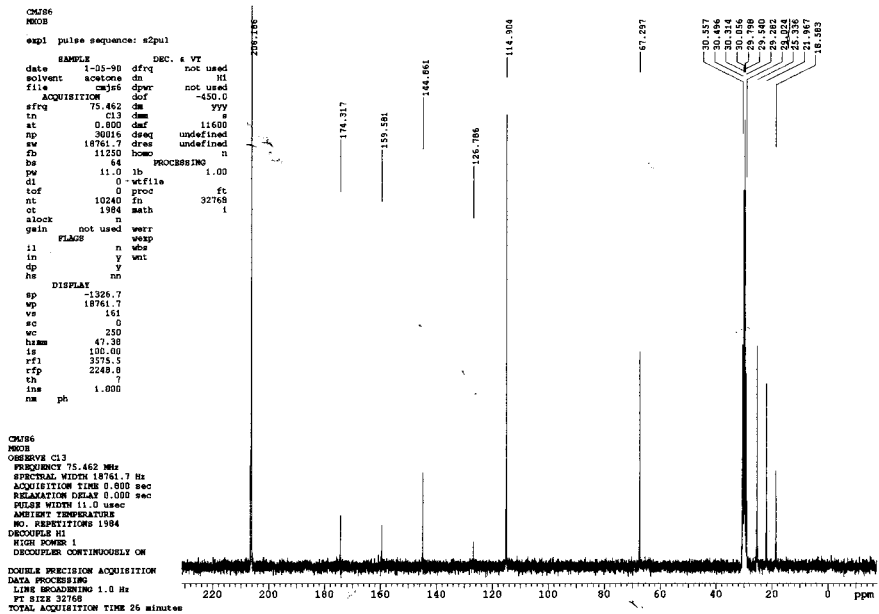
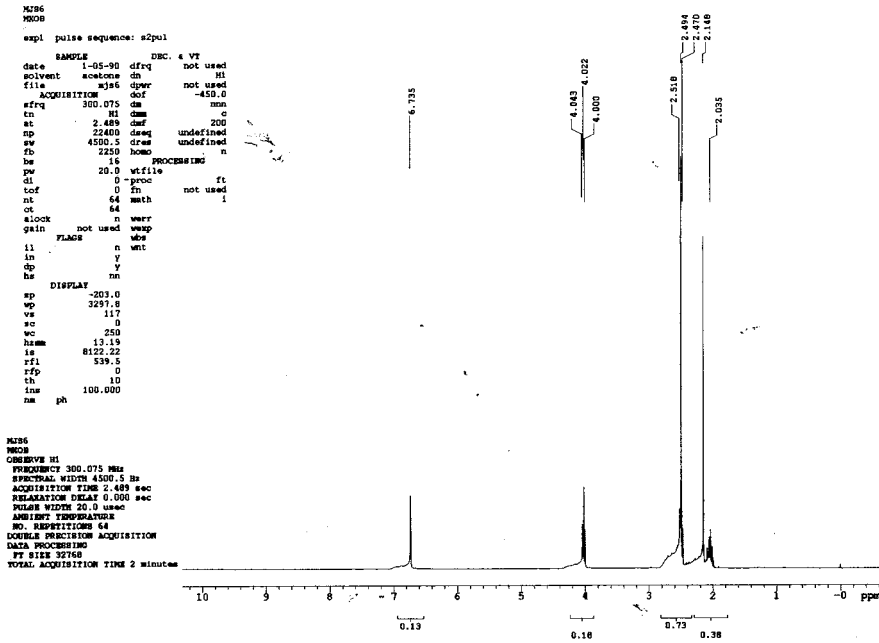
Ácido 2-[1-(4-metiltio)-3,5-xililoxi]acético (MXOA).



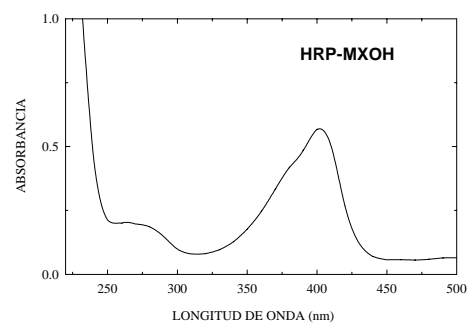
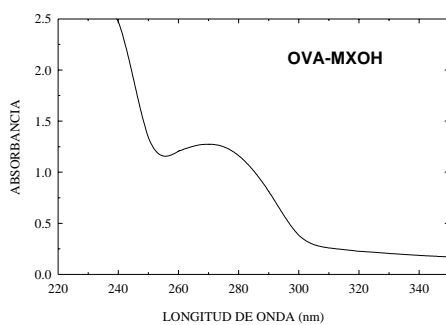
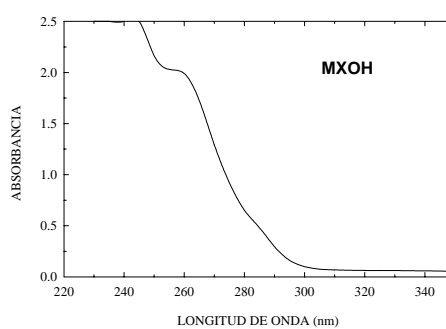
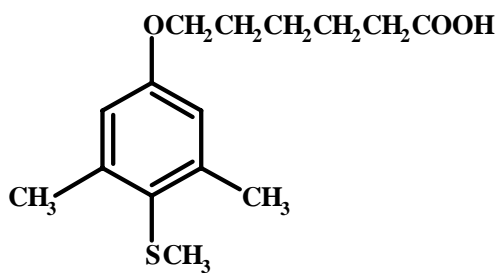


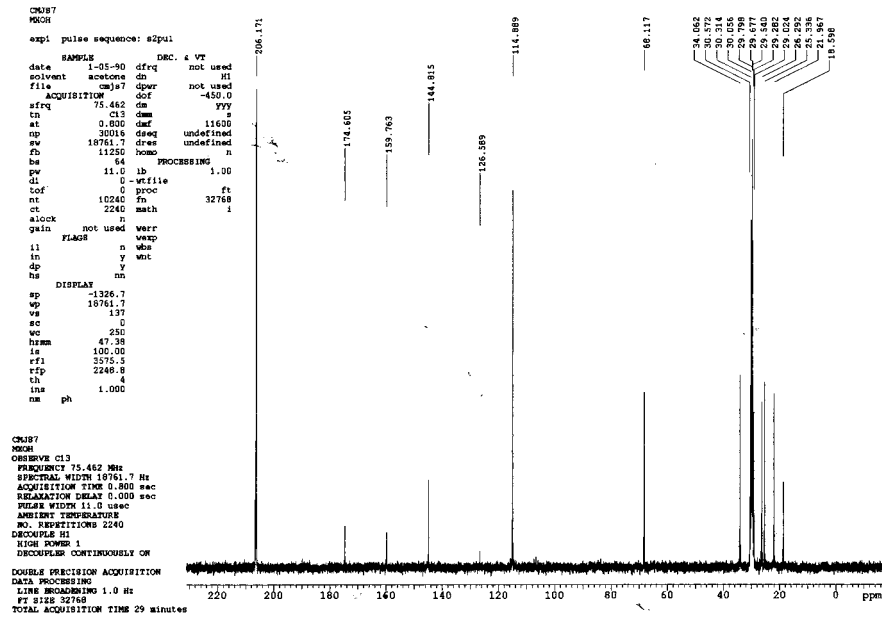
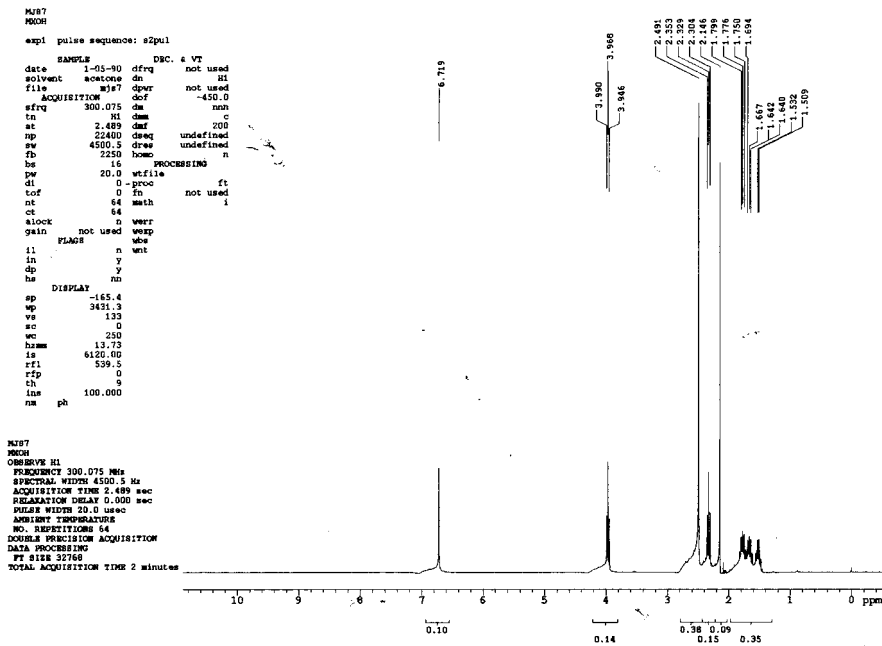
Ácido 4-[1-(4-metiltio)-3,5-xililoxi]butanoico (MXOB).





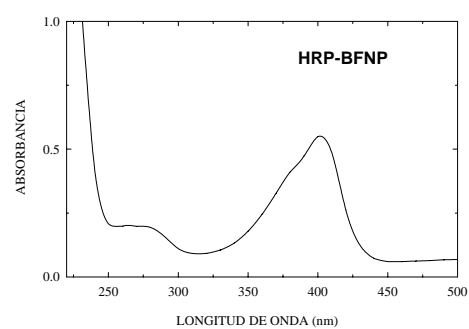
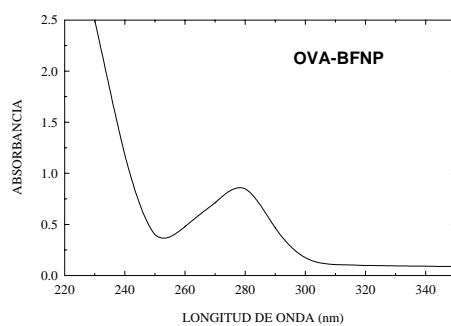
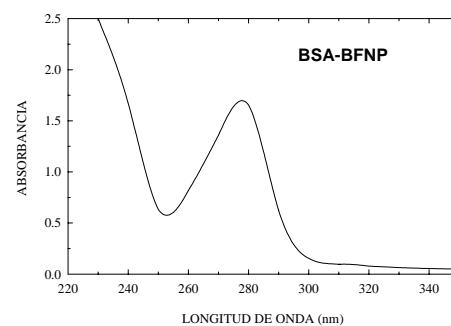
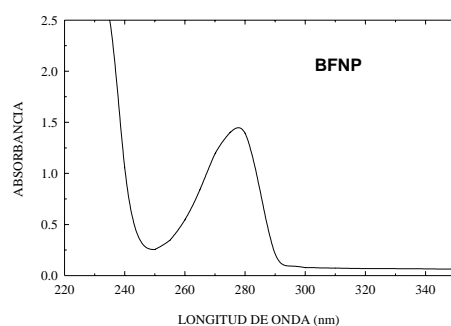
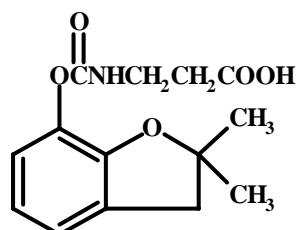
Ácido 6-[1-(4-metiltio)-3,5-xililoxi]hexanoico (MXOH).

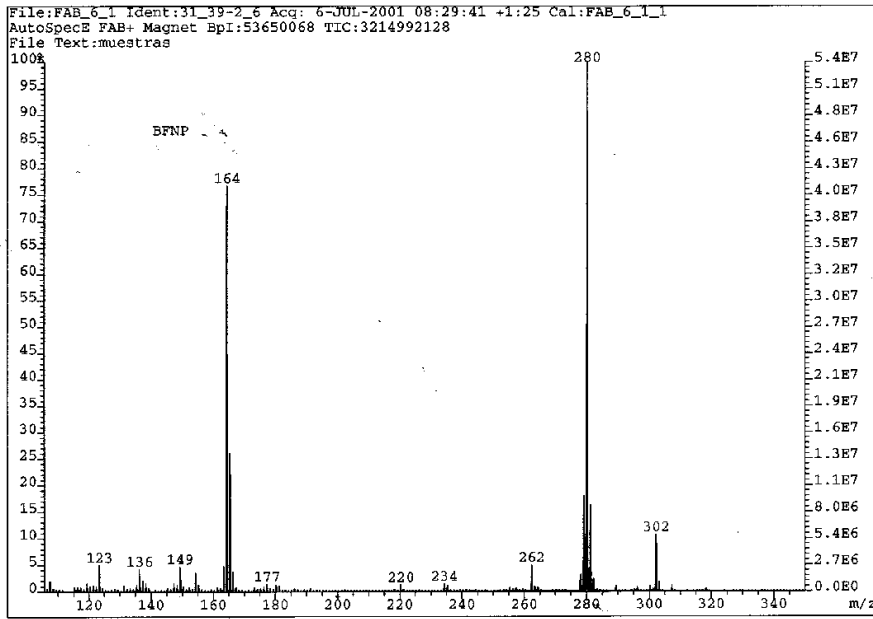




2. ESPECTROS DE LOS HAPTENOS Y DE LOS CONJUGADOS HAPTÉNICOS DEL CARBOFURAN.

Ácido 3-[[[(2,3-Dihidro-2,2-dimetil-7benzofuraniloxi)carbonil]amino]propanoico (BFNP).

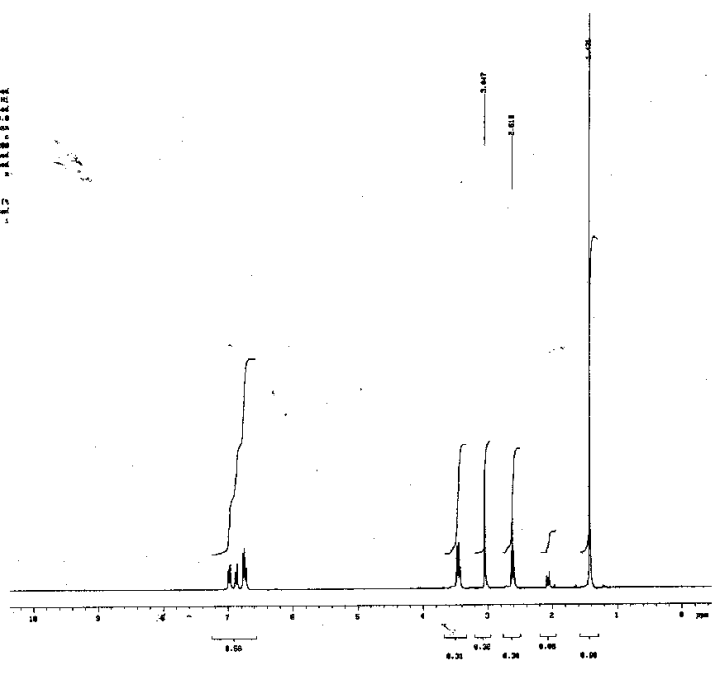


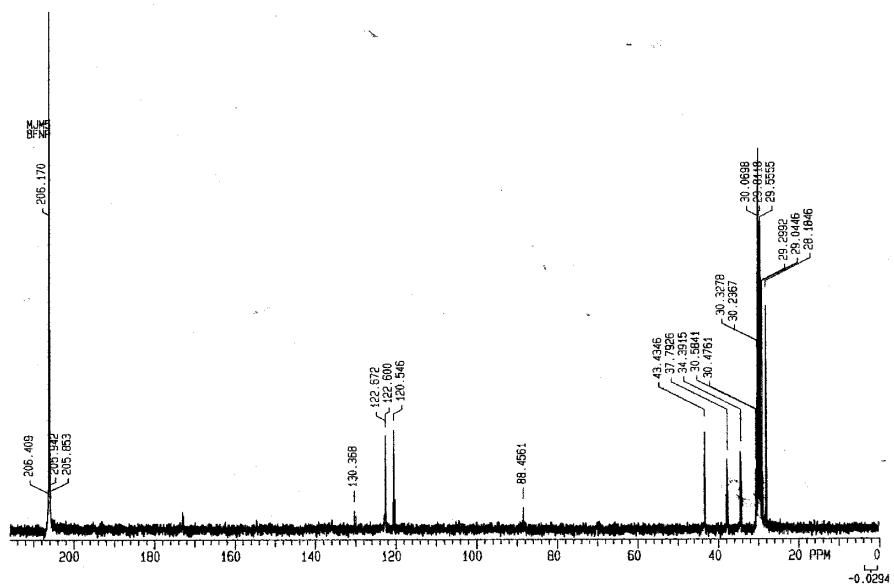


```

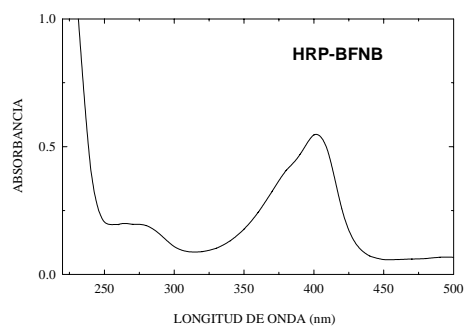
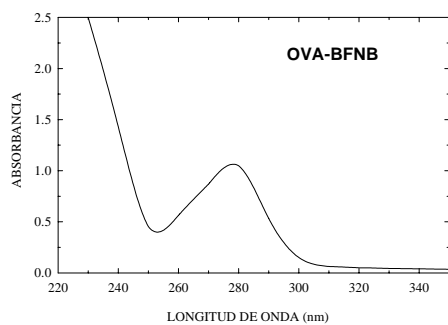
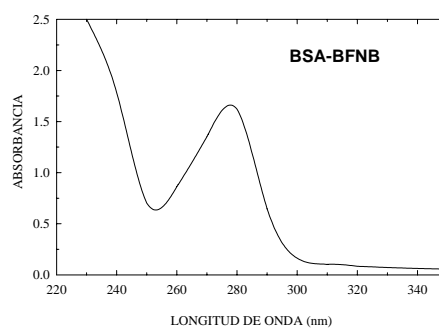
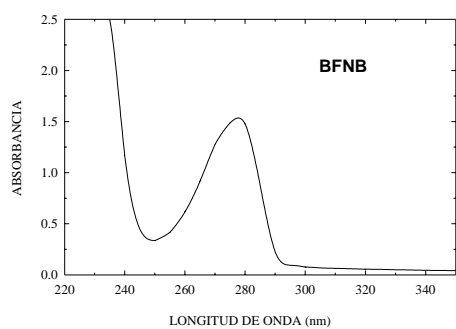
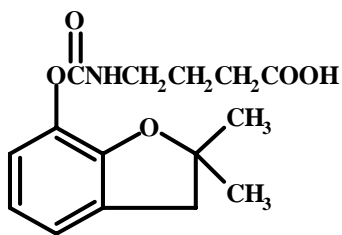
NOTE
SFR
----
exp1 pulse sequence: s2pul
SAMPLER
Date 5-03-98 dfrq not used
delvmt modhmo de not used
File name8 dpar not used
ACQUISITION det -100.0
sfra 200.000 de not
lu 10 de not
sl 2.400 det 200
sp 80000 de04 uncalibred
sw 4000.0 de04 uncalibred
z0 80000 de04 x
de 10 PROCESSING
pr 10.0 -10000
sl 0 2000
tbl 0 10 not used
at 04 makh
ct 04
alch 0 very
pfr not used
FLAG
cl 0 vnt
la 0
dp 0
hs 0
SIMPLAR
sp -124.0
wp 2042.4
vc 100
vc 0
vc 0
kame 10.07
lp 8000.00
rfl 320.0
rfd 0
rl 1.0
lra 100.000
sr pA
NOTE
SFR
REVERSE IS
FREQUENCY 200.000 Hz
RESOLUTION 4000.0 Hz
ACQUISITION TIME 0.000 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 10.0 nsec
ANNEAL TEMPERATURE
NO. REPEATITIONS 64
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 0 minutes

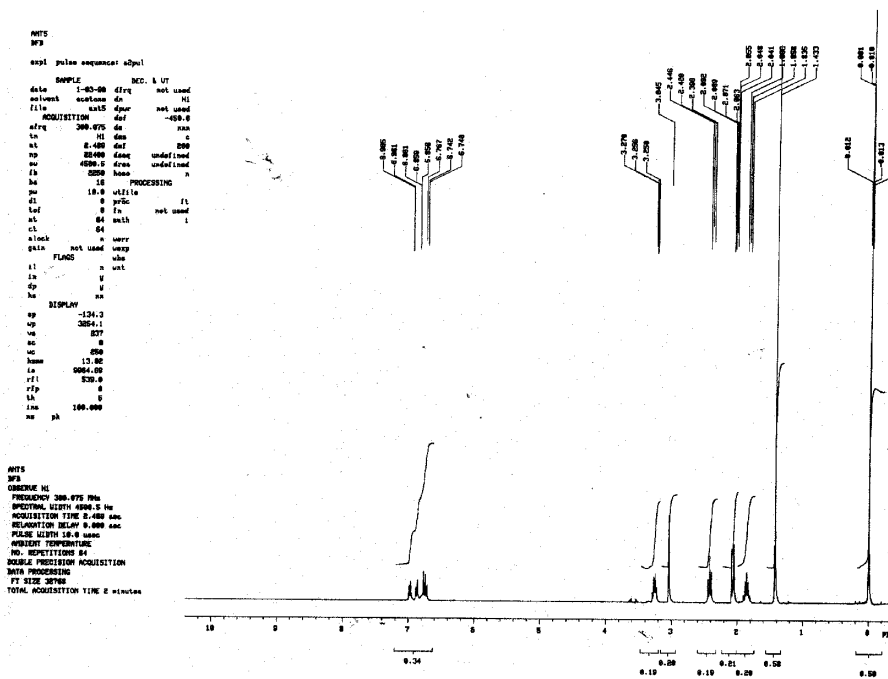
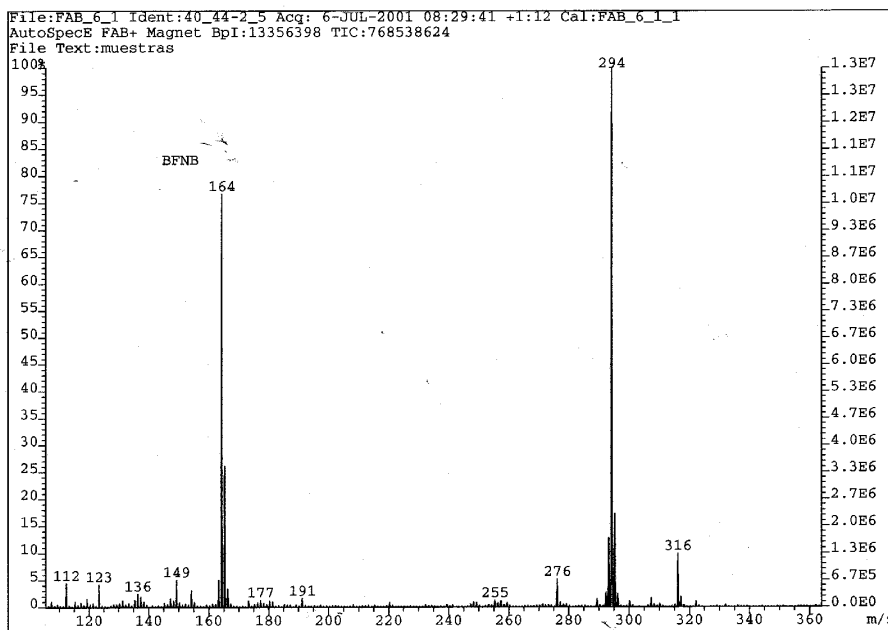
```

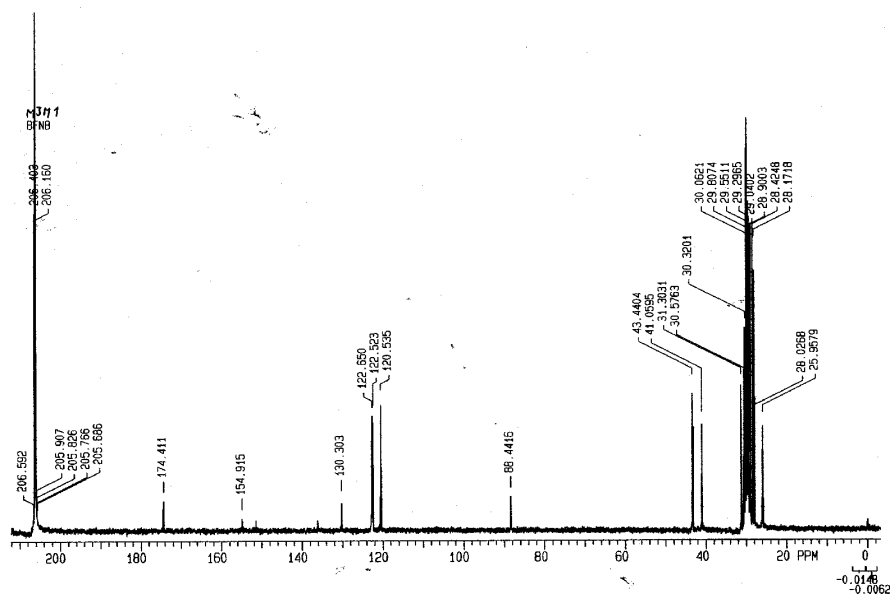




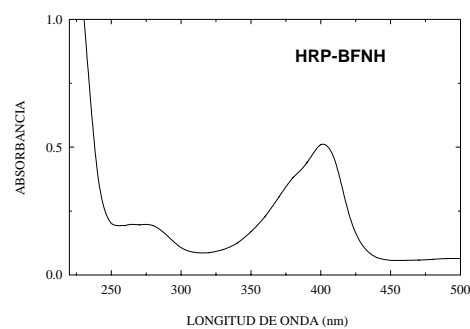
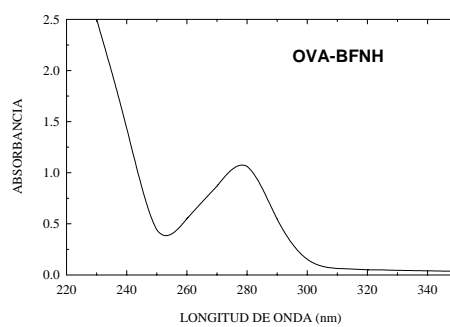
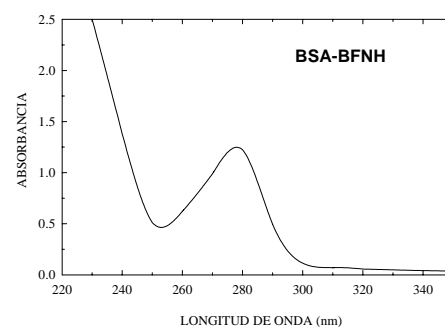
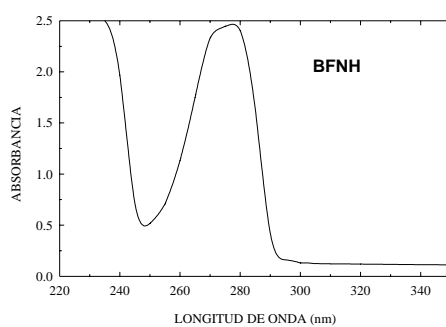
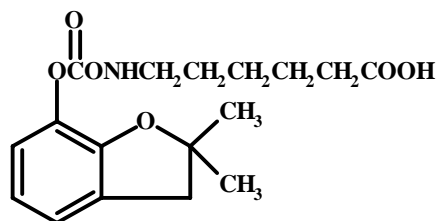
Ácido 4-[[[(2,3-Dihidro-2,2-dimetil-7benzofuraniloxi)carbonil]-amino]butanoico (BFNB).

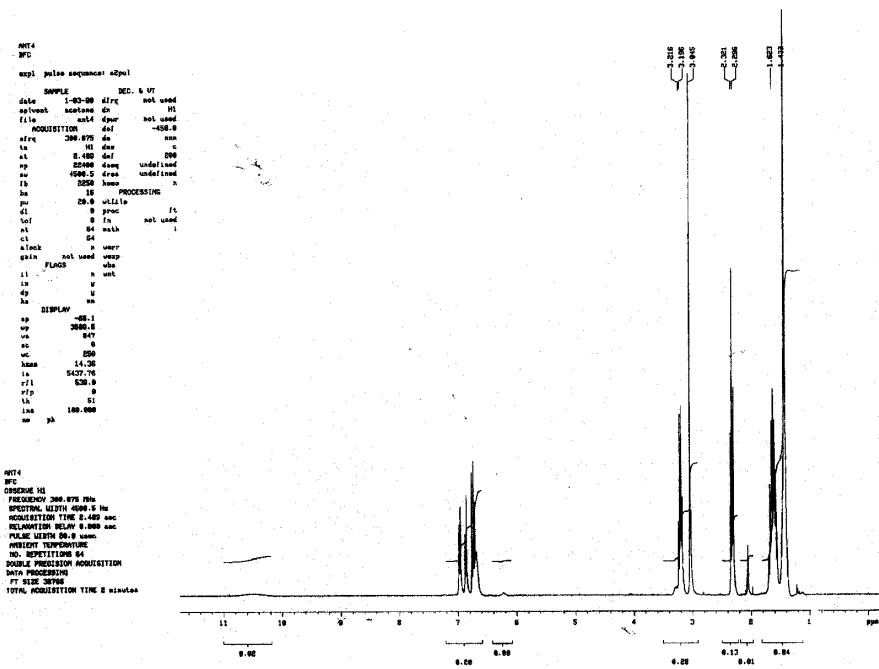
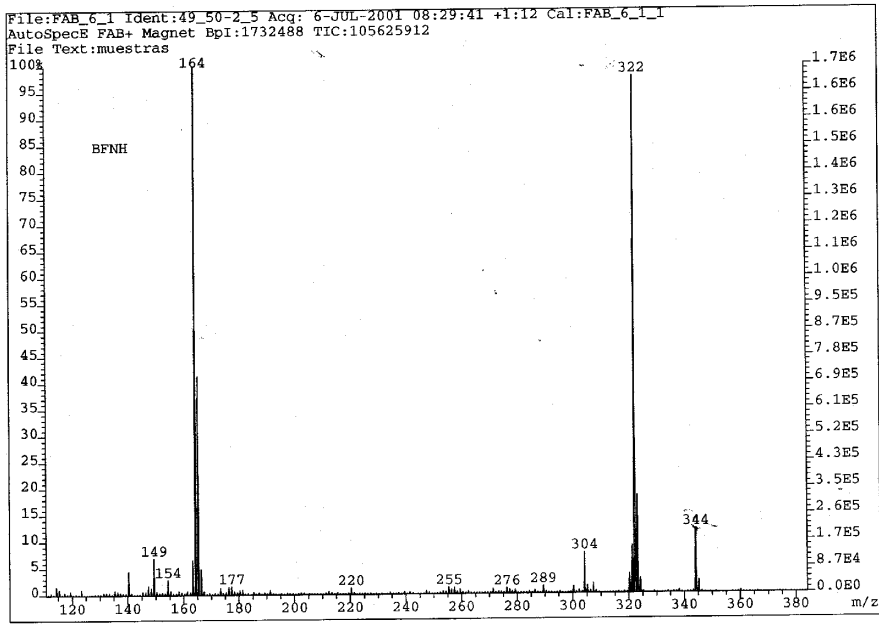




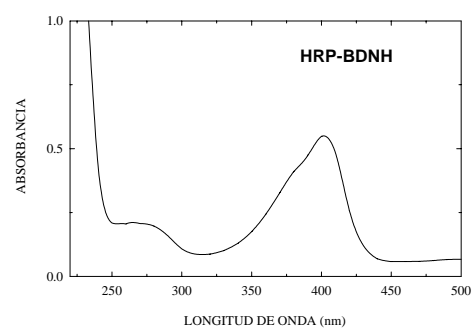
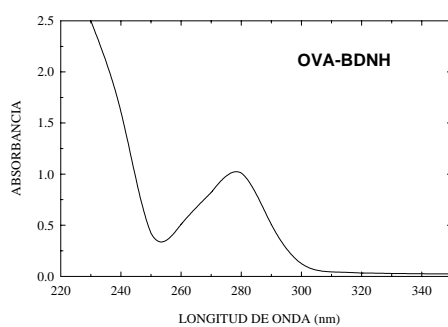
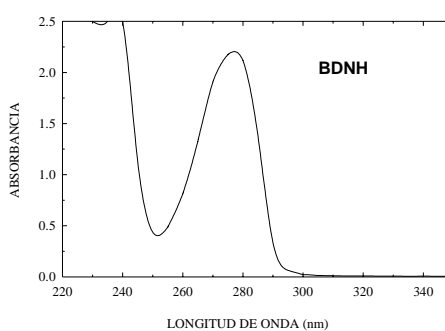
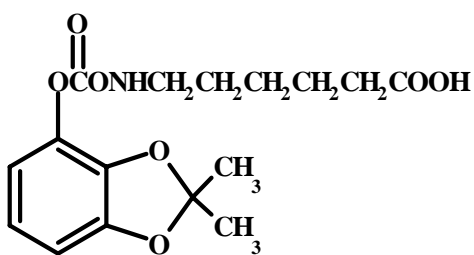


Ácido 6-[[2,3-Dihidro-2,2-dimetil-7benzofuraniloxi)carbonil]-amino]hexanoico (BFNH).



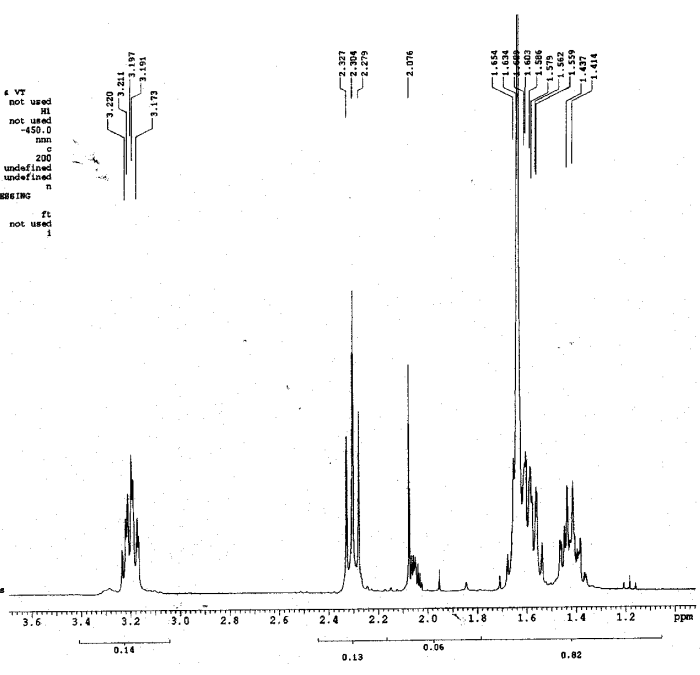


Ácido 6-[[[(2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-oxi)carbonil]-amino]hexanoico (BDNH).



```

M1822
NAME
expl pulse sequence: #2pul
SAMPLE DRC: # VT
date 1-06-90 dfrq not used
solvent acetone d1 HI
file #1#22 dpr not used
ACQUISITION dof -450.0
frq 300.075 da nm
ln HI dm c
at 2.489 daf 200
np 22400 dseq undefined
sw 4500.5 dres undefined
fb 2250 homo n
bs 16 - PROCESSING n
pw 20.0 wfile ft
d1 0 proc ft
tof 0 fn not used
nt 64 math i
ct 64
slock n werr
gain not used wexp
FLAG n vws
il n wnt
in y
op y
hs DISPLAY nn
sp 274.9
sv 833.2
vs 865
sc 0
wc 200
hsm 4.17
is 6375.89
rfi 1355.9
rfp 612.2
th 21
ins 100.000
nm odc ph
    
```

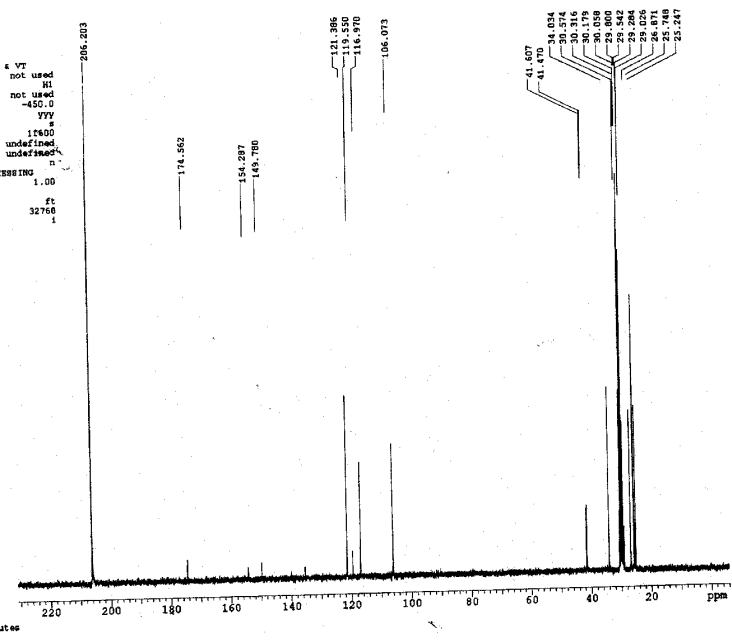


```

M1822
NAME
OBSERVE H1
FREQUENCY 300.075 MHz
SPECTRAL WIDTH 4500.5 Hz
ACQUISITION TIME 2.489 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 20.0 usec
AMPLITUDE TEMPERATURE
NO. REPEATITIONS 64
DOUBLE PULSION ACQUISITION
DATA PROCESSING
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 2 minutes
    
```

```

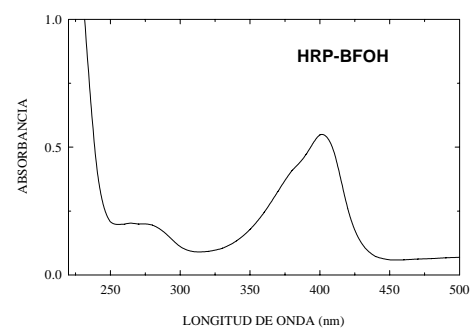
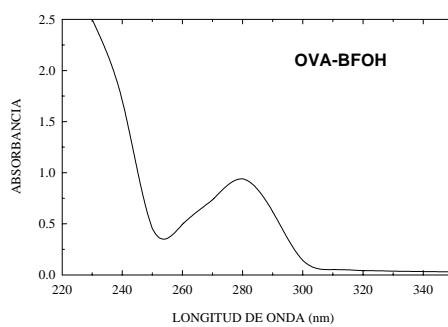
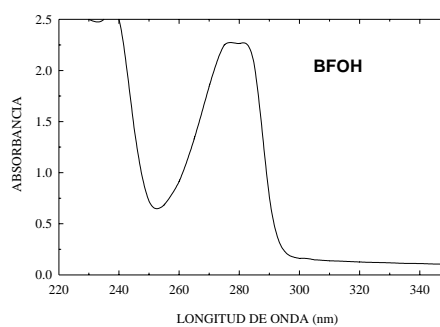
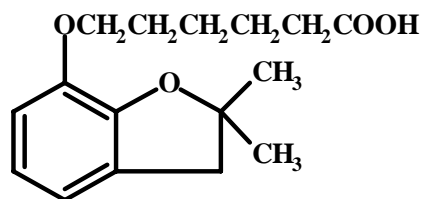
CM1822
NAME
expl pulse sequence: #2pul
SAMPLE DRC: # VT
date 1-06-90 dfrq not used
solvent acetone d1 HI
file #1#22 dpr not used
ACQUISITION dof -450.0
frq 75.462 da VVY
ln C13 dm s
at 0.800 daf 17600
np 30016 dseq undefined
sw 18761.7 dres undefined
fb 11250 homo n
bs 64 lb PROCESSING 1.00
pw 11.0 wfile ft
d1 0 proc ft
tof 2048 fn 32768
nt 2048 math i
ct 2048
slock n werr
gain not used wexp
FLAG n vws
il n wnt
in y
op y
hs DISPLAY nn
sp -458.5
sv 17892.5
vs 140
sc 0
wc 250
hsm 71.57
is 100.00
rfi 3375.3
rfp 2248.8
th 3
ins 1.000
nm odc ph
    
```

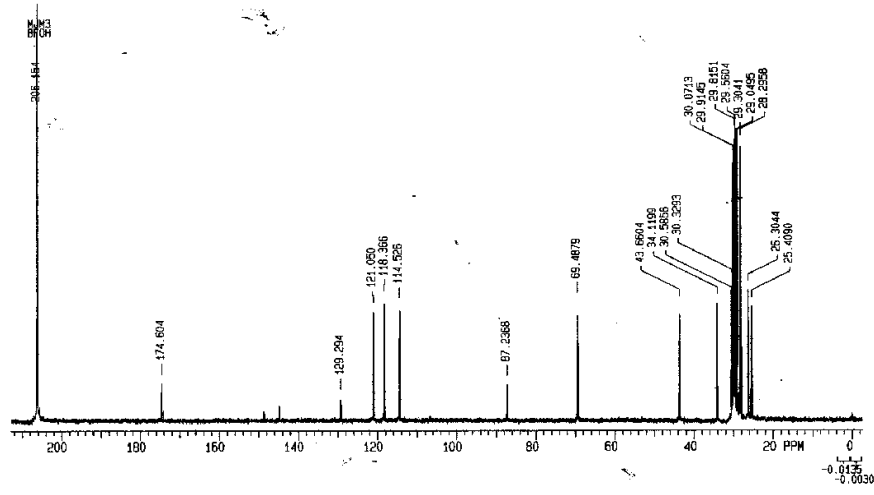
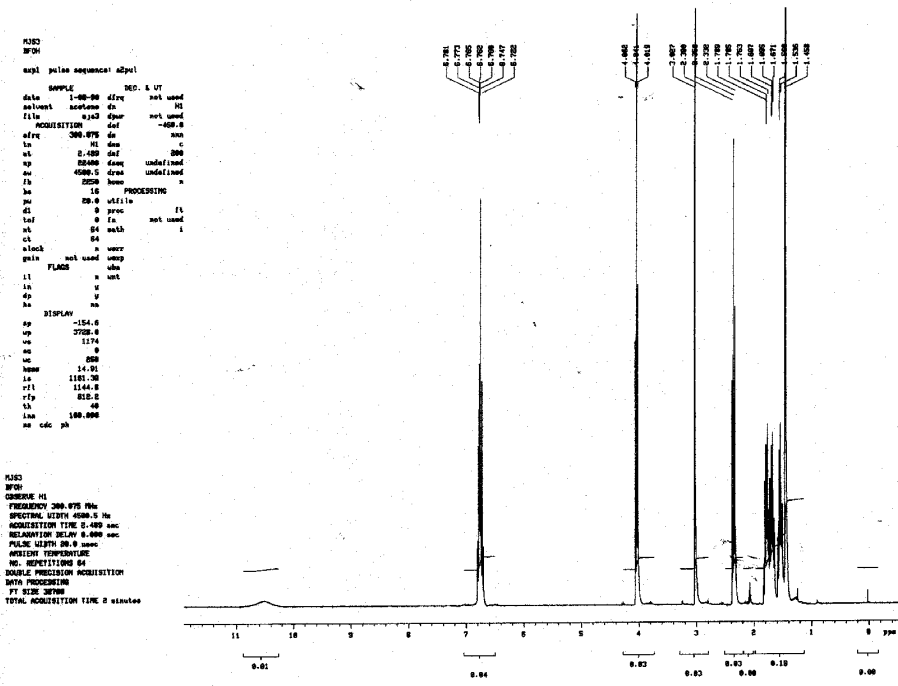


```

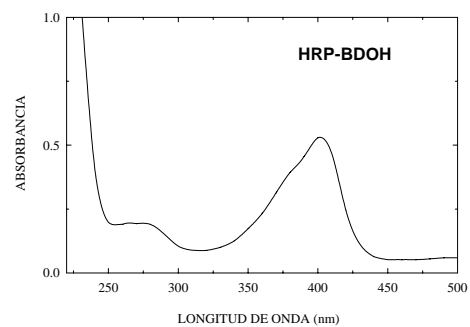
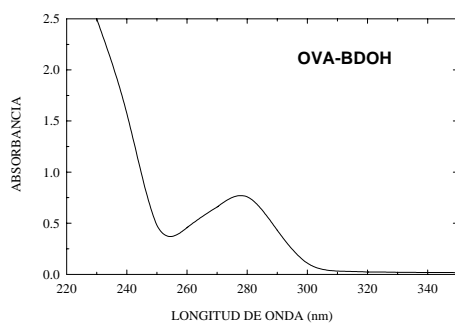
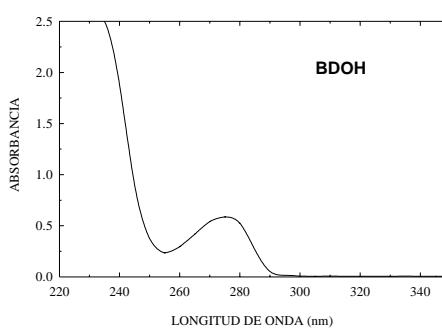
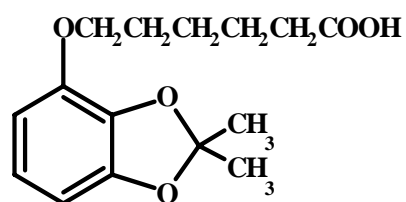
CM1822
NAME
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.462 MHz
SPECTRAL WIDTH 18761.7 Hz
ACQUISITION TIME 0.800 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 11.0 usec
AMPLITUDE TEMPERATURE
NO. REPEATITIONS 2048
DECOUPLE H1
HIGH POWER 1
DECOUPLE CONTINUOUSLY ON
DOUBLE PULSION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 1.0 Hz
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 27 minutes
    
```

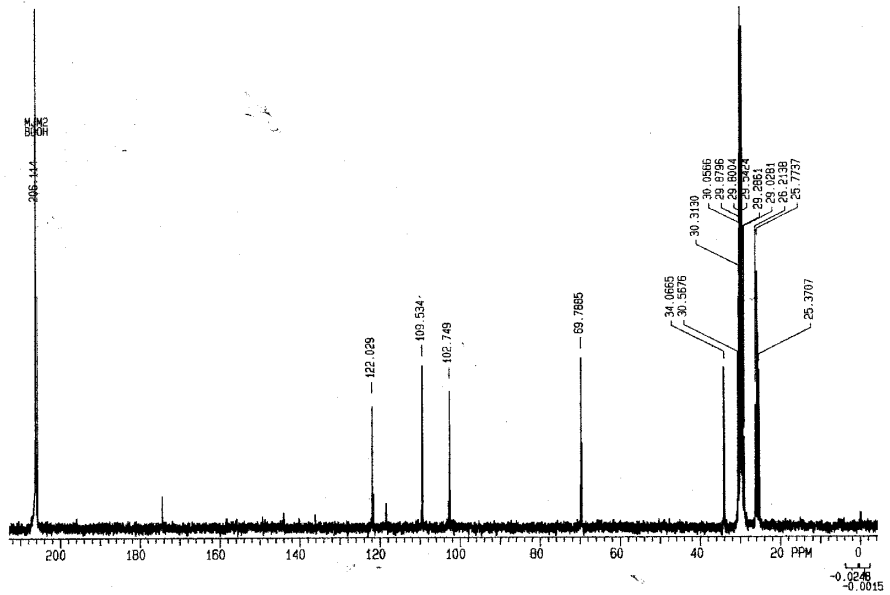
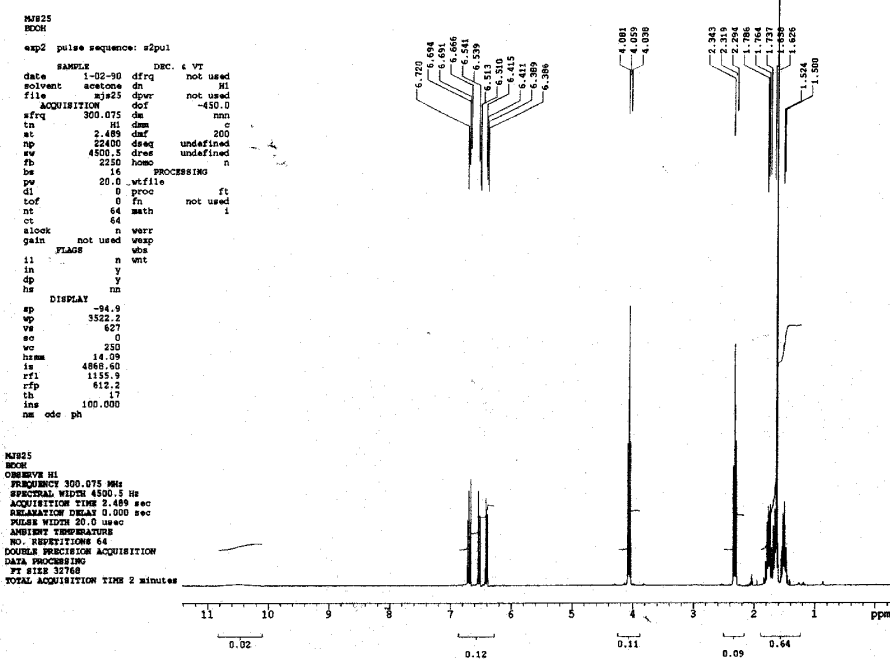

Ácido 6-(2,3-dihidro-2,2-dimetil-7benzofuraniloxi)hexanoico (BFOH).





Ácido 6-(2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-oxi)hexanoico (BDOH).





APÉNDICE II.

PUBLICACIONES Y DESARROLLOS DERIVADOS DE LA TESIS.

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos durante estos años de trabajo han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Abad, A.; MORENO, M.J.; Montoya, A. Development of a Monoclonal Immunoassay for Carbofuran and its Application to the Analysis of Fruit Juices. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 103-110.

Abad, A.; MORENO, M.J.; Montoya, A. Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to the *N*-methylcarbamate Pesticide Methiocarb. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2417-2426.

Abad, A.; MORENO, M.J.; Montoya, A. Development of Monoclonal-Antibody Based Immunoassays to the *N*-Methylcarbamate Pesticide Carbofuran. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2475-2485.

Abad, A.; MORENO, M.J.; Pelegrí, R.; Martínez, M.I.; Sáez, A.; Gamón M.; Montoya, A. Determination of Carbaryl, Carbofuran and Methiocarb in Cucumbers and Strawberries by Monoclonal Enzyme Immunoassays and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. An Analytical Comparison. *J. Chromatogr. A* **1999**, *833*, 3-12.

Abad, A.; MORENO, M.J.; Pelegrí, R.; Martínez, M.I.; Sáez, A.; Gamón M.; Montoya, A. Monoclonal Enzyme Immunoassay for the Analysis of Carbaryl in Fruits and Vegetables without Sample Cleanup. *J. Agr. Food Chem.* **2001**, *49*, 1707-1712.

Montoya, A.; Abad, A.; Manclús, J.J.; MORENO, M.J.; Gamón, M.; Sáez, A.; Pelegrí, R.; Martínez, M.I. Aplicación de Inmunoensayos Monoclonales, Individuales y Multianalito, al análisis de plaguicidas en frutas y hortalizas. *Phytoma* **2001**, *129*, 21-24.

MORENO, M.J.; Abad, A.; Pelegrí, R.; Martínez, M.I.; Sáez, A.; Gamón M.; Montoya, A. Validation of a monoclonal Enzyme Immunoassay for the Determination of Carbofuran in Fruits and Vegetables. *J. Agr. Food Chem.* **2001**, *49*, 1713-1719.

MORENO, M.J.; Abad, A.; Montoya, A. Application of two Enzyme Immunosorbent Assays to the Determination of Methiocarb in Fruit Juices and Water Samples. (En preparación)

MORENO, M.J.; Abad, A; Pelegrí, R.; Martínez, M.I.; Sáez, A.; Gamón M.; Montoya, A. Development of two Enzyme Assay for the Insecticide Methiocarb and Application to the Analysis in Fruits and Vegetables without Sample Cleanup. (En preparación)

DESARROLLOS

Merece la pena destacar que partiendo de los ELISAs individuales de carbaryl, carbofuran y methiocarb, y del ELISA multirresiduo, se han desarrollado en este laboratorio kits de ELISA rápidos, sencillos y fáciles de manejar por personal mínimamente entrenado, que permiten la determinación individual o simultánea de estos plaguicidas. Estos kits están disponibles a través del Laboratorio Integrado de Bioingeniería y del CTT (Centro de Transferencia de Tecnología) de la UPV.