

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***ESTUDIO DE INMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DEL INSECTICIDA SPIROTETRAMAT EN ALIMENTOS***

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

AUTOR: CHRISTIAN FERNÁNDEZ GONZÁLEZ

TUTORA: ISABEL HERNANDO HERNANDO

COTUTOR: JOSEP VICENT MERCADER BADIA

Curso académico: 2018/2019

VALENCIA, JULIO 2019





## **Estudio de inmunoensayos para la determinación de residuos del insecticida spirotetramat en alimentos**

**Autor:** Christian Fernández González

**Tutora:** Isabel Hernando Hernando

**Cotutor:** Josep Vicent Mercader Badia

Valencia, Julio 2019

### **RESUMEN:**

Hoy en día los plaguicidas están muy presentes en los alimentos, ya que se utilizan para proteger a las plantas y animales de cualquier tipo de plaga y su presencia constituye una fuente de contaminación para los seres humanos, por lo que se establecen límites máximos de residuos de estos plaguicidas para cada alimento. El objetivo de este trabajo es el estudio de la influencia de distintos factores fisicoquímicos sobre una serie de inmunoensayos desarrollados para la determinación de los residuos del insecticida spirotetramat en alimentos. Debido a que este insecticida se hidroliza a spirotetramat-enol tras la absorción por la planta, y que se ha establecido un único límite máximo de residuos con la suma de ambos residuos, en este trabajo se estudiará tanto spirotetramat como su metabolito. En concreto se ha evaluado la influencia del pH, la fuerza iónica, el disolvente etanol, y dos matrices alimentarias (vino blanco y vino tinto) sobre los principales parámetros analíticos de cinco inmunoensayos distintos, utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales. Los resultados obtenidos demuestran que los anticuerpos monoclonales funcionan mejor en las condiciones de ensayo que los policlonales, y se observó que el formato indirecto fue el más estable de todos, manteniendo la señal máxima ( $A_{max}$ ) y sensibilidad del ensayo ( $IC_{50}$ ) alrededor del valor de referencia en la mayoría de los estudios. De manera general se observó que el pH no influye significativamente en la detección de los analitos. En cuanto al estudio de fuerza iónica, se observa un aumento de  $A_{max}$  y de la  $IC_{50}$  a fuerzas iónicas altas para el formato directo y el directo de captura, y una bajada de ambas al disminuir la fuerza iónica. En los formatos indirectos ocurre el efecto contrario. El estudio del disolvente etanol muestra que concentraciones altas producen una bajada de señal, siendo esta pérdida más destacable para el formato directo y captura, y por el contrario la  $IC_{50}$  aumenta considerablemente cuanto más etanol hay en el ensayo. Tras el estudio del efecto matriz, se observa que el vino blanco no influye demasiado en la señal, mientras que el vino tinto afecta en gran medida, disminuyendo la  $A_{max}$  cuanto más matriz hay en el ensayo. En cambio, la  $IC_{50}$  en este estudio se mantiene bastante estable en todos los formatos. Los tres inmunoensayos con anticuerpos monoclonales son buenos candidatos para su aplicación al análisis de residuos de spirotetramat en alimentos, particularmente el ensayo con anticuerpo de captura y el indirecto.

**Palabras clave:** Plaguicida, insecticida, spirotetramat, spirotetramat-enol, límite máximo de residuos, anticuerpos monoclonales, policlonales, inmunoensayos, ELISA competitivo, vino.

## **Estudi d'immunoassaigs per a la determinació de residus de l'insecticida spirotetramat en aliments**

**Autor:** Christian Fernández González

**Tutora:** Isabel Hernando Hernando

**Cotutor:** Josep Vicent Mercader Badia

València, Juliol 2019

### **RESUM:**

Hui dia els plaguicides estan molt presents en els aliments, ja que s'utilitzen per a protegir a les plantes i animals de qualsevol tipus de plaga i la seua presència constitueix una font de contaminació per als éssers humans, per la qual cosa s'estableixen límits màxims de residus d'aquests plaguicides per a cada aliment. L'objectiu d'aquest treball és l'estudi de la influència de diferents factors fisicoquímics sobre una sèrie d'immunoassajos desenvolupats per a la determinació dels residus de l'insecticida spirotetramat en aliments. Pel fet que aquest insecticida s'hidrolitza a spirotetramat-enol després de l'absorció per la planta, i que s'ha establert un únic límit màxim de residus amb la suma de tots dos residus, en aquest treball s'estudiarà tant spirotetramat com el seu metabòlit. En concret s'ha avaluat la influència del pH, la força iònica, el dissolvent etanol, i dues matrius alimentàries (vi blanc i vi negre) sobre els principals paràmetres analítics de cinc immunoassajos diferents, utilitzant anticossos monoclonals i policlonals. Els resultats obtinguts demostren que els anticossos monoclonals funcionen millor en les condicions d'assaig que els policlonals, i es va observar que el format indirecte va ser el més estable de tots, mantenint el senyal màxim ( $A_{max}$ ) i sensibilitat de l'assaig ( $IC_{50}$ ) al voltant del valor de referència en la majoria dels estudis. De manera general es va observar que el pH no influeix significativament en la detecció dels anàlisis. Quant a l'estudi de força iònica, s'observa un augment de  $A_{max}$  i de la  $IC_{50}$  a forces iòniques altes per al format directe i el directe de captura, i una baixada de totes dues en disminuir la força iònica. En els formats indirectes ocorre l'efecte contrari. L'estudi del dissolvent etanol mostra que concentracions altes produeixen una baixada de senyal, sent aquesta pèrdua més destacable per al format directe i captura, i per contra la  $IC_{50}$  augmenta considerablement com més etanol hi ha en l'assaig. Després de l'estudi de l'efecte matriu, s'observa que el vi blanc no influeix massa en el senyal, mentre que el vi negre afecta en gran manera, disminuint la  $A_{max}$  quanta més matriu hi ha en l'assaig. En canvi, la  $IC_{50}$  en aquest estudi es manté prou estable en tots els formats. Els tres immunoassajos amb anticossos monoclonals són bons candidats per a la seua aplicació a l'anàlisi de residus de spirotetramat en aliments, particularment l'assaig amb anticòs de captura i l'indirecte.

**Paraules clau:** Plaguicida, insecticida, spirotetramat, spirotetramat-enol, límit màxim de residus, anticossos monoclonals, policlonals, immunoassajos, ELISA competitiu, vi.

## **Study of immunoassays for the determination of spirotetramat insecticide residues in food**

**Author:** Christian Fernández González

**Tutor:** Isabel Hernando Hernando

**Cotutor:** Josep Vicent Mercader Badia

Valencia, July 2019

### **ABSTRACT:**

Nowadays, pesticides are really present in food, as they are used to protect plants and animals from any type of pest. Their presence constitutes a source of contamination for human beings, so that maximum residue limits of these pesticides on food are established. The aim of this project is to study the influence of different physicochemical factors on a series of immunoassays carried out in order to determine the residues of the spirotetramat insecticide in food. Due to the fact that this insecticide is hydrolyzed to spirotetramat-enol after the plant's absorption, and that a single maximum residue limit has been established with the sum of both residues, both spirotetramat and its metabolite will be studied in this investigation. Specifically, the influence of pH, ionic strength, ethanol solvent, and two food matrices (white wine and red wine) on the main analytical parameters of five different immunoassays will be considered, using monoclonal and polyclonal antibodies. The results show that, under the parameters of this study, monoclonal antibodies work better under test conditions than polyclonal antibodies. It has also been observed that the indirect format was the most stable of all, maintaining the maximum signal ( $A_{max}$ ) and sensitivity of the assay ( $IC_{50}$ ) around the reference value in most studies. In general, it was observed that pH does not significantly influence the detection of analytes. As for the ionic strength study, an increase of  $A_{max}$  and  $IC_{50}$  up to high ionic forces is observed for the direct and direct capture format; and a decrease of both when the ionic strength decreases. In indirect formats occurs the opposite effect. The study of the ethanol solvent shows that high concentrations of it reduce its signal. This loss of signal is more remarkable for the direct format and capture. On the contrary, the  $IC_{50}$  increases considerably as more ethanol is in the assay. After studying the matrix effect, it is observed that white wine does not influence the signal that much, whereas red wine affects it to a great extent, decreasing the  $A_{max}$  as more matrix there is in the assay. In contrast, in this study, the  $IC_{50}$  remains quite stable in all formats. The three monoclonal antibody immunoassays are good candidates for their application to the analysis of spirotetramat residues in food, particularly the capture antibody assay and the indirect antibody assay.

**Keywords:** Pesticide, insecticide, spirotetramat, spirotetramat-enol, maximum residue limit, monoclonal antibodies, polyclonals, immunoassays, competitive ELISA, wine.

## Agradecimientos

Aprovecho este espacio para agradecer a todas las personas que han hecho posible la realización de este proyecto de final de grado, y que me han acompañado en este viaje para completar mis estudios en el grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

En primer lugar, quiero dar las gracias a Isabel por ofrecerme la posibilidad de realizar el TFG en el IATA. Isabel me ha acogido desde el primer momento, con su visión moderna del mundo me ha sabido aconsejar, y me ha tranquilizado en todos los momentos en los que he ido a contarle mis preocupaciones. Ojalá durante mi vida llegue a viajar tanto como tú, ya que en cada llamada que te hacía para consultarte algo, acababas diciendo que mañana te ibas a Colombia, o México, aunque fuera por trabajo. También te doy las gracias por ponerme en contacto con Josep dejándome en tan buenas manos.

A Josep, mi tutor del IATA, por ser el punto de partida para cada estudio, cada ensayo y cada formato, por apoyarme día tras día y revisar conmigo cada resultado y cada cálculo. Gracias por tener tanta paciencia conmigo y explicarme los cálculos desde distintas perspectivas, por ayudarme a conseguir completar el TFG, porque has confiado en mí y en mi capacidad para conseguirlo. Gracias por esa profesionalidad que te caracteriza, y por todas y cada una de tus correcciones, porque me han ayudado a perfeccionar este proyecto.

Por supuesto, muchas gracias a Ramón, futuro Doctor y mi mano derecha en el laboratorio, por estar a mi lado en cada momento y asegurarme cada paso que daba, por cederme siempre la pipeta multicanal y por contarme curiosidades de su tierra y culturizarme con palabras y frases hechas ecuatorianas. Muchísimas gracias por ir a tapizar las placas los domingos, para poder tener un día más para hacer réplicas, ya que me vino muy bien para avanzar.

Cómo no, muchas gracias a Hadyn, Daniel, Paula, Simone y Teresa, por haberme dado la oportunidad de formar parte del equipo y haberme hecho sentir tan a gusto. Especialmente gracias a Daniel por revisar cálculos conmigo y a Hadyn por dejarme lavar mis placas primero, mientras que yo tenía 2, él tenía 56.

Gracias a mis compañeros de la Uni por pasar junto a mí esta última etapa que es el TFG, y espero que no perdamos el contacto, porque sois un gran apoyo para mí.

Mención de honor a Cecilia, por pasar las noches en vela junto a mí mientras escribía el trabajo, y por acompañarme durante la carrera. <3

Por último, gracias a mis padres y mi hermano por apoyarme siempre y por acompañarme en este largo camino que es la vida. Sin vosotros no hubiera logrado acabar todos los años de estudios, empezando en la guardería El Molí, Primaria, Secundaria y la ESO en La Salle “de arriba”, Bachillerato en La Salle “de abajo”, Ciencia y Tecnología de los Alimentos en la UPV, prácticas en JECMA, el TFG en el IATA y hasta hoy. GRACIAS POR TODO.

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	5
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
3.1	Instrumentos utilizados .....	6
3.2	Reactivos utilizados.....	7
3.3	Tampones .....	7
3.4	Procedimientos .....	7
3.5	Inmunoensayos estudiados.....	9
3.6	Procesamiento de datos .....	10
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	11
4.1	Estudio de la influencia del pH.....	11
4.2	Estudio de la fuerza iónica .....	14
4.3	Estudio de la influencia del disolvente etanol.....	18
4.4	Estudio del efecto matriz de vino blanco y vino tinto .....	21
5.	CONCLUSIONES.....	25
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	26

## Índice de figuras

**Figura 1.** Estructuras químicas de spirotetramat (izquierda) y spirotetramat-enol (derecha).

**Figura 2.** Formatos de ELISA: (a) formato directo o de anticuerpo inmobilizado y (b) formato indirecto o de conjugado inmobilizado (Dankward, 2006).

**Figura 3.** Inmunoensayo competitivo en microplaca de ELISA.

**Figura 4.** Pipeta volumétrica multicanal.

**Figura 5.** Representación de ELISA competitivo en formato directo (izquierda) e indirecto (derecha) (Ceballos, 2017).

**Figura 6.** Ejemplo de curvas de inhibición obtenidas en SoftMax Pro.

**Figura 7.** Efecto del pH en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 8.** Efecto del pH en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 9.** Efecto del pH en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 10.** Efecto del pH en el formato CI homólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 11.** Efecto del pH en el formato CI heterólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 12.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 13.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 14.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 15.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CI heterólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 16.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CI homólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 17.** Efecto del etanol en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 18.** Efecto del etanol en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 19.** Efecto del etanol en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 20.** Efecto del etanol en el formato CI homólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 21.** Efecto del etanol en el formato CI heterólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 22.** Efecto de la matriz vino blanco en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).



**Figura 23.** Efecto de la matriz vino blanco en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 24.** Efecto de la matriz vino blanco en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 25.** Efecto de la matriz vino tinto en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 26.** Efecto de la matriz vino tinto en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

**Figura 27.** Efecto de la matriz vino tinto en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

## Lista de abreviaturas

$A_{max}$ : Absorbancia máxima

CD: Formato competitivo directo

CDC: Formato competitivo directo de captura

CI: Formato competitivo indirecto

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

DMF: *N,N'*-dimetilformamida

EFSA: European Food Safety Authority

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

GAM: Goat anti-mouse

GAR-HRP: Antisero policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo (Goat anti rabbit) marcado con HRP

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HRP: Peroxidasa de rábano picante

$IC_{50}$ : Concentración de analito que reduce la señal al 50%

LC-MS: Liquid chromatography–mass spectrometry

LMR: Límite máximo de residuos

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPD: *o*-Fenilendiamina

OVA: Ovoalbúmina

PBS: Tampón fosfato salino

PBST: Tampón fosfato salino con Tween 20

RAM-HRP: Antisero policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón (Rabbit anti-mouse) marcado con HRP

SBF: Suero bovino fetal

SP: Spirotetramat

SP-enol: Spirotetramat-enol

SP-glc: Spirotetramat-enol glucósido

SP-keto: Spirotetramat cetohidróxido

SP-mono: Spirotetramat monohidróxido

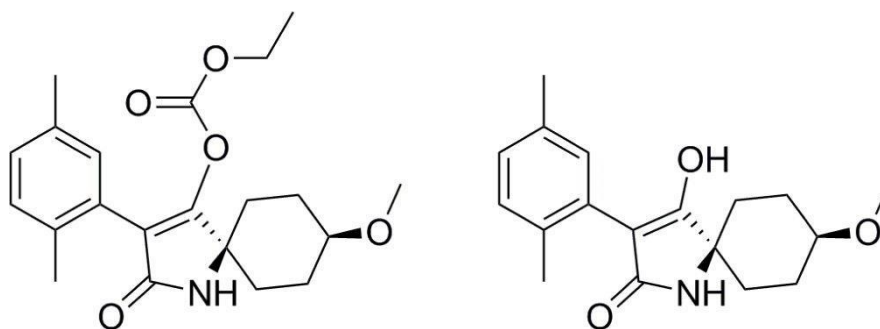
# 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día el uso de plaguicidas en las plantaciones agrícolas está muy normalizado. La gran mayoría de las empresas agroalimentarias optan por utilizar estos compuestos fitosanitarios, que sirven para proteger las plantas y los animales de la acción de insectos, hongos, ácaros o roedores, entre otros, y de todo tipo de forma animal o vegetal que pueda constituir una plaga. El primer plaguicida sintético fue el DDT; Paul Müller fue quien descubrió sus propiedades insecticidas en 1939 (Ferrer, 2003; Ramírez & Lacasaña, 2001; Jáquez Matas, 2013). A partir de ahí, aparecieron otros análogos y se expandió masivamente al resto del mundo. Hay plaguicidas de distintos tipos, y se pueden clasificar en función de su familia química (pueden ser organoclorados, organofosforados, carbamatos, etc.), su acción específica (si son insecticidas, fungicidas, fitorreguladores, herbicidas, etc.), su toxicidad (por ejemplo, según la OMS se clasifican como extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II) o ligeramente peligrosos (III)), o su vida media y su persistencia (pueden ser permanentes si no desaparecen, persistentes si aguantan 20 meses o más, de persistencia moderada entre 1 y 18 meses de vida media, o no persistentes si no permanecen al pasar 12 semanas) (Ramírez & Lacasaña, 2001; del Puerto Rodríguez, Suárez & Palacio, 2014).

El uso de plaguicidas genera mayores rendimientos en los cultivos agrícolas debido a que, efectivamente, se logra prevenir del ataque de plagas, atenuando su efecto en los productos de las cosechas. Pero además su uso tiene consecuencias indeseadas como puede ser su efecto en el medio ambiente, además de observarse altos niveles de contaminación por residuos agroquímicos que acaban llegando al ser humano y asimismo a los alimentos. Los plaguicidas son aplicados mediante diversos métodos en actividades de tipo forestal, cultivos agrícolas, granjas, hábitats acuáticos, vías y carreteras, zonas urbanas y jardines, entre otros. Su extensivo uso hace que el contacto con los plaguicidas por parte de personas y animales sea inevitable (Badii & Landeros, 2017; Edda, Lepori, Mitre & Nassetta, 2017). Toda esta contaminación por residuos de los productos fitosanitarios provoca enfermedades, destrucción de la flora y de la fauna y también de los recursos naturales disponibles (Torres & Capote, 2004).

Spirotetramat (SP) es el nombre común del insecticida cis-4-(etoxicarbonilo)-8-metoxi-3-(2,5-xilil)-1-azaspiro [4.5]-dec-3-en-2-ona. Este es un biocida de nueva generación que fue descubierto como un derivado del antibiótico natural thiolactomicina, y en 2013 fue incluido en el Anexo I de la Regulación (EC) número 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios en el mercado (Cevallos-Cedeño, Agulló, Abad-Somovilla, Abad-Fuentes & Mercader, 2018). Pertenece a la familia del ácido tetrámico, y estructuralmente está formado por un grupo espirocíclico que contiene un grupo dimetilfenil y un grupo etil carbonato como sustituyentes, como aparece en la [Figura 1](#). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la actividad carboxilasa del acetil CoA, bloqueando así la biosíntesis de lípidos en una gran variedad de plagas de insectos (Cevallos-Cedeño et al, 2018). Este insecticida es del tipo sistémico, se aplica a la planta y es absorbido por las hojas, tallos, corteza y raíces, repartiéndose así por toda la planta y ofreciéndole protección total, aunque no se aplique a toda la superficie. De esta manera los agentes activos del insecticida circulan por la savia haciéndola tóxica para los insectos que intentan succionarla

(Ponce, Cantú, Flores, Badii, Zapata, López & Fernández, 2006). Lo que ocurre tras la absorción por el organismo es que SP es transformado a una forma más polar, llamada spirotetramat-enol (SP-enol) (Figura 1), mediante la hidrólisis del grupo etil carbonato. Esta hidrólisis también ocurre en el medio ambiente debido a que SP es un compuesto termolábil que se degrada a temperatura ambiente, y más aún bajo condiciones alcalinas. SP-enol es el metabolito principal de SP, pero no es el único, también se forman otros derivados menores como spirotetramat-enol glucósido (SP-glc), spirotetramat cetohidróxido (SP-keto), spirotetramat monohidróxido (SP-mono), y spirotetramat desmetil-enol (Cevallos-Cedeño et al, 2018, Nauen, Reckmann, Thomzik & Thielert, 2008; Planes, Catalán, Tena, Porcuna, Jacas, Izquierdo & Urbaneja, 2013).



**Figura 1.** Estructuras químicas de spirotetramat (izquierda) y spirotetramat-enol (derecha).

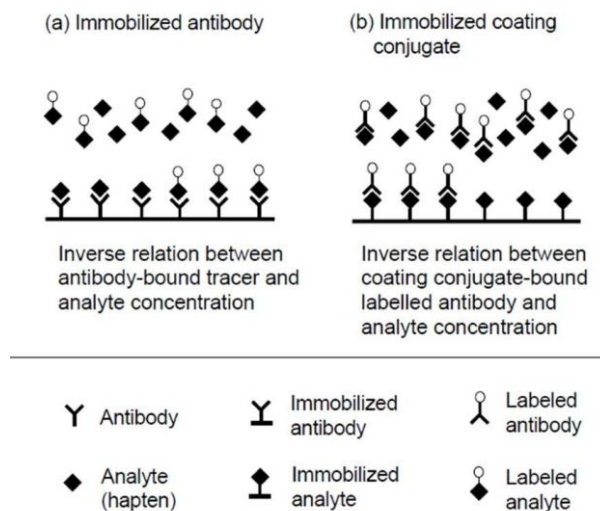
La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha definido el residuo de SP para fines analíticos en frutas y hortalizas como la suma de SP y SP-enol. Según la Regulación (EC) 822/2009, aprobada por la Comisión Europea el 27 de agosto de 2009, se establece el límite máximo de residuos para el SP en 2 mg/kg para la uva de mesa y de vinificación (European Commission, 2009).

El método más utilizado actualmente para el análisis de SP y SP-enol en alimentos es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), preferentemente acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS). Estos métodos son muy fiables, ya que tienen gran sensibilidad y resolución a la hora de identificar la presencia de SP y SP-enol, pero por el contrario tienen algunas desventajas notables. El principal inconveniente de HPLC-MS es que son equipos muy costosos. Este factor representa una limitación importante para muchos laboratorios. Por otra parte, utilizar estos equipos requiere de personal cualificado que tenga de 6 a 12 meses de experiencia para poder obtener el máximo rendimiento del equipo, por lo que dificulta todavía más el poder utilizar estos métodos. Por todo lo descrito anteriormente se puede concluir que HPLC-MS es un método caro, complicado y no portátil.

El desarrollo de nuevos métodos de identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas como SP está a la orden del día. El presente trabajo ha consistido en el estudio de una metodología alternativa y/o complementaria a los métodos como el HPLC-MS. El **ELISA** (en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica inmunoquímica mediante la cual se logra detectar un antígeno que reacciona con un anticuerpo, y donde uno de los inmunorreactivos está inmovilizado sobre un soporte sólido y el otro lleva acoplada una enzima capaz de generar un producto con color o algún otro método de detección (Guzmán-

Vázquez, 2004; Céspedes, Glennly, Felices, Balda & Suárez, 2002; Rodríguez Sánchez, Pupo Antúnez, Ilnait, Otero & Martínez Machín, 2005).

Las ventajas de este tipo de inmunoensayos son muchas, y hacen que sea una muy buena alternativa para la detección de una gran variedad de antígenos. Para empezar, son métodos mucho más baratos que un LC-MS, además son más rápidos y sencillos, por los que no se necesita personal tan cualificado y con tanta experiencia para poder llevar a cabo el análisis. Es un método muy versátil, permite utilizar muchos formatos diferentes para adaptarse a cada situación concreta y de esta manera tener diferentes aplicaciones. Por ejemplo, mediante tiras reactivas, placas ELISA, análisis in situ (métodos portátiles), screening (para analizar muchas muestras), etc.



**Figura 2.** Formatos de ELISA: (a) formato directo o de anticuerpo inmovilizado y (b) formato indirecto o de conjugado inmovilizado (Dankward, 2006).

Existen diferentes formatos de ELISA según el reactivo que se inmoviliza (Figura 2). En este trabajo se ha estudiado el método ELISA mediante tres formatos, el **formato directo** o de anticuerpo inmovilizado (CD), el **formato directo con anticuerpo de captura** (CDC) que es una variante del anterior, y el **formato indirecto** o de conjugado inmovilizado (CI), que se explicarán más adelante. En todos los casos es necesario medir la absorbancia del producto de la reacción enzimática asociada a la reacción inmunoquímica entre el anticuerpo y el antígeno. Para poder comprender correctamente los tipos de ensayos que se han evaluado durante los distintos estudios de este proyecto, es necesario definir previamente algunos conceptos.

Los **anticuerpos policlonales** son aquellos que no se purifican totalmente, sino parcialmente a partir del suero del animal. No se obtiene una única molécula, sino un conjunto de ellas, por lo que no se puede decir que tenga una concentración determinada y se hablará de diluciones. Los **anticuerpos monoclonales**, por otra parte, sí que se purifican totalmente y se obtiene un único tipo de molécula, por lo que se puede expresar su concentración.

Se define como compuesto **inmunógeno** a las sustancias capaces de provocar una respuesta inmunitaria específica, ya sea una respuesta humoral o celular. El tamaño promedio que debe tener un inmunógeno es de 1000-2000 Dalton en adelante. Los **haptenos**, en cambio, son moléculas que no generan una respuesta inmune, ya que tienen un tamaño

mucho menor que los compuestos inmunógenos. Por otra parte, como se están analizando haptenos, estos al ser tan pequeños solamente tienen un sitio de unión al anticuerpo, este lugar se denomina **epítipo**. Otras proteínas al ser más grandes tienen varios epítopos, pero el hapteno solo tiene uno. Es por esta razón por la que se realizan **ensayos de competición**, en los que el analito (SP o SP-enol) rivaliza con un hapteno sintético marcado con una proteína (**conjugado de ensayo**) por unirse al único lugar de unión disponible del anticuerpo (Garcés, 2008).

La **heterología** en un inmunoensayo supone que el hapteno sintético que participa en la competición es diferente al hapteno que se empleó para generar el anticuerpo. Esto implica un reconocimiento más débil de los haptenos utilizados en los conjugados de ensayo, respecto al **analito** (la molécula que queremos analizar). Así se facilita la unión del anticuerpo con el analito, dando una mayor sensibilidad (Garcés, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, en los ensayos competitivos las moléculas de analito compiten con moléculas de un conjugado proteína-hapteno por unirse al anticuerpo, y posteriormente se generará más o menos señal dependiendo de la cantidad de conjugado que haya interactuado con el anticuerpo. Se utilizará una cantidad de conjugado suficiente para que haya una proporción limitante y ocurra una competición real. La **señal máxima** del ensayo se obtendrá en ausencia del analito, por lo que se habrá formado el complejo anticuerpo-conjugado. Por otra parte, la **señal mínima** se obtendrá cuando el analito se encuentre en exceso, formándose el complejo anticuerpo-analito y desplazando al conjugado de la unión con el anticuerpo. Como consecuencia la señal generada en los ensayos de ELISA competitivo es **inversamente proporcional** a la concentración de analito (se puede observar este resultado en la [Figura 3](#), donde una concentración de analito decreciente en sentido vertical implica más color, es decir, más señal) (Ceballos, Abad, Mercader, 2017).



**Figura 3.** Inmunoensayo competitivo en microplaca de ELISA.

Generalmente, la señal obtenida por la adición del sustrato enzimático puede medirse mediante absorbancia o luminiscencia. En este proyecto se ha utilizado un lector para medir la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. Al representar la señal en función de la concentración de analito, utilizando una escala logarítmica, se obtiene una curva sigmoide. Esta es la **curva de inhibición**, que representa el grado de inhibición del complejo anticuerpo-conjugado a distintas concentraciones de analito. Esta curva consta de cuatro parámetros, que son los que se analizan para evaluar los resultados de un ensayo: la señal máxima del ensayo ( $A_{max}$ ) corresponde a la asíntota superior de la curva; la señal mínima, también llamada ruido

de fondo ( $A_{\min}$ ), que corresponde a la asíntota inferior; la concentración en el punto donde la curva pasa de convexa a cóncava ( $IC_{50}$ ), y la pendiente de la curva en el punto de inflexión. El concepto de  $IC_{50}$  hace referencia al punto en el que la concentración de analito provoca que la señal sea la mitad que  $A_{\max}$ , y por eso este punto se utiliza para estimar numéricamente la sensibilidad del ensayo (Ceballos, Abad, Mercader, 2017), de tal modo que **a menor  $IC_{50}$  habrá mayor sensibilidad**.

## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización de la influencia de distintos parámetros fisicoquímicos sobre los parámetros analíticos de inmunoensayos tipo ELISA competitivo para el análisis de SP y SP-enol.

Concretamente se han realizado los siguientes estudios:

- Estudiar la influencia del pH
- Estudiar la influencia de la fuerza iónica
- Estudiar la influencia del disolvente etanol
- Estudiar la influencia de distintas matrices alimentarias

Para realizar estos estudios de una manera completa, se ha empleado varios formatos diferentes de ELISA, concretamente el formato Competitivo Directo (CD), el formato Competitivo Directo de Captura (CDC), y el formato Competitivo Indirecto (CI). Además, se han realizado estudios con anticuerpos monoclonales y con anticuerpos policlonales para determinar cuáles son los óptimos para la detección de SP y SP-enol en alimentos.

El plan de trabajo ha consistido en una serie de etapas:

- Clases teóricas y prácticas de formación en la tecnología ELISA
- Plan de Bienvenida y formación sobre el uso de equipos de protección individual
- Preparación de tampones y reactivos
- Familiarización con inmunoensayos en diferentes formatos con anticuerpos policlonales y monoclonales
- Ensayos por triplicado con tampones a diferente pH y fuerza iónica en los cinco inmunoensayos seleccionados
- Ensayos por triplicado en presencia de etanol con los cinco inmunoensayos seleccionados
- Ensayos por triplicado del efecto del vino sobre los tres inmunoensayos que emplean anticuerpos monoclonales
- Elaboración de fichas con los gráficos de los resultados de los inmunoensayos
- Construcción de tablas con los valores de  $A_{\max}$  e  $IC_{50}$  y los valores normalizados
- Representación gráfica de los resultados y su interpretación
- Consultas bibliográficas
- Escritura de la memoria del Trabajo Fin de Grado

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Instrumentos utilizados

Durante la preparación de los experimentos, la realización de los ensayos y el tratamiento de los datos obtenidos, se han utilizado una serie de instrumentos que han sido indispensables para tales fines. Se describen a continuación:

- Pipetas volumétricas de laboratorio. Se han utilizado pipetas automáticas monocanal de volumen variable. También se ha hecho mucho uso de pipetas multicanal, que son muy útiles para agilizar el pipeteo al trabajar con placas ELISA (Figura 4).
- Microplacas ELISA. Son las placas donde se han realizado los ensayos; placas de poliestireno de la marca Costar, y consisten en 96 pocillos con una capacidad de 300  $\mu\text{L}$  por pocillo aproximadamente, donde según el tipo de formato aplicado, se añadieron distintos componentes (Figura 3).
- Reservorios. Son de tres tipos. Placas donde se han realizado las diluciones para hacer las curvas y dopajes de los analitos. Constan de 96 pocillos con un volumen máximo de 3 mL aproximadamente, constituidas externamente de plástico con una cobertura interna de vidrio. También se han empleado reservorios de plástico de un solo canal alargado de unos 50 mL de capacidad donde se colocan las diluciones para utilizar una pipeta multicanal y poder pipetear en distintos pocillos a la vez. Por último están los reservorios multicanal. Es un recipiente de plástico que tiene diversos compartimentos para poder pipetear distintas diluciones con la pipeta multicanal.
- Lavador. Es un instrumento de la marca Biotek, el modelo Elx405 Select Bio-Stack, que se utiliza para lavar las placas ELISA después de cada reacción.
- Lector de absorbancia. Es un equipo de la marca Biotek que mide la absorbancia de cada pocillo de la placa ELISA a una longitud de onda de 492 nm.
- Programa informático KCjunior, para la lectura de la absorbancia.
- Programa SoftMax Pro v4.7 para representar las curvas estándar y obtener los valores de la  $A_{\text{max}}$  y la  $IC_{50}$ .



Figura 4. Pipeta volumétrica multicanal.

### 3.2 Reactivos utilizados

Se han utilizado una serie de reactivos específicos para este estudio, ya sean los analitos, los anticuerpos, los trazadores y conjugados, sustratos enzimáticos, tampones, disolventes, matrices, etc. Se concreta a continuación los más relevantes:

- Spirotetramat (SP). Es un estándar analítico grado pestanal de Sigma/Aldrich. Se utilizaron disoluciones preparadas en *N, N'*-dimetilformamida (DMF) a distintas concentraciones.
- Spirotetramat-enol (SPenol). Es otro estándar analítico grado pestanal de Sigma/Aldrich. También se utilizaron disoluciones en DMF a distintas concentraciones.
- Anticuerpos monoclonales SPm#23 y SPo#237 y el anticuerpo policlonal SPo#1.
- Trazadores enzimáticos HRP-SPh y HRP-SPo de peroxidasa.
- Conjugados OVA-SPh, OVA-SPo y OVA-SPc de ovoalbúmina.
- GAM (Goat Anti-Mouse). Es un anticuerpo que sirve para el preapizado con monoclonales.
- GAR-HRP (Goat Anti-Rabbit). Es un anticuerpo secundario que sirve para la detección de policlonales.
- RAM-HRP (Rabbit Anti-Mouse). Otro anticuerpo secundario usado para la detección de monoclonales.

### 3.3 Tampones

- Tampón de tapizado básico: 50 mM carbonato pH 9.6
- Tampón de tapizado neutro. 20 mM fosfato pH 7.4
- Tampón de ensayo: 20 mM fosfato pH 7.4, con 280 mM de NaCl + 0.05% Tween20
- PBS: 10 mM fosfato pH 7.4, con 140 mM de NaCl
- PBST: 10 mM fosfato pH 7.4, con 140 mM de NaCl + 0.05% Tween20
- Tampón de revelado: 25 mM citrato, 62 mM fosfato, pH 5.4
- Disolución de lavado: 150 mM NaCl + 0.05% Tween20

### 3.4 Procedimientos

Se han estudiado tres formatos de ELISA competitivo que se describen a continuación. Cada día se prepararon disoluciones de proteínas y patrones nuevas. Los patrones se prepararon por dilución seriada en tubos de vidrio.

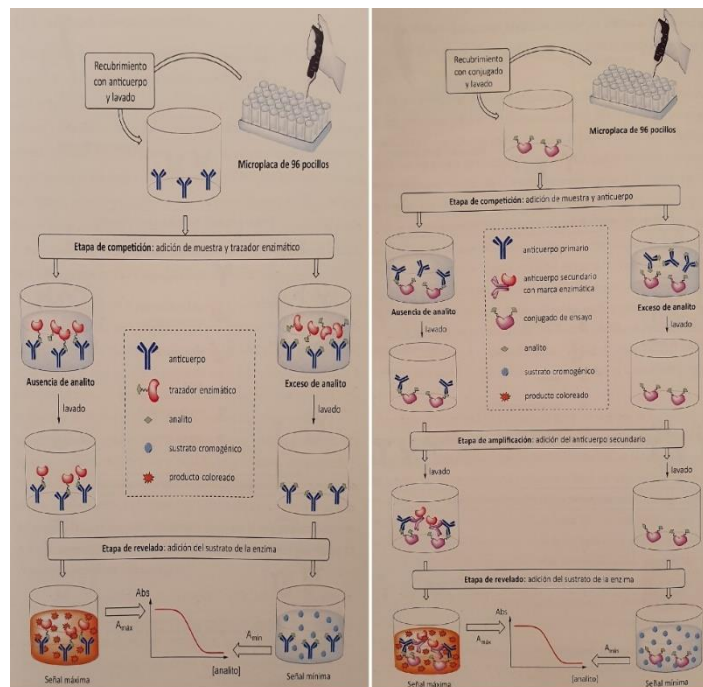
*Formato Directo (CD)*: Consiste en la inmovilización del anticuerpo, seguido de la competición entre el analito y un conjugado enzima-hapteno, se puede observar el proceso en la [Figura 5](#). Las etapas de las que está formado son las siguientes:

- Tapizado. En esta primera etapa es donde se inmoviliza el anticuerpo, se tapiza la placa con tampón de tapizado básico dejándola toda la noche a 4°C.
- Competición: Es donde tiene lugar la unión del analito o el conjugado con el anticuerpo, se deja que ocurra la competición durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prepararon disoluciones patrón de SP y SP-enol a diferentes concentraciones en



agua MilliQ. El trazador enzimático se preparó en cada uno de los tampones estudiados.

- Revelado. Se adiciona el sustrato de la enzima para que produzca la reacción, y por tanto la coloración. Se deja 10 minutos reaccionar y se detiene con una disolución de  $H_2SO_4$  1 M. Se utiliza tampón de revelado con 2 mg/mL de o-fenilendiamina (OPD) y 0.012% agua oxigenada ( $H_2O_2$ ).
- Lectura. En este punto, se lee la absorbancia de los 96 pocillos de la placa en el lector, y posteriormente se utilizará un programa de tratamiento de datos llamado SoftMax Pro.
- Entre etapa y etapa, excluyendo el revelado, siempre se lava la placa en el lavador con disolución de lavado.



**Figura 5.** Representación de ELISA competitivo en formato directo (izquierda) e Indirecto (derecha) (Ceballos, 2017).

**Formato Directo de Captura (CDC):** Este formato es una variante del Directo, en el que inicialmente se tapiza la placa con un primer anticuerpo capaz de unirse al segundo anticuerpo, para evitar la aleatoriedad en la fijación a la placa y la posibilidad de bloquear los sitios de unión e inutilizar el anticuerpo, y se utilizan las mismas condiciones que el tapizado del formato Directo. Posteriormente se realiza la captura, donde se adiciona el anticuerpo específico, que se unirá al anticuerpo ya fijado, utilizando tampón PBST. Las demás etapas son iguales que el formato Directo. La diferencia con el directo es que en el de captura se realiza una etapa más, se utilizan más reactivos y el ensayo conlleva más tiempo, pero tiene la gran ventaja de que el ensayo es estandarizable, se puede utilizar para cualquier ensayo que vaya a utilizar un anticuerpo monoclonal, por lo que es muy versátil.

**Formato Indirecto (CI):** Consiste en la inmovilización del conjugado proteína-hapteno, y se tapiza con el tampón de tapizado. A continuación tiene lugar la competición, donde se adiciona el analito y el anticuerpo, por lo que puede formarse el complejo anticuerpo-analito

en disolución, o formarse el anticuerpo-conjugado fijado a la placa. Las disoluciones patrón de analito se preparan en agua MilliQ y el anticuerpo en los tampones estudiados. La siguiente etapa se denomina detección, y consiste en la adición de un anticuerpo conjugado a una enzima, utilizando el tampón PBST. Por último, se realiza el revelado igual que el formato Directo (Ceballos, 2017). El proceso del formato Indirecto también aparece en la [Figura 5](#).

### 3.5 Inmunoensayos estudiados

Para este trabajo se estudiaron 3 inmunoensayos con anticuerpos monoclonales y 2 inmunoensayos con anticuerpos policlonales.

Las condiciones particulares de los ensayos optimizados con anticuerpos monoclonales fueron las siguientes:

- CD
  - Se realizó el tapizado con el anticuerpo *SPm#23* a 0.3 µg/mL en tampón de tapizado básico.
  - Se realizó la competición utilizando *HRP-SPh* a 300 ng/mL y patrones de analito desde 1000 nM con un factor de dilución de 3 para SP y desde 30 nM con un factor de dilución de 3 para SP-enol.
- CDC
  - Se realizó el tapizado con *GAM* a 1 µg/mL en tampón de tapizado básico.
  - Se realizó la captura utilizando *SPm#23* a 0.1 µg/mL en tampón PBST.
  - Se realizó la competición utilizando *HRP-SPh* a 35 ng/mL y patrones de analito desde 1000 nM con un factor de dilución de 3 para SP y desde 30 nM con un factor de dilución de 3 para SP-enol.
- CI
  - Se realizó el tapizado con el conjugado *OVA-SPh* a 0.1 µg/mL en tampón de tapizado neutro.
  - Se realizó la competición utilizando *SPo#237* a 30 ng/mL y patrones de analito desde 1000 nM con un factor de dilución de 3 para SP y desde 30 nM con un factor de dilución de 3 para SP-enol.
  - Se realizó la detección utilizando *RAM* a una dilución 1/2000 en tampón PBST.

Hay que puntualizar que, para el estudio del efecto matriz, en la competición de los tres ensayos optimizados con anticuerpos monoclonales, los patrones de analito fueron desde 30 nM con un factor de dilución de 3 tanto para SP como para SP-enol, debido a la etapa de hidrólisis realizada en este estudio.

Las condiciones particulares de los ensayos optimizados con anticuerpos policlonales fueron las siguientes:

- CI homólogo
  - Se realizó el tapizado con el conjugado *OVA-SPo* a 0.01 µg/mL en tampón de tapizado básico.

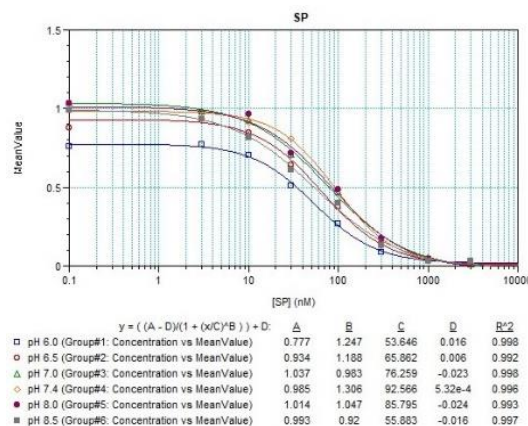
- Se realizó la competición utilizando el anticuerpo SPo#1 a una dilución de 1/200000 y patrones de analito desde 10000 nM con un factor de dilución de 10 tanto para SP como para SP-enol.
- Se realizó la detección utilizando GAR-HRP a una dilución 1/10000 en tampón PBST.
- CI heterólogo
  - Se realizó el tapizado con el conjugado OVA-SPc a 3 µg/mL en tampón de tapizado neutro.
  - Se realizó la competición utilizando el anticuerpo SPo#1 a una dilución de 1/6000 y patrones de analito desde 10000 nM con un factor de dilución de 10 tanto para SP como para SP-enol.
  - Se realizó la detección utilizando GAR-HRP a una dilución 1/10000 en tampón PBST.

### 3.6 Procesamiento de datos

Tras el revelado de los ensayos realizados se midió la absorbancia de cada pocillo a 492 nm, se pasaron los resultados a SoftMax Pro y este utilizó una fórmula que ajustaba los valores obtenidos con una ecuación de cuatro parámetros que resulta en una curva de inhibición sigmoide. La variable A corresponde a  $A_{max}$ , B corresponde a la pendiente, C es la  $IC_{50}$ , y D es la  $A_{min}$ . Esta es la fórmula utilizada:

$$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

Como puede observarse en la [Figura 6](#), se obtuvieron una serie de curvas de inhibición con sus valores de  $A_{max}$ ,  $IC_{50}$ , pendiente y  $A_{min}$  para cada parámetro estudiado. Estos parámetros han sido tampones a distinto pH, las distintas concentraciones de NaCl para estudiar el efecto de la fuerza iónica, la variación de la concentración de etanol para analizar el efecto del disolvente y distintas concentraciones de las matrices de vino tinto y blanco.



**Figura 6.** Ejemplo de curvas de inhibición obtenidas en SoftMax Pro.

Los resultados obtenidos por el programa informático se utilizaron para analizar en conjunto las múltiples réplicas de cada ensayo. Se exportaron los valores de A ( $A_{max}$ ) y de C ( $IC_{50}$ ) a una tabla de Excel, donde se normalizaron los datos y se realizó la media de las réplicas. A continuación, se representó en una gráfica la variación de la  $A_{max}$  y en otra la de  $IC_{50}$  para cada analito en función de la variación del pH y la fuerza iónica, y en función de la concentración de matriz y de disolvente.

La representación de  $A_{max}$  e  $IC_{50}$  sirve para observar su variación en función de las distintas condiciones de ensayo. Cada valor se representa en función del valor obtenido en las condiciones de referencia de cada estudio. A modo de ejemplo, si se observa un aumento de  $A_{max}$  conforme aumenta el pH respecto al pH del tampón PBS, se puede interpretar que el pH ligeramente más básico afecta positivamente al ensayo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos de cada estudio en los diferentes formatos utilizados para los dos tipos de anticuerpos estudiados. Para cada ensayo se adjuntará una gráfica que muestre la evolución de la  $A_{max}$  en función de distintos parámetros y otra gráfica para la  $IC_{50}$ . Antes de las gráficas se interpretarán estos resultados, comentando finalmente cómo afectan cada uno de los parámetros fisicoquímicos estudiados.

En las gráficas de  $A_{max}$  de cualquier estudio realizado se espera ver la superposición de la curva de SP y SP-enol. Esto es lógico porque la  $A_{max}$  es independiente del analito, como bien dice su definición (la  $A_{max}$  es la señal en ausencia de analito). En cambio, la variación de la  $IC_{50}$  sí puede sufrir diferencias en función del analito ya que evalúa la afinidad por el analito, por lo que habrá más diferencias entre las curvas de SP y SP-enol. En cada figura, las gráficas de la evolución de  $A_{max}$  están colocadas a la izquierda, mientras que las de  $IC_{50}$  están en la derecha.

### 4.1 Estudio de la influencia del pH

Primeramente, se ha querido estudiar la influencia del pH en la detección de los analitos SP y SP-enol, ya que el pH es un parámetro fisicoquímico que se puede modificar a la hora de llevar a cabo un ensayo, y si se observa que a un pH ligeramente ácido, por poner un ejemplo, se obtiene una mayor señal, quizá sea conveniente acidificar la solución sobre la cual se realizará la detección de los analitos. Además, la matriz alimentaria puede modificar el pH del ensayo por lo que es necesario saber cómo se comporta.

Se ha estudiado el efecto del pH preparando distintos tampones fosfato 20 mM a pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 y 8.5. En todos los tampones se ajustó la fuerza iónica a una concentración de 332 mM para que fuera constante en todos ellos y no afectara al ensayo, provocando que cualquier variación de  $A_{max}$  e  $IC_{50}$  sea debida al pH. El valor de referencia en este estudio es el de pH 7.4, debido a que ese es el pH del tampón PBS, y siempre tendrá un valor de 1 en las gráficas.

Se estudió un rango de pH entre 6.0 y 8.5 porque es un rango que está alrededor de la neutralidad. El pKa es el pH al cual la mitad de los grupos de la molécula están protonados y

la otra mitad no lo está, e indica cómo se van a protonar los grupos de la molécula. En caso del SP, su pKa es 10.7, es bastante básico. El pKa del SP-enol es 4.9, más ácido. Si se hubiera estudiado un rango de pH más amplio para cubrir esos pKa, seguramente se hubieran observado más diferencias en las curvas de ambos analitos.

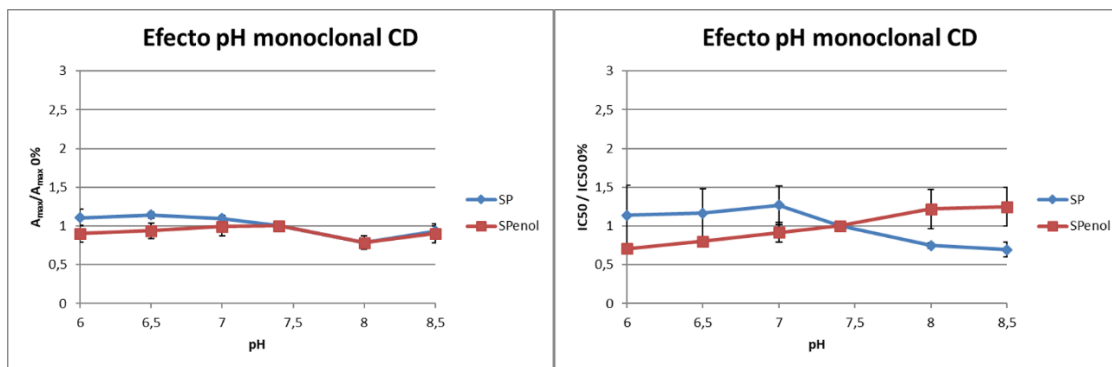
El problema de estudiar pH tan ácidos o básicos es que los inmunoensayos no funcionarían debido a que a esos pH las proteínas se desnaturizarían (a pH muy básicos) o estarían muy protonadas (a pH muy ácido) y perderían su actividad. Lo mismo ocurriría para los anticuerpos, la estabilidad del anticuerpo depende de su solvatación y un pH alejado de la neutralidad afectaría negativamente, además de que la interacción anticuerpo-antígeno se establece muchas veces mediante puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, etc, donde el pH influye en gran medida y un pH extremo disminuiría la interacción pudiendo llegar incluso a desnaturizarse.

#### Ensayos con anticuerpos monoclonales

- Formato Directo (CD)

La  $A_{max}$  se mantiene relativamente constante ante la variación del pH, a ningún pH la señal varía más de un 20% del punto de referencia (Figura 7).

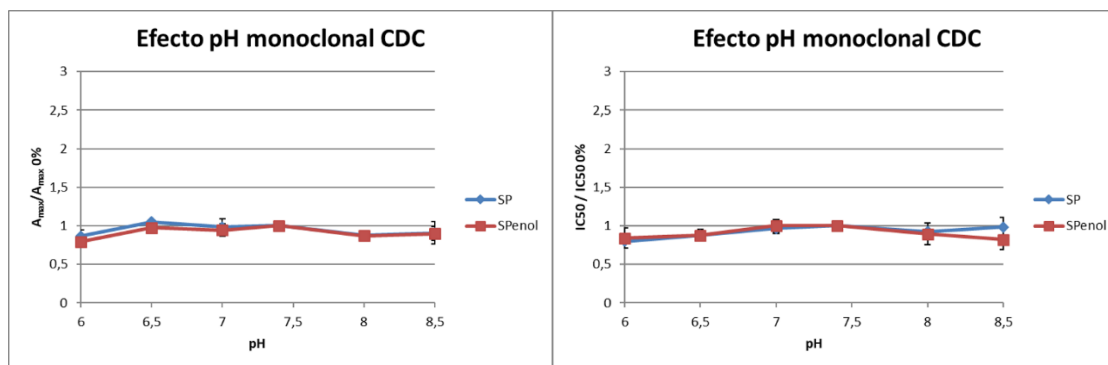
En cuanto a la  $IC_{50}$ , es curioso que se observa una bajada de la  $IC_{50}$  para el analito SP al subir el pH, mientras que ocurre lo contrario en la curva del SP-enol, pudiéndose apreciar una ligera subida de la  $IC_{50}$  al aumentar el pH. Esto se puede explicar debido a que a pH alcalino el SP se transforma en SP-enol provocando el mejor reconocimiento de SP-enol que a SP.



**Figura 7.** Efecto del pH en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Directo de Captura (CDC)

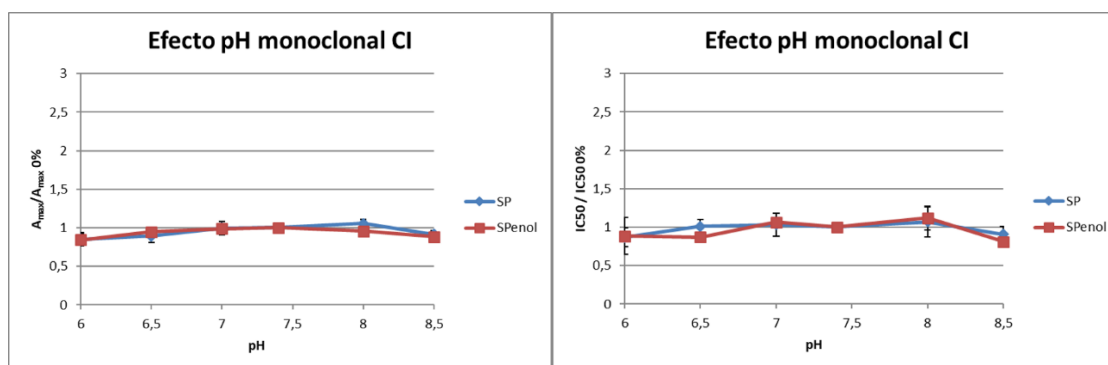
Este formato ha demostrado ser más robusto en cuanto al pH, y no se observan variaciones notables de la  $A_{max}$  ni de la  $IC_{50}$  (Figura 8).



**Figura 8.** Efecto del pH en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Indirecto (CI)

Al igual que el formato directo de captura, en el formato indirecto también se observa que la  $A_{max}$  y la  $IC_{50}$  son muy estables frente a la variación del pH (Figura 9).



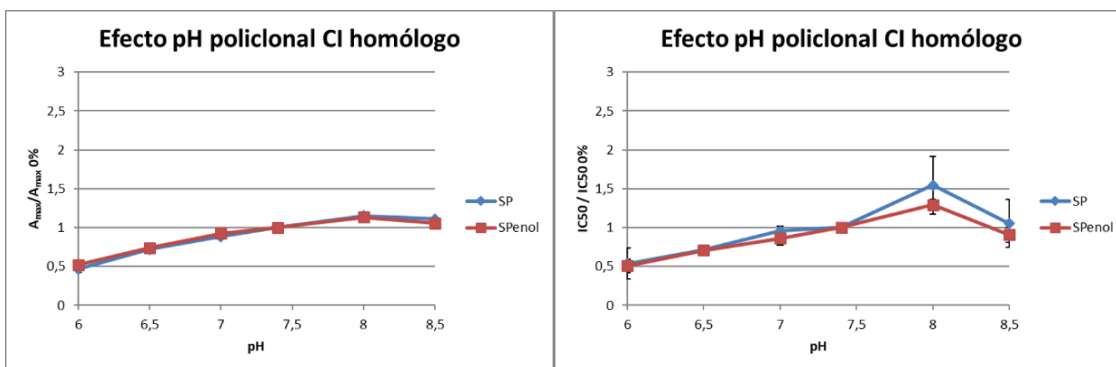
**Figura 9.** Efecto del pH en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

#### Ensayos con anticuerpos policlonales

- Formato Indirecto homólogo

En lo referente a la  $A_{max}$ , se observa un descenso de la señal hasta la mitad cuando el pH llega a 6.0, manteniendo la estabilidad a pH más alcalinos hasta llegar a 8.5 (Figura 10).

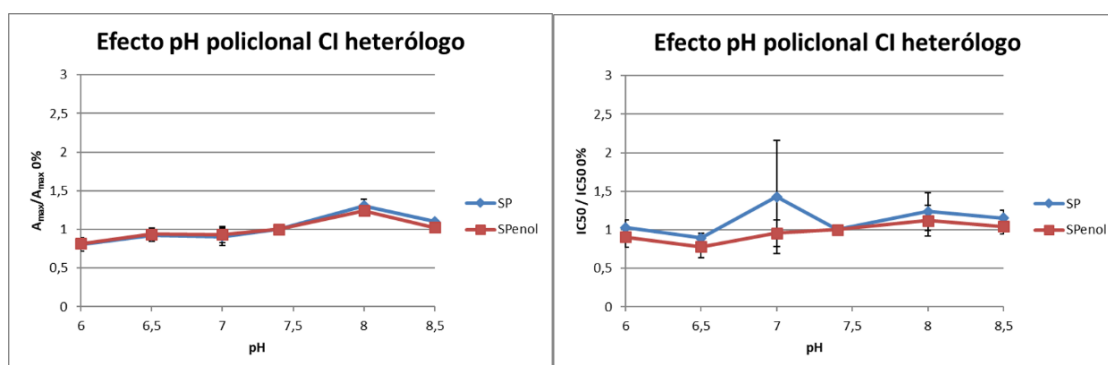
La  $IC_{50}$ , al igual que la  $A_{max}$ , es más baja cuando el pH es más ácido y aumenta para ambos analitos a pH 8.0, especialmente para el SP donde aumenta un 50%. Es curioso que el pico de aumento de  $IC_{50}$  parece ser a pH 8.0, mientras que al subir el pH hasta 8.5, esta se vuelve a estabilizar.



**Figura 10.** Efecto del pH en el formato CI homólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Indirecto heterólogo

El formato Indirecto heterólogo mantiene más constantes los valores de  $A_{max}$  y de  $IC_{50}$  que el formato indirecto homólogo. La variación en la  $IC_{50}$  a pH 7.0 del analito SP puede deberse a algún fallo de pipeteo que haya provocado algún valor erróneo, ya que se observa una desviación estándar mucho mayor a lo habitual (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto del pH en el formato CI heterólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

Este estudio del pH nos indica que los ensayos donde se han utilizado anticuerpos monoclonales funcionan ligeramente mejor que los anticuerpos policlonales, pero en general se puede observar que el pH no influye destacablemente en la variación de  $A_{max}$  y de  $IC_{50}$  de ambos analitos.

#### 4.2 Estudio de la fuerza iónica

El estudio del efecto de la fuerza iónica en la detección de los analitos SP y SP-enol se realiza con el mismo fin que el estudio del pH, para averiguar de qué manera influye en la señal obtenida y en la  $IC_{50}$  y así intentar optimizar las condiciones de ensayo y prever las variaciones provocadas por la matriz alimentaria.

Para el estudio se prepararon seis tampones fosfato 20 mM a diferentes fuerzas iónicas, pero manteniendo el pH constante a 7.4 en todos ellos, para que no influyese en los resultados. Se preparó cada tampón a una concentración de cloruro sódico determinada para que alcanzara una fuerza iónica concreta, y es necesario puntualizar que se prepararon los

tampones al doble de la concentración de NaCl deseada en ensayo, debido a que en la etapa de competición de todos los formatos utilizados la concentración de los tampones iba a reducirse al 50% al añadir el analito.

- Tampón 1: Concentración de NaCl a 50 mM, para tener una fuerza iónica de 49.9 mM
- Tampón 2: Concentración de NaCl a 100 mM, para tener una fuerza iónica de 75.3 mM
- Tampón 3: Concentración de NaCl a 200 mM, para tener una fuerza iónica de 125.7 mM
- Tampón 4: Concentración de NaCl a 280 mM, para tener una fuerza iónica de 166.0 mM
- Tampón 5: Concentración de NaCl a 400 mM, para tener una fuerza iónica de 226.2 mM
- Tampón 6: Concentración de NaCl a 500 mM, para tener una fuerza iónica de 276.3 mM

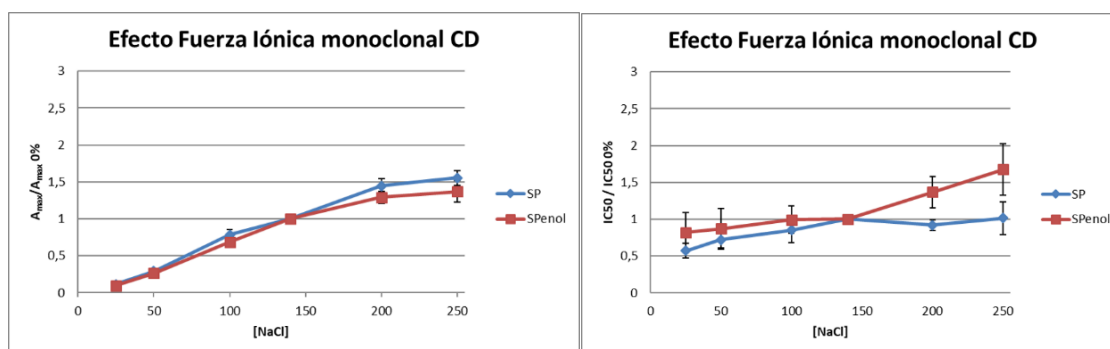
Es importante decir que, en este estudio, el punto de referencia es el tampón 4, que tiene una concentración de NaCl de 280 mM, y corresponde a la fuerza iónica en ensayo equivalente a la del tampón PBS, que es 166.0 mM y que al normalizar en la gráfica tiene un valor de 1.

#### Ensayos con anticuerpos monoclonales

- Formato Directo (CD)

Se puede observar en la [Figura 12](#) cómo la bajada de fuerza iónica afecta fatalmente a la señal de los analitos, reduciéndola hasta prácticamente 0 cuando la concentración de cloruro sódico es de 25 mM. Por otro lado, el aumento de la fuerza iónica provoca el aumento de la señal, llegando a una señal del 150% cuando la concentración de cloruro sódico es de 250 mM.

La  $IC_{50}$  se comporta de forma distinta para cada analito. Para el analito SP, fuerzas iónicas elevadas no le afectan y a SP-enol sí, debido a que ésta es una molécula más fácilmente ionizable, por lo que a una concentración de cloruro sódico de 250 mM la  $IC_{50}$  supera el 150%.



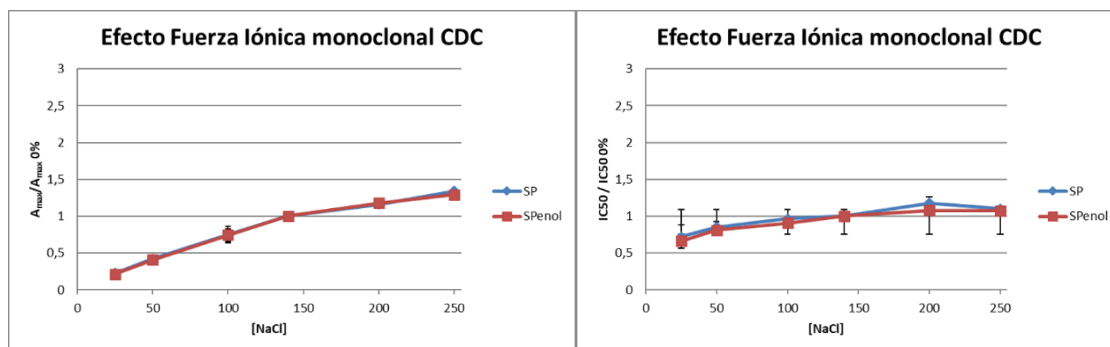
**Figura 12.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Directo de Captura (CDC)

La evolución de la  $A_{max}$  del formato directo de captura es muy similar a la del formato directo, sigue el mismo comportamiento y es lógico, ya que se trata del mismo anticuerpo y los mismos conjugados.

Se observa cómo la  $IC_{50}$  se mantiene más estable que en el formato directo, observándose una ligera bajada cuando se disminuye la fuerza iónica ([Figura 13](#)).



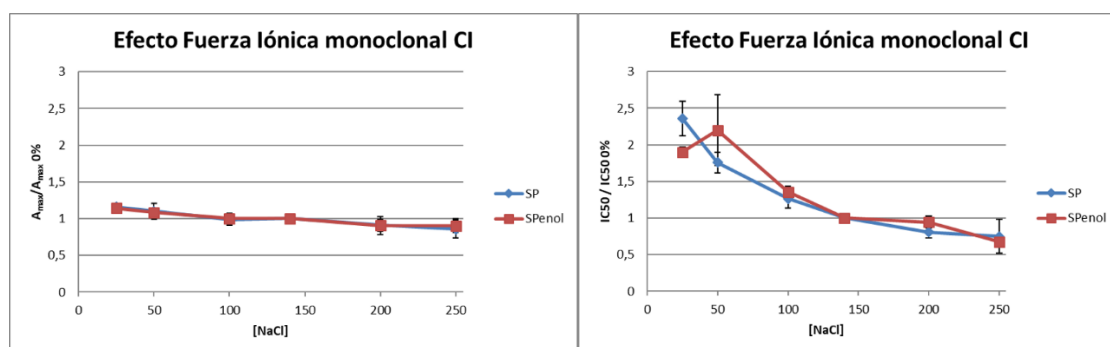


**Figura 13.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Indirecto (CI)

El comportamiento es diferente, debido a que se utiliza un anticuerpo diferente. La  $A_{max}$  se mantiene estable, no se observan variaciones de la señal superiores al 10% (Figura 14).

En cambio, hablando de la  $IC_{50}$ , a los dos analitos les afecta mucho la bajada de la fuerza iónica, llegando a superar el 200% a una concentración de cloruro sódico de 50 mM para el SP-enol, y un poco por debajo del 200% para el SP. Por otra parte, la subida de la fuerza iónica desde una concentración de cloruro sódico por encima de los 140 mM, provoca la bajada de la  $IC_{50}$  de hasta casi el 50% para ambos analitos.



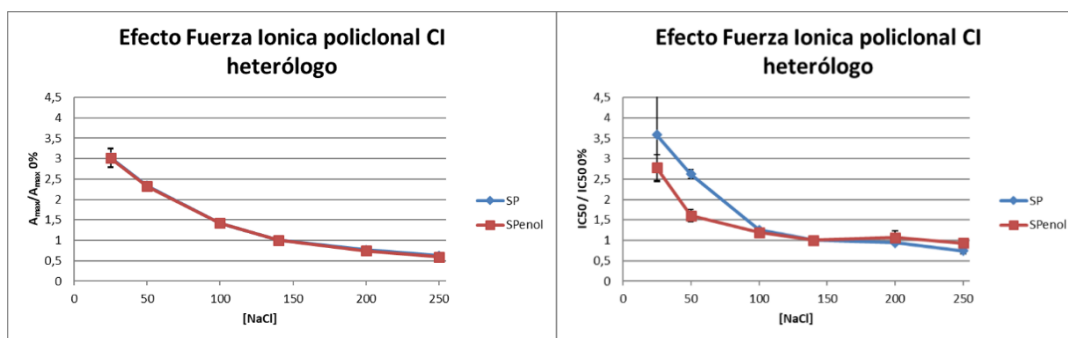
**Figura 14.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

#### Ensayos con anticuerpos policlonales

- Formato Indirecto heterólogo

En cuanto a la evolución de la  $A_{max}$ , en la Figura 15 se observa que, si aumenta la concentración de cloruro sódico y en consecuencia aumenta la fuerza iónica, se produce una bajada de la señal hasta el 50%, exactamente a una concentración de NaCl de 250 mM. En cambio, si baja la concentración de NaCl, bajando así la fuerza iónica, la señal se dispara hasta alcanzar el 300%, concretamente a una concentración de NaCl de 25 mM. El resultado de este estudio es bastante positivo, ya que, si necesitamos una señal alta, se puede variar la fuerza iónica para obtenerla. Por ejemplo, si se realiza un ensayo que se obtiene una señal muy baja, se podría reducir la fuerza iónica de los tampones utilizados para conseguir un aumento de la señal.

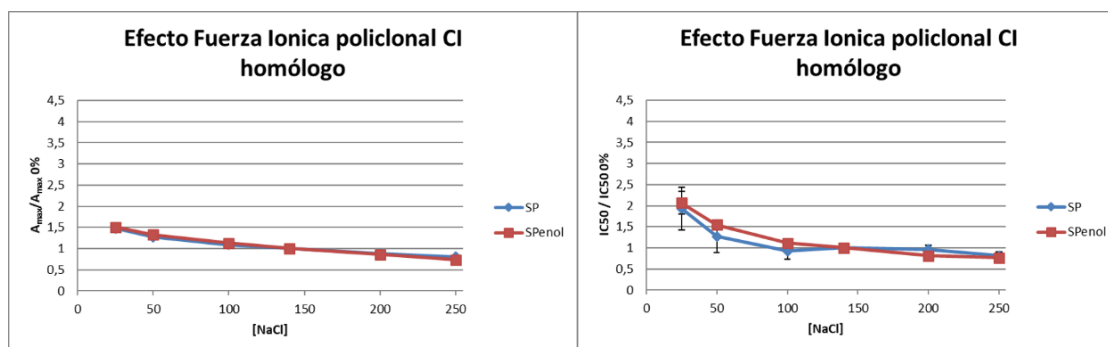
La  $IC_{50}$  no varía si aumenta la fuerza iónica, pero si esta disminuye, la  $IC_{50}$  aumenta considerablemente, hasta valores superiores a 2,75 veces en SP-enol y hasta 3,5 veces en SP. Esto es un problema, ya que se si se busca aumentar la señal disminuyendo la fuerza iónica, además de conseguir una señal más alta, se obtendrán valores de  $IC_{50}$  superiores. Habrá que buscar un punto intermedio para que el ensayo obtenga suficiente señal sin perder sensibilidad.



**Figura 15.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CI heterólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Indirecto homólogo

En cuanto a la  $A_{max}$ , el comportamiento es menos drástico que el CI heterólogo. Al bajar la concentración de cloruro sódico aumenta la señal, pero no tanto, llegando al 150%. Si aumenta la fuerza iónica se reduce ligeramente la  $A_{max}$ . Este ensayo es más resistente a cambios de fuerza iónica, pero la tendencia a disminuir la  $A_{max}$  si se aumenta la fuerza iónica es clara. La  $IC_{50}$  evoluciona de la misma forma que el formato indirecto heterólogo (Figura 16).



**Figura 16.** Efecto de la fuerza iónica en el formato CI homólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

En resumen, se observan diferencias muy drásticas al utilizar anticuerpos monoclonales o policlonales en los ensayos, observándose que con anticuerpos policlonales aumenta la  $A_{max}$  al bajar la fuerza iónica, y viceversa, ésta disminuye al aumentar la fuerza iónica, mientras que con anticuerpos monoclonales se observa el efecto contrario.

Estos resultados son interesantes porque en estos ensayos se refleja la influencia de la especificidad de cada anticuerpo, el sitio de unión de cada anticuerpo al analito es diferente, también ocurren distintos tipos de reacciones para la interacción con el anticuerpo según qué anticuerpo se utiliza.

También es entendible que el comportamiento de SP y SP-enol sea ligeramente diferente en cuanto a la evolución de la  $IC_{50}$ , debido a que uno es más polar que el otro, y eso hace que la fuerza iónica les afecte de distinta manera.

Se podrían hacer estudios para comprobar si compensa aumentar la fuerza iónica en los ensayos, ya que, a concentraciones de cloruro sódico de 250 mM, la  $IC_{50}$  disminuye y esto es positivo, pero por el contrario la  $A_{max}$  también disminuye, aunque es mínimamente, llegando a perder un 20% de señal.

### 4.3 Estudio de la influencia del disolvente etanol

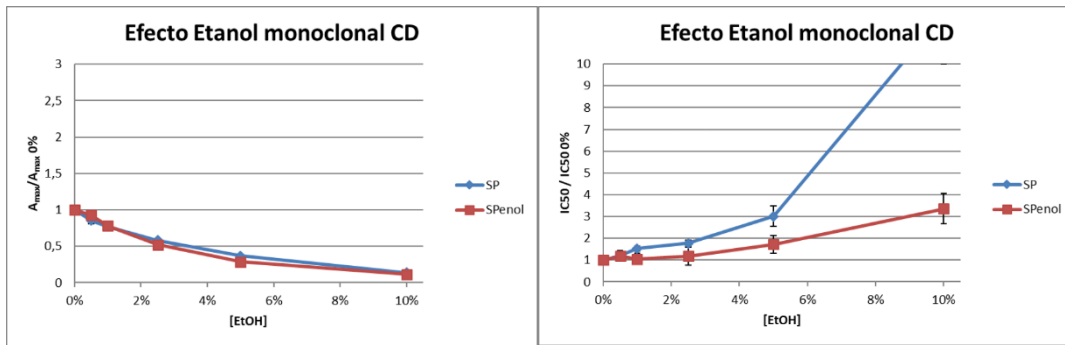
El estudio de la influencia de los disolventes para la detección de SP y SP-enol en los alimentos es muy importante debido a que estos alimentos pueden contener estos componentes en su composición, ya sea de manera natural o por los diferentes tratamientos que recibe el producto durante su elaboración y procesado. Se estudió concretamente el disolvente etanol, que está presente de manera natural en productos como el vino, por lo que es muy interesante estudiar cómo afectan distintas concentraciones de etanol en la detección de los analitos. Para realizar los ensayos, se prepararon diluciones a distinta concentración de etanol, desde 0%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5% y 10%. El valor de referencia fue la dilución de 0% de etanol, ya que se consideró el blanco, y tiene un valor de 1 en todas las gráficas de este estudio.

#### *Ensayos con anticuerpos monoclonales*

- Formato Directo (CD)

Sobre la  $A_{max}$ , en la [Figura 17](#) se ve claramente la tendencia de disminuir la  $A_{max}$  cuanto más alta es la concentración de etanol. Ya a una concentración de etanol del 1% se observa como la señal disminuye un 20%, llegando a perderse el 80% de la señal cuando se alcanzan concentraciones de etanol del 10%. Esto es negativo para el ensayo, ya que significa que la presencia de este disolvente en las muestras (por ejemplo, en vino) afecta significativamente a la señal obtenida en este ensayo, dificultando la detección de los analitos si hay etanol.

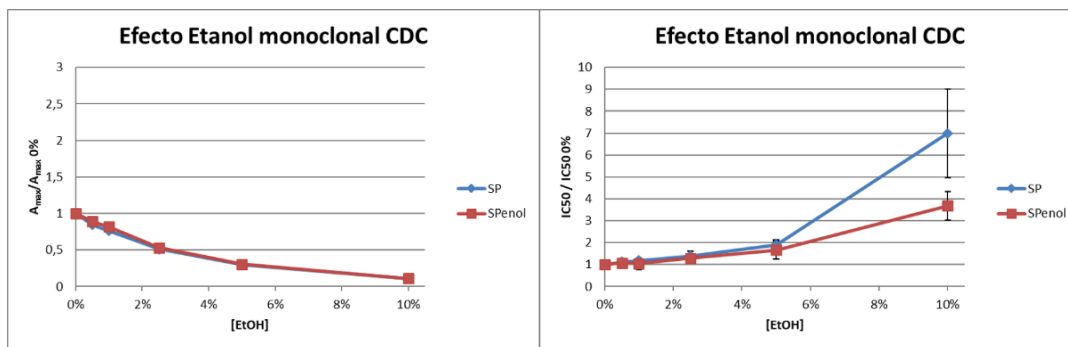
En cuanto a la  $IC_{50}$ , en el ensayo directo afecta bastante, ya que conforme aumenta la concentración de etanol se observa un crecimiento de la  $IC_{50}$  para ambos analitos, pero más destacable en el caso de SP, donde llega a valores de entre 10 y 14 veces superior. Este resultado ha provocado que se tenga que aumentar la escala de las gráficas de  $IC_{50}$  en este estudio, para poder comparar el resultado en todos los formatos al estar la gráfica en la misma escala.



**Figura 17.** Efecto del etanol en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Directo de Captura (CDC)

Los resultados son análogos a los del formato Directo, lo que es lógico ya que es una variante del formato Directo, observándose un comportamiento parecido tanto de la  $A_{max}$  como de la  $IC_{50}$  frente a las distintas concentraciones de etanol para los dos analitos (Figura 18).

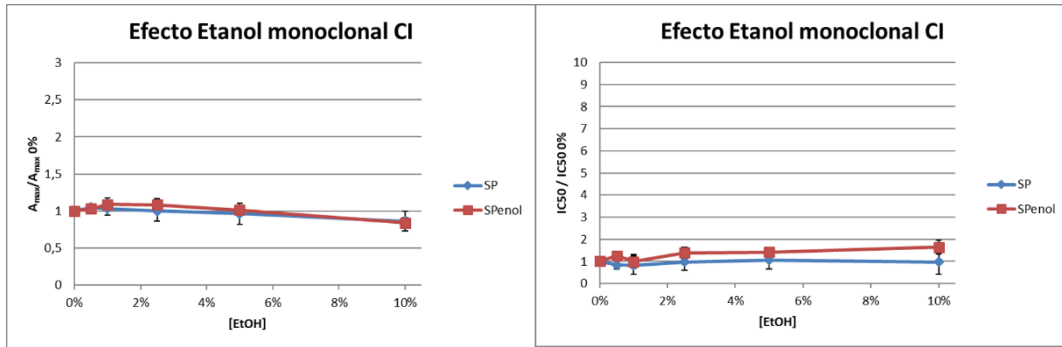


**Figura 18.** Efecto del etanol en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Indirecto (CI)

Este ensayo es bastante robusto, ya que los resultados obtenidos no varían tanto como en los formatos anteriores. Sobre la  $A_{max}$ , no varía significativamente al aumentar la concentración de etanol, observándose que llega a perder el 20% de señal ya cuando hay un 10% de etanol (Figura 19).

En cambio, se observa que la evolución de la  $IC_{50}$  en función de la concentración de etanol varía para los dos analitos. En el caso de SP, no hay variación. En el caso de SP-enol, la curva tiende a aumentar, y esto significa que el ensayo pierde sensibilidad por el analito.



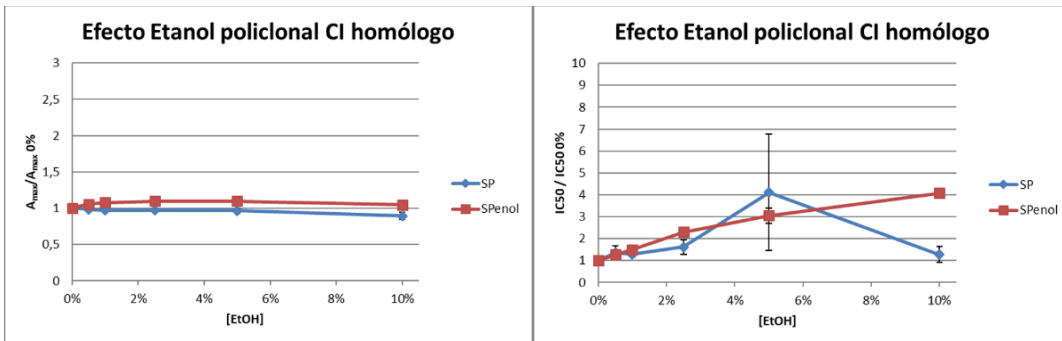
**Figura 19.** Efecto del etanol en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

Se puede explicar que la variación de  $A_{max}$  sea mayor en el CD y CDC que en CI debido a que el etanol puede afectar al grupo hemo del trazador, ya que se encuentran en contacto en ambos formatos. En cambio, en el CI la enzima no está en contacto con el etanol porque se realiza un lavado intermedio; lo que está en contacto con el etanol es el anticuerpo y el conjugado inmovilizado, que son más resistentes.

#### Ensayos con anticuerpos policlonales

- Formato Indirecto homólogo

La  $A_{max}$  es bastante estable ya que no llega a variar ni un 20% a una concentración de 10% de etanol, lo que es bueno para el ensayo. En cambio, la  $IC_{50}$  aumenta para ambos analitos al aumentar la concentración de etanol, siendo la subida de  $IC_{50}$  muy leve para el SP y bastante más destacada para SP-enol. El pico observado en el valor de  $IC_{50}$  de SP a 5% de etanol podría tratarse de un error experimental (Figura 20).



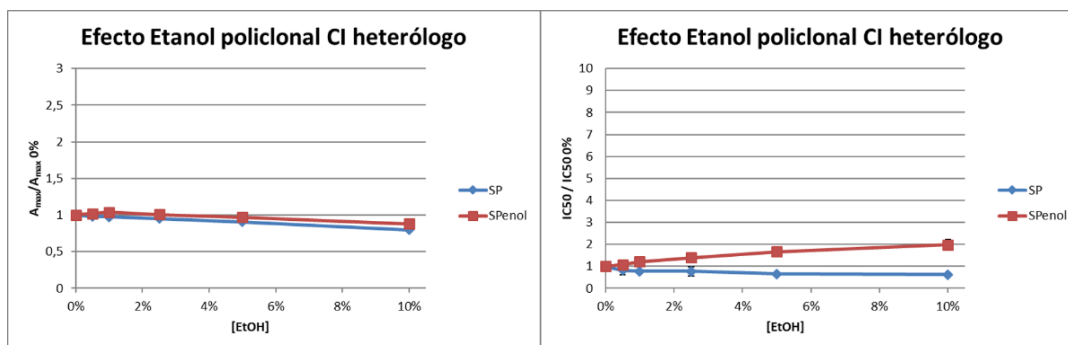
**Figura 20.** Efecto del etanol en el formato CI homólogo con anticuerpos policlonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Indirecto heterólogo

La evolución de  $A_{max}$  se parece considerablemente al ensayo del formato homólogo, manteniéndose muy estable a pesar de variar la concentración de etanol. En la Figura 21 se aprecia una ligera disminución de la señal a concentraciones de etanol altas.

La evolución de la  $IC_{50}$  también se parece al resultado del formato homólogo, pero en el caso del SP-enol, la  $IC_{50}$  aumenta pero no tanto, llegando a duplicarse aproximadamente a una

concentración de etanol de 10%. Los valores de IC<sub>50</sub> para el SP se mantienen cercanos a los obtenidos sin etanol, mostrando que el etanol no perjudica al analito SP, sino que le favorece.



**Figura 21.** Efecto del etanol en el formato CI heterólogo con anticuerpos policlonales: variación de la A<sub>max</sub> (izquierda) y variación de la IC<sub>50</sub> (derecha).

#### 4.4 Estudio del efecto matriz de vino blanco y vino tinto

El último estudio se realizó para evaluar la influencia de dos matrices alimentarias en la detección del SP y SP-enol. El estudio de una matriz alimentaria es mucho más complejo que el estudio de otro parámetro fisicoquímico como puede ser el pH o la fuerza iónica, ya que pueden influir más factores en los resultados obtenidos. Se estudió el vino blanco y el vino tinto, para ver el efecto de los distintos componentes de su composición en la detección del SP y SP-enol.

Se prepararon distintas diluciones de cada matriz en agua MilliQ, a  $\frac{1}{2,5}$ ,  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{50}$  y 0. El valor de referencia, al igual que en el estudio del etanol, es la muestra sin matriz, que se considera el blanco, y que tiene un valor de 1 en todas las gráficas del estudio.

Se prepararon las disoluciones patrón de SP y SP-enol en la matriz diluida mientras que el trazador enzimático en los ensayos CD y CDC o el anticuerpo en los ensayos CI se prepararon en tampón de ensayo.

Los anticuerpos estudiados reconocen mejor a SP-enol que a SP. Esto se debe a que cuando se obtuvo los anticuerpos, probablemente se hidrolizó el grupo carbonato del SP al ser muy lábil y los anticuerpos se formaron contra SP-enol, o sea, el hidrolizado de SP. Dado que es necesario realizar un ensayo que pueda medir ambos analitos a la vez, dando un único valor final, los vinos reciben algunos tratamientos para transformar todo el SP en SP-enol. Este tratamiento es una hidrólisis, donde el SP se transforma en SP-enol permitiendo realizar una única medida de la cantidad de plaguicida presente en el alimento. Por esta razón, los ensayos realizados para este estudio han incluido una etapa de hidrólisis de los analitos, replicando el tratamiento que reciben los alimentos para su análisis.

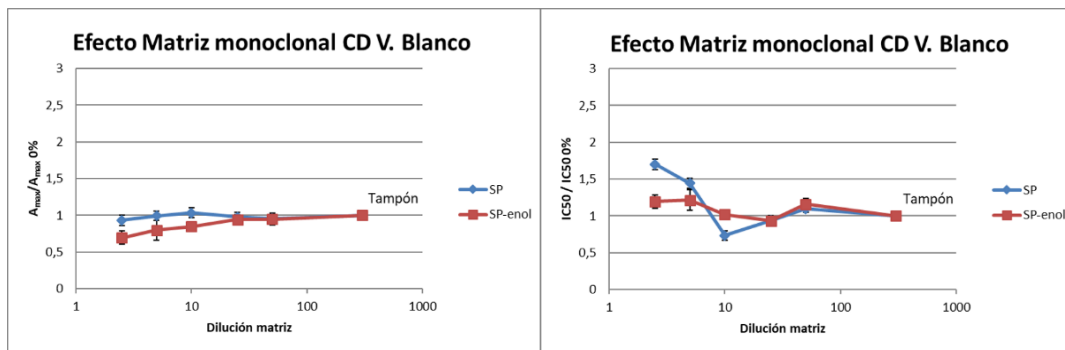
Se realizaron ensayos de los tres formatos con anticuerpos monoclonales, tanto para la matriz de vino blanco como para la de vino tinto.

## Ensayos con anticuerpos monoclonales

1. Vino blanco
  - Formato Directo (CD)

Sobre la variación de la  $A_{max}$ , en la [Figura 22](#) se observa cómo baja ligeramente la señal conforme la dilución de vino es más pequeña, o sea, cuanto más matriz hay. Cuando la dilución es de  $\frac{1}{2,5}$ , la variación de la  $A_{max}$  llega a ser del 20%.

Respecto a la  $IC_{50}$ , se puede ver que para ambos analitos se mantiene relativamente constante hasta una dilución de matriz de 1/10, mientras que a diluciones menores la  $IC_{50}$  aumenta hasta multiplicarse por más de 1.5 en el caso del SP, manteniéndose más estable para el SP-enol. No es un aumento demasiado grande de la  $IC_{50}$ , por lo que es interesante para los ensayos.

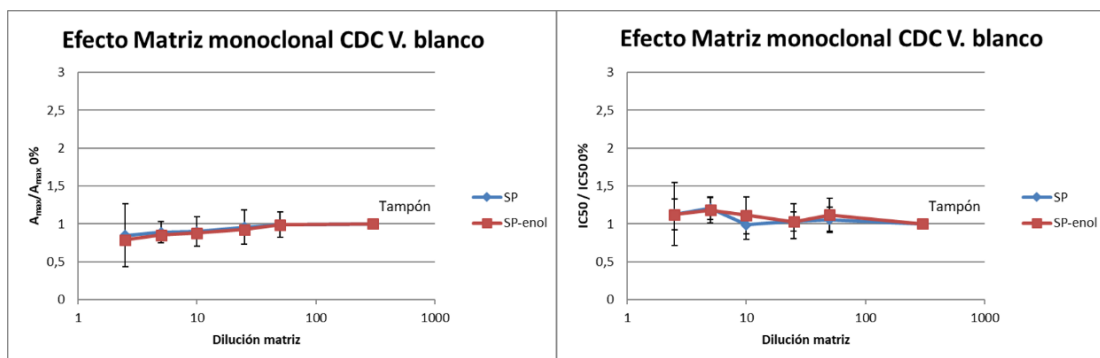


**Figura 22.** Efecto de la matriz vino blanco en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Directo de Captura (CDC)

Se puede observar cómo en este formato la  $A_{max}$  varía como en el anterior, perdiendo solamente hasta un 20% de señal cuando la dilución de matriz es  $\frac{1}{2,5}$ .

Para la  $IC_{50}$  ocurre lo mismo, para ambos analitos se mantienen los valores constantes a cualquier dilución de vino blanco, aumentando ligeramente a partir de diluciones de  $\frac{1}{5}$  y menos diluidas ([Figura 23](#)).

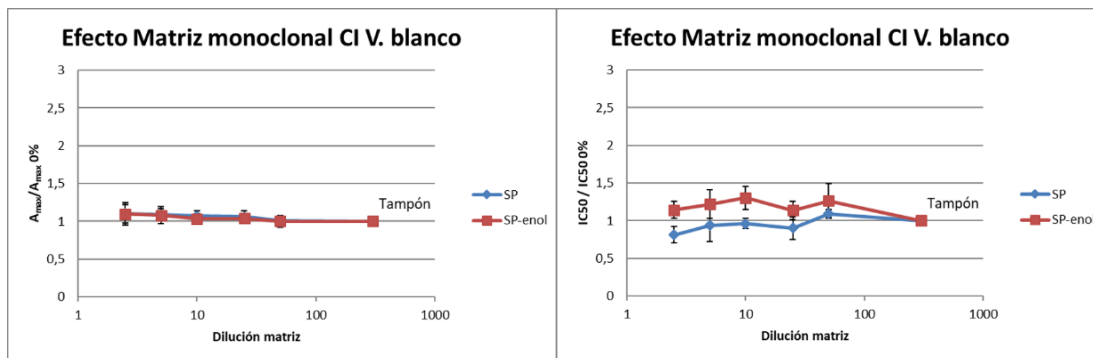


**Figura 23.** Efecto de la matriz vino blanco en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Indirecto (CI)

La  $A_{max}$  no varía prácticamente nada con las distintas diluciones de matriz, demostrando mucha robustez, e incluso aumentando un poco la señal si hay más matriz, cosa que es beneficiosa para el ensayo (Figura 24).

La  $IC_{50}$  tiene un comportamiento distinto para los dos analitos. La de SP-enol es mayor en presencia de matriz mientras que la de SP varía poco.



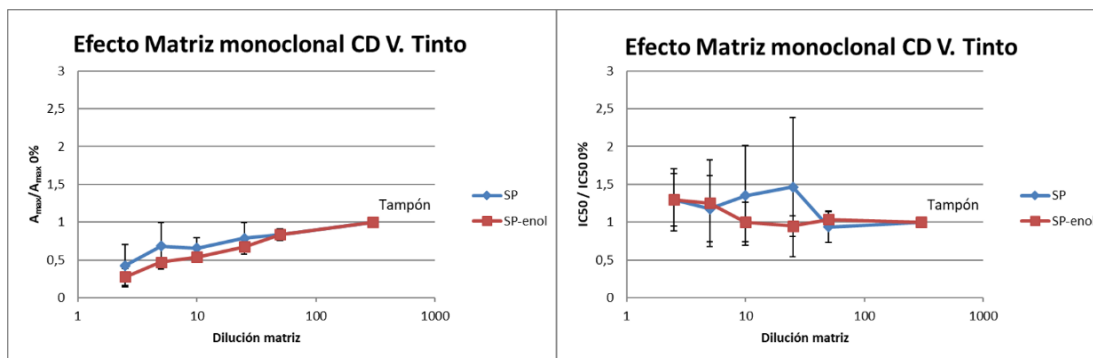
**Figura 24.** Efecto de la matriz vino blanco en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

## 2. Vino tinto

- Formato Directo (CD)

Por una parte, la variación de  $A_{max}$  es más grande en el vino tinto que en vino blanco, como se puede apreciar en la Figura 25, llegando a bajar la señal al 50% cuando se llega a la muestra con más matriz. Esto es muy negativo para el estudio, ya que se demuestra que la matriz analizada afecta significativamente a la obtención de señal, y habrá que tenerlo en cuenta a la hora de realizar la detección de SP y SP-enol en esta matriz.

Por otra parte, la  $IC_{50}$  se ve afectada cuando la dilución es baja. Sí que se puede observar un aumento de casi el 50% en ambos analitos cuando se llega a una dilución más pequeña de matriz, la de  $\frac{1}{2,5}$ . La desviación en las medidas de la  $IC_{50}$  de SP hace difícil determinar la dilución óptima.



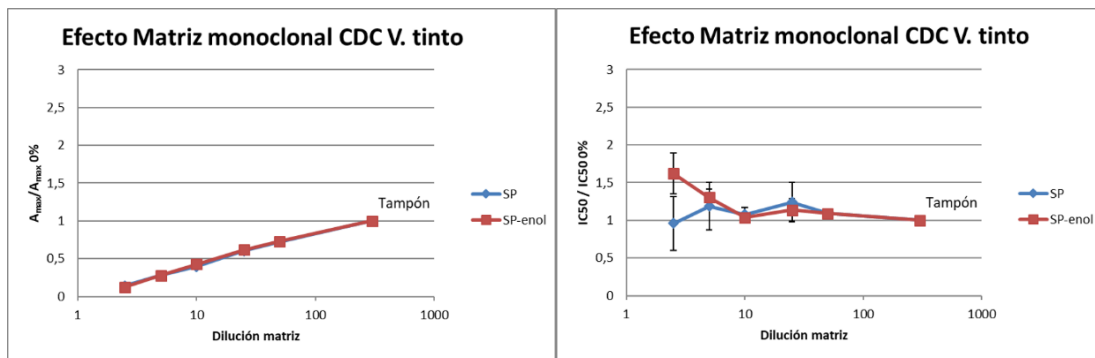
**Figura 25.** Efecto de la matriz vino tinto en el formato CD con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).



- Formato Directo de Captura (CDC)

La variación de la  $A_{max}$  en el vino tinto es abrumadora, hay un efecto muy notable de la matriz sobre la señal, ya que desde diluciones de  $\frac{1}{10}$ , la señal de ambos analitos ya disminuye un 60%, llegando a perderse un 80% de señal cuando la dilución es  $\frac{1}{2,5}$ . Esto da que pensar que al menos, en el vino tinto, será complicada la detección de SP y SP-enol mediante la utilización de estos formatos, y quizá haya que buscar una alternativa más eficiente.

En cuanto a la  $IC_{50}$ , en la [Figura 26](#) se ve cómo el SP-enol aumenta poco a poco hasta alcanzar el 160% en la dilución menor de vino tinto. En cambio, para SP la  $IC_{50}$  se mantiene relativamente constante, experimentando una bajada mínima al llegar a dilución de matriz de  $\frac{1}{2,5}$ .

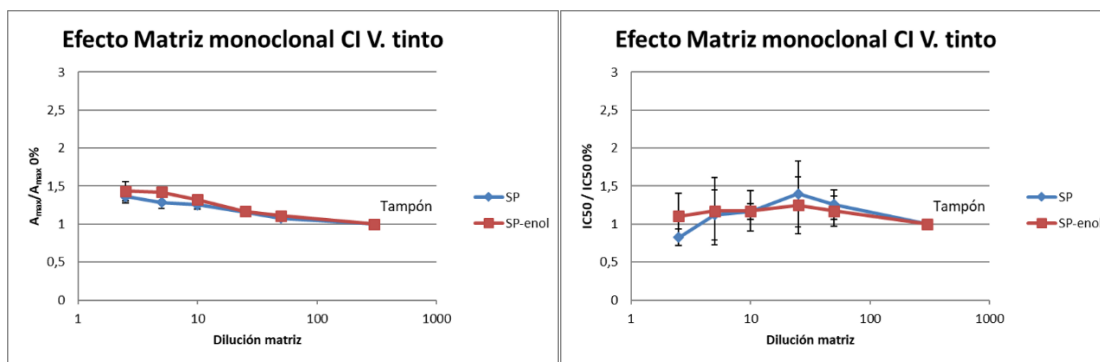


**Figura 26.** Efecto de la matriz vino tinto en el formato CDC con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

- Formato Indirecto (CI)

Respecto a la  $A_{max}$ , se observa un aumento de hasta un 40% a la dilución de matriz de  $\frac{1}{2,5}$ . Esto es positivo para el ensayo, en algunos casos donde el ensayo dé poca señal, se podría utilizar el formato indirecto para aumentarla ([Figura 27](#)).

En cuanto a la  $IC_{50}$ , el SP-enol aumenta ligeramente hasta un valor de 1,2 veces al llegar a la dilución  $\frac{1}{5}$ , y baja de nuevo hasta un valor de 1,1 veces en la dilución  $\frac{1}{2,5}$ . En cambio, el analito SP se comporta de manera distinta, reduciéndose más la  $IC_{50}$ , ya que a una dilución de  $\frac{1}{2,5}$  llega a bajar hasta valores de 0,8 veces.



**Figura 27.** Efecto de la matriz vino tinto en el formato CI con anticuerpos monoclonales: variación de la  $A_{max}$  (izquierda) y variación de la  $IC_{50}$  (derecha).

Finalmente, se puede resumir diciendo que el vino tinto tiene mayor influencia sobre la  $A_{max}$  y también la  $IC_{50}$  que el vino blanco, el cual se mantiene bastante firme y robusto con valores cercanos al de referencia. También se puede apreciar que el formato indirecto ha demostrado ser el más estable para ambas matrices, donde en ningún ensayo se producen variaciones de más del 50%.

## 5. CONCLUSIONES

Tras acabar todos los estudios, se pueden sacar una serie de conclusiones analizando los resultados obtenidos en cada ensayo, comparando los formatos y teniendo una visión más global de cada estudio realizado.

La influencia del pH sobre la detección del plaguicida SP y su derivado SP-enol ha resultado ser mínima tanto en los ensayos con monoclonales como con policlonales. La variación del pH en los ensayos no ha afectado significativamente a la señal y a la  $IC_{50}$  para ninguno de los dos analitos.

Los cambios de la fuerza iónica modifican los parámetros analíticos de los ensayos en los formatos CD y CDC mientras que el ensayo en formato CI es más resistente. Los resultados con los ensayos en formato CI fueron semejantes tanto con anticuerpos monoclonales como con policlonales.

El estudio de la influencia del etanol se puede concluir remarcando que este disolvente ejerce una influencia muy negativa en la detección de los analitos SP y SP-enol. Al aumentar la concentración de etanol, a partir de 2% de etanol, disminuye la señal obtenida en todos los formatos, especialmente en CD y CDC. Por el contrario, la  $IC_{50}$  aumenta notablemente, demostrando que la presencia del etanol en el ensayo perjudica los resultados obtenidos.

Tras realizar los estudios con tampones, se llegó a la conclusión de que los anticuerpos monoclonales daban mejores resultados que los policlonales.

El último estudio realizado, el de la influencia de dos matrices alimentarias en la detección del SP y SP-enol, dio los resultados esperados tanto para vino blanco como para tinto. Se esperaba que el vino tinto fuera más problemático, ya que está compuesto por una matriz más

compleja, lleva muchos taninos que pueden interferir con el anticuerpo y por eso se producen variaciones importantes en esta matriz, bastante mayores que en el vino blanco. Mientras que la presencia del vino blanco en el ensayo produjo una ligera pérdida de señal y variaciones no significativas en la IC<sub>50</sub>, la presencia de vino tinto en el ensayo produjo una caída más notable de la señal, y mayores variaciones de la IC<sub>50</sub>. Se puede finalizar este estudio diciendo que para el vino tinto el único formato aceptable para la detección de SP y SP-enol ha sido el indirecto.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- RAMÍREZ, J. A., & LACASAÑA, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos Prevención Riesgos Laborales*, 4(2), 67-75.
- GARCÉS GARCÍA, M. (2008). Inmunoensayos rápidos para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva (Tesis Doctoral).
- DANKWARDT, A. (2006). Immunochemical assays in pesticide analysis. En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, Ed. Robert A. Meyers. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 1-27.
- European Commission. Commission Regulation (EC) No 822/2009 of 27 August 2009. (2009). *Official Journal of the European Union*, L239, 5.
- TORRES, d., & CAPOTE, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista Ecosistemas*, 13(3).
- PONCE, G., CANTÚ, P. C., FLORES, A., BADII, M., ZAPATA, R., LÓPEZ, B., & FERNÁNDEZ, I. (2006). Modo de acción de los insecticidas. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(4), 1-3.
- CÉSPEDES, M., GLENNY, M., FELICES, V., BALDA, L., & SUÁREZ, V. (2002). Prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19(1), 24-27.
- LEPORI, E. C. V., MITRE, G. B., & NASSETTA, M. (2013). Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 25-43.
- RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, H., PUPO ANTÚNEZ, M., ILNAIT, M. T., OTERO, A., & MARTÍNEZ MACHÍN, G. (2005). Anticuerpos monoclonales que reconocen al polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 57(2), 162-164.
- NAUEN, R., RECKMANN, U., THOMZIK, J., & THIELERT, W. (2008). Biological profile of spirotetramat (Movento®)—a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer CropScience Journal*, 61(2), 245-278.
- CEVALLOS-CEDEÑO, R. E., AGULLÓ, C., ABAD-SOMOVILLA, A., ABAD-FUENTES, A. & MERCADER, J. V. (2018). Hapten Design and Antibody Generation for Immunoanalysis of Spirotetramat and Spirotetramat-enol. *ACS Omega*, 3, 11950-11957.

- PLANES, L., CATALÁN, J., TENA, A., PORCUNA, J. L., JACAS, J. A., IZQUIERDO, J., & URBANEJA, A. (2013). Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. *Journal of Pest Science*, 86(2), 321-327.
- GUZMÁN-VÁZQUEZ, E. (2004). Las pruebas de ELISA. *Gac. Med. Mex.*, 140(3), 48-49.
- CEBALLOS-ALCANTARILLA, E. (2017). Desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis en alimentos de fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa (Tesis Doctoral).
- DEL PUERTO RODRÍGUEZ, A. M., ZUÁREZ TAMAYO, S., & PALACIO ESTRADA, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.
- FERRER, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. En *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 26, pp. 155-171). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- JÁQUEZ MATAS, S. V. (2013). Comportamiento de plaguicidas persistentes en el medio ambiente. *Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango*.