



Desarrollo de métodos inmunoquímicos para la determinación de sustancias tóxicas en alimentos y aguas

Programa de Doctorado en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria (RD 99/2011)

Tesis Doctoral presentada por

Ramón E. Cevallos Cedeño

Dirigida por

Dr. Josep Vicent Mercader Badia

Valencia, abril de 2020

Dr. Josep Vicent Mercader Badia, Científico Titular de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) de València,

HACE CONSTAR QUE

el trabajo de investigación “Desarrollo de métodos inmunoquímicos para la determinación de sustancias tóxicas en alimentos y aguas” que presenta D. Ramón E. Cevallos Cedeño por la Universitat Politècnica de València, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria del IATA-CSIC para optar al grado de Doctor.

Valencia, abril 2020

Dr. Josep Vicent Mercader Badia

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi mayor agradecimiento a todas las personas e instituciones públicas que han formado parte de este trabajo y sobre todo porque me dieron la oportunidad para formarme en esta noble aventura que conllevó a la realización de la presente tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mi esposa María Eugenia y a mis hijos Eduardo Juskie y Dulce María. Gracias de todo corazón por estar a mi lado en todo momento y en las múltiples circunstancias durante estos cuatro años, siendo mi mayor fuerza de superación para llegar a la meta. Sin ellos hubiera sido muy difícil ya que con todas las experiencias, aprendimos a sobrellevar cada uno de las situaciones complicadas, principalmente y sobre todo de la mejor manera demostrando madurez emocional y tranquilidad frente a las adversidades. Acontecimiento muy marcado por el nacimiento extremadamente prematura de nuestra hija Dulce María, que al final y, con mucha paciencia tuvimos el carácter para afrontar.

A mis padres Wilvio Ramón y Angélica Alicia, gracias por darme la vida y sobre todo porque han estado muy pendiente en todo momento, por sus principios y confianza que tenemos mutuamente como unos grandes amigos. Asimismo, quiero agradecer a mis hermanas María Dolores, María Isabel y Rosangela Lisette, mis sobrinos Michael, Mateo y Valentina, por apoyarme y estando pendientes todo este tiempo desde nuestra linda y esperanzadora América.

A mi abuelito Ramón que aunque te fuiste antes de nuestro retorno te llevaremos en lo más profundo del corazón. Gracias a su ejemplo de padre, esposo, persona y amigo, nos dejó un gran legado. Te echaremos mucho de menos y más aún cuando volvamos pero estamos seguros y tranquilos que estarás muy bien acompañado de tu esposa.

A mi primo Walter Cevallos y su esposa Aide, sus hijas Valeria y Jossely por su atención y apoyo brindado a mis padres durante todo este tiempo en mi ausencia. De igual manera por estar pendiente constantemente de todos nosotros. Te aprecio mucho primo; son un gran ejemplo de seres humanos y padres.

A mis padrinos de boda Juan Luís Lucas y Betty Johanna Reina, por su apoyo incondicional en la beca, su confianza e íntegra amistad que guardamos por muchos años han demostrado ser mis mejores amigos.

A mi suegra Mariana y su esposo Don Néilson Cortazar, así como también a la Sra. Urania Rosado que desde el primer día que estuvimos fuera de nuestro país, estuvieron allí para hacernos una llamada de aliento y sobre todo de saber cómo nos encontrábamos.

A Jovi, por todos sus conocimientos y tiempo entregado durante estos cuatro años dedicados muy puntualmente y con los detalles que representa una verdadera dirección, sobre todo cuando las cosas parecían no tener un norte y donde demostró claramente su experiencia como científico, aunque en ocasiones me decía NO SE QUE DECIRTE, pero que luego de darle vueltas y más vueltas al problema, siempre encontrabas la solución.

A mi tutora María Isabel Hernando Hernando que junto con Jovi llevaron una gran armonía de trabajo en cada etapa de mi tesis doctoral pudiendo avanzar progresivamente. Gracias Isabel por tu apoyo y optimismo para cumplir de la mejor manera el trabajo.

A Antonio Abad Fuentes que de manera muy cautelosa contribuyó en este trabajo estableciendo una acertada comunicación con Jovi y sobre todo por estar pendiente de todo lo que necesitaba en el laboratorio para no parar el trabajo experimental.

A Antonio Abad Somovilla y a Consuelo Agulló Blanes, personas muy dedicadas al trabajo en conjunto sobre la temática de todo lo realizado en el departamento de química orgánica de la Universitat de València siendo su trabajo el punto de partida en esta tesis.

A Vicenta Devesa por esa calidad de persona y humildad donde muchas veces conversamos de la familia, amigos y demás compartiendo experiencias y sobre todo porque tuvo la voluntad en buscar un laboratorio para mi estancia en el IATA-CSIC. Gracias a ella estuve en esta aventura.

A Dinoraz Vélez científica compañera de trabajo de Vicenta que de igual manera cuando las visitaba en su laboratorio o nos encontrábamos por algún lugar del centro siempre hablábamos unos cuantos minutos. A estas dos grandes científicas y sobre todo personas, un agradecimiento muy especial por ser tan desinteresadas pero lo más importante voluntarias en muchos aspectos de su trabajo.

A los hermanos Carlos Alberto y Felipe Arturo Jadán Piedra al ser el primer nexo para iniciar este largo y bonito camino de una mi estancia de estudios de doctorado. Gracias a ellos escogí España y en concreto la Universitat Politècnica de València así como la institución donde realicé mi trabajo pudiendo compartir experiencias y compañerismo.

A mis compañeros de laboratorio por guiarme desde el primer día y durante todos estos años de mi tesis doctoral. A Eric, Jennifer, Daniel, Hadyn y sobre todo a Paula Peña que fue a quien más la molesté con mis dudas y preguntas y que siempre me aclaraba a la hora de realizar los ensayos, además de dar alegría y positivismo a todos en cada momento. De igual manera quiero agradecer a José Gimeno, que a pesar del poco tiempo que coincidimos en el laboratorio, mostró la mayor voluntad y sobre todo ayuda en la parte final de mi tesis doctoral.

A todos los que realizaron prácticas en el laboratorio y que han formado parte en la armonía del grupo. Muy agradecido por tan valiosa colaboración y más allá de aquello por haber compartido unos meses de sus vidas y trabajo. Con mucho cariño hacia ellos: Irene, Alba, Sara, Teresa, Christian y Tania.

A la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), del gobierno de la República de Ecuador que al adjudicarme la beca bajo el “PROGRAMA DE BECAS PARA DOCTORADO (PHD) PARA DOCENTES DE UNIVERSIDADES Y DE ESCUELAS POLITÉCNICAS 2015”, permitió formarme como persona y profesional en mis estudios de doctorado.

A la Universidad Técnica de Manabí (U.T.M.), institución a la que pertenezco y apoyó para poder cursar mis estudios de doctorado, de manera muy especial al señor rector Ing. Vicente Véliz Briones PHD y al Ing. Emilio Cedeño Palma, director del Departamento de Relaciones Internacionales convenios y becas, quienes estuvieron pendiente de mi trabajo desde su despacho y fuera del mismo.

Por último y de manera muy cariñosa, a la Universitat Politècnica de València (UPV) e Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), por darme la oportunidad en formar parte y por acogerme durante estos años, instituciones de gran prestigio y sobre todo de referencia en España y el mundo.

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis doctoral es el estudio, desarrollo y validación de diferentes métodos inmunoquímicos que permitan determinar contaminantes químicos en alimentos de origen vegetal y en agua, de manera que contribuyan a mejorar su calidad y por ende la seguridad del consumidor.

Spirotetramat es un plaguicida de nueva generación altamente eficiente, comercializado mundialmente para su uso como insecticida en multitud de cultivos agrícolas. Tiene propiedades sistémicas, ya que después de la absorción se transloca tanto a través del xilema como del floema, gracias a que es transformado por la planta en spirotetramat-enol, mucho más polar. En consecuencia, la definición de residuo de este insecticida en alimentos de origen vegetal para fines analíticos incluye también dicho metabolito. Por otro lado, anatoxina-a es un alcaloide secundario con neurotoxicidad aguda que se pueden encontrar en agua dulce. Esta toxina es producida por siete géneros diferentes de cianobacterias, y se ha detectado en lagos y otras fuentes de agua de todos los continentes.

El análisis de sustancias como spirotetramat y anatoxina-a se lleva a cabo actualmente mediante métodos cromatográficos como HPLC-MS. Estas técnicas presentan una elevada sensibilidad y fiabilidad; sin embargo, requieren personal altamente cualificado y un equipamiento caro y no portable. Una opción complementaria son los métodos inmunoquímicos, como el ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) o el inmunoensayo de flujo lateral (LFIA, *Lateral Flow ImmunoAssay*), ya que son métodos de análisis rápidos y económicos, y además son muy versátiles permitiendo adaptarlos a necesidades analíticas particulares, como los ensayos de cribado de numerosas muestras o los ensayos portátiles con lectura visual de los resultados.

A partir de una colección de bioconjugados y de anticuerpos de spirotetramat y de anatoxina-a se caracterizó la afinidad y especificidad de los inmunorreactivos con el fin de seleccionar parejas conjugado/anticuerpo aptas para el desarrollo de inmunoensayos tipo ELISA y LFIA competitivos. Se optimizaron las condiciones de ensayo, y se llevó a cabo un estudio de la influencia de diferentes factores fisicoquímicos sobre los parámetros analíticos de los ensayos seleccionados. Posteriormente se evaluó la influencia de la matriz alimentaria, particularmente uva, zumo de uva y vino, así como de aguas de diferente procedencia, sobre la señal y la sensibilidad de los inmunoensayos.

La diferente afinidad de los anticuerpos hacia spirotetramat y spirotetramat-enol nos llevó a optimizar el tratamiento de muestra, incluyendo una etapa de hidrólisis para transformar spirotetramat en spirotetramat-enol de manera controlada, rápida y cuantitativa. De este modo se hizo posible aportar resultados en forma de suma de la concentración de ambos compuestos en la muestra, tal y como exige la legislación vigente. Además, para la extracción de residuos de este insecticida a partir de muestras de uva se puso a punto un procedimiento empleando la tecnología QuEChERS, y para la reducción de interferencias de vinos y zumos se utilizó polivinilpolipirrolidona. En el caso de las aguas, se aplicó una simple filtración para eliminar partículas en suspensión.

Los inmunoensayos enzimáticos en microplaca optimizados para determinar de manera competitiva residuos de spirotetramat presentaron valores de IC_{50} para spirotetramat-enol en torno a 0.1 ng/mL, y límites de detección alrededor de 0.02 ng/mL. El estudio de la precisión y exactitud del método empleando muestras de alimentos dopados reflejó límites de cuantificación de 2.5 ng/mL para uva, zumos de uva y vinos, tanto blancos como tintos, muy por debajo de los límites máximos de residuos autorizados en la Unión Europea para este insecticida en dichos alimentos. Finalmente, un estudio comparativo con HPLC-MS/MS validó el inmunoensayo estudiado para el análisis de residuos de spirotetramat en muestras de uva en un amplio rango de concentraciones. En el caso de anatoxina-a, se optimizaron dos inmunoensayos tipo ELISA competitivo, cuyos valores de IC_{50} estuvieron entre 0.5 y 1.0 ng/mL, con límites de detección por debajo de 0.1 ng/mL. El análisis de diferentes tipos de aguas fortificadas con anatoxina-a reveló que los inmunoensayos desarrollados permiten la cuantificación de esta cianotoxina entre 0.5 y 500 ng/mL.

Adicionalmente se optimizaron y caracterizaron ensayos inmunocromatográficos tipo tiras reactivas, tanto para spirotetramat como para anatoxina-a, válidos como técnicas portables y rápidas para la determinación semi-cuantitativa de estas sustancias tóxicas en vino y aguas, respectivamente. Siguiendo la normativa europea para métodos de análisis rápidos frente a pequeñas moléculas orgánicas, se determinó la señal umbral para discernir las muestras positivas, que superan la concentración de cribado establecida, de las negativas. En el caso de spirotetramat, el método desarrollado permite el cribado, tanto instrumental como visual, con un intervalo de confianza del 99%, de muestras de vino a una concentración de spirotetramat más spirotetramat-enol de 1000 ng/mL, equivalente al límite máximo de residuos. Para anatoxina-a, las tiras inmunocromatográficas desarrolladas pudieron detectar muestras de agua con 2 ng/mL de dicha cianotoxina con una fiabilidad del 99%, y muestras con 1 ng/mL con una probabilidad del 40%, mientras que el límite de detección visual fue de 3 ng/mL.

RESUM

L'objectiu de la present tesi doctoral és l'estudi, desenvolupament i validació de diferents mètodes immunoquímics que permeten determinar contaminants químics en aliments d'origen vegetal i en aigua, de manera que contribuïsquen a millorar la seua qualitat i per tant la seguretat dels consumidors.

Spirotetramat és un plaguicida de nova generació altament eficient, comercialitzat mundialment per a l'ús com insecticida en multitud de cultius agrícoles. Té propietats sistèmiques, ja que en ser absorbit es transloca tant a través del xilema com del floema, gràcies a que és transformat per la planta en spirotetramat-enol, molt més polar. Conseqüentment, la definició de residu d'aquest insecticida en aliments d'origen vegetal amb finalitats analítiques inclou també l'esmentat metabòlit. D'una altra banda, anatoxina-a és un alcaloide secundari amb neurotoxicitat aguda que es pot trobar en aigua dolça. Aquesta toxina és produïda per set gèneres de cianobacteris diferents, i s'ha detectat en llacs i altres fonts d'aigua de tots els continents.

L'anàlisi de substàncies com spirotetramat i anatoxina-a es duu a terme actualment mitjançant mètodes cromatogràfics, com HPLC-MS. Aquestes tècniques presenten una elevada sensibilitat i fiabilitat; tanmateix, requereixen personal altament qualificat i un equipament car i no portable. Una opció complementària són els mètodes immunoquímics, com l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) o l'immunoassaig de flux lateral (LFIA, Lateral Flow Immunoassay), ja que són mètodes d'anàlisi ràpids i econòmics, i a més són molt versàtils, la qual cosa permet adaptar-los a necessitats analítiques particulars, com són els assaigs per destriar nombroses mostres o els assaigs portàtils amb lectura visual dels resultats.

A partir d'una col·lecció de bioconjugats i d'anticossos de spirotetramat i d'anatoxina-a es va caracteritzar l'afinitat i especificitat dels immunorreactius amb la finalitat de seleccionar parelles conjugat/anticòs aptes per desenvolupar immunoassaigs tipus ELISA i LFIA competitiu. S'optimitzaren les condicions d'assaig, i es va dur a terme un estudi de la influència de diferents factors fisicoquímics sobre els paràmetres analítics dels assaigs seleccionats. Posteriorment, es va avaluar la influència de la matriu alimentària, particularment raïm, suc de raïm i vi, així com d'aigües de diferent procedència, sobre el senyal i la sensibilitat dels assaigs.

La diferent afinitat dels anticossos cap a spirotetramat i spirotetramat-enol ens va dur a optimitzar el tractament de mostra mitjançant la inclusió d'una etapa d'hidròlisi per

transformar spirotetramat en spirotetramat-enol de manera ràpida, controlada i quantitativa. D'aquesta manera es va fer possible aportar resultats en forma de suma de la concentració d'ambdós composts en la mostra, tal i com exigeix la legislació vigent. A més a més, per extraure residus d'aquest insecticida a partir de mostres de raïm es va posar a punt un procediment emprant la tecnologia QuEChERS, i per reduir interferències de vins i sucs es va utilitzar polivinilpolipirrolidona. En el cas de les aigües, es va aplicar una simple filtració per eliminar partícules en suspensió.

Els immunoassaigs enzimàtics en microplaca optimitzats per determinar de manera competitiva residus de spirotetramat presentaren valors d' IC_{50} per spirotetramat-enol al voltant de 0.1 ng/mL, i límits de detecció propers a 0.02 ng/mL. L'estudi de la precisió i exactitud del mètode emprant mostres d'aliments dopats va reflectir límits de quantificació de 2.5 ng/mL per raïm, sucs de raïm i vins, tant blancs com negres, molt per sota dels límits màxims de residus autoritzats per la Unió Europea per a aquest insecticida en els esmentats aliments. Finalment, un estudi comparatiu amb HPLC-MS/MS va validar l'immunoassaig estudiat per analitzar residus de spirotetramat en mostres de raïm en un ampli rang de concentracions. En el cas d'anatoxina-a, es van optimitzar dos immunoassaigs tipus ELISA competitiu, els valors d' IC_{50} dels quals van estar entre 0.5 i 1.0 ng/mL, amb límits de detecció per davall de 0.1 ng/mL. L'anàlisi de diferents tipus d'aigües fortificades amb anatoxina-a ens va revelar que els immunoassaigs desenvolupats permeten quantificar aquesta cianotoxina entre 0.5 i 500 ng/mL.

Adicionalment es van optimitzar i caracteritzar assaigs immunocromatogràfics, tipus tires reactives, tant per spirotetramat com per anatoxina-a, vàlids com a tècniques portables i ràpides per determinar semi-quantitativament aquestes substàncies tòxiques en vi i aigües, respectivament. Seguint la normativa europea per a mètodes ràpids front a petites molècules orgàniques, es va determinar el senyal indicatiu del llinard per distingir les mostres positives, que superen la concentració de destriament establerta, de les negatives. En el cas de spirotetramat, el mètode desenvolupat permet el triatge, tant instrumental com visual, amb un interval de confiança del 99%, de mostres de vi amb una concentració de residu de 1000 ng/mL, equivalent al límit màxim de residus, expressada com la suma de spirotetramat més spirotetramat-enol. Per anatoxina-a, les tires immunocromatogràfiques desenvolupades van poder detectar mostres d'aigua amb 2 ng/mL de l'esmentada cianotoxina amb una fiabilitat del 99%, i mostres amb 1 ng/mL amb una probabilitat del 40%, mentre que el límit de detecció visual va ser de 3 ng/mL.

ABSTRACT

The aim of this doctoral thesis is the study, development and validation of different immunochemical methods for determining chemical contaminants in produce and water, in a way that they may contribute to improving food quality and therefore to assure consumer safety.

Spirotetramat is a highly efficient new-generation pesticide, marketed worldwide for use as insecticide in many agricultural crops. It has systemic properties, since short after absorption it translocates through both the xylem and the phloem, thanks to the fact that it is transformed by the plant into the much more polar spirotetramat-enol. Consequently, the residue definition for this insecticide in foods of plant origin with analytical purposes also includes said metabolite. On the other hand, anatoxin-a is a secondary alkaloid with acute neurotoxicity that can be found in fresh water. This toxin is produced by seven different genera of cyanobacteria, and has been detected in lakes and other water resources on all continents.

The analysis of substances like spirotetramat and anatoxin-a is currently carried out by chromatographic methods like HPLC-MS. These techniques are highly sensitive and reliable; however, they require highly qualified personnel and expensive, non-portable equipment. Nowadays, the immunochemical methods, such as the ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) or the LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay), constitute excellent complementary analytical options to instrumental strategies, since they are fast and inexpensive analytical methods, and are also very versatile so they can be adapted to particular analytical needs, such as screening assays for large numbers of samples or portable tests with visual reading of the results.

The antibody affinity and specificity from a collection of spirotetramat and anatoxin-a immunoreagents was characterized in order to select conjugate/antibody pairs suitable for the development of competitive ELISA and LFIA tests. The assay conditions were optimized, and a study of the influence of different physicochemical factors over the analytical parameters of the selected immunoassays was carried out. Subsequently, the influence of the food matrix, particularly grape, grape juice and wine, as well as water from different sources, over the assay signal and sensitivity was evaluated.

The different affinity of the available antibodies towards spirotetramat and spirotetramat-enol led us to optimize the sample treatment procedure, so a hydrolysis step to transform spirotetramat into spirotetramat-enol in a controlled, rapid and quantitative way, was included. Thus, it was possible to provide results in the form of the sum of the concentration of both compounds in the sample, as required by current legislation. In addition, a procedure

using QuEChERS technology was developed to extract residues of this insecticide from grape samples, and polyvinylpyrrolidone was used to reduce interferences from wines and juices. In the case of waters, a simple filtration was applied to remove suspended particles.

Microplate enzyme immunoassays that were optimized to competitively determine spirotetramat residues showed IC_{50} values for spirotetramat-enol around 0.1 ng/mL, and limits of detection around 0.02 ng/mL. Precision and accuracy studies with these immunoassays using fortified food samples reflected limits of quantification of 2.5 ng/mL for grapes, grape juices and wines, both white and red, well below the maximum residue limits authorized by the European Union for this insecticide in such foodstuffs. Finally, a comparative study with HPLC-MS/MS validated the studied immunoassay for analyzing spirotetramat residues in grape samples within a wide range of concentrations. In the case of anatoxin-a, two competitive ELISA tests were developed, whose IC_{50} values were between 0.5 and 1.0 ng/mL, with limits of detection below 0.1 ng/mL. The analysis of different types of water that had been fortified with anatoxin-a revealed that the developed immunoassays can quantify the target cyanotoxin between 0.5 and 500 ng/mL.

Additionally, immunochromatographic assays were optimized and characterized as dipsticks for portable and rapid semi-quantitative determination of spirotetramat or anatoxin-a in wine or water, respectively. Following the European regulation for rapid screening methods against small organic molecules, the signal cut-off threshold was determined in order to distinguish the positive samples, which exceed the established screening target concentration, from the negative ones. In the case of spirotetramat, the developed method allowed the screening, both instrumentally and visually, of wine samples with a 99% confidence interval at a residue concentration of 1000 ng/mL, which is equivalent to the maximum residue limit, expressed as the sum of spirotetramat plus spirotetramat-enol. For anatoxin-a, the developed immunochromatographic strips were able to detect, with 99% reliability, water samples at 2 ng/mL of said cyanotoxin, and samples with 1 ng/mL with a probability of 40%, while the visual limit of detection was 3 ng/mL.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	8
ABREVIATURAS Y SIGLAS	18
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Residuos agroquímicos en alimentos	22
1.1.1. <i>Los herbicidas</i>	24
1.1.2. <i>Los fungicidas</i>	25
1.1.3. <i>Los insecticidas</i>	25
1.2. Spirotetramat	27
1.2.1. <i>Descripción</i>	27
1.2.2. <i>Características físicoquímicas</i>	27
1.2.3. <i>Toxicidad</i>	28
1.2.4. <i>Spirotetramat-enol y otros metabolitos</i>	29
1.2.5. <i>Usos agroquímicos</i>	30
1.2.6. <i>Legislación</i>	31
1.3. Anatoxina-a	31
1.3.1. <i>Descripción</i>	31
1.3.2. <i>Incidencia</i>	32
1.4. Métodos analíticos instrumentales	34
1.4.1. <i>Determinación de spirotetramat en alimentos</i>	34
1.4.2. <i>Determinación de anatoxina-a en aguas</i>	36
1.5. Métodos inmunoquímicos aplicados al análisis de pequeñas moléculas orgánicas ...	37
1.5.1. <i>Antecedentes históricos</i>	37
1.5.2. <i>Inmunorreactivos</i>	39
1.5.3. <i>Métodos inmunoanalíticos</i>	46
1.6. El inmunoensayo enzimático de adsorción en microplaca	48
1.6.1. <i>El ELISA competitivo</i>	49
1.6.2. <i>Formatos</i>	50
1.6.3. <i>Etapas del desarrollo de un inmunoensayo</i>	54
1.7. La inmunocromatografía de flujo lateral	57
2. OBJETIVOS	61
3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1. Reactivos e instrumentos	63
3.1.1. <i>Reactivos generales</i>	63
3.1.2. <i>Instrumentos</i>	64

3.1.3. Disoluciones y tampones.....	65
3.1.4. Haptenos, bioconjugados y anticuerpos	65
3.1.5. Materiales para los inmunoensayos en microplaca.....	66
3.1.6. Materiales para los inmunoensayos de flujo lateral.....	67
3.1.7. Muestras de alimentos y aguas	67
3.2. Preparación de bioconjugados del hapteno SP_h	68
3.2.1. Preparación del conjugado de BSA	68
3.2.2. Preparación del conjugado de OVA	68
3.2.3. Preparación del conjugado de HRP.....	68
3.3. Procedimientos de ELISA competitivo	69
3.3.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa	69
3.3.2. Formato de anticuerpo de captura con detección directa	69
3.3.3. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta	70
3.4. Caracterización de bioconjugados y anticuerpos	70
3.4.1. Determinación de la carga hapténica de los bioconjugados	70
3.4.2. Isotipación de anticuerpos monoclonales.....	70
3.4.3. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos	71
3.4.4. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos	72
3.5. Caracterización de inmunoensayos en microplaca	72
3.5.1. Optimización de inmunorreactivos y selección de inmunoensayos	72
3.5.2. Determinación de la sensibilidad y selectividad de los inmunoensayos	72
3.5.3. Estudio de la influencia del pH	73
3.5.4. Estudio de la influencia de la fuerza iónica.....	74
3.5.5. Tolerancia a disolventes orgánicos	75
3.6. Procedimiento de hidrólisis de spirotetramat	75
3.6.1. Optimización de las condiciones de hidrólisis	75
3.6.2. Evaluación mediante HPLC-MS/MS	75
3.7. Validación de inmunoensayos en microplaca para spirotetramat	76
3.7.1. Extracción de muestras de uva	76
3.7.2. Estudio del efecto matriz.....	77
3.7.3. Análisis de muestras fortificadas	77
3.7.4. Análisis mediante HPLC-MS/MS.....	78
3.8. Validación de inmunoensayos en microplaca para anatoxina-a	78
3.8.1. Estudio del efecto matriz.....	78
3.8.2. Análisis de muestras fortificadas	79
3.9. Desarrollo de ensayos inmunocromatográficos	79
3.9.1. Preparación de las tiras reactivas	79
3.9.2. Preparación del bioconjugado con oro coloidal.....	80

3.9.3. Optimización de las condiciones de ensayo	80
3.9.4. Validación de los ensayos inmunocromatográficos	81
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
PARTE I. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS PARA SPIROTETRAMAT	83
4.1. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados	83
4.1.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa	84
4.1.2. Formato de anticuerpo de captura con detección directa	85
4.1.3. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta	86
4.2. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos policlonales y la selectividad de los inmunoensayos seleccionados	89
4.3. Caracterización de inmunoensayos tipo ELISA basados en anticuerpos policlonales .	90
4.3.1. Estudio de la influencia del pH	91
4.3.2. Estudio de la influencia de la fuerza iónica	93
4.3.3. Tolerancia a disolventes orgánicos	95
4.3.4. Evaluación del efecto matriz en zumos de uva y vinos	97
4.4. Obtención de conjugados con el hapteno SPh	99
4.5. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados	100
4.5.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa	101
4.5.2. Formato de anticuerpo de captura con detección directa	102
4.5.3. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta	103
4.6. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales y la selectividad de los inmunoensayos seleccionados	104
4.7. Caracterización de inmunoensayos tipo ELISA basados en anticuerpos monoclonales	106
4.7.1. Estudio de la influencia del pH	106
4.7.2. Estudio de la influencia de la fuerza iónica	107
4.7.3. Tolerancia a disolventes orgánicos	109
4.8. Validación de inmunoensayos tipo ELISA basados en anticuerpos monoclonales....	112
4.8.1. Obtención de muestras	112
4.8.2. Estudios para la hidrólisis controlada de spirotetramat	113
4.8.3. Evaluación del efecto matriz de extractos de uva, zumos de uva y vinos	116
4.8.4. Curvas estándar y condiciones óptimas de ensayo	118
4.8.5. Análisis de muestras fortificadas	120
4.8.6. Estudio comparativo con HPLC-MS/MS usando muestras ciegas	123
4.9. Desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral	125
4.9.1. Preparación de las tiras inmunorreactivas y del anticuerpo marcado con oro coloidal	125

4.9.2. Optimización del ensayo	125
4.9.3. Validación con muestras de vino	130
PARTE II. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS PARA ANATOXINA-A	138
4.10. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados.....	138
4.10.1. Formato de anticuerpo inmovilizado y anticuerpo de captura con detección directa	138
4.10.2. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta	139
4.11. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales y la selectividad de los inmunoensayos seleccionados	140
4.12. Caracterización de inmunoensayos tipo ELISA.....	140
4.12.1. Estudio de la influencia del pH y de la fuerza iónica	141
4.12.2. Tolerancia a disolventes orgánicos	143
4.13. Validación de inmunoensayos tipo ELISA.....	145
4.13.1. Obtención de muestras	145
4.13.2. Evaluación del efecto matriz de muestras de agua	146
4.13.3. Curva estándar y parámetros analíticos	147
4.13.4. Análisis de muestras fortificadas	149
4.14. Desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral.....	151
4.14.1. Preparación de las tiras y del anticuerpo marcado con oro coloidal	151
4.14.2. Optimización del ensayo	151
4.14.3. Validación con diferentes tipos de agua	154
5. CONCLUSIONES.....	157
6. REFERENCIAS	159

ABREVIATURAS Y SIGLAS

A	Absorbancia
A ₀	Absorbancia en ausencia de analito
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
A _{máx}	Señal máxima del ensayo
A _{mín}	Señal mínima del ensayo
AOAC	Association of Analytical Communities
AP	Fosfatasa alcalina
BCIP	Bromocloro indolil fosfato
BHC	Hexacloruro de benceno
BPA	Buenas prácticas agrícolas
BPM	Buenas prácticas de manufactura
BSA	Seroalbúmina bovina
CDR	Regiones determinante de complementariedad
CL ₅₀	Concentración letal 50%
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DL ₅₀	Dosis letal 50%
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
EFSA	Autoridad europea para la seguridad de los alimentos
EIA	Inmunoensayos enzimáticos
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
ESI	Ionización por electrospray
Fab	Fragmento de unión al antígeno
FAO	Organización para la agricultura y los alimentos de la ONU
Fc	Fragmento cristalizable
FR	Regiones marco
GAM	Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón
GAR	Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas
HAT	Suplemento o medio de cultivo con hipoxantina, aminopterina y timidina
hCG	Gonadotropina corónica humana

HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-i)etano-sulfónico
HFCS	Suplemento de fusión y clonaje para hibridomas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HT	Suplemento o medio de cultivo con hipoxantina y timidina
HV	Regiones hipervariables
I	Fuerza iónica
IC ₅₀	Concentración de analito que reduce un 50% la señal máxima
Ig	Inmunoglobulina
JMPR	Reunión conjunta sobre residuos de plaguicidas (FAO/WHO)
K _d	Constante de equilibrio
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral
LMR	Límite máximo de residuos
LOD	Límite de detección
mAb	Anticuerpo monoclonal
MALDI	Desorción-ionización láser asistida por matriz
MRI	Manejo de resistencia a insecticidas/acaricidas
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MW	Microondas
Mw	Peso molecular
NHS	N-Hidroxisuccinimida
OGM	Organismos genéticamente modificados
OMS	Organización mundial de la salud
OPD	o-Fenilendiamina
OVA	Ovoalbúmina
pAb	Anticuerpo policlonal
PB	Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4
PBS	Tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, 140 mM NaCl
PC	Peso corporal
PEG	Polietilenglicol
PHI	Intervalo previo a la cosecha
PSA	Aminas primarias y secundarias
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>

rAbs	Anticuerpos recombinantes
RAM	Anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón
RC	Reactividad cruzada
RCF	Fuerza centrífuga relativa
RGB	<i>Red Green Blue</i>
RIA	Radioinmunoensayos
RM	Relación molar hapteno-proteína
SAS	Sulfato amónico saturado
SBA	Suero bovino adulto
SBF	Suero bovino fetal
SP	Spirotetramat
SP-ceto	Spirotetramat-cetohidróxido
SP-enol	Spirotetramat-enol
SP-glu	Spirotetamat-enol-glucósido
SP-mono	Spirotetramat-monohidróxido
SPE	Extracción en fase sólida
SPIA	Ensayo de inmunoadsorción en fase sólida
TFA	Trifluoroacetato
TMB	Tetrametilbencidina
TOF	Detector de tiempo de vuelo
TRR	Residuo radioactivo total
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/visible
vLOD	Límite de detección visual

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura ha sido la “profesión” más antigua que el ser humano ha experimentado a lo largo de su vida. Tradicionalmente, y en el mejor de los casos hasta el último siglo en que se ha desarrollado y llevado a cabo de manera muy artesanal sin la presencia de sustancias químicas que en su momento eran desconocidas. Probablemente, en algún momento hemos escuchado y sobre todo participado de una u otra manera de la agricultura tradicional donde la aplicación de la fuerza física era la herramienta principal para producir los alimentos, pero que hoy en día, debido al incremento acelerado de la población mundial y con el ritmo de vida que llevamos actualmente, estamos en la necesidad de producir los alimentos a una mayor escala, acelerando el tiempo de producción y con ello la implementación de lo que hoy conocemos como agricultura moderna o mecanizada. Es por esto que durante los últimos años los países han recurrido a la aplicación de agroquímicos (fertilizantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas, etc.) para la producción y conservación de alimentos, que permitan cumplir con los objetivos de la alimentación.

Sin embargo, el uso de agroquímicos, en muchos casos, ha representado un alto coste, exponiéndonos frecuentemente y acarreando con ello problemas graves de salud, contaminación ambiental, aparición de plagas resistentes, entre otros, que aún desconocemos. El desafío para la ciencia y en concreto para todos los centros de investigación que se dedican constantemente al cuidado y evaluación de los alimentos, es hacer que estos lleguen en las condiciones idóneas a nuestra mesa cumpliendo de esta manera los debidos controles de seguridad y fitosanitarios que la reglamentación exige.

Con lo mencionado anteriormente y gracias a las grandes empresas, se han desarrollado una gran variedad de insecticidas, herbicidas, acaricidas, fungicidas, entre otros, para combatir insectos, malas hierbas, ácaros, hongos, etc. El uso correcto y en las dosis recomendadas de dichas sustancias, no deberían representar un problema para la salud, ya que las instituciones públicas y/o privadas son las encargadas de establecer los límites máximos de residuos (LMR) que cada alimento puede contener debido a que durante la precosecha y postcosecha han sido utilizados con el objetivo prolongar la vida útil, así como también impedir en lo posible que estos sean atacados por agentes externos como los ya descritos en este párrafo.

Sin embargo, y de manera lamentable por las malas experiencias suscitadas durante los últimos años respecto a alimentos contaminados y con elevada presencia de sustancias químicas han saltado las alarmas para que el consumidor en general tenga un motivo más que suficiente de repulsión a la hora de hacer la compra y sobre todo al consumirlos. De esta

manera, aparecen recientemente los “alimentos ecológicos o alimentos orgánicos”, pero ¿qué tan confiable son estos alimentos?, ¿existe fraude?; pues son las preguntas que muchas veces nos planteamos dado que nuestro cerebro ya no concibe que un alimento sea producido sin la aplicación de productos agroquímicos que hoy por hoy son imprescindibles para el control de plagas.

La necesidad de mejorar la calidad y cantidad de las cosechas basado en el rendimiento de los campos agrícolas y hatos ganaderos con el fin de alimentar a una población humana en constante crecimiento, nos ha obligado a desarrollar una agricultura intensiva, que descansa entre otras cosas, en la lucha sin cuartel contra todas las plagas que se oponen a la producción agrícola y agropecuaria con los mejores estándares de calidad de sus alimentos. Hoy no se concibe una agricultura moderna y eficaz sin el empleo de plaguicidas, promotores del crecimiento animal, fertilizantes sintéticos y biocidas de todo tipo.¹

1.1. Residuos agroquímicos en alimentos

Existe bastante confusión en ciertos ambientes entre contaminantes y residuos en alimentos, por lo que conviene diferenciarlos. Contaminante es cualquier sustancia o cuerpo extraño (xenobiótico) que por alguna circunstancia llega al organismo animal o vegetal, al alimento o al medioambiente y permanece en él constituyendo un riesgo para la salud, la economía o el equilibrio ecológico. En cambio, residuo es toda sustancia química que, como consecuencia de las actividades humanas para la producción de alimentos, llega al alimento o pienso y, de forma directa o indirecta, pone en peligro la salud del ser humano, su bienestar o el de los animales. Como se deduce de estas definiciones el concepto de contaminante es mucho más amplio que el de residuo.²

Los contaminantes que pueden encontrarse en los alimentos se dividen atendiendo a su naturaleza biológica o inerte, en dos apartados:

- **Biológicos o bióticos:** Microorganismos, toxinas microbianas, zooparásitos, excretas y restos de animales, etc.
- **Químicos o abióticos:** Plaguicidas, metales pesados, medicamentos, productos industriales y radionúclidos.

Dentro de los contaminantes químicos o abióticos destacan los plaguicidas que se usan profusamente en la agricultura moderna. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) son “productos empleados para destruir o repeler los seres que intervienen en la transmisión de enfermedades, que destruyen la producción vegetal y animal o que originan

molestias dificultando el bienestar humano”. En 1986 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA), o más conocida como FAO, define como plaguicida a “toda sustancia o mezcla de sustancias empleada para prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y animales, las especies nocivas que dañan o interfieren en la producción, procesado, almacenamiento, transporte o mercadeo de los alimentos, las condiciones agrícolas, la madera y sus productos y los piensos animales, así como las que se administran a los animales para el control de insectos, arácnidos u otra plaga corporal”.³ Los plaguicidas deben ser efectivos sin provocar lesiones humanas o en los propios cultivos.

Los plaguicidas pueden ser de naturaleza química y biológica. Entre los primeros existen alrededor de 1000 principios activos con las cuales se producen 30000 formulados. Los plaguicidas biológicos tienen 195 principios activos y con ellos se fabrican hasta 780 productos diferentes. Esta gran cantidad de mezclas fabricadas a partir de diferentes principios activos a los que se asocian excipientes o diluyentes denominados ingredientes inertes que constituyen una gran proporción del producto y cuyos efectos nocivos superan frecuentemente los del propio ingrediente activo, hace que sea difícil su manejo, de ahí que existan diferentes clasificaciones, que favorecen el trabajo de las personas que interactúan con ellos, además de tener cierto control sobre los efectos, el ambiente y la salud.⁴

En general, los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso. En 1978, la OMS estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones en un período de tiempo relativamente corto.⁵ Según su toxicidad la OMS clasifica los plaguicidas (**Tabla 1.1**) como extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II) o ligeramente peligrosos (III), o también relacionados con su vida media y su persistencia como pueden ser permanentes si no desaparecen, persistentes si resisten más de 20 meses, de persistencia moderada entre 1 y 18 meses de vida media, o no persistentes si no permanecen al pasar 12 semanas.⁶

Tabla 1.1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL₅₀ (mg/kg).

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligrosos	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrín, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano
Clase III	Ligeramente peligrosos	Malatión

Los compuestos químicos que se utilizan en la protección de los cultivos reciben el nombre genérico de plaguicidas o pesticidas. Estos compuestos, según su efectividad particular contra insectos, ácaros, ratas, caracoles, o nematodos, reciben los nombres específicos de insecticidas, acaricidas, raticidas o rodenticidas, caracolicidas o molusquicidas, y nematicidas, respectivamente. También se incluye a los herbicidas y fungicidas que se utilizan para combatir las malezas y las enfermedades fúngicas, respectivamente.⁷ Hoy en día los plaguicidas se usan para controlar una gran variedad de plagas antes de que estas puedan dañar los cultivos. Los más utilizados son los herbicidas, fungicidas e insecticidas.

1.1.1. Los herbicidas

El uso de herbicidas ha causado cambios significativos en los sistemas de producción de todos los principales cultivos a nivel mundial. El control químico altamente efectivo de las malezas ha reemplazado el control manual, animal y mecánico, ha aumentado la productividad, y también ha permitido el desarrollo de granjas de mayor extensión y una mejora substancial para los agricultores. Sin embargo, los herbicidas no han tenido solamente el resultado en la extinción de malas hierbas, sino que también han causado, junto con otros factores influyentes una continua selección de plantas resistentes. Como consecuencia, estas plantas con tales propiedades de supervivencia pueden convertirse en dominantes y distribuirse en áreas cada vez más grandes.⁸ Los primeros casos de resistencia a herbicidas se informaron alrededor de 1970, desde entonces la resistencia de las malezas mono y dicotiledóneas a los herbicidas se ha convertido en un problema creciente en todo el mundo. A finales de 2010, la encuesta internacional de malezas resistentes a herbicidas registró 348 biotipos resistentes a herbicidas, con 194 especies de malezas, 114 dicotiledóneas y 80 monocotiledóneas.⁹

1.1.2. Los fungicidas

El primer fungicida que se descubrió a principios del siglo XIX fue lima-azufre, presentado por William Forsyth y recomendado para el control de las enfermedades de los árboles frutales de mildiu polvoriento.^{10,11} El término fungicida no solamente se refiere a un producto que tiene la capacidad de destruir hongos, sino que incluye también todos aquellos compuestos que pueden proporcionar resistencia a la planta huésped o que convierten el medio en un lugar inadecuado para el desarrollo y crecimiento del organismo infeccioso. El siguiente hito fue el introducido por Millardet en 1885 de la mezcla de Burdeos, una preparación a base de cobre utilizado para combatir el patógeno de mildiu recién introducido *Plasmopara viticola* en viñedos.¹²

Los primeros fungicidas orgánicos (compuestos organomercuriales) fueron introducidos para el tratamiento de semillas de cereales a principios del siglo XX, y desde los compuestos orgánicos de la década de 1930, como los ditiocarbamatos y las ftalimidias se han convertido en herramientas importantes para el control de enfermedades de plantas. El modo de acción de estos fungicidas se describe como “multisitio” ya que inhiben simultáneamente un rango de enzimas y estructuras celulares y proporcionan una protección preventiva de las plantas contra diversas enfermedades de forma sistémica, en la superficie de la planta.¹³

1.1.3. Los insecticidas

Los insecticidas constituyen recursos de primera importancia contra las plagas, tanto porque sus efectos son más rápidos que cualquier otra forma de represión como por ser fácilmente manejables. Se considera que su utilización, conjuntamente con la de otros plaguicidas, ha jugado un rol importante en el incremento de la productividad agrícola de las últimas décadas, sobre todo en los países más tecnificados. En la actualidad se cuenta con una gran cantidad de compuestos insecticidas con características toxicológicas, físicas y químicas muy diversas. Miles de nuevos productos son investigados anualmente en busca de nuevas propiedades y algunos de ellos llegan a incorporarse al mercado después de muchos años de experimentación. Entre los países productores de insecticidas más importantes están los Estados Unidos, Alemania, Japón, Rusia, Suiza, Italia y Holanda.⁷

Las primeras aplicaciones de insecticidas modernos fueron tan especuladoras que muchas esperanzas se cifraron en la posibilidad de erradicar las principales plagas. Desafortunadamente después de algo más de cuatro décadas de aquellos resultados extraordinarios, se ha podido comprobar que los problemas causados por las múltiples plagas no han desaparecido y, por el contrario, en muchos casos se han agravado. La utilización de los

insecticidas trajo consigo fenómenos nuevos, no previstos, como el desarrollo de resistencias y la aparición de nuevas plagas por la destrucción de sus enemigos naturales.

En la actualidad la pérdida de eficacia, aparición de nuevas plagas, contaminación del medioambiente, destrucción de la fauna silvestre, y los peligros de intoxicación, son fenómenos comunes ligados al uso de insecticidas. A pesar de todo ello, la agricultura moderna difícilmente podría mantener rendimientos altos sin el uso razonable de estos productos. Muchos de los problemas citados se han derivado del mal empleo y uso excesivo de insecticidas y plaguicidas en general. Aún hoy, mucha gente, incluyendo agricultores y profesionales no bien enterados, cree que el combate de las plagas por medio de insecticidas es algo simple y basta con seguir las instrucciones de los envases o, lo que es peor, creer que "si poco es bueno, mucho es mejor". De esta manera aumentan dosis innecesariamente o mezclan productos sin ninguna racionalidad, para estar seguros de no fallar con el tratamiento.

La era de los insecticidas modernos en la agricultura se inició inmediatamente después de terminada la segunda guerra mundial. El descubrimiento de la acción insecticida del dicloro difenil tricloroetano (DDT) en 1939 y del hexacloruro de benceno (BHC) en 1941 permitió su uso para combatir insectos vectores de enfermedades que afectaban a las tropas aliadas. Rápidamente su uso se extendió al combate de plagas agrícolas y del ganado, y años más tarde su uso se había generalizado en casi todos los países del mundo. Al grupo de los insecticidas clorados pronto se unió el grupo de los fosforados, posteriormente los carbamatos y más recientemente los piretroides estables.⁷

Haciendo referencia al autor citado en el último párrafo, los insecticidas presentan grandes variaciones en cuanto a su estabilidad química y física, lo que afecta al tiempo y las condiciones de su almacenamiento, así como su efecto residual en la planta. Expuestos al medio ambiente, los insecticidas con alta tensión de vapor resultan volátiles y se disipan más rápidamente que aquellos con baja tensión de vapor. Por otro lado, los factores físicos, químicos y biológicos del medio ambiente también influyen marcadamente en la estabilidad y persistencia de los productos. Entre estos factores se encuentran la temperatura, luz, radiación ultravioleta, los agentes oxidantes, hidrolizantes y reductores y el pH del medio; así como los fermentos y los microorganismos desintegradores.

En la utilización de un insecticida es importante considerar que el efecto residual prolongado confiere un mayor período de protección a las plantas, pero al mismo tiempo afecta más gravemente la fauna benéfica y dificulta su recuperación, incrementa el peligro de los residuos tóxicos sobre las plantas y requiere de un mayor intervalo entre la última aplicación y la cosecha. Lo contrario puede indicarse para los productos de escaso poder residual.

1.2. Spirotetramat

1.2.1. Descripción

En los últimos años, tres insecticidas con nuevo modo de acción han sido desarrollados por Bayer CropScience AG: spiroadiclofen, spiromesifen y spirotetramat. Los tres insecticidas se derivan de tiolactomicina, un producto natural que es un antibiótico de tiolactona inicialmente aislado de una bacteria del suelo, *Nocardia* sp.¹⁴⁻¹⁵

Spirotetramat, abreviado como SP en la presente tesis doctoral, es un nuevo insecticida que pertenece químicamente a la clase del ácido tetrámico espirocíclico y derivados.^{16,17} SP es el nombre registrado de cis-4-(ethoxycarbonyloxy)-8-methoxy-3-(2,5-xylyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one (IUPAC), con un peso molecular de 373.48 g/mol. SP es activo contra los insectos que chupan y perforan, como los ácaros, pulgones y moscas blancas, al actuar como inhibidor interrumpiendo la biosíntesis de lípidos. Es un insecticida sistémico que penetra en las hojas de las plantas cuando se rocía. En las plantas se hidroliza a la forma enólica mediante la escisión del grupo etoxicarbonilo central. El enol es más estable debido a que el doble enlace está en conjugación con el grupo amida y el anillo del benceno.^{18,15}

SP es un insecticida de tipo sistémico que se aplica a la planta y es absorbido por las hojas, tallos, corteza y raíces. Además, SP tiene propiedades de translocación; es decir, una vez que ha penetrado en la planta, la molécula se hidroliza a su forma de enol en la posición C-4, y como ácido débil más polar, este compuesto puede moverse tanto acropetalmente vía xilema como basipetalmente vía floema.¹⁹ De esta manera los agentes activos del insecticida circulan por la savia haciéndola tóxica para los insectos que intentan succionarla.²⁰ Esta propiedad incrementa su eficacia en cualquier parte de la planta, aportando protección a los nuevos brotes u hojas que aparecen después de la aplicación,¹⁹ y permitiéndole acabar con las plagas que son difíciles de alcanzar, como el chinche harinero de la uva *Planococcus ficus*.

1.2.2. Características físicoquímicas

El aspecto de SP es de color blanco a beige claro, disponible en estado sólido o en forma líquida, su olor es débil, con un valor de pH 4.5 y con una densidad de 1.07 g/cm³ a 20 °C. Respecto al umbral olfativo, no presenta olor característico tanto de la sustancia activa pura como la fabricada. Su coeficiente de partición n-octanol/agua a 20 °C y pH 7 es Kow 324 y su presión de vapor extrapolable 5.6x10⁻⁹ Pa a 20 °, 1.5x10⁻⁸ Pa a 25 °C y de 1.5x10⁻⁶ Pa a 50 °C, la densidad relativa de la sustancia activa purificada a 20 °C es de 1.23, la temperatura de fusión a presión atmosférica es de 142 °C, su temperatura de auto-inflamación no se ha observado hasta el punto de fusión (mayor a 40 °C dado que el principio activo es un sólido) o hasta la

temperatura máxima de prueba, 401 °C. SP no es explosivo y no tiene propiedades oxidantes. El principio activo es bastante soluble en disolvente polar orgánico como diclorometano, dimetilsulfóxido o acetona y ligeramente soluble en solventes no polares como n-hexano. Su solubilidad en agua depende del pH y varía de 19.1 mg/L, a pH 9, a 33.5 mg/L a pH 4. Posee una constante de disociación ácido-base (pKa) a 25 °C de 10.7. Su estabilidad permite el almacenamiento en condiciones prácticas y comerciales. En definitiva, las propiedades indican que no se deben tener problemas particulares cuando se utiliza como se recomienda.^{21,22}

1.2.3. Toxicidad

Los valores de referencia toxicológicos establecidos para SP también son aplicables a los metabolitos. La Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*) concluye que la ingesta de residuos a corto y largo plazo resultante del uso de SP en el grupo de frutas y bayas pequeñas de acuerdo con lo previsto, es poco probable que las prácticas agrícolas represente un riesgo para la salud de los consumidores.

En el año 2016 la EFSA evaluó el perfil toxicológico de SP en el marco de la revisión por pares en virtud del Reglamento (CE)N° 1107/2009 donde los datos fueron suficientes para derivar una Ingesta Diaria Aceptable de 0.05 mg/kg de peso corporal por día y una Dosis de Referencia Aguda de 1.0 mg/kg de peso corporal. Además, en dicho informe se presenta el estudio del metabolismo de SP en cultivos primarios; se investigó en grupos de frutas de, raíces, hojas y legumbres/oleaginosas, después de aplicaciones foliares.

La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL₅₀) o de la concentración letal media (CL₅₀). Sobre su toxicidad oral aguda es mayor a 2000 mg/kg (ratas hembras), su toxicidad cutánea es mayor a 4000 mg/kg (macho/hembra). Respecto a la toxicidad aguda por inhalación es mayor a 3 mg/L con un tiempo de exposición de 4 h en forma de aerosol líquido. Basado en un estudio respecto a la evidencia global de una serie de pruebas *in vitro* e *in vivo*, SP no es mutagénico/genotóxico y tampoco es carcinogénico sobre estudios de alimentación de por vida en ratas y ratones. SP causó toxicidad en el desarrollo solo a niveles de dosis tóxicos para las ratas, causando retraso en el crecimiento fetal, además de la histopatología testicular observada después de la exposición subcrónica y crónica.^{22,21} Ambos parámetros (DL₅₀ y CL₅₀), varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, entre otros), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo. Al basarse en la observación de especies animales, es importante señalar que estos indicadores no proporcionan información sobre los efectos crónicos, ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto.²³

1.2.4. Spirotetramat-enol y otros metabolitos

Luego de la absorción por el organismo, SP es transformado a una forma más polar, llamada spirozetramat-enol (SP-enol), mediante la hidrólisis del grupo etil carbonato (**Figura 1.1**). Dicha hidrólisis también ocurre en el medioambiente 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 SP-enol-glucósico (SP-glu), SP-cetohidróxido (SP-ceto) y SP-monohidróxido (SP-mono).¹⁹



Figura 1.1. Estructuras químicas de spirozetramat (izquierda) y spirozetramat-enol (derecha).

Las principales reacciones metabólicas implican la escisión hidrolítica del grupo etilcarbonato para formar el SP-enol, que se degrada aún más por oxidación o reducción para formar los metabolitos SP-ceto y SP-mono.²⁴⁻²⁶

Estudios previos sobre la evaluación de los residuos y basado en los documentos 1607/VI/97 de la Comisión Europea de 1999, y las recomendaciones establecidas en los informes JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues) de la FAO y la OMS del año 2004 y 2007, se estudió el metabolismo de SP en cuatro grupos de plantas; semillas oleaginosas (legumbres), semillas de algodón y cultivos frondosos de lechuga, hortalizas de raíz (papa) y cultivos frutales (manzana). Los estudios se realizaron con un total de 2 a 3 aplicaciones foliares. En todos los casos el SP fue el componente predominante de los residuos, que representaron entre el 20% y el 72% de residuo radioactivo total (TRR) en la mayoría de las muestras, excepto en las semillas de algodón y las hortalizas de raíz donde casi no se detectó y los residuos estaban compuestos principalmente por el metabolito SP-enol con un 40% a 66% de TRR. El metabolito SP-enol y su conjugado glucurónico también se identificaron principalmente en lechuga, hojas de algodón y manzana. Los otros dos metabolitos SP-ceto y SP-mono representaron menos del 20% en todos los cultivos.

Sobre la base de estos estudios, la definición de residuo de SP para la evaluación de riesgos se ha propuesto como la suma de SP, SP-enol, SP-glc, SP-ceto y SP-mono, expresada como SP, suponiendo que todos los metabolitos son de toxicidad similar.²⁷ No obstante, para

fines analíticos prácticos la definición de residuo en productos de origen vegetal se ha limitado a la suma de SP y SP-enol expresada como SP, ya que ambos compuestos representan la mayor parte de los residuos. Además, como los residuos de SP no son estables en condiciones de almacenamiento congelado y se degradan a SP-enol, es necesario incluir este metabolito en la definición del residuo para monitoreo.²⁴

1.2.5. Usos agroquímicos

Los plaguicidas se aplican exhaustivamente en viñedos ya que son un cultivo sensible, sujeto al ataque de muchas plagas, las mismas que pueden disminuir la producción de uva y vino causando importantes pérdidas económicas.²⁸ Además, se aplican mediante diversos métodos en actividades de tipo forestal, granjas, hábitats acuáticos, vías y carreteras, zonas urbanas y jardines, entre otros.

SP se comercializa bajo el nombre de Movento para uso mundial contra la mosca blanca, áfidos, escamas y otras plagas de insectos chupadores de cultivos agrícolas.²⁹ Su eficacia de aplicación varía de bueno a excelente en un amplio espectro de plagas incluidos los pulgones (*Aphis* spp., *Myzus* spp., *Dysaphis* spp., *Toxoptera* spp., *Phorodon humuli*), Pemphigidae (*Eriosoma* spp., *Pemphigus* spp.), pulgones de raíz (*Phylloxera* spp.), psílicos (*Psylla* spp., *Paratrioza cockerelli*), escamas (*Ceroplastes* spp., *Pulvinaria* spp., *Aonidiella* spp., *Quadraspidotus* spp., *Orthezia praelonga*), insectos harinosos (*Pseudococcus* spp., *Planococcus* spp.) y moscas blancas (*Bemisia* spp., *Trialeurodes vaporariorum*). Debido a que no presenta reactividad cruzada con otras clases químicas existentes, SP tendrá un gran valor y será una nueva herramienta muy útil para manejar la resistencia a los insecticidas en muchos cultivos y plagas en todo el mundo.

Actualmente, SP se está utilizando mundialmente en cultivos de frutas de pepita, frutas de hueso, cítricos, uvas, almendras, nueces, lúpulo, té, verduras, algodón y frutas tropicales.¹⁹ Además se está empezando a utilizar en India, China, EE.UU. y Brasil para frenar la expansión del dragón amarillo o HLB (*Candidatus Liberibacter* spp.) puesto que está destruyendo los cultivos de cítricos. EL dragón amarillo es considerada la enfermedad más destructiva para los cítricos en el mundo debido ya que causa la muerte del árbol de forma inevitable. Esta bacteria es transmitida por un insecto, denominado psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), en climas calientes y por el psílido *Trioza erytrae* en climas más fríos.³⁰⁻³¹ De esta manera, la aplicación de SP permite erradicar a sus vectores principales.

1.2.6. Legislación

La Unión Europea (UE), el 20 de noviembre de 2013, mediante su reglamento de ejecución (UE) N°1177/2013, aprobó la comercialización de SP para uso fitosanitario con arreglo al Reglamento de la comisión Europea (CE) N°1107/2009 del parlamento Europeo y del Consejo.³² De esta manera la sustancia activa SP, especificada en el anexo I de dicho reglamento, quedó aprobada en las condiciones fijadas.

El límite máximo de residuos (LMR), es la concentración máxima de residuos del ingrediente activo o metabolito de un plaguicida en un producto agrícola, expresada en miligramos de sustancia química por kilogramo de producto (mg/kg) o partes por millón (ppm). La 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 y revisada en el año 2016 donde se propone 2 mg/kg como LMR para SP uva de mesa y de vinificación.³³

1.3. Anatoxina-a

1.3.1. Descripción

La anatoxina-a (2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno) es una amina secundaria bicíclica cuyo estereoisómero dextrógiro es el que se encuentra en la naturaleza (**Figura 1.2**). Está considerada una de las cianotoxinas más tóxicas que se pueden encontrar en agua dulce.³⁴ El primer caso confirmado de intoxicación por anatoxina-a se produjo en Canadá en los años 60, donde causó la muerte de ganado vacuno. En aquel momento, debido a su elevada toxicidad, se denominó a la sustancia causante todavía no identificada como *Very Fast Death Factor*, debido a que inyectada intraperitonealmente en ratones, éstos morían en menos de cinco minutos.³⁵ La elevada potencia que tiene anatoxina-a como neurotoxina (DL₅₀ intraperitoneal en ratones: 250 µg/kg) se debe a que es un agonista de la acetilcolina, uniéndose de forma irreversible al receptor nicotínico de acetilcolina a nivel intramuscular, lo que bloquea el canal de sodio e impide la repolarización de la membrana, causando sobreestimulación muscular que provoca convulsiones, parálisis y finalmente la muerte por parada cardiorrespiratoria.³⁶

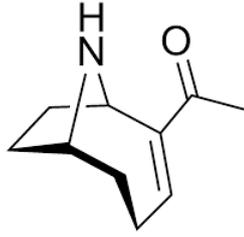


Figura 1.2. Estructura química de (+)-anatoxina-a.

Las neurotoxinas cianobacterianas por tanto interfieren con el sistema nervioso, interrumpiendo la propagación normal del nervio impulsor de las neuronas a los músculos. A pesar de que aún no se ha documentado ningún evento mortal en humanos por la ingestión de anatoxina-a, es elevado el riesgo potencial, sobre todo para poblaciones como las ubicadas en la zona de México Oeste y grandes lagos de los EE.UU. y Canadá,³⁷ así como en algunas regiones de Nueva Zelanda, Francia, Alemania y Australia, en donde la anatoxina-a es la biotoxina encontrada con más frecuencia y a concentraciones más elevadas.³⁸⁻³⁹ Quizás el caso más llamativo de entre los recientes fue en noviembre de 2013 que consistió en la muerte repentina de más de 100 alces cerca de un abrevadero artificial en un área rural de una pequeña localidad de Nuevo México en EE.UU. Además, existen evidencias considerables de intoxicaciones en seres humanos por la ingesta accidental de esta cianotoxina que han terminado en cuadros clínicos incapacitantes, principalmente por bañistas y personas que realizan actividades recreativas en lagos y ríos.⁴⁰⁻⁴¹

Las floraciones de cianobacterias pueden crear numerosos problemas estéticos y relacionados con la salud. Las floraciones causan una ofensa a los olores y claridad del agua dulce reducida, lo que resulta una disminución del valor recreativo de lagos y embalses afectados. La aparición y eventual colapso y descomposición de las floraciones de cianobacterias pueden conducir a un agotamiento significativo del oxígeno disuelto incrementando las concentraciones de amoníaco en el agua, provocando la muerte de peces.⁴² Los tratamientos de agua potable también pueden verse afectados negativamente. Prevenir la formación de floraciones es el método más eficiente para evitar cianobacterias y contaminación por toxinas del agua potable.

1.3.2. Incidencia

Las cianobacterias son un grupo de algas procariotas (tanto unicelulares como pluricelulares) que realizan fotosíntesis oxigénica con un registro fósil desde el Precámbrico. Desde entonces han tenido mucho tiempo para propagarse por todos los ambientes acuáticos

de todas las partes de la tierra, en sus lagos, ríos, lagunas, humedales, mares, e incluso algunas viven de forma subaérea en una diversidad de sustratos y emplean la humedad atmosférica. Se encuentran distribuidas en todos los continentes y en todas las latitudes; algunas de sus especies habitan en condiciones muy extremas, como manantiales termales por encima de 80 °C, en rocas de desiertos extremadamente cálidos o extremadamente fríos, regiones tropicales, en la Antártida, lagos hipersalinos, pantanos o en biotopos de zonas volcánicas.⁴³⁻⁴⁴

El desarrollo mundial de las floraciones (periodo de grandes crecimientos de algas y otros microorganismos que pueden afectar la calidad del agua y al funcionamiento de los sistemas acuáticos) de cianobacterias ha aumentado significativamente en el medio marino y aguas continentales desde finales del siglo pasado debido a la eutrofización del agua. Este fenómeno se ve favorecido por la capacidad de las cianobacterias planctónicas para sintetizar vesículas de gas que les permite flotar en la columna de agua. Además, las cianobacterias bentónicas que proliferan en el fondo de lagos, ríos y aguas costeras forman esteras densas cerca de la costa. La proliferación masiva es de interés público con respecto a la capacidad de ciertas cianobacterias para producir compuestos hepatotóxicos y neurotóxicos que pueden afectar la salud pública, actividades humanas y animales salvajes.⁴⁵

La anatoxina-a y su análogo la homoanatoxina-a son producidas por un elevado número de especies de cianobacterias. La distribución de cianobacterias productoras de estos compuestos es mundial e incluye cianobacterias planctónicas filamentosas como *Dolichospermum* spp., *Aphanizomenon* spp., *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Planktothrix rubescens*, *Oscillatoria* spp., *Arthrospira fusiformis* y varias *Oscillatoria* spp. bentónicas, así como *Phormidium favosum*, entre otras. Todas ellas son capaces de producir estas neurotoxinas, y se han identificado tanto en aguas dulces como en aguas salobres/marinas en casi todas las regiones geográficas del planeta.

En condiciones naturales, la concentración de anatoxina-a disuelta en el agua liberada por estos microorganismos suele ser muy baja, entre 0.1 y 10 µg/L; sin embargo, esos valores tienden a incrementarse cuando la floración envejece o empieza a declinar. Así pues, la liberación de la toxina parece ocurrir principalmente, o de manera exclusiva durante la senescencia, muerte y lisis celular, más que por excreción continua al entorno.⁴⁶

Diferentes cepas de cianobacterias con varios niveles de producción de neurotoxinas aparecen y pueden coexistir en el mismo depósito de agua.⁴⁷ Por ejemplo, el 25% de las muestras recolectadas en lagos alemanes y los reservorios fueron positivos.⁴⁸ Sin embargo, en lagos finlandeses y portugueses, en aguas naturales y reservorios artificiales de agua dulce, aproximadamente el 60% de las cepas fueron capaces de producir anatoxina-a y el rango de

concentración en la biomasa de cianobacterias fue muy amplio (0.06-24.6 µg por cada gramo de peso seco).⁴⁹⁻⁵⁰

Debido a la ausencia de estudios toxicológicos rigurosos, son pocos los países que han establecido regulaciones sobre los niveles máximos permisibles de anatoxina-a en aguas. En EE.UU., algunos estados han adoptado como valor provisional de referencia 1 µg/L como nivel máximo aceptable de esta cianotoxina en aguas de abastecimiento público, y de 75 µg/L en aguas de uso recreativo.⁵¹ Otros países, como Canadá y Nueva Zelanda, consideran como valores guía de seguridad concentraciones de anatoxina-a en agua potable de 3.7 y 6.0 µg/L, respectivamente.⁵² Haciendo referencia a los niveles máximos permisibles mencionados anteriormente, se ha llegado a registrar concentraciones superiores a 1 mg/L de anatoxina-a libre, un valor al menos 100 veces superior al recomendado por los diferentes organismos oficiales considerando que el agua potable se atribuye a su papel excepcional como base para la vida, con un consumo diario en el rango de litros, de tal manera que las personas eviten la exposición cuando está contaminada.⁵³

Respecto a la regulación sobre la presencia de anatoxina-a en alimentos, son pocos los países donde existe algún tipo de legislación. En EE.UU., sólo California proporciona valores guía de seguridad de cianotoxinas en pescado para consumo humano, estableciendo como umbral de seguridad una concentración de anatoxina-a de 1100 ng/g (peso húmedo).⁵³

En España, las aguas superficiales son la principal fuente de agua potable y recreativa, siendo la mayor parte de esta agua almacenada en depósitos. Los lagos no son abundantes y los ríos están en su mayoría represados con el objetivo de almacenar agua para los meses de verano cuando la lluvia es muy escasa o prácticamente ausente en algunas regiones. No obstante, en los últimos años se ha demostrado que las microcistinas están bastante extendidas en el país, pero no se dispone de datos sobre la incidencia de anatoxina-a.⁵³⁻⁵⁰

1.4. Métodos analíticos instrumentales

1.4.1. Determinación de spirotetramat en alimentos

Una de las principales etapas de vigilancia en la seguridad química de los alimentos, es la obtención de datos acerca de los niveles de determinadas sustancias que pueden estar presentes en los alimentos (contaminantes, residuos, aditivos, entre otros). La obtención de estos datos es el resultado de un proceso minucioso que comienza con la selección y validación de un método analítico cuya ejecución ha de ser controlada de manera permanente. Para una correcta selección de un método analítico (entendido como método el conjunto

sucesivo de las fases indicadas de extracción, purificación, determinación, detección y/o cuantificación), es preciso considerar todos aquellos factores que pueden influir en la validez del resultado, en relación a los motivos que dan origen a su demanda.

Cualquier método analítico antes de ser utilizado debe ser validado; es decir, se realizan las comprobaciones que aseguran que el método es científicamente correcto en las condiciones en que va a ser aplicado. En el proceso de validación se comprueban sus características técnicas en cuanto a selectividad y sensibilidad, linealidad, límites de detección, determinación o cuantificación, exactitud y precisión, siguiendo normas internacionales o directivas comunitarias.⁵⁴ El proceso para determinar la exactitud de los métodos se lleva a cabo con materiales de referencia certificados, si es posible, o con muestras enriquecidas artificialmente en el caso de no disponer de los materiales de referencia adecuados. La precisión del método se calcula mediante el análisis repetido de una misma muestra. Idealmente, los porcentajes de recuperación obtenidos se deben mantener en el intervalo 80-120%, y los coeficientes de variación deben ser inferiores al 20%.

El análisis de residuos y contaminantes en los alimentos supone la determinación de sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas (del orden de mg/kg o µg/kg) en matrices muy complejas, generalmente sólidas o semi-sólidas. Por lo tanto, generalmente es preciso realizar en primer lugar una extracción cuantitativa de la sustancia y/o purificar, y a veces concentrar, el extracto obtenido antes de proceder a su detección y cuantificación. La extracción y purificación previas se realizan mediante diferentes procedimientos según el tipo de muestra; como por ejemplo, la extracción en fase líquida (LPE) con disolventes orgánicos, extracción en fase sólida (SPE), extracción en fase sólida dispersa (dSPE), extracción con fluidos supercríticos, etc.⁵⁵

Se conoce que la cromatografía permite separar los componentes de una mezcla por interacción simultánea de los mismos con una fase estacionaria y una fase móvil, por lo que resulta ideal para muestras que contienen varios tipos de residuos. Es por ello que para realizar el análisis de residuos de plaguicidas normalmente se recurre a las técnicas cromatográficas, como son la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y la cromatografía de gases (GC). Para el análisis de residuos de SP se han descrito métodos basados en ambos métodos cromatográficos.

Hoy en día se han desarrollado una serie de métodos para el análisis de SP, SP-enol y otros metabolitos en distintas matrices alimentarias mediante una técnica cromatográfica u otra, que dependiendo de la complejidad de la matriz, ésta es tratada de una u otra forma. En tal virtud, la gran mayoría de los métodos que se pueden encontrar y que se han descrito para el análisis de SP en alimentos son multirresiduo, los mismos que hacen referencia a alguna

técnica cromatográfica con detección por espectrometría de masas, siendo el número de analitos por cada método desde unos pocos hasta muchos.

Estudios sobre la persistencia de residuos de SP se han llevado a cabo en chili, algodón y mango⁵⁶⁻⁵⁸ ya que es importante obtener la mayor cantidad de información para determinar el intervalo de seguridad previo a la cosecha para que los residuos de plaguicidas en el producto cosechado tengan una concentración por debajo de los LMR. Los residuos de SP y SP-enol se extrajeron y se purificaron utilizando el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Otro ejemplo, el realizado en la India por Mohapatra y colaboradores,⁵⁹ quienes determinaron la presencia de SP, SP-enol e imidacloprid en uva. Las muestras fueron extraídas y purificadas por el método QuEChERS y analizadas por cromatografía de gases con espectrometría de masas.

Sin embargo, las técnicas cromatográficas convencionales a pesar de su elevado poder analítico, presentan varios inconvenientes lo que las hace poco aptas para algunas aplicaciones; es así, que éstos métodos no resultan ser los más adecuados cuando se desea realizar un análisis rápido de una sola especie en un elevado conjunto de muestras. Asimismo, su utilización requiere de equipos altamente sofisticados y por ende de un elevado coste, por lo que deben ser manejados y controlados por personas altamente capacitadas y cualificadas. Por otro lado, y desde el punto de vista más práctico, es necesario realizar un tratamiento previo de las muestras incluyendo en todos los casos una etapa de extracción con disolventes orgánicos acompañada de la etapa de limpieza, incrementando aún más el coste y el impacto ambiental. Con todos los inconvenientes descritos, se hace más que necesario la búsqueda de métodos analíticos rápidos, seguros, sencillos y fiables a la hora de empleados, además de ser portátiles y económicos para complementar de esta manera las técnicas cromatográficas más habituales.

1.4.2. Determinación de anatoxina-a en aguas

Del grupo de biotoxinas de origen cianobacteriano, la anatoxina-a fue la primera en ser estructuralmente elucidada. Desde entonces, los métodos analíticos para su identificación se han ampliado y sobre todo mejorado de manera notable, a tal punto de constituirse en una de las principales herramientas con las que disponen las autoridades competentes para poder garantizar la seguridad de los ciudadanos.

Los métodos cromatográficos son altamente capaces de determinar varios analitos de manera simultánea, con gran sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. En el caso de las biotoxinas debido al carácter polar de la mayoría de ellas, la cromatografía en fase líquida es la utilizada de manera más amplia como método de separación que la cromatografía en fase

gaseosa. Pese a las modernas prestaciones que actualmente poseen los equipos cromatográficos, la anatoxina-a particularmente es un analito difícil de analizar, debido a su carácter polar, tamaño pequeño y ausencia de grupos fluorescentes. La **Tabla 1.2** muestra algunas técnicas analíticas cromatográficas de referencia para la determinación de anatoxina-a.

Tabla 1.2. Técnicas cromatográficas para la detección y cuantificación de anatoxina-a

Método analítico	Matriz	LOD/LOQ	Preparación de la muestra	Referencia bibliográfica
	Agua	0.2/0.58 µg/L	WCX SPE	60
HPLC-FLD	Pescado	80/170 ng/g	WCX SPE	60
	Agua	5-7 µg/L	MCX SPE	60
GC-MS	Agua	2 ng/mL	SPME	61
CZE+MEKC	Cianobacteria	1-4 µg/mL	Extracto crudo	62
MALDI-TOF	Agua	Solo detección	Sin tratamiento	61
LC-MS/MS	Agua	< 0.5 µg/L	MCX SPE	63
UPLC-MS/MS	Agua	1.9/5.0 ng/mL	Filtración + concentración	39

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia; FLD: Detección de Fluorescencia; GC-MS: Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas, CZE+MEKC: Electroforesis en Zona Capilar + Cromatografía Electrocinética Micelar, MALDI-TOF: Espectrometría de Masas por Ionización/Desorción Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo, LC-MS/MS: Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas en Tándem, UPLC-MS/MS: Cromatografía Líquida de Eficacia Ultraelevada-Espectrometría de Masas, SPE: Extracción en Fase Sólida, SPME: Microextracción en Fase Sólida, WCX: Intercambio Catiónico Débil, MCX: Intercambio Catiónico Mixto.

1.5. Métodos inmunoquímicos aplicados al análisis de pequeñas moléculas orgánicas

1.5.1. Antecedentes históricos

Las técnicas para la determinación de contaminantes orgánicos en alimentos son fundamentalmente de dos tipos: cromatográficos y de reconocimiento molecular.⁴⁶ El reconocimiento molecular es el fenómeno mediante el cual una especie química es reconocida e identificada selectivamente por un receptor adecuado. Entre los sistemas biológicos en que se da este tipo de procesos están las enzimas, anticuerpos o receptores celulares capaces de identificar de manera selectiva a un sustrato, antígeno u hormona, respectivamente.⁶⁴

Los métodos de reconocimiento molecular, basados en técnicas que emplean receptores, ya sean estos aptámeros, polímeros de impresión molecular, proteínas de membrana o transportadoras y muy especialmente anticuerpos, son considerados la mejor opción cuando

es necesario realizar un elevado número de análisis en tiempos cortos o en entornos poco dotados técnicamente. En este sentido, los métodos inmunoanalíticos o inmunoensayos se basan en la unión selectiva, reversible y no covalente entre un antígeno y un anticuerpo que lo reconoce con una elevada afinidad.

El concepto de inmunoensayo se describió por primera vez en 1945 cuando Landsteiner sugirió que los anticuerpos podrían unirse selectivamente a moléculas pequeñas (haptenos) cuando se encontraran conjugadas con una molécula transportadora más grande.⁶⁵ Este concepto específico de hapteno fue más tarde explorado por Yalow y Berson a finales de la década de 1950, y tuvo lugar en un inmunoensayo aplicado a la monitorización de insulina en humanos.⁶⁶⁻⁶⁷ Dicho trabajo preparó el escenario para el avance rápido de los métodos inmunoquímicos para uso clínico. La primera aplicación de los métodos inmunoquímicos hacia los plaguicidas no fue sino hasta 1970 cuando Centeno y Johnson desarrollaron anticuerpos selectivamente para el malatión.⁶⁸ Años más tarde se desarrollaron radioinmunoensayos para aldrin y dieldrin, y para paration.⁶⁹⁻⁷⁰ Posteriormente en 1972, Engvall y Perlman introdujeron el uso de enzimas como etiquetas para inmunoensayo.⁷¹⁻⁷² Desde entonces, y debido a la gran versatilidad para adaptarse a múltiples formatos de ensayo, los métodos inmunoquímicos han encontrado un gran número de aplicaciones, tanto a nivel analítico como preparativo sobre todo en aquellos casos en los que es necesario el análisis rápido de un gran número de muestras o para realizar determinaciones preliminares fuera del laboratorio.⁷³

Hoy en día, estos métodos alternativos se presentan como una gran opción para su uso y aplicación en múltiples campos, siendo su principal característica el ser rápidos, y entre cuyas ventajas están la posibilidad de liberar lotes rápidamente, ahorro de coste, una importante disminución del trabajo manual, optimización y racionalización del recurso humano, uso de equipos semiautomáticos o automáticos, facilidad en la ejecución de los ensayos, análisis de cantidades importantes de muestras, menor uso de espacios en los laboratorios, bajo impacto ambiental, rapidez en la entrega de los resultados, disponibilidad de ensayos sensibles y con un bajo límite de detección, y optimización de los recursos.⁷⁴⁻⁷⁵

Una de las principales características de los inmunoensayos, es su elevada capacidad de análisis de muestras, lo cual los hace particularmente adecuados para estudios de monitoreo a gran escala. Además, los métodos inmunoquímicos tienen la ventaja de adaptarse a una serie de formatos de ensayo, de este modo es posible desarrollar inmunoensayos de bajo coste, portátiles y fáciles de usar. Su principal inconveniente son las interferencias, pero generalmente se pueden evitar por la dilución simple de la muestra; sin embargo, las interferencias causadas por los componentes de la matriz pueden variar de una muestra a otra, especialmente en muestras de alimentos. Dentro de las desventajas de estos métodos

alternativos se podría decir la falta de disponibilidad de reactivos adecuados y la escasa regulación oficial. En general se utilizan como métodos cualitativos o semi-cuantitativos. No obstante lo anterior, la tecnología inmunoquímica hoy en día está suficientemente avanzada para que algunos inmunoensayos se puedan usar para obtener resultados cuantitativos con sensibilidad, exactitud y precisión similares o mayores que otros métodos analíticos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el inmunoensayo claramente no es el mejor método analítico para todo tipo de analitos, en todas las situaciones; por ejemplo, la cromatografía de gases sigue siendo el método de elección para el análisis de compuestos volátiles. Sin embargo, la tecnología de inmunoensayos es importante para el analista porque le sirve de complemento para los métodos clásicos, proporcionando así una estrategia analítica adicional para muchos compuestos y quizás el único análisis analítico razonable de elección para otros.⁷⁶⁻⁷⁷

1.5.2. Inmunorreactivos

Lo primero que se debe hacer para desarrollar un método inmunoquímico, es la obtención de anticuerpos específicos para el analito de interés, que habitualmente se lleva a cabo mediante la inmunización de animales de laboratorio. Por otro lado, cuando el analito de interés es un compuesto de bajo peso molecular, como es el caso del insecticida SP y la cianotoxina anatoxina-a, no tiene actividad inmunogénica por lo que para obtener anticuerpos es necesario preparar conjugados en los que un análogo de la molécula de interés quede unido covalentemente a una molécula de gran tamaño transportadora que sí es inmunogénica. No obstante, dicho acoplamiento solo es posible si la molécula contiene algún grupo químico reactivo o activable. Por otro lado, si este es el caso, puede ser interesante mantener dicho grupo químico accesible para su interacción con el anticuerpo. En consecuencia, se impone la necesidad de sintetizar un análogo funcionalizado de la molécula de interés.

1.5.2.1. Haptenos

Un hapteno es una sustancia química de pequeño peso molecular (menor de 2000 Da) que por sí misma no induce a la formación de anticuerpos (no es inmunogénica) pero que puede ser reconocida por un anticuerpo (es antigénica). Sobre su aplicación y contexto en los inmunoensayos para moléculas pequeñas, el término hapteno se utiliza para designar a un compuesto sintético capaz de imitar la estructura química del analito problema a detectar y que al mismo tiempo permite el acoplamiento a una proteína. Dicho en otras palabras, el

hapteno es el que permite la obtención de anticuerpos capaces de reconocer al analito debido a la similitud estructural entre ellos.

La capacidad de generar anticuerpos de exquisita especificidad y afinidad, juega un papel crítico en una gran variedad de campos que van desde anticuerpos catalíticos hasta el inmunodiagnóstico,⁷⁸ y para ello es fundamental un correcto diseño de haptenos. En la década de 1920, Karl Landsteiner, examinó la posibilidad de si un anticuerpo anti-hapteno podía unirse a otros haptenos con estructura ligeramente distinta dando lugar a una reacción cruzada. Para ello estudió las modificaciones que permitían o prevenían una reacción cruzada aportando de esta manera información sobre la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo. El trabajo realizado por Landsteiner demostró la gran especificidad del sistema inmunitario para reconocer pequeñas variaciones estructurales en los haptenos, así como la enorme cantidad de epítomos (porción de una molécula que es reconocida por el sistema inmunitario) capaces de ser identificados.⁶⁵ Mediante el uso de métodos fisicoquímicos, los químicos han ayudado a definir a nivel molecular la relación entre la estructura de un hapteno y las propiedades de unión de los anticuerpos que un hapteno genera. La especificidad y afinidad, son dos propiedades de los anticuerpos que continúa fascinando hoy en día a los químicos, tanto como intrigaron a Karl Landsteiner.

De la estructura química de los haptenos sintetizados dependerán en gran medida las propiedades de los anticuerpos que se producen por parte del organismo inmunizado, razón por la que esta primera etapa correspondiente a la síntesis de haptenos merece especial atención y se convierte así, en la mayoría de los casos, en la etapa determinante para desarrollar inmunoensayos. En tal virtud, el hapteno debe poseer una estructura química lo más parecida al analito de interés, pudiendo preservar los principales grupos de la molécula, su conformación, distribución electrónica y las propiedades hidrofóbicas de la molécula original.⁷⁹⁻⁸⁰ De esta manera resulta lógico pensar que, si el hapteno es muy similar al analito, los anticuerpos generados hacia dicho hapteno deberán reconocer también al analito con elevada afinidad y especificidad.

El acoplamiento químico de un hapteno a una proteína transportadora genera un conjugado hapteno-portador que constituye el inmunógeno. La inmunización con tal conjugado produce anticuerpos específicos para tres tipos de antígenos: anticuerpos contra el hapteno, anticuerpos contra el portador y anticuerpos contra el hapteno y el portador.⁸¹ Por ello, para favorecer la obtención de anticuerpos contra el hapteno es importante separarlo de la proteína mediante un brazo espaciador, evitando también el enmascaramiento de ciertas partes del hapteno por proximidad al sitio de unión con la proteína. Además, es importante que el brazo espaciador no contenga elementos fuertemente inmunogénicos por sí mismos,

como son anillos aromáticos, dobles enlaces conjugados o heteroátomos, ni tampoco que sea excesivamente polar, lo que podría cambiar la distribución electrónica de la molécula y desviar la respuesta inmunitaria hacia el brazo espaciador en lugar de hacia la parte del hapteno que imita al analito. La aproximación más extendida es la introducción de una cadena hidrocarbonada lineal totalmente saturada de entre 3 y 6 átomos de carbono.

Para el acoplamiento (conjugación) es necesario que el hapteno posea grupos funcionales, tales como $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ o $-\text{SH}$, capaces de reaccionar con alguno de los grupos disponibles en las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas transportadoras. Landsteiner propuso que “la especificidad de un anticuerpo se dirige fundamentalmente hacia la porción del hapteno más alejada del brazo espaciador que une el hapteno a la proteína transportadora”,⁸² sugiriendo que la región de la molécula más alejada a la proteína estaría más accesible durante la respuesta inmunitaria, permitiendo al anticuerpo interactuar fuertemente y desarrollar un paratopo (sitio de unión) más restrictivo. Por ello, dicho grupo funcional debe estar localizado en el extremo del brazo espaciador. El grupo funcional más habitual es el grupo carboxilo dada la facilidad de conjugación que éste presenta con los grupos amino libres de los aminoácidos básicos de las proteínas portadoras, fundamentalmente lisinas, a través de la formación de un enlace amida.

1.5.2.2. Bioconjugados

Para la obtención de anticuerpos contra un determinado hapteno es necesario que su acoplamiento a una proteína sea de manera covalente, de tal forma que al utilizar el complejo proteína-hapteno como inmunógeno, se desencadene la respuesta inmunitaria deseada. Además, para favorecer la generación de anticuerpos hacia el hapteno y no hacia la proteína conviene que la densidad hapténica, o relación molar hapteno-proteína (RM), sea elevada. Son los grupos funcionales del hapteno que definen la selección del método que se utilizará para conjugar el hapteno a los grupos funcionales del portador.⁸³

El análisis de proteínas a través de un inmunoensayo se puede realizar mediante ensayo tipo sándwich, ya que debido a su gran tamaño poseen varios epítopos que permiten la unión de varias moléculas de anticuerpo a una molécula de proteína de manera simultánea. En cambio, los compuestos de bajo peso molecular constituyen un único epítipo, y por lo tanto no pueden interactuar de manera simultánea con dos moléculas de anticuerpo. La estrategia que se sigue en este caso es recurrir a ensayos competitivos mediante la utilización de antígenos que mimetizan el analito y que compiten con el analito libre por unirse al anticuerpo. Generalmente dichos competidores son conjugados proteicos de haptenos

sintéticos. Por lo tanto, a parte del inmunógeno, se requiere la preparación de un tipo de conjugado proteína-hapteno adicional, los conjugados de ensayo.

La RM de un conjugado proteína-hapteno es un parámetro cuya determinación es considerada de interés, debido a que su valor óptimo es diferente en función de su finalidad. Por ejemplo, un conjugado con fines de inmunización requiere un valor moderadamente elevado de RM y poder favorecer la exposición del hapteno al sistema inmunitario, mientras que para conjugados destinados a ser empleados en inmunoensayos competitivos, es recomendable un valor más moderado de RM. La RM puede estimarse mediante espectrometría UV/vis cuando el hapteno absorbe radiación en esta región del espectro electromagnético. Por otro lado, la elevada capacidad actual de los equipos que hacen uso de técnicas como espectrometría de masas MALDI-TOF permite una medida precisa de la masa de macromoléculas, por lo que éstas también pueden emplearse para el cálculo de la densidad hapténica de un conjugado.⁸⁴

Las proteínas que se utilizan con mayor frecuencia para la conjugación covalente de los haptenos son las albúminas, seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina (OVA), conalbúmina (CONA) y seroalbúmina humana (HSA). Los criterios de selección se basan en su elevada inmunogenicidad, solubilidad y facilidad de conjugación. Algunas de las características más destacables por las que la BSA es la proteína más utilizada son: elevado número de residuos de lisina disponibles, tolerancia a cargas hapténicas altas sin pérdida de solubilidad, elevada estabilidad física y química, disponibilidad y bajo coste. Asimismo, con esta proteína se facilita la determinación del número de moléculas acopladas, y además, presenta amplia tolerancia a diferentes disolventes orgánicos, en los cuales normalmente son solubles los haptenos, tales como piridina, DMSO y DMF.⁸⁵⁻⁸⁶

1.5.2.3. Anticuerpos

Los anticuerpos, conocidos también como inmunoglobulinas, son glicoproteínas generadas por los sistemas inmunitarios de animales vertebrados para combatir entidades extrañas que pueden dañar al huésped. Son producidos por linfocitos B, y están programados para identificar y eliminar especialmente el agente invasor. En humanos hay cinco clases diferentes de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) que se caracterizan en función de su estructura, función y localización. Las IgG son la clase de inmunoglobulinas más abundante, representando el 80% del total de las inmunoglobulinas en suero. Se considera la opción más interesante para las aplicaciones en inmunoquímica debido a su alta tasa de síntesis, tamaño pequeño y estabilidad.⁸⁷

Típicamente, una IgG está compuesta por dos cadenas pesadas idénticas (de 50 kDa cada una) y dos cadenas ligeras idénticas (de 25 kDa cada una), que están estabilizadas y conectadas entre sí mediante enlaces disulfuro entre cadenas e intracadenas. Además, las dos cadenas pesadas están asociadas a polisacáridos. Los anticuerpos tienen dos funciones fundamentales, de reconocimiento y unión de antígenos, que llevan a cabo mediante los extremos aminoterminales de las cadenas, de secuencia variable y de la que depende la especificidad, y una función efectora, realizada por el extremo carboxiterminal de las cadenas pesadas, en el fragmento constante de la molécula, que difiere según se trate de cadenas ligeras κ o λ .⁸⁸

El anticuerpo está formado por una región correspondiente al fragmento cristalizante (Fc) y dos regiones correspondientes al fragmento de unión al antígeno (Fab) conectadas entre sí por una región bisagra (**Figura 1.3**). Funcionalmente, en la región Fc es donde están localizadas las funciones efectoras (unión del complemento, unión a receptores en macrófagos o receptores celulares) y los sitios de glicosilación, desempeñando un papel importante durante la activación de la respuesta inmune. En cambio, en cada región Fab se localiza el sitio de unión al antígeno. La región de la bisagra imparte flexibilidad a los brazos Fab que se requiere para interactuar eficientemente con el antígeno. En general, los dos brazos de unión del antígeno, junto con la región constante, forman una estructura en forma de Y.

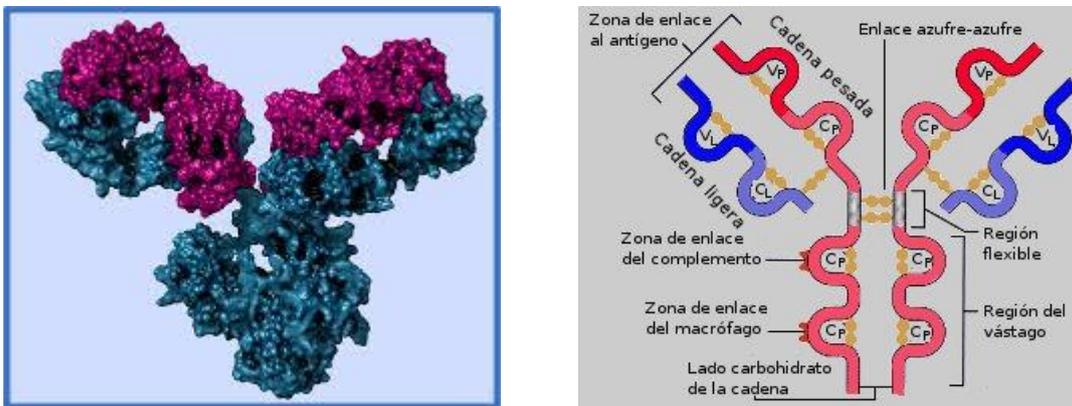


Figura 1.3. Representación esquemática de una inmunoglobulina tipo IgG.

La mayor parte de la estructura del anticuerpo es constante y sólo los extremos de los fragmentos Fab presentan regiones variables. En base a la composición de aminoácidos de cada cadena, estas se subdividen en regiones constantes y variables. Los extremos variables de la cadena ligera y la cadena pesada se denominan V_L y V_H , respectivamente. En esta zona se produce la interacción con el antígeno, por lo que constituye la porción más pequeña del anticuerpo necesaria para su actividad, proporcionando un grado excepcional de versatilidad. Cada cadena pesada y cadena ligera contiene tres regiones hipervariables (HV) o regiones determinantes de complementariedad (CDR) separadas entre sí por cuatro regiones marco

(FR). La diversidad en la unión al antígeno es aportada por las CDR que contienen altos niveles de variaciones de aminoácidos en comparación con las FR que se conservan de forma comparativa en la naturaleza.

Los anticuerpos se pueden clasificar en tres tipos diferentes: policlonales, monoclonales y recombinantes. Los anticuerpos policlonales (pAbs) son una mezcla heterogénea de anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B en respuesta a un antígeno. Debido a su heterogeneidad, los pAbs tienen afinidades y especificidades diferentes hacia múltiples sitios o epítomos en el antígeno. Los pAbs son los más fáciles de generar y producir. Para generarlos, primero un huésped adecuado se inmuniza con el antígeno seleccionado (a intervalos deseados) para inducir a los linfocitos B a producir inmunoglobulinas capaces de reconocer ese antígeno. Generalmente se usan adyuvantes junto con el antígeno para aumentar la respuesta inmunitaria al antígeno. Una vez que se genera un título de anticuerpo deseado (niveles de anticuerpos específicos en el suero del huésped), se recoge sangre del animal, se separa el suero (llamado antisuero) y se aíslan los anticuerpos mediante precipitación de proteínas y, ocasionalmente es posible una mayor purificación mediante cromatografía de afinidad. El animal más utilizado para obtener pAbs es sin duda el conejo, por su intensa respuesta a inmunógenos, por aportar una cantidad importante de suero, y por ser fácil de manejar y estabular. No obstante, también se usan cabras, ovejas, ratas, perros y burros, entre otros mamíferos. De manera alternativa, los pAbs pueden producirse en pollos. La forma predominante de anticuerpo de pollo es la inmunoglobulina Y (IgY). Cuando se inmuniza un pollo, se generan anticuerpos séricos que se transfieren a la yema de huevo.⁸⁹ Estos anticuerpos se acumulan en altas concentraciones en la yema de huevo (como IgY) y por tanto pueden aislarse fácilmente.⁹⁰⁻⁹²

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se producen utilizando la tecnología de hibridomas desarrollada por Niels K. Jerne, Georges J. F. Köhler y César Milstein, basada en la immortalización de linfocitos B, y por la que se les concedió el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1984. La producción de mAbs utilizando dicha tecnología es un proceso de trabajo intensivo y de múltiples etapas que requiere meses de dedicación desde la inmunización hasta la clonación y estabilización definitiva del hibridoma. Los pasos básicos involucrados son la preparación del antígeno, la inmunización de los animales hasta obtener títulos apropiados, la recolección del bazo de los huéspedes inmunizados, la fusión de linfocitos con mielomas para la generación de hibridomas, su selección y subclonación, y finalmente, la expansión del hibridoma y la purificación de los anticuerpos producidos a partir del sobrenadante de cultivo. Los protocolos de inmunización y fusión celular pueden variar de un laboratorio a otro, pero en general los huéspedes reciben inyecciones con el inmunógeno en una emulsión con

adyuvante cada 2-3 semanas después de la inmunización inicial.⁹³⁻⁹⁴ El animal más utilizado es el ratón ya que genera anticuerpos de muy elevada afinidad y especificidad, es pequeño y por lo tanto fácil de manejar y estabular, y sobre todo porque existen todo tipo de reactivos disponibles para la generación de mAbs de ratón (como por ejemplo los mielomas de ratón genéticamente adecuados para la fusión celular) y para su uso en inmunoensayos.

Los anticuerpos recombinantes (rAbs) son la última generación de anticuerpos, producidos utilizando técnicas de biología molecular y/o tecnología de ADN recombinante. En 2018, la importancia de este enfoque fue reconocida por la concesión del Premio Nobel en Química a Gregory P. Winter y George Smith por sus contribuciones al desarrollo de elementos clave para el cribado y la ingeniería de anticuerpos. Esta tecnología requiere recuperar y amplificar genes de anticuerpos, combinarlos y clonarlos en un vector adecuado para generar bibliotecas de anticuerpos de presentación molecular.⁹⁵

Los pAbs, mAbs y los rAbs poseen distintas ventajas e inconvenientes. La elección de generar un tipo particular de anticuerpo u otro se reduce a unos pocos criterios esenciales, es decir, los costos asociados, el tiempo de generación y la aplicación prevista del anticuerpo generado. Algunas diferencias claves se destacan en la **Tabla 1.3**.

Tabla 1.3. Ventajas y limitaciones de diferentes tipos de anticuerpos.

Características	Anticuerpo		Anticuerpo
	policlonal	Anticuerpo monoclonal	recombinante
Tiempo de producción	Corto	Largo	Corto a moderado
Facilidad de producción	Muy fácil	Difícil	Fácil
Costo de producción	Bajo	Moderado a alto	Bajo a moderado
Estabilidad	Alta	Moderada	Depende del formato
Número de animales necesarios para la producción	Alto	Moderado	Bajo a ninguno
Variaciones de lote a lote	Si	No	No
Suministro	Limitado	Ilimitado	Ilimitado
Análisis detallado de anticuerpos	Imposible	Posible	Posible
Especificidad del epítipo	Poliespecífico	Monoespecífico	Monoespecífico
Especificidad del antígeno	Moderada	Alta	Alta
Afinidad	Variable	Moderada a alta	Moderada
Generación de anticuerpos del isotipo deseado	Imposible	Posible	Posible
Capacidad de reticular antígenos	Si	No	No
Modificación genética	Imposible	Posible sólo cuando se convierte a rAb	Posible

1.5.3. Métodos inmunoanalíticos

El principio de los inmunoensayos se basa en la interacción antígeno-anticuerpo; la unión de ellos es un proceso reversible en el que están involucradas interacciones no covalentes.⁹⁶ Los reactivos están en un estado de equilibrio que se caracteriza por la ley de la acción de masas. Las primeras aplicaciones de los inmunoensayos en laboratorios clínicos a menudo implicaban la detección con compuestos radiactivos. Estos radioinmunoensayos (RIA) han sido reemplazados por inmunoensayos enzimáticos (EIA), que ofrecen una detección de antígenos fácil y no peligrosa para la salud. Para ello, las moléculas enzimáticas se conjugan con anticuerpos primarios o secundarios, o con análogos del analito. Un anticuerpo que se une específicamente a su antígeno se denomina anticuerpo primario y un anticuerpo que se une a un anticuerpo se llama anticuerpo secundario. Cuando se añade el sustrato adecuado, la enzima cataliza la producción de un producto final coloreado, que se puede visualizar y cuantificar. Las enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano picante (HRP).⁹⁷

Los inmunoensayos se pueden clasificar en función de si es necesario o no separar el complejo anticuerpo-antígeno del anticuerpo y del antígeno libres para la obtención de una señal que se pueda correlacionar con la concentración de antígeno. Cuando la detección de la señal se realiza a partir de la mezcla de inmunorreacción se habla de un ensayo homogéneo. Un ejemplo de inmunoensayo enzimático en fase homogénea es el EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*). Mientras que se denomina ensayo heterogéneo a aquél en el que para poder cuantificar el analito es necesario separar el producto de la reacción inmunoquímica, lo que se puede conseguir mediante la inmovilización de uno de los inmunorreactivos sobre un soporte sólido.

Dentro de las principales ventajas del ensayo homogéneo son su simplicidad, al no requerir etapas adicionales de lavado o separación, y por otro lado su rapidez, ya que el equilibrio se alcanza en un tiempo menor al encontrarse todos los inmunorreactivos en disolución.⁹⁸ Un ejemplo es el inmunoensayo de polarización de la fluorescencia (FPIA de sus siglas en inglés, *Fluorescence Polarization ImmunoAssay*). En cuanto a los ensayos en fase heterogénea, son los más utilizados, ya que por lo general proporcionan una mayor sensibilidad y son menos susceptibles a sufrir interferencias de la muestra.⁹⁹

La mayoría de los métodos inmunoanalíticos ligados a enzimas requieren la separación del complejo anticuerpo-antígeno de las moléculas de anticuerpo y/o antígeno que no han reaccionado, y por lo tanto son ensayos que tienen lugar en fase heterogénea. Tales sistemas se denominan ensayos de inmunoadsorción en fase sólida ligados a enzimas (ELISA de sus

siglas en inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).⁹⁶ Sin duda el método ELISA es el que mayor éxito ha alcanzado de todos los métodos inmunoquímicos existentes, y actualmente es uno de los más utilizados.

Como se ha explicado anteriormente, la naturaleza monovalente de las moléculas orgánicas pequeñas para interactuar con los anticuerpos obliga a que los ensayos sean de tipo competitivo. En un inmunoensayo competitivo, tal como indica su nombre, el analito de interés compite con un conjugado de ensayo por los sitios de unión del anticuerpo, que debe encontrarse en concentración limitante para que la competición sea real, de tal manera que la señal se genere a partir de la cantidad de conjugado que ha interactuado con el anticuerpo. El método ELISA competitivo es sin lugar a dudas el método inmunoanalítico más empleado para el análisis de pequeñas moléculas orgánicas dada la facilidad, versatilidad y rapidez con que se obtienen los resultados.¹⁰⁰

Los biosensores son dispositivos analíticos conformados por un elemento biológico de reconocimiento, como los anticuerpos, asociado a un mecanismo de detección e interpretación de la señal obtenida producto de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico, constituyéndose en una herramienta para inspeccionar la calidad y los procesos con un panorama prometedor con respecto a los métodos tradicionales, en cuanto a especificidad, sencillez, respuesta clara y real en las áreas ambiental, clínica y de alimentos. Entre las ventajas de los biosensores para el aseguramiento de la calidad fisicoquímica, microbiológica y la vida de los alimentos, se destacan: alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, debido a que las mediciones de nutrientes, micronutrientes, contaminación por residuos, toxinas y productos metabólicos se encuentran en concentraciones a nivel de trazas.¹⁰¹⁻¹⁰²

Una forma de caracterizar la interacción antígeno-anticuerpo es su evaluación desde los puntos de vista cinético y termodinámico. Así, los parámetros de mayor interés que pueden proporcionar estudios de este tipo son las constantes de velocidad y de equilibrio asociadas al proceso. Dada la gran diversidad existente de métodos inmunoquímicos, esta información puede ser útil para decidir posteriormente si un anticuerpo es adecuado o no para el método que se desea desarrollar, o si sería más adecuado para otra técnica. Por ejemplo, un anticuerpo capaz de unirse de forma rápida e intensa al antígeno sería muy útil para ELISA, pero no tanto para el desarrollo de una columna de inmunoafinidad, puesto que quedaría excesivamente retenido sobre el lecho cromatográfico siendo difícil su posterior elución.

Una técnica relativamente reciente que permite la determinación de estas constantes es la resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés, *Surface Plasmon Resonance*). Dicho fenómeno físico fue inicialmente observado a principios del siglo XX por R. W. Wood,¹⁰³ y tras varias décadas de investigación fue implementada entre 1980 y 1990 como

técnica de análisis. Mediante SPR, es posible seguir en tiempo real una interacción entre dos biomoléculas sobre la superficie de un chip sin necesidad de utilizar ningún tipo de marcaje, situación que la convierte en una técnica analítica de gran interés.

1.6. El inmunoensayo enzimático de adsorción en microplaca

Como ya se ha indicado, la técnica ELISA es una de las más empleadas en inmunoquímica. Se basa principalmente en llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo en fase heterogénea, con uno de los componentes inmovilizado sobre un soporte sólido y con el otro inmunorreactivo, no inmovilizado, marcado por una enzima. Posteriormente, se evalúa el grado de reconocimiento a través de la adición de un sustrato de la enzima de marcaje dando lugar a una señal. Si el sustrato es cromogénico la señal será la absorbancia de la disolución coloreada resultante. Alternativamente se utilizan sustratos fluorogénicos o luminogénicos con los que se puede conseguir aumentar la sensibilidad del ensayo. Aunque existen distintos soportes, la manera más habitual es que los inmunoensayos enzimáticos se realicen en microplacas de poliestireno, de tal manera que la inmovilización de uno de los inmunorreactivos generalmente se produce por adsorción pasiva o por captura indirecta mediante un anticuerpo secundario inmovilizado.

La función de la superficie del soporte sólido es tan crucial como la del complejo antígeno-anticuerpo con el que interactúa. Es importante considerar la superficie como un componente integral de cualquier inmunoensayo tipo ELISA debido a su efecto sobre las biomoléculas, ya que éstas pueden o no unirse a la matriz, su orientación y conformación, y por tanto su capacidad de interactuar, pueden verse afectadas, y además su accesibilidad a las moléculas en disolución es menor que si el ensayo se desarrolla en fase homogénea. Este fenómeno de unión a un soporte sólido está controlado por las propiedades químicas y físicas de la superficie y de la biomolécula, pero puede ser modulado por otros factores como el pH, la fuerza iónica, los detergentes y la temperatura del medio de reacción.¹⁰⁴

Aunque para el desarrollo de inmunoensayos tipo ELISA se ha utilizado un gran número de enzimas, las más comunes son la peroxidasa del rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina (AP). En el caso de la HRP, la detección colorimétrica de la actividad se realiza mediante la oxidación de una serie de sustratos tales como OPD (*o*-fenilenodiamina), ABTS (ácido 2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La OPD es un sustrato incoloro que, al ser oxidado por la peroxidasa empleando el H₂O₂ como receptor de electrones, da lugar a un compuesto de color anaranjado que muestra un máximo de absorción a 492 nm en medio ácido. En lo que respecta a la AP, esta enzima cataliza en medio

básico la hidrólisis de ésteres de fosfato de sustratos como el PNPP (*p*-nitrofenilo fosfato) o el BCIP (bromocloroindolilo fosfato), produciéndose productos de hidrólisis coloreados.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

1.6.1. El ELISA competitivo

El ELISA competitivo utiliza dos inmunorreactivos, el anticuerpo y el conjugado de ensayo, para la determinación del analito. Para que ocurra la competición entre el conjugado de ensayo y el analito por unirse al anticuerpo es necesario que este último se encuentre en cantidades limitantes. En ausencia de analito se formará la máxima cantidad posible de complejo anticuerpo-conjugado, dando lugar a lo que se conoce como la señal máxima del ensayo ($A_{m\acute{a}x}$). Por otro lado, la presencia de analito desplazará al conjugado reduciendo la señal, hasta llegar al valor mínimo cuando el primero se encuentre en exceso. De esta manera, cuanto mayor sea la cantidad de analito que se une al anticuerpo, menor será la de conjugado, y viceversa. La señal generada en un ELISA competitivo es inversamente proporcional a la concentración de analito.

La representación en escala semilogarítmica de la señal de un ELISA competitivo frente a la concentración de analito da lugar a una curva decreciente sigmoidea. Esta representación suele llamarse curva de inhibición, ya que representa el grado de inhibición de la interacción entre el anticuerpo y el conjugado debido a la presencia del analito. Una curva de inhibición viene definida por cuatro parámetros (**Figura 1.4**): la asíntota superior, que corresponde a la señal máxima ($A_{m\acute{a}x}$), la asíntota inferior, que representa la señal mínima ($A_{m\acute{i}n}$) o ruido de fondo, la concentración en el punto de inflexión y la pendiente de la curva en dicho punto. Generalmente, se toma el valor de la concentración de analito en el punto de inflexión de la curva como una referencia de la sensibilidad del ensayo, siendo ésta tanto mayor cuanto menor sea el valor de dicha concentración. Tradicionalmente este valor equivale a la IC_{50} , ya que coincide con la concentración que proporciona una inhibición de la $A_{m\acute{a}x}$ del 50% si el valor de la señal mínima tiende a cero. Además, cuando el ensayo se lleva a cabo en condiciones limitantes dicho valor constituye una estimación bastante cercana de la constante de equilibrio (K_D).

Otros parámetros analíticos de interés son el límite de detección (LOD) del inmunoensayo y el rango de cuantificación. El LOD se define como la concentración mínima de analito que puede ser detectada con fiabilidad. Una forma habitual de calcular dicho valor es determinar la IC_{10} , es decir la concentración de analito que produce un 10% de inhibición de la reacción anticuerpo-conjugado, y que se corresponde con el 90% de la señal máxima. Por otro lado, el rango de cuantificación o de trabajo comprende aquellas concentraciones de analito cuyas medidas son de una precisión suficiente para satisfacer las necesidades particulares del

analista. La concentración más baja del mismo se denomina límite de cuantificación (LOQ). En general, se asume que el intervalo de trabajo está comprendido entre las concentraciones de analito que reducen la señal máxima entre el 20% y el 80%.¹⁰⁸ La **Figura 1.4** resume todos los parámetros mencionados para un ensayo competitivo tipo ELISA.

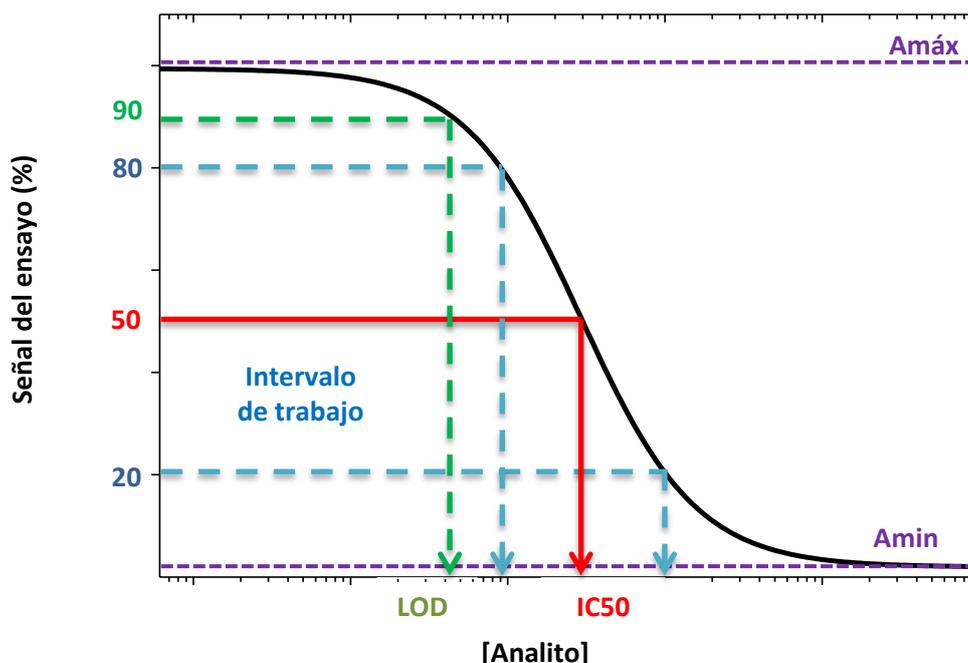


Figura 1.4. Curva de inhibición sigmoidea obtenida de un inmunoensayo competitivo tipo ELISA. Se representa en escala semilogarítmica la señal frente a la concentración de analito. Los colores rojo, verde y azul resaltados corresponden a los parámetros de IC_{50} , LOD e intervalo de trabajo, respectivamente. Las asíntotas correspondientes a la señal máxima ($A_{máx}$) y mínima ($A_{mín}$) de la curva también se han resaltado.

1.6.2. Formatos

Todos los inmunoensayos tipo ELISA competitivo tienen en común al menos tres etapas: el recubrimiento o tapizado inicial de la superficie de los pocillos, la competición entre analito y conjugado por unirse al anticuerpo, y el revelado de la actividad enzimática. Cabe recalcar que después de cada etapa del ensayo se realiza un lavado de los pocillos, el cual tiene como finalidad eliminar todo aquello que no haya quedado retenido. Dentro de esta técnica, existen diferentes formatos dependiendo del inmunorreactivo que se inmoviliza (el anticuerpo o el conjugado de ensayo) y del modo en que se realiza el marcaje enzimático.¹⁰⁹

En el formato de anticuerpo inmovilizado (**Figura 1.5**), el hapteno se acopla de manera covalente a una enzima (trazador enzimático). De este modo el marcaje es directo sobre uno de los inmunorreactivos, por lo que este formato de manera más sencilla se denomina directo.

La utilización de un conjugado no enzimático para llevar a cabo la detección de manera indirecta es factible, pero tendría poco sentido. En el formato directo, para la etapa de competición se mezclan en el pocillo el analito y el trazador enzimático – con adición simultánea o no –, donde ambos compiten por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado de modo que, en función de la concentración de analito libre presente en la muestra, quedará una determinada cantidad de conjugado enzimático retenido.

Por otro lado, el anticuerpo puede ser inmovilizado de manera indirecta empleando un anticuerpo de captura que reconoce al anticuerpo primario, o mediante algún receptor inespecífico, como la estreptavidina y proteína G o A. Esta inmovilización mediante captura resulta muy útil para revertir posibles alteraciones en el funcionamiento del anticuerpo como consecuencia de su inmovilización directa sobre la placa. En el formato directo con captura, el anticuerpo se suele añadir al pocillo antes de la etapa de competición, pero también es posible incubarlo con el analito en presencia o no del trazador enzimático antes de depositarlo en el pocillo, o mezclarlo simultáneamente con el analito y el trazador enzimático en el pocillo pretapizado.

En el formato de conjugado inmovilizado el anticuerpo primario está en disolución (**Figura 1.6**). Generalmente el marcaje enzimático se lleva a cabo indirectamente mediante la utilización de un conjugado enzima-anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario. Es por ello que este formato se conoce como formato indirecto. No obstante, también es posible el marcaje directo del anticuerpo primario. En la etapa de competición se añaden al pocillo una cantidad limitante de anticuerpo primario y el analito, de tal manera que se establece una competencia entre el conjugado inmovilizado y el analito en disolución por unirse al anticuerpo primario. En tal virtud, cuanto más analito libre haya en disolución, menos anticuerpo se unirá al conjugado inmovilizado y viceversa. Posteriormente a la etapa de lavado, se adiciona el anticuerpo secundario marcado enzimáticamente. La diferencia metodológica con el formato directo es que el indirecto implica una etapa de incubación más y un lavado adicional de los pocillos.

Existe otra manera muy útil si se desea disminuir el tiempo del ensayo indirecto conocido como formato indirecto de una sola etapa, en el que tanto el anticuerpo primario como el secundario se adicionan simultáneamente, pudiendo obtener en ocasiones ensayos con una sensibilidad muy similar al ensayo de dos etapas consecutivas.¹¹⁰⁻¹¹⁴

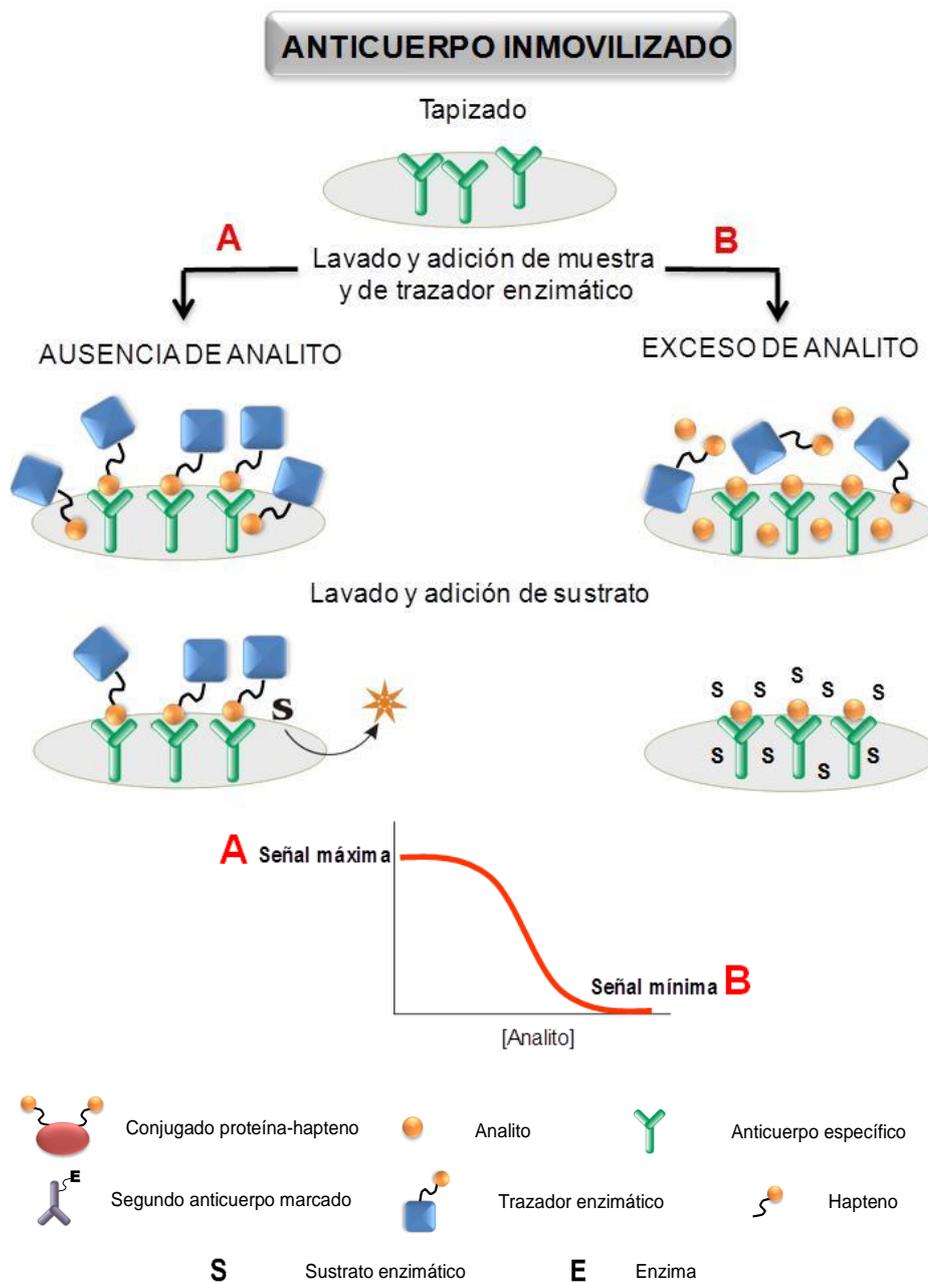


Figura 1.5. Representación esquemática de un ELISA competitivo en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa. Representación modelo tomada de la tesis doctoral de la Dra. Rosario López Moreno, Valencia 2012.

CONJUGADO INMOVILIZADO

Tapizado

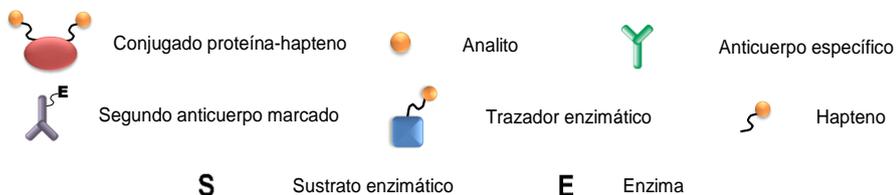
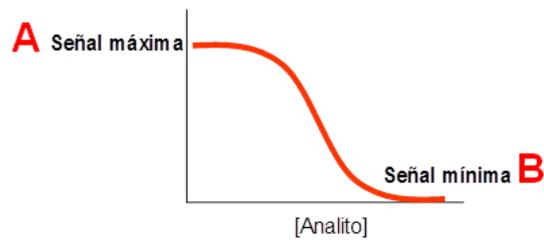
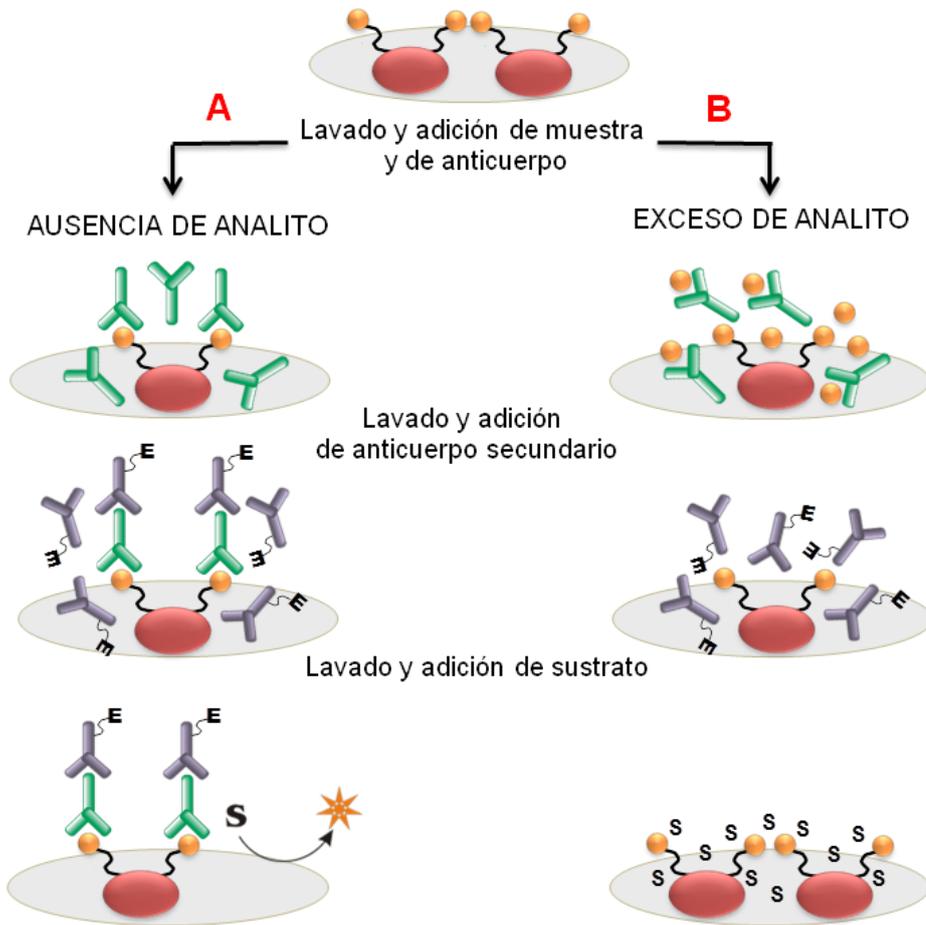


Figura 1.6. Representación esquemática de un ELISA competitivo en formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta. Representación modelo tomada de la tesis doctoral de la Dra. Rosario López Moreno, Valencia 2012.

Estos formatos de ELISA competitivo presentan ventajas e inconvenientes referidas a parámetros tales como el número de etapas necesarias y por ende al tiempo para cada uno de ellos (sobre todo en el formato indirecto), la concentración de anticuerpo empleada (mayor en el formato directo), la robustez, influencia de factores externos, como por ejemplo la matriz analizada, o la tolerancia a disolventes orgánicos, que junto con la sensibilidad y la selectividad obtenida determinan la elección final del formato empleado para el desarrollo de un inmunoensayo.

1.6.3. Etapas del desarrollo de un inmunoensayo

En general, los métodos inmunoquímicos para estudio de moléculas orgánicas pequeñas poseen un esquema común y bien establecido, que se inicia con el diseño y la síntesis de haptenos, la preparación de bioconjugados, y la generación de anticuerpos específicos del analito de interés según se ha descrito en el apartado 1.5.2.

Los anticuerpos obtenidos se evalúan frente a los conjugados disponibles mediante ELISA competitivo bidimensional en los formatos deseados. Esto se realiza con el objetivo de seleccionar las mejores combinaciones anticuerpo/conjugado que dan lugar a curvas de inhibición con el menor valor de IC_{50} y con el valor de la pendiente de la curva sigmoidea lo más cercano a 1.0. Luego de obtener las mejores combinaciones de anticuerpo/conjugado, se seleccionan para ser reensayadas optimizando las concentraciones de inmunorreactivos necesarias y más bajas para obtener un valor de $A_{m\acute{a}x}$ entre 1.0 y 1.3.

Dentro de las propiedades más importantes para caracterizar un anticuerpo son su afinidad y especificidad hacia el analito de interés. En este sentido, la afinidad de un anticuerpo se define como la suma de todas las fuerzas repulsivas y atractivas (enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, de van der Waals y/o hidrofóbicas) que se producen entre el sitio de unión del anticuerpo (paratopo) y el correspondiente determinante antigénico (epítopo), y que normalmente se expresa como K_D , la misma que está estrechamente relacionada de con uno de los parámetros analíticos, la IC_{50} . Por otro lado, y como se ha dicho anteriormente, la especificidad es la capacidad que posee un anticuerpo para distinguir entre varios antígenos o analitos que poseen estructuras similares; esto se debe realizar con conjugados homólogos mediante estudios de reactividad cruzada (RC) con otros analitos de estructura química similar al analito de interés.¹¹⁵ Generalmente, lo ideal es que un anticuerpo sea lo más específico posible para evitar posibles interferencias debidas al reconocimiento de compuestos con estructuras similares a las del analito.

La sensibilidad de un inmunoensayo competitivo depende de la relación existente entre la afinidad del anticuerpo hacia el analito de interés y hacia el conjugado de ensayo. En un ELISA

competitivo, la sensibilidad está estrechamente relacionada con la capacidad que tiene el analito para desplazar la interacción entre el conjugado competidor y el anticuerpo, lo que se puede determinar por el balance entre los equilibrios analito-anticuerpo y conjugado-anticuerpo. Por lo tanto, cualquier limitación del equilibrio de reconocimiento molecular anticuerpo-conjugado influirá en el aumento de la sensibilidad.¹¹⁶ De esta manera, una estrategia que puede proporcionar los ensayos más sensibles es la heterología, basada en el uso de conjugados competidores con haptenos heterólogos.

La definición de heterología viene determinada por la naturaleza del hapteno del conjugado competidor que interviene en el inmunoensayo. De esta manera, un conjugado homólogo se define como aquel que lleva el mismo hapteno que el conjugado empleado en la inmunización de la cual proviene el anticuerpo. Por el contrario, en el conjugado heterólogo presenta un hapteno estructuralmente distinto al hapteno del inmunógeno. Dado que un hapteno heterólogo teóricamente es reconocido en menor medida que un hapteno homólogo, la interacción anticuerpo-analito resulta indirectamente favorecida, de manera que se observa un aumento aparente de la afinidad del anticuerpo hacia el analito, lo que dará lugar a un incremento en la sensibilidad del inmunoensayo.

Las heterologías más frecuentes implican la introducción del brazo espaciador en diferentes posiciones (heterología de posición del espaciador)⁷⁹⁻¹¹⁷⁻¹¹⁹, cambios en la longitud o estructura de éste (heterología de brazo espaciador)¹²⁰⁻¹²¹ e inclusive modificaciones pequeñas en el esqueleto del hapteno que mimetiza el analito (heterología estructural).¹²² En este punto cabe remarcar la importancia que adquiere de nuevo el diseño y la síntesis de haptenos para la consecución de un inmunoensayo con las propiedades analíticas deseadas.

La selectividad de un inmunoensayo competitivo depende de la especificidad del anticuerpo. En los ensayos que utilizan un anticuerpo policlonal, la selectividad también está determinada por su afinidad hacia el conjugado de ensayo.¹²³ La selectividad de los ensayos se evalúa mediante el empleo de distintos compuestos como competidores, lo que permite conocer cuáles son los más adecuados para el objetivo perseguido, ya sea un ensayo específico o genérico. Este último tipo de inmunoensayo resulta especialmente útil para realizar un cribado inicial con un elevado número de muestras en las que se sospecha de la presencia de compuestos pertenecientes a una misma familia.¹²⁴⁻¹²⁶

Para continuar con la optimización y desarrollo de los inmunoensayos se realiza un estudio de caracterización con el fin de evaluar su comportamiento frente a la variación de parámetros fisicoquímicos como la temperatura, el tiempo de incubación, el pH, la fuerza iónica, la presencia de disolventes orgánicos, entre otros, ya que pueden afectar el

reconocimiento molecular. Además, es posible mejorar la sensibilidad de un inmunoensayo competitivo mediante la optimización de dichos parámetros.¹²⁷

Antes de proceder a la realización del inmunoensayo es preciso establecer un procedimiento de preparación de las muestras. Si estas son líquidas pueden analizarse en muchos casos directamente o luego de hacer una dilución empleando el tampón más adecuado, aunque también se puede analizar un extracto orgánico derivado de la muestra. La obtención de extractos es necesaria para el análisis de muestras sólidas y semisólidas. En el caso de la extracción de residuos de plaguicidas en alimentos, el método de extracción oficial de la EFSA y de la AOAC, es el conocido como QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*).⁵⁹⁻¹²⁸⁻¹²⁹ En resumen, consta de dos etapas, una primera etapa de extracción líquida con acetonitrilo seguida de una fase de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida por dispersión con una mezcla de aminas primarias y secundarias (PSA) y/o carbón activo. El procedimiento de cada una de las etapas del método QuEChERS, se detallarán más adelante en el apartado de materiales y métodos. La aplicación de las muestras podría conllevar la aparición de interferencias relacionadas con la propia naturaleza de la matriz y del extracto alterando el resultado final, dando lugar a lo que se conoce como efecto matriz. Para esto, se busca la forma de eliminar dicho efecto y poder realizar los ensayos de manera correcta, pudiendo hacer esto en muchos casos a través de una dilución.

Llegados a este punto, es preciso comprobar si el inmunoensayo desarrollado proporciona resultados cuantitativos fiables o bien si su carácter es semi-cuantitativo o simplemente cualitativo. Para esto existen diferentes métodos, uno de los cuales consiste en el análisis de muestras fortificadas con una concentración conocida de analito (muestras dopadas), permitiendo de esta manera determinar la exactitud y precisión del método desarrollado.¹¹⁶ La validación de los inmunoensayos constituye la última etapa en el desarrollo de un método inmunoquímico. Para ello, se puede validar nuevos métodos mediante el análisis de muestras de concentración desconocida y la comparación estadística de los resultados obtenidos con los que proporciona un método analítico de referencia como los mencionados en la **Tabla 1.2**. Cabe mencionar que, en esta fase de validación, es necesario analizar un número estadísticamente significativo de muestras con varias repeticiones (3 a 5). Estos estudios permiten determinar las características analíticas de cada ensayo, como son los límites de detección y de cuantificación, rangos de trabajo, exactitud y precisión.

1.7. La inmunocromatografía de flujo lateral

La importante y creciente demanda de pruebas rápidas ha estimulado cada vez más el desarrollo de nuevas técnicas en diagnóstico clínico, ambiental, monitoreo y análisis de alimentos. Hasta el momento, una variedad de técnicas, incluida la cromatografía de gases acoplada a detectores de espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con diferentes detectores, como los de UV, diodos o espectrometría de masas, incluso con detectores en tándem (HPLC-MS/MS), el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y los biosensores, se han utilizado para detectar pequeñas moléculas. La mayoría de estas técnicas son específicas y sensibles, requiriendo un cierto tiempo, instrumentación costosa y personal más o menos especializado. Comparado a los métodos analíticos convencionales, los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA, de sus siglas en inglés, *Lateral Flow ImmunoAssay*) poseen muchas ventajas en términos de bajo coste, fácil operación, respuesta *in situ* y resultados rápidos y visuales.¹⁰⁹⁻¹³⁰⁻¹³¹

Los primeros ensayos de flujo lateral surgieron a finales de la década de 1960. Posteriormente, en 1976 se comercializó el primer ensayo de flujo lateral para detectar gonadotropina corónica humana (hCG) en orina, conocido mundialmente como test del embarazo, siendo el más importante y sobre todo el más utilizado hasta la fecha. A partir de entonces, esta tecnología se ha venido utilizando ampliamente en la detección de diversas moléculas orgánicas de bajo peso molecular como marcadores de cáncer, micotoxinas, drogas, metales pesados, antibióticos y plaguicidas, entre otros.¹³² Un gran número de publicaciones científicas en el área del diagnóstico de la medicina,¹³³⁻¹³⁵, veterinaria,¹³⁵ en el control de drogas,¹³⁶ análisis medioambiental¹³⁷⁻¹³⁸ o en la seguridad alimentaria,¹³⁹⁻¹⁴⁵ han sido un claro ejemplo de la importancia que han alcanzado los métodos inmunocromatográficos durante los últimos años.

Inicialmente las técnicas inmunocromatográficas fueron diseñadas para realizar un estudio de cribado previo de muestras con fines cualitativos, pudiendo obtener información en un tiempo muy corto, reduciendo así de manera considerable el coste en este tipo de análisis. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que esta tecnología puede ser adaptada para el análisis semi-cuantitativo de diversos compuestos de bajo peso molecular.¹⁴⁶⁻¹⁵⁰

Los dispositivos de flujo lateral se pueden presentar en dos configuraciones posibles. La más utilizada en ensayos clínicos es la configuración en casete, en la cual todos los componentes están ensamblados y contenidos dentro de una carcasa de plástico, con un receptáculo donde se deposita la muestra y una ventana donde se leen los resultados. En este tipo de inmunoensayo generalmente la cromatografía tiene lugar en posición horizontal. Para

la presente tesis doctoral se desarrollaron inmunoensayos de flujo lateral en la configuración de tiras reactivas (dipsticks en inglés) o tiras inmunocromatográficas (ICS, de sus siglas en inglés, *ImmunoChomatography Strips*) para ensayos competitivos dado que se estudiaron analitos con un bajo peso molecular, puesto que las moléculas pequeñas no pueden unirse a dos anticuerpos de manera simultánea.¹⁵¹ En este tipo de inmunoensayo la cromatografía tiene lugar en posición vertical.

Existen numerosos formatos posibles de tiras reactivas en función del inmunorreactivo que está marcado. En el formato más habitual, el anticuerpo es el que está marcado y forma parte de la fase móvil, mientras que el conjugado de ensayo se inmoviliza sobre la membrana de nitrocelulosa para formar la línea test. La línea control habitualmente se prepara con un anticuerpo secundario que reconoce al primario. Ambas líneas se sitúan a una distancia de 10 y 15 mm, respectivamente, de la base de la membrana de nitrocelulosa. Para llevar a cabo el ensayo, el anticuerpo específico marcado se mezcla con la muestra. Al insertar la tira en la mezcla de reacción el líquido fluye por capilaridad por los diferentes componentes de la tira inmunocromatográfica.

Es importante describir los componentes básicos o materias primas que proporcionarán una máxima calidad y menor costo para un ensayo de flujo lateral, entre los que se encuentran **(Figura 1.7)**:

Almohadilla de muestra. Constituida principalmente de celulosa y/o vidrio, y es la parte de la tira que entrará en contacto con la muestra para iniciar el ensayo. Su función principal es transportar la muestra hacia los otros componentes de la tira inmunocromatográfica y ejercer un cierto filtrado de la muestra. La almohadilla de muestra, debe ser capaz de transportar la muestra hasta la tira de forma suave, continua y sobre todo de manera homogénea.

Membrana de nitrocelulosa. El material clave para un ensayo de flujo lateral, es la membrana de nitrocelulosa. Esta membrana proporciona el lugar donde ocurre la cromatografía y la reacción anticuerpo-conjugado.¹³² Esta membrana, sobre la cual se dibujan las líneas test y control, está disponible en diferentes tamaños de poro lo que determina el flujo lateral; así una membrana ideal debe proporcionar soporte y buena unión para capturar diferentes proteínas.¹⁵² Finalmente, una dispensación adecuada de los biorreactivos, el secado y el bloqueo juegan un papel importante en la mejora de la sensibilidad del ensayo.

Almohadilla absorbente. Funciona como sumidero al final de la tira ayudando a mantener el flujo del líquido sobre la membrana y evitando su retorno. Su capacidad para retener el líquido puede desempeñar un papel importante en los resultados del ensayo.

Tarjeta adhesiva. Los tres componentes anteriores están fijados o montados sobre un soporte adhesivo. Los materiales utilizados para la tarjeta adhesiva suelen ser flexibles y no deben interferir con el ensayo de flujo lateral. Se trata de un componente pasivo que solo debe proporcionar una plataforma para el montaje adecuado de todos los componentes. Por lo tanto, el respaldo de la tarjeta sirve como soporte facilitando de esta manera el manejo de la tira.

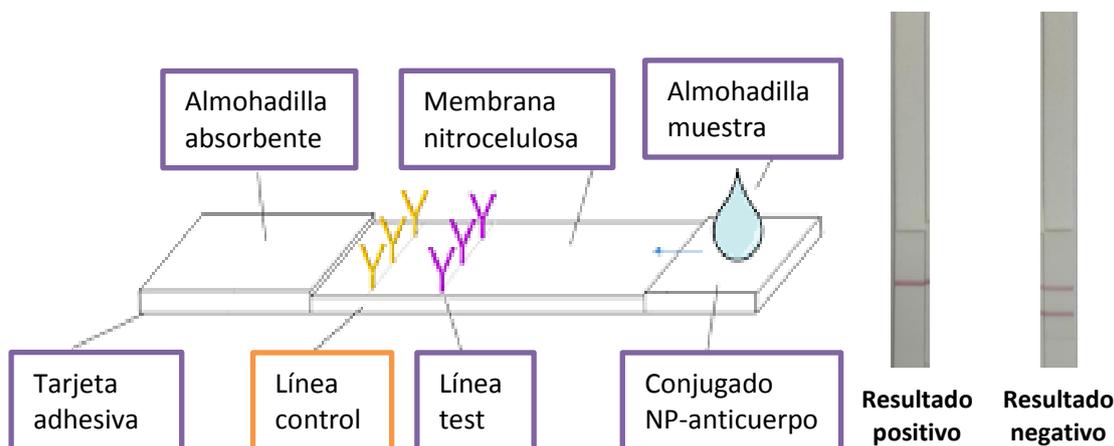


Figura 1.7. Esquema de una tira inmunocromatográfica y sus componentes. Visión de unas tiras reactivas de ensayos con o sin analito.

Respecto a los reactivos de marcaje empleados en un ensayo de flujo lateral, la oferta es muy amplia, incluyendo nanopartículas de oro y plata, partículas magnéticas, nanopartículas de carbón, nanopartículas de látex, quantum dots, entre otros. Cualquiera de los reactivos para el marcaje empleado, este debe ser detectable a concentraciones muy bajas y debe retener sus propiedades tras la conjugación con las moléculas de biorreconocimiento; además que sea fácil en la conjugación con las biomoléculas y que presente estabilidad durante un período de tiempo más largo con características deseables.¹⁵³ En el desarrollo de la presente tesis doctoral, se emplearon las nanopartículas de oro por ser las más usadas en un ensayo de flujo lateral. El oro coloidal es inerte y proporciona perfectas partículas esféricas. Estas partículas tienen una afinidad muy alta hacia las biomoléculas y se pueden funcionalizar fácilmente. Sus propiedades dependen del tamaño y forma.¹⁵⁴⁻¹⁵⁵

Las tiras se preparan dispensando sobre la membrana de nitrocelulosa una disolución de GAM para la línea control, mientras que para la línea test se dispensa el conjugado de BSA seleccionado para cada caso. Consta además de una fase móvil, formada por un bioconjugado NP-mAb preparado añadiendo volúmenes pequeños de una dilución de mAb sobre la preparación diluida de las NPs. Cuando la tira se coloca en la solución de prueba, la solución ingresa a la almohadilla de depósito solubilizando el anticuerpo marcado que se une al analito objetivo. Este complejo analito-anticuerpo fluye con la muestra líquida lateralmente a lo largo

de la superficie de la tira. Un ensayo de flujo lateral puede proporcionar una determinación de sí/no sobre la presencia del analito objetivo (ensayo cualitativo) o un resultado umbral (ensayo semi-cuantitativo), en un tiempo de entre 5 a 10 min.¹⁰⁹ La presencia de color rosa en la línea control indica un resultado positivo cuando la línea test no lo presenta (no inhibición), mientras que la presencia de color rosa en la línea test indica inhibición parcial o total cuando la línea control no lo presenta o en su defecto es muy bajo. Finalmente, la presencia de color rosa en las dos líneas indica un resultado negativo en ausencia de analito (**Figura 1.7**). Cada inmunoensayo es una sola unidad que permite pruebas manuales de una muestra individual.¹⁵⁶

Los principales pasos en el desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral son: preparación del anticuerpo marcado, optimización de la dispensación sobre la membrana de los conjugados de bioreconocimiento de las moléculas tanto en la línea de test como control, ensamblaje de todos los componentes en la tarjeta adhesiva y finalmente, optimización de las condiciones de ensayo.

En la presente tesis doctoral se desarrolló un ensayo inmunocromatográfico para determinar residuos del insecticida SP en alimentos y otro para analizar la presencia de la cianotoxina anatoxina-a en agua, siguiendo la normativa de la Comisión Europea para la validación de bioensayos de cribado rápidos y semi-cuantitativos para la determinación de contaminantes en alimentos.¹⁵⁷

2. OBJETIVOS

El trabajo realizado en esta tesis doctoral tiene como objetivo central el desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis, con elevada sensibilidad y selectividad, del insecticida spirotetramat y la cianotoxina anatoxina-a en muestras de origen alimentario y aguas, permitiendo de manera rápida, económica y sencilla su determinación adecuándose la legislación europea.

En tal virtud, la tesis consta de dos partes, y en cada una se han planteado los siguientes objetivos específicos:

PARTE I. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DEL INSECTICIDA SPIROTETRAMAT EN ALIMENTOS

- ❖ Estudiar la correlación estructura-función de los haptenos disponibles de spirotetramat mediante el análisis de la afinidad y especificidad de los anticuerpos policlonales generados, y de este modo identificar los inmunógenos más adecuados para generar anticuerpos de elevadas prestaciones, y si es posible diseñar nuevos haptenos heterólogos.
- ❖ Evaluar nuestra colección de anticuerpos monoclonales y de bioconjugados de spirotetramat en términos de afinidad y especificidad, y seleccionar parejas de inmunorreactivos para el desarrollo de inmunoensayos de elevada sensibilidad y selectividad.
- ❖ Caracterizar inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales empleando diversos formatos de ELISA competitivo:
 - Optimizar las condiciones de ensayo.
 - Establecer un procedimiento rápido y sencillo para el análisis simultáneo de spirotetramat y spirotetramat-enol.
 - Determinar la precisión y exactitud de los inmunoensayos seleccionados y validar los resultados empleando muestras de uva y derivados de la uva con residuos de spirotetramat.
- ❖ Desarrollar un inmunoensayo de flujo lateral para el análisis rápido y portátil de residuos de spirotetramat en muestras de vino, y su validación siguiendo la normativa vigente sobre límites máximos de residuos y sobre métodos de cribado para el análisis de contaminantes químicos en alimentos.

PARTE II. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS PARA LA CIANOTOXINA ANATOXINA-A EN MUESTRAS DE AGUA

- ❖ Evaluar nuestra colección de anticuerpos monoclonales y bioconjugados de anatoxina-a en términos de afinidad y especificidad, y seleccionar parejas de inmunorreactivos para el desarrollo de inmunoensayos.
- ❖ Caracterizar inmunoensayos tipo ELISA competitivo desde el punto de vista de la sensibilidad y la selectividad, así como estudiar la influencia de diferentes factores fisicoquímicos y de matrices de agua diversas sobre los parámetros analíticos del ensayo.
- ❖ Determinar la precisión y la exactitud de los inmunoensayos desarrollados para el análisis de anatoxina-a en muestras de aguas de diversa procedencia.
- ❖ Desarrollar un inmunoensayo de flujo lateral para el análisis rápido y portátil de anatoxina-a en muestras de agua, y su validación siguiendo la normativa vigente sobre métodos de cribado para el análisis de contaminantes químicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos e instrumentos

3.1.1. Reactivos generales

Los estándares analíticos de SP (CAS 203313-25-1, Mw 373.44 g/mol), SP-enol (CAS 203312-38-3, Mw 301.38 g/mol), SP-ceto (CAS 1172134-11-0, Mw 317.38 g/mol), SP-mono (CAS 1172134-12-1, Mw 303.40 g/mol) y SP-glu (CAS 1172614-86-6, Mw 463.52 g/mol) se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). Se prepararon varias disoluciones stock concentradas (10 y 100 mM) de dichos estándares en *N,N*-dimetilformamida (DMF) de Acros Organics, New Jersey (EE.UU.) en viales de vidrio de color ámbar y se almacenaron a -20 °C. Asimismo, se emplearon una serie de estándares analíticos disponibles en el laboratorio, como: spirodiclofen (CAS 148477-71-8, Mw 411.32 g/mol), maneb (CAS 12427-38-2, Mw 265.30 g/mol como monómero), deltamethrin (CAS 52918-63-5, Mw 505.20 g/mol), propamocarb (CAS 24579-73-5, Mw 188.27 g/mol), spiroxamine (CAS 118134-30-8, Mw 297.48 g/mol), spiromesifen (CAS 283594-90-1, Mw 370.48 g/mol), azoxystrobin (CAS 131860-33-8, Mw 403.39 g/mol), boscalid (CAS 188425-85-6, Mw 343.21 g/mol), cyprodinil (CAS 121552-61-2, Mw 225.29 g/mol), fludioxonil (CAS 131341-86-1, Mw 248.19 g/mol), fenhexamid (CAS 126833-17-8, Mw 302.20 g/mol), trifloxystrobin (CAS 141517-21-7, Mw 408.37 g/mol), pyrimethanil (CAS 53112-28-0, Mw 199.25 g/mol), pyraclostrobin (CAS 175013-18-0, Mw 387.82 g/mol), dimoxystrobin (CAS 149961-52-4, Mw 326.39 g/mol), imidacloprid (CAS 138261-41-3, Mw 255.66 g/mol), fenhexamid (CAS 126833-17-8, Mw 302.20), fenamidone (CAS 161326-34-7, Mw 311.40 g/mol), thiabendazole (CAS 148-79-8, Mw 201.25 g/mol), *o*-fenilfenol (CAS 108-95-2, Mw 94.11 g/mol), chlorothalonil (CAS 1897-45-6, Mw 265.91 g/mol), mandipropamid (CAS 374726-62-2m, Mw 411.88 g/mol), fenpropimorph (CAS 67564-91-4, Mw 303.48 g/mol) y procimidona (CAS 62-53-3, Mw 93.13 g/mol), los cuales fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid). Los estándares analíticos de (+)-anatoxina-a y (-)-anatoxina-a, se obtuvieron en forma de clorhidrato, mientras que la (+)-homoanatoxina-a y (-)-homoanatoxina-a se obtuvieron en forma de trifluoroacetato en el Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València según se describe en Addante-Moya y colaboradores.¹⁵⁸ Se prepararon disoluciones stock a 100 mM en DMF y se almacenaron también a -20 °C.

Las sales de fosfato monosódico monohidrato y de fosfato disódico dodecahidrato, así como el Tris (tris(hidroximetil)aminometano), calidad AnalaR NORMAPUR, fueron adquiridas de VWR Prolabo (Leuven, Bélgica). El HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)etano-1-sulfónico) se compró a PanReac AppliChem (Barcelona). La ovoalbúmina (OVA, grado V), la

peroxidasa de rábano picante (HRP, tipo VI-A) y el Tween-20 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid). La seroalbúmina bovina (BSA, fracción V) fue suministrada por Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). Los disolventes orgánicos, metanol, etanol y acetonitrilo grado HPLC, empleados para la caracterización fisicoquímica y la extracción de muestras, se compraron a Scharlau (Barcelona). La suspensión concentrada de SP al 10% (p/v) empleada para el tratamiento de uvas (Movento® Gold) fue adquirida de Bayer AG (Leverkusen, Alemania).

3.1.2. Instrumentos

La purificación de los conjugados se llevó a cabo con un equipo ÄKTA Purifier de GE Healthcare (Uppsala, Suecia) equipado con un detector UV a 280 nm. Para lavar las microplacas se utilizaron lavadores automáticos modelo ELx405 adquiridos de BioTek Instruments (Winooski, VT, EE.UU.). Los espectros UV/Vis de los conjugados y la absorbancia de los ensayos ELISA se determinaron con un espectrofotómetro PowerWave HT, también de BioTek Instruments, equipado con un monocromador para la lectura de microplacas de 96 pocillos.

Los espectros de masas de los conjugados proteína-hapteno se obtuvieron en un equipo TOF/TOF™ 5800 de ABSciex (Framingham, MA, EE.UU.) mediante desorción-ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, del inglés *Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization Time of Flight*). La matriz se obtuvo a partir de una disolución de ácido sinapínico de Bruker (Billerica, MA, EE.UU.) a 5 mg/mL y ácido 2,2,2-trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v) en CH₃CN/H₂O 7:3 (v/v). La mezcla de calibración TOF/TOF™ fue proporcionada también por ABSciex.

El análisis de muestras mediante HPLC-MS/MS en fase reversa se llevó a cabo en un cromatógrafo Acquity de Waters (Milford, MA, EE.UU.) equipado con un sistema binario de suministro de disolvente, acoplado a un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo TQD provisto con una fuente de electrospray Z-spray. Se empleó una columna Bridged Ethylene Hybrid C18 (50×2.1 m, tamaño de partícula 1.7 µm) también de Waters como fase estacionaria. La ionización por electrospray se llevó a cabo en modo positivo a 120 °C aplicando al capilar un voltaje de 3 kV, con un flujo de gas en el cono de 35 L/h y utilizando nitrógeno a 300 °C como gas de desolvatación a un flujo de 680 L/h.

El equipo utilizado para dispensar los inmunorreactivos sobre la membrana de LFIA fue una dispensadora modelo ZX1010 con dos cabezales de contacto tipo Frontline HR™ de Biodot (Irvine, CA, EE.UU.). Para cortar las tiras se adquirió una guillotina modelo CM5000 también de Biodot.

3.1.3. Disoluciones y tampones

Las disoluciones acuosas y tampones utilizados en el presente trabajo fueron preparadas en agua purificada con un equipo MilliQ de Merck-Millipore (Burlington, MA, EE.UU.). A continuación, se describe su composición:

- *Tampón de tapizado de carbonato*: Tampón carbonato-bicarbonato sódico 50 mM, pH 9.6.
- *Tampón de tapizado de fosfato*: Tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4.
- *PB*: Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4.
- *PBS*: Tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, con NaCl 140 mM.
- *PBS-T*: PBS con Tween-20 al 0.05% (v/v).
- *PBS2x-T*: PBS al doble de concentración, pH 7.4, con Tween-20 al 0.05% (v/v).
- *Disolución de lavado*: NaCl 150 mM y Tween-20 al 0.05% (v/v).
- *Disolución de revelado*: OPD a 2 mg/mL y H₂O₂ al 0.012% (v/v) en tampón de revelado.
- *Tampón de revelado*: Citrato sódico 25 mM y fosfato sódico 62 mM, pH 5.4.
- *Disolución de parada*: H₂SO₄ 1 M.
- *SAS*: Disolución saturada de sulfato amónico.
- *Tampón Tris de dilución*: Tris-HCl 200 mM, pH 8.0, con 280 mM NaCl.
- *Tampón Tris de ensayo*: Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, 140 mM NaCl y 0.05% Tween-20 (v/v).

3.1.4. Haptenos, bioconjugados y anticuerpos

En este trabajo se emplearon cuatro haptenos derivados de SP, cuyas estructuras químicas se representan en la **Figura 3.1**, preparados en el Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València por los profesores Antonio Abad Somovilla y Consuelo Agulló Blanes. La principal diferencia estructural entre SP_m, SP_o y SP_c estriba en la posición del brazo espaciador. Además, el hapteno SP_h presenta el brazo espaciador en la misma posición que el hapteno SP_c pero no contiene el grupo carbonato que sí está presente en los otros tres haptenos.

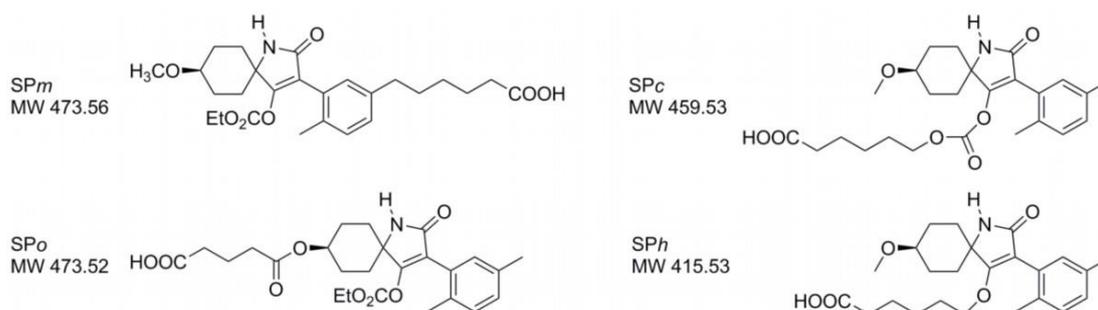


Figura 3.1. Estructura química de los haptenos de spirotetramat.

Los haptenos *SPm*, *SPo* y *SPc* formaban parte de los conjugados de BSA empleados en la inmunización de animales de laboratorio y la obtención de pAbs y mAbs llevados a cabo con anterioridad a la presente tesis doctoral. Por otro lado, se emplearon bioconjugados de OVA y HRP de los haptenos *SPm*, *SPo* y *SPc* obtenidos en estudios anteriores. Adicionalmente, durante la presente tesis doctoral se prepararon nuevos bioconjugados del hapteno *SPh*.

De igual manera, se emplearon dos haptenos derivados de anatoxina-a, *ANm* y *ANc* (**Figura 3.2**), los cuales formaban parte de los conjugados de BSA empleados en estudios de inmunización de animales de laboratorio para la obtención de mAbs. Finalmente, como en el caso anterior, se emplearon bioconjugados de OVA y HRP de los haptenos *ANm* y *ANc* preparados en el Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València por el Dr. Guillermo Quiñones Reyes.

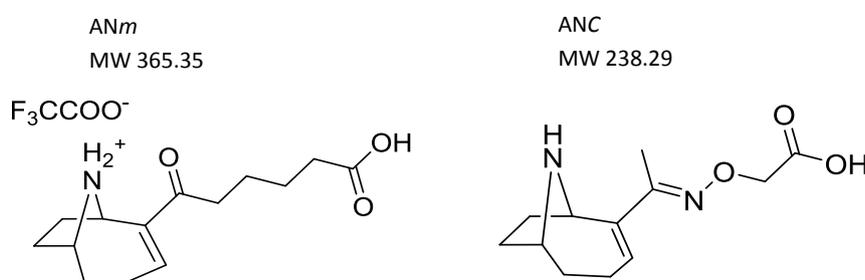


Figura 3.2. Estructura química de los haptenos de anatoxina-a.

Los anticuerpos de SP estudiados fueron seis pAbs – dos obtenidos con el conjugado de BSA del hapteno *SPm* (llamados *SPm*#1 y *SPm*#2), dos con el de *SPo* (*SPo*#1 y *SPo*#2) y otros dos con el de *SPc* (*SPc*#1 y *SPc*#2) – más seis mAbs – tres generados con el conjugado de *SPm* (*SPm*#23, *SPm*#25 y *SPm*#216) y tres con el de *SPo* (*SPo*#227, *SPo*#237 y *SPo*#243), todos ellos obtenidos en nuestro laboratorio con anterioridad a este estudio. El nombre de cada anticuerpo indica el hapteno cuyo conjugado se empleó para la inmunización del animal del cual proviene.

Para los estudios con anatoxina-a se emplearon cuatro mAbs (*ANm*#38, *ANm*#39, *ANm*#44 y *ANm*#325) así como el trazador enzimático del hapteno homólogo HRP-*ANm* y los bioconjugados de OVA y BSA del hapteno heterólogo *ANc*. Los anticuerpos, haptenos y bioconjugados de anatoxina-a fueron preparados por el Dr. Guillermo Quiñones Reyes.⁴⁶

3.1.5. Materiales para los inmunoensayos en microplaca

La *o*-fenilendiamina (OPD), el H₂O₂ (30%, v/v) y el suero bovino adulto (SBA) fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania). El pAb de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP (GAR-HRP) se compró a BioRad (Madrid). El pAb de conejo anti-

inmunoglobulinas de ratón conjugado a HRP (RAM-HRP) fue obtenido de Dako (Glostrup, Dinamarca). El pAb de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón (GAM) se adquirió de Jackson Immunoresearch Laboratories Inc (West Grove, PA, EE.UU.). Las placas Costar® de poliestireno *high-binding* de 96 pocillos de fondo plano (ref. 3590) fueron suministradas por Corning (Corning, NY, EE.UU.).

3.1.6. Materiales para los inmunoensayos de flujo lateral

Se emplearon membranas de nitrocelulosa de elevada adsorción de proteínas (ref. 70CNPH-N-SS40) de 25 mm de ancho y 15 μm de tamaño de poro, provenientes de la empresa MDI Advanced Microdevices PVT LTD. (Ambala Cantt, India). Como almohadilla de muestra se usó papel de celulosa de 17 mm de ancho compradas a la empresa Millipore Corporation (Billerica, MA, EE.UU.), y como almohadilla de absorción se usó celulosa de 43 mm adquirida a Ahlstrom-Munksjö (Helsinki, Finlandia). Para ensamblar los componentes de las tiras se usaron tarjetas adhesivas de 7.8x30 cm como soporte compradas a la empresa Kenosha (Amstelveen, Países Bajos). Para la preparación de disoluciones de anticuerpos se empleó Biostab *Peroxidase Conjugate Stabilizer* de Sigma-Aldrich (Madrid). Las nanopartículas (NP) de oro coloidal utilizadas fueron bioconjugados de GAM de 40 nm que se adquirieron de BBI Solutions (Parkway, Reino Unido).

3.1.7. Muestras de alimentos y aguas

Las muestras de alimentos empleadas fueron vinos y zumos comerciales (blancos y tintos) de la marca Fidencio y Don Simón, respectivamente, comprados en una cadena de supermercados local. En todos los casos se utilizó el mismo lote de vinos y zumos. Se empleó polivinilpolipirrolidona (PVPP) de 110 μm de tamaño de partícula adquirida en Sigma-Aldrich (Madrid) para la limpieza de los zumos y los vinos. Además, se compraron uvas blancas de origen Chile y tintas de origen Alicante. Las uvas fueron trituradas y homogenizadas utilizando una batidora de marca De'Longhi (Treviso, Italia). La extracción se llevó a cabo con acetonitrilo grado HPLC de Scharlab (Barcelona). El gel adsorbente de aminas primarias/secundarias (PSA) de 40-60 μm para la limpieza de muestras mediante extracción en fase sólida, así como el sulfato de magnesio anhidro se obtuvieron también de Scharlab.

Las muestras de agua se recogieron de cuatro lugares con características diferentes: agua de cisterna, agua de balsa de riego, agua del lago de Sant Vicent de Llíria y agua del río Turia. Todas ellas se filtraron con filtros hidrofílicos de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro, tipo Millex-HV de la marca Millipore (Burlington, MA, EE.UU.), y se almacenaron a 4 °C.

3.2. Preparación de bioconjugados del hapteno SP h

3.2.1. Preparación del conjugado de BSA

Se preparó una disolución 50 mM en DMF del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno SP h (SP h -NHS), preparado, purificado y caracterizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València. A 1 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón PB, en viales de vidrio ámbar, se añadieron 136 μ L de la disolución de éster activo lentamente (gota a gota), con agitación constante y vigorosa. Por tanto, se emplearon 30 mol de hapteno por mol de proteína. La reacción de conjugación se incubó toda la noche (16 h aproximadamente) a temperatura ambiente y con agitación suave. Transcurrido este tiempo, los conjugados se purificaron por cromatografía de filtración empleando 3 columnas Sephadex G-25 HiTrap Desalting de 5 mL cada una, dispuestas en serie, adquiridas a GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Para la elución se empleó PB con un flujo de 5 mL/min. Tras el proceso de purificación, las fracciones que contenían el conjugado de BSA se juntaron y se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL con PB considerando que no hubo pérdidas. Esta disolución se esterilizó usando filtros estériles de Millipore Millex-HV (PVDF) de 0.45 μ m, y se almacenó a -20 °C.

3.2.2. Preparación del conjugado de OVA

A partir de una disolución 50 mM en DMF del hapteno SP h activado y purificado, se tomaron 122 μ L y se añadieron lentamente (gota a gota), con agitación constante y vigorosa, a un volumen de 1.8 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón PB, usando viales de vidrio ámbar. Por tanto, se emplearon 10 mol de hapteno por mol de proteína. La reacción de conjugación se incubó toda la noche (16 h aproximadamente) a temperatura ambiente y con agitación suave. Posteriormente se procedió a la purificación del conjugado como se ha descrito para el conjugado de BSA. Las fracciones que contenían el conjugado se juntaron y se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón PB, se añadió timerosal hasta el 0.01% (v/v), y se almacenó a -20 °C.

3.2.3. Preparación del conjugado de HRP

A partir de una disolución 5 mM del hapteno SP h activado y purificado en DMF (se utilizó una dilución 1/10 de la disolución 50 mM preparada para los otros conjugados), se tomaron 100 μ L y se añadieron lentamente (gota a gota), con agitación constante y suave, sobre 0.9 mL de una disolución de HRP a una concentración de 3 mg/mL en tampón PB, en viales de vidrio ámbar. En este caso se emplearon 8 mol de hapteno por mol de proteína. La reacción de conjugación se incubó toda la noche (16 h aproximadamente) a temperatura ambiente y con

agitación suave. Posteriormente, el trazador enzimático se purificó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, si bien en este caso se emplearon 2 columnas HiTrap en serie. Se juntaron las fracciones que contenían el trazador y se añadió un volumen de PBS que contenía BSA 1% (p/v) y timerosal 0.02% (p/v), y la disolución final se almacenó a 4 °C en tres viales de vidrio color ámbar. La concentración final del trazador enzimático HRP-SP_h se determinó a partir de la absorbancia del conjugado a 400 nm, que después de diluir fue de 0.5 mg/mL.

3.3. Procedimientos de ELISA competitivo

3.3.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

En este formato de ensayo, denominado mayormente formato directo, el tapizado se realizó a 4 °C con las placas tapadas durante toda la noche, utilizando 100 µL por pocillo de una disolución de anticuerpo específico en tampón de tapizado de carbonato. Luego de la incubación, la placa se lavó cuatro veces con disolución de lavado. La etapa de competición se llevó a cabo mezclando en cada pocillo 50 µL de disolución de patrón de analito, muestra o blanco diluido en PBS o agua MilliQ y 50 µL de trazador enzimático diluido en PBS-T o PBS2x-T. Posterior a la incubación de 1 h a temperatura ambiente, la placa se lavó nuevamente como se describió anteriormente. La presencia de trazador enzimático retenido en los pocillos por el anticuerpo se reveló colorimétricamente mediante la adición de 100 µL por pocillo de disolución de revelado preparada en ese momento, y la reacción enzimática se detuvo a los 10 min con 100 µL por pocillo de disolución de parada. Seguidamente, y en el menor tiempo posible, se leyó la absorbancia a 492 nm de los pocillos utilizando la absorbancia a 650 nm como referencia.

3.3.2. Formato de anticuerpo de captura con detección directa

Los pocillos de la placa se tapizaron mediante incubación durante toda la noche a 4 °C con las placas tapadas conteniendo 100 µL por pocillo de disolución de GAM a 1 µg/mL o GAR a 1 µg/mL para los estudios con mAbs o pAbs, respectivamente, en tampón de tapizado de carbonato. Luego de la incubación, la placa se lavó cuatro veces con disolución de lavado y se adicionaron 100 µL por pocillo del anticuerpo específico diluido en PBS-T o PBS2x-T. Tras incubar las placas durante 1 h a temperatura ambiente y después lavarlas nuevamente como se ha venido mencionando, se llevaron a cabo la etapa de competición y el resto de las etapas del inmunoensayo tal como se ha descrito en el formato anterior.

3.3.3. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

En este formato de ELISA competitivo, también conocido como formato indirecto, el tapizado de los pocillos de la placa se efectuó a temperatura ambiente durante toda la noche utilizando el conjugado OVA-hapteno diluido en tampón de tapizado de fosfato para los ensayos de SP o en tampón de tapizado de carbonato para los ensayos de anatoxina-a, y dispensando 100 μ L de disolución de conjugado por pocillo. Seguidamente, la placa se lavó cuatro veces con disolución de lavado como se ha descrito para los otros formatos. La etapa de competición se efectuó al mezclar en cada pocillo 50 μ L de patrón de analito, muestra o blanco diluido en PBS o agua MilliQ y 50 μ L de anticuerpo específico diluido en PBS-T o en PBS2 \times -T. Tras incubar la placa 1 h a temperatura ambiente, nuevamente se lavó la misma cuatro veces con la correspondiente disolución. Después se añadieron 100 μ L por pocillo de disolución de anticuerpo secundario (RAM-HRP diluido 1/2000 en PBS-T para los ensayos con mAbs o GAR-HRP diluido 1/10000 en PBS-T con un 10% (v/v) de SBA para ensayos con pAbs). Una vez incubada la placa durante 1 h a temperatura ambiente, se lavó por última vez y se generó y midió la señal del ensayo tal como se ha descrito para el formato directo.

3.4. Caracterización de bioconjugados y anticuerpos

3.4.1. Determinación de la carga hapténica de los bioconjugados

La RM conseguida, es decir el número de moléculas de hapteno acopladas por molécula de proteína, se determinó en el Servicio de Proteómica de la Universitat de València mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Para ello se dializó exhaustivamente (5 \times 1 L durante 24 h) una alícuota de 100 μ L de disolución de cada conjugado (50 o 100 μ g) frente a agua MilliQ. La diálisis de los conjugados se llevó a cabo en mini casetes de diálisis Slide-A-Lyzer[®] MINI de 300 μ L de capacidad, equipados con membranas permeables a moléculas de peso molecular inferior a 10 kDa, que fueron adquiridas de Thermo Scientific (Rockford, IL, EE.UU.).

3.4.2. Isotipación de anticuerpos monoclonales

La isotipación de las cadenas pesadas de los mAbs se efectuó con el kit de isotipación Calbiochem[®] Hybridoma Subisotyping Kit para inmunoglobulinas de ratón de Merck-Millipore (Darmstadt, Alemania). Para la isotipación de las cadenas ligeras se emplearon anticuerpos de Rockland Immunochemicals Inc. (Limerick, PA, EE.UU.). El ensayo se llevó a cabo mediante ELISA no competitivo con detección indirecta, siguiendo las instrucciones del fabricante de los kits. Por un lado, se emplearon seis anticuerpos de conejo anti-cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (RAM-antiH) capaces de reconocer cadenas pesadas de tipo γ 1

(IgG₁), γ2a (IgG_{2a}), γ2b (IgG_{2b}), γ3 (IgG₃), μ (IgM) y α (IgA). Por otro lado, se emplearon dos anticuerpos de conejo anti-cadena ligera de inmunoglobulina de ratón (RAM-antiL) para el reconocimiento de cadenas ligeras de tipo κ y λ.

Protocolo para la isotipación. Cada mAb se diluyó a 1 μg/mL en tampón de tapizado de carbonato y se distribuyeron 100 μL por pocillo en 8 pocillos. Tras incubar la placa a 4 °C durante toda la noche, se lavó 4 veces con disolución de lavado. Posteriormente se añadió a cada pocillo 100 μL de disolución del correspondiente RAM-antiH (diluciones 1/2) o RAM-antiL (anti-κ diluido 2.4×10^5 veces y anti-λ 4×10^4 veces) en PBS-T, y se dejó incubar la placa a temperatura ambiente durante 1 h. Tras lavar la placa, se añadieron 100 μL por pocillo de GAR-HRP (suministrado con el kit) diluido 4×10^3 veces en PBS-T, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 h. Tras un último lavado, la señal se generó y registró como se describe en el apartado 3.3.1.

3.4.3. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos

ELISA competitivo bidimensional directo con o sin captura. Cada anticuerpo se confrontó con su trazador homólogo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3 para estos formatos. En el caso de los ensayos con pAbs de SP se evaluaron diluciones desde 1/3000 a 1/30000, mientras que cuando se utilizaron mAbs, tanto de SP como de anatoxina-a, las concentraciones estudiadas fueron desde 10 hasta 300 ng/mL. Las concentraciones de trazador ensayadas estuvieron entre 10 y 300 ng/mL en la etapa de competición. Cada anticuerpo fue evaluado frente a siete disoluciones patrón de analito más un blanco, preparadas por dilución en serie partiendo de 10000 nM con un factor de dilución de 10. Se consideró que los anticuerpos con mayor afinidad hacia el analito fueron aquellos que presentaron valores de IC₅₀ menores.

ELISA competitivo bidimensional indirecto. Cada anticuerpo se ensayó frente a su conjugado de tapizado homólogo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.3. Para ambos tipos de anticuerpo se tapizó con disoluciones de conjugado a 100, 1000 o 3000 ng/mL. La etapa de competición se llevó a cabo con diluciones de pAb para SP de 1/3000, 1/10000, 1/30000 y 1/100000. En el caso de los estudios con mAbs, tanto de SP como de anatoxina-a, se evaluaron concentraciones de anticuerpo específico entre 10 y 300 ng/mL. La preparación de las disoluciones patrón de analito y la estimación de la afinidad se realizó de igual modo que en el formato anterior.

3.4.4. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos

El estudio de especificidad se llevó a cabo mediante ensayos de reactividad cruzada (RC) empleando conjugados homólogos en el formato directo o directo con captura. Se emplearon las concentraciones óptimas de inmunorreactivos determinadas anteriormente por ensayo bidimensional. De este modo, se evaluó el reconocimiento mostrado por los anticuerpos de SP hacia sus principales metabolitos (SP-enol, SP-ceto, SP-mono y SP-glu) así como hacia sustancias con alguna similitud estructural (spirodiclofen, spiromesifen y spiroxamine). En el caso de los mAbs de anatoxina-a, se ensayaron la (+)-anatoxina-a, la (-)-anatoxina-a, la (+)-homoanatoxina-a y la (-)-homoanatoxina-a. Con este propósito se prepararon disoluciones patrón en PBS de cada uno de los compuestos analizados y se determinaron los valores de IC₅₀ para cada analito. La RC (%) para cada compuesto, indicativa del grado de interacción de los anticuerpos hacia el mismo, se calculó mediante la siguiente expresión:

$$RC = [(IC_{50} \text{ (analito)}) / IC_{50} \text{ (análogo)}] * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

3.5. Caracterización de inmunoensayos en microplaca

3.5.1. Optimización de inmunorreactivos y selección de inmunoensayos

Cada anticuerpo se evaluó frente a todos los conjugados heterólogos disponibles mediante ELISA competitivo bidimensional, en los tres formatos descritos en la sección 3.3, preparando los inmunorreactivos según se detalla en el apartado 3.4.3. De este modo se seleccionaron las parejas anticuerpo/conjugado que daban lugar a curvas de inhibición con el menor valor de IC₅₀. Para seleccionar los mejores inmunoensayos también se consideró que las concentraciones de inmunorreactivos necesarias para obtener un valor de A_{máx} entre 0.8 y 1.3 fuesen lo más bajas posibles, y que el valor de la pendiente de la curva sigmoidea fuese lo más cercano posible a 1.0.

3.5.2. Determinación de la sensibilidad y selectividad de los inmunoensayos

Una vez que los inmunoensayos se seleccionaron para ser desarrollados según el método ELISA competitivo, para cada uno se evaluó la serie de patrones de analito que mejor permitió definir la curva estándar. Se llevaron a cabo los inmunoensayos como fueron descritos en el apartado 3.3, usando las concentraciones de inmunorreactivos (anticuerpo y conjugado) óptimas en cada caso. El primer punto de la curva se preparó a partir de una disolución stock de concentración mil veces superior, previamente preparada en DMF. Las disoluciones patrón fueron preparadas por dilución en serie del patrón de mayor concentración, más un blanco,

evaluando diferentes factores de dilución. Cada punto se analizó por triplicado en pocillos adyacentes. La señal del ensayo se monitorizó espectrofotométricamente en modo dual a 492 nm, empleando 650 nm como longitud de onda de referencia. Los valores de absorbancia obtenidos con los patrones a partir de los ensayos competitivos se representaron frente al logaritmo de la concentración de analito, resultando en una curva de inhibición sigmoidea al ajustarlos matemáticamente con el programa estadístico SigmaPlot 14.0 de SPSS Inc. (Chicago, IL, EE.UU.) a la siguiente ecuación logística de cuatro parámetros para curvas estándar:

$$y = d + [(a-d)/(1+(x/c)^{-b})] \quad \text{Ecuación 2}$$

donde **y** es el valor de absorbancia obtenida frente a una concentración **x** de analito, **a** es la asíntota superior de la curva correspondiente a la absorbancia obtenida en ausencia de analito ($A_{máx}$), **b** es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, **c** es la concentración de analito en el punto de inflexión y **d** es el valor de la asíntota inferior correspondiente al ruido de fondo. El parámetro **c** equivale al valor de IC_{50} cuando **d** es cercano a cero.

Para seleccionar la curva estándar óptima se usó como criterio la presencia de la mayor cantidad de puntos en el intervalo $IC_{10} - IC_{90}$, más uno o dos puntos en la asíntota inferior y de dos a tres puntos en la asíntota superior. El valor de IC_{50} se tomó como el parámetro indicativo de la sensibilidad del inmunoensayo. El límite de detección (LOD) de los ensayos tipo ELISA en microplaca se estableció como la concentración de analito que generó un 10% de disminución de la señal máxima (IC_{10}). El intervalo de trabajo para la determinación de la concentración de analito se estableció entre los valores de IC_{20} e IC_{80} – valores de concentración de analito que produjeron un 20% y un 80% de reducción de la $A_{máx}$, respectivamente.

La selectividad de los inmunoensayos seleccionados se determinó mediante el cálculo de la RC (%) hacia otras sustancias potencialmente presentes en las muestras empleando la **ecuación 1** descrita en el apartado 3.4.4.

3.5.3. Estudio de la influencia del pH

Los inmunoensayos que fueron seleccionados en sus respectivos formatos se realizaron según se ha descrito en la sección 3.3, utilizando las concentraciones de inmunorreactivos óptimas en cada caso. Para cada valor de pH ensayado, la competición se efectuó mezclando 50 μ L por pocillo de disoluciones patrón en agua MilliQ con 50 μ L por pocillo de disolución del inmunorreactivo de competición disuelto en el tampón a dicho pH preparado de tal manera que la fuerza iónica, la concentración total del sistema tampón y la concentración de Tween-20 en ensayo fuesen iguales a las de la mezcla PBS/PBS-T 1:1 (v/v) (162 mM, 10 mM y 0.025%

(v/v), respectivamente). Los valores de pH ensayados fueron de 6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 y 8.5. En todos los casos se usó tampón fosfato y se empleó como referencia el pH de 7.4.

Con este objetivo, se preparó una disolución precursora de la especie ácida a 40 mM (NaH_2PO_4) y otra de la especie básica a 40 mM (Na_2HPO_4), que se mezclaron lentamente entre ellas hasta obtener el tampón con el pH deseado, y se midió el volumen. A continuación, se añadió Tween-20 al 5% (v/v) para alcanzar un 0.05% (v/v) de concentración final y NaCl 1 M para obtener una fuerza iónica final de 324 mM. Finalmente se añadió agua MilliQ para que el tampón fosfato quedase a 20 mM. El volumen final debe ser el doble que el volumen medido al ajustar el pH.

3.5.4. Estudio de la influencia de la fuerza iónica

En el estudio de la influencia de la fuerza iónica sobre los ELISAs seleccionados, los inmunorreactivos se disolvieron en diversos tampones fosfato con concentraciones variables de NaCl y preparados de tal manera que el pH, la concentración del tampón fosfato y la concentración de Tween-20 en ensayo fueran siempre iguales a las de la mezcla PBS/PBS-T 1:1 (v/v) (7.4, 10 mM y 0.025% (v/v), respectivamente). Para este estudio se preparó una disolución precursora de NaH_2PO_4 40 mM y otra de Na_2HPO_4 40 mM. Estas disoluciones se mezclaron lentamente entre si hasta obtener el tampón deseado con un pH de 7.4. A continuación se separaron seis alícuotas y se añadió Tween-20 al 5% (v/v) a cada una de ellas para obtener una concentración de 0.05% (v/v), considerando que el volumen final será el doble del inicial. Después se adjuntó NaCl 1 M hasta alcanzar la correspondiente cantidad prefijada de NaCl (50, 100, 200, 280, 400, 500 mM) y las mezclas se diluyeron con agua MilliQ hasta alcanzar el volumen deseado. El inmunoensayo se llevó a cabo mezclando 50 μL por pocillo de disoluciones patrón en agua MilliQ con 50 μL por pocillo de disolución del inmunorreactivo de competición disuelto en el tampón a ensayar. Como fuerza iónica de referencia se empleó la del tampón PBS (162 mM). La fuerza iónica de dichos tampones en ensayo se muestra en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Concentración de NaCl y fuerza iónica en ensayo de los tampones estudiados.

NaCl (mM)	I (mM)
25	47
50	72
100	122
140	162
200	222
250	272

3.5.5. Tolerancia a disolventes orgánicos

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la influencia ejercida por diferentes disolventes orgánicos sobre los parámetros analíticos de los inmunoensayos ($A_{\text{máx}}$ e IC_{50}) seleccionados. Los disolventes evaluados fueron etanol y acetonitrilo. Los patrones de analito se prepararon en agua MilliQ con diferentes concentraciones del disolvente orgánico en estudio. La competición se realizó mezclando 50 μL por pocillo de disolución de patrón con disolvente y 50 μL por pocillo del inmunorreactivo de competición en PBS2 \times -T. Los porcentajes de disolventes evaluados en ensayo fueron de 0.5%, 1%, 2%, 5% y 10% (v/v). Además, se incluyeron patrones sin disolvente como control, también en agua MilliQ.

3.6. Procedimiento de hidrólisis de spirotetramat

3.6.1. Optimización de las condiciones de hidrólisis

El estudio de hidrólisis de SP conllevó la realización de una serie de etapas cuyo objetivo final fue convertir SP en SP-enol. En primer lugar, se evaluaron varias disoluciones de NaOH a diferente concentración para diluir extractos de uva, vino y zumos de uva. Por otra parte, para verificar la hidrólisis de SP mediante ELISA competitivo, las disoluciones patrón de SP en agua se diluyeron 1/5 en NaOH 40 mM, se incubaron a temperatura ambiente durante un cierto tiempo, y a continuación se diluyeron 1/2 en tampón Tris de dilución. Las disoluciones patrón hidrolizadas y tamponadas se ensayaron por duplicado en pocillos adyacentes empleando los inmunoensayos optimizados. Las disoluciones de anticuerpo o trazador enzimático se prepararon en tampón Tris de ensayo. Las curvas de inhibición resultantes se compararon con las obtenidas utilizando patrones de SP-enol tratados del mismo modo y de SP sin tratar.

3.6.2. Evaluación mediante HPLC-MS/MS

Se preparó una muestra de agua MilliQ dopada con SP a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual se diluyó 1/2 en NaOH 40 mM y se incubó 10 min a temperatura ambiente, e inmediatamente se acidificó con 1 volumen de ácido cítrico 40 mM. A continuación, se transfirieron 10 μL de la mezcla sobre 990 μL de acetonitrilo, y se secó con MgSO_4 anhidro. Como controles se utilizaron agua dopada con SP-enol a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y agua sin dopar, que se trataron con NaOH y ácido cítrico como la muestra dopada con SP. Además, cada una de las muestras siguió un procedimiento paralelo, a modo de control, en el que tan solo se diluyeron con agua en vez de tratarlas con sosa.

Los extractos orgánicos se analizaron por cromatografía de líquidos acoplada a un detector de espectrometría de masas en tándem empleando el equipo y la columna descritos en el apartado 3.1.2. Se emplearon ocho patrones con mezclas iguales de SP, SP-enol, SP-ceto

y SP-mono entre 0.1 y 300 ng/mL de cada analito en acetonitrilo. Se inyectaron 5 μ L de cada muestra a una temperatura de columna de 45 °C. La fase móvil consistió en una mezcla binaria de agua con 0.2% (v/v) de ácido fórmico (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B). El tiempo total de la cromatografía fue de 8 min, con un perfil cromatográfico consistente en 5% de B durante 3 min, 95% de B durante 0.5 min y 5% de B durante 4.5 min. El flujo se estableció en 0.3 mL/min. Los espectros de masas se adquirieron con ionización positiva en modo de seguimiento múltiple de fragmentos (MRM, del inglés *Multiple Reaction Monitoring*) usando un tiempo de retraso entre canales de 0.02 s. Los tiempos de retención de los analitos y los iones monitorizados para su cuantificación se muestran en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Parámetros para la cuantificación de SP y sus principales metabolitos.

Compuesto	t_R (min)	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)	Iones ^a
SP	3.59	35	20	374 (330.09; 302.10)
SP-enol	2.96	40	25	302 (270.09; 216.04)
SP-ceto	3.09	30	12	318 (300.08; 268.10)
SP-mono	2.84	30	25	304 (130.90; 118.90)

^a Ion molecular $[M+H]^+$ y entre paréntesis los iones secundarios empleados en la cuantificación.

3.7. Validación de inmunoensayos en microplaca para spirotetramat

3.7.1. Extracción de muestras de uva

Los extractos de uva se obtuvieron a partir de muestras comerciales de uva blanca de Chile o tinta de Alicante mediante el procedimiento de extracción QuEChERS, siguiendo el método oficial AOAC 2007.01 de la Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales y basándose en la publicación de Mohapatra y colaboradores.⁵⁹ Las uvas se trituraron durante 2 min con la batidora, se transfirieron 15 g de uvas homogenizadas a tubos de polipropileno de 50 mL de capacidad y se añadieron 15 mL de acetonitrilo grado HPLC. Posteriormente los tubos se agitaron enérgicamente durante 1 min con ayuda de un agitador vórtex. Seguidamente se agregaron 6 g de $MgSO_4$ anhidro y 1.5 g de NaAcO, y se agitaron igualmente en el vórtex durante 2 min. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 2700 g durante 10 min usando una centrífuga ROTOFIX 32A de marca Hettich (Tuttlingen, Alemania). El sobrenadante se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 mL de capacidad, al que se le agregaron 200 mg de PSA y 600 mg de $MgSO_4$ anhidro. Los tubos se agitaron nuevamente en el vórtex durante 1 min y se volvieron a centrifugar tal como se hizo en la fase de extracción. La fase orgánica se separó y se almacenó a -20 °C.

3.7.2. Estudio del efecto matriz

Se analizó la influencia de la matriz del extracto QuEChERS de uva blanca de Chile en acetonitrilo y de muestras de vino y zumo de uva, libres de residuos de SP – verificado por HPLC-MS/MS según se describe en el apartado 3.6.2 –, sobre los parámetros analíticos de los inmunoensayos seleccionados y optimizados según el método ELISA competitivo. Para llevar a cabo este estudio se prepararon series de patrones de SP-enol en cada una de las muestras. Posteriormente se diluyeron 1/5, 1/10, 1/20, 1/50 y 1/100 con NaOH 40 mM, se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, y finalmente se diluyeron 1/2 con tampón Tris de dilución. Como control se prepararon patrones de SP-enol en agua MilliQ que se diluyeron 1/2 en NaOH 80 mM siguiendo el mismo protocolo que con las muestras. La etapa de competición se realizó mezclando en cada pocillo 50 μ L de patrón de SP-enol así preparado y 50 μ L del inmunorreactivo de competición en tampón Tris de ensayo. Cada punto se analizó por triplicado en pocillos adyacentes. La dilución mínima requerida para la determinación precisa de ambos analitos de estudio se determinó comparando los parámetros analíticos ($A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50}) de las curvas de inhibición obtenidas en las matrices diluidas con los de la curva control.

3.7.3. Análisis de muestras fortificadas

La exactitud y precisión de los inmunoensayos en microplaca desarrollados fue evaluada mediante el análisis de muestras de extractos de uva blanca de Chile, vinos y zumos fortificadas. Además, se incluyeron como control muestras sin dopar que se analizaron y trataron igual que las muestras fortificadas. Las muestras de matriz fortificada se prepararon a 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 ng/mL de SP, SP-enol o una mezcla 1:1 (p/p) de SP + SP-enol. Seguidamente las muestras dopadas se diluyeron 1/5 (1/25 para los extractos) y 1/50 utilizando una disolución de NaOH 40 mM y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Terminada la etapa de hidrólisis, cada muestra se diluyó a la mitad en tampón Tris de dilución. Adicionalmente las muestras se limpiaron con un PVPP al 3% (p/v), agitando energicamente y posteriormente centrifugando como se ha descrito en el apartado anterior. Las disoluciones de anticuerpo y de trazador enzimático para la etapa competitiva se prepararon en tampón Tris de ensayo. Cada muestra se analizó por triplicado en pocillos adyacentes. El valor promedio de la absorbancia proporcionado por cada muestra se interpoló en una curva estándar de SP-enol incluida también por triplicado en la misma placa. Los patrones de SP-enol se prepararon en agua MilliQ, se diluyeron 1/5 con NaOH 40 mM y después de incubar 10 min a temperatura ambiente se diluyeron 1/2 con tampón Tris de dilución. Los valores de recuperación (%) se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación} = ([\text{SP-enol}]_{\text{ELISA}}/[\text{analito}]_{\text{fortificada}}) * 100$$

Ecuación 3

3.7.4. Análisis mediante HPLC-MS/MS

Se utilizaron uvas tintas de Alicante que fueron tratadas en el laboratorio con una suspensión concentrada comercial (Movento® Gold de Bayer) que contiene un 10% (p/v) del insecticida SP. Se prepararon tres disoluciones en agua de grifo a 10, 80 y 160 mg/L, y se rociaron las uvas con la ayuda de un nebulizador manual. A continuación, se recogieron muestras de bayas de uva sin tratar como blanco y bayas tratadas, separándolas del raspón, las cuales se trituraron y se extrajeron por QuEChERS como se ha descrito en el apartado 3.7.1. El día después del primer tratamiento, las muestras tratadas se volvieron a tratar como el primer día y se recogieron muestras de nuevo. Además, cada uno de los extractos de las muestras se diluyó 1/10 en acetonitrilo para obtener nuevas muestras. Como control se extrajeron muestras de uva sin tratar. Las muestras se analizaron por ELISA competitivo y por cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas en tándem. El análisis de los extractos mediante HPLC-MS/MS se realizó por triplicado como se ha descrito en el apartado 3.6.2 empleando curvas estándar de SP y SP-enol. Los patrones de estos analitos se prepararon como una mezcla a partes iguales de cada uno de ellos en acetonitrilo, y por dilución seriada a partir del más concentrado, en el rango entre 1 y 2500 ng/mL. Para el análisis mediante inmunoensayo las muestras se diluyeron 1/1000 en NaOH 40 mM y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se diluyeron 1/2 con tampón Tris de dilución. El análisis mediante inmunoensayo se llevó a cabo por quintuplicado, según se describe en el apartado anterior, utilizando una curva estándar de SP-enol. El sesgo de los resultados observados entre ambos métodos se calculó como el cociente de la media de las concentraciones obtenidas. La correlación de datos se analizó por regresión lineal utilizando el programa SigmaPlot.

3.8. Validación de inmunoensayos en microplaca para anatoxina-a

3.8.1. Estudio del efecto matriz

Las matrices evaluadas fueron agua de cisterna, agua de balsa de riego, agua de lago y agua de río descritas en el apartado 3.1.7. Primero se prepararon diluciones seriadas en agua MilliQ de cada matriz de agua filtrada, que se emplearon para la preparación de patrones de (+)-anatoxina-a. Se evaluaron factores de dilución de la matriz de 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500, y se incluyeron patrones de (+)-anatoxina-a en agua MilliQ como control. La etapa de competición se realizó mezclando en cada pocillo 50 µL de patrón y 50 µL del inmunorreactivo

de competición en PBS2×-T. La dilución mínima requerida para la eliminación de los efectos matriz se determinó comparando los parámetros analíticos ($A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50}) de las curvas de inhibición obtenidas en las matrices diluidas con los de la curva control.

3.8.2. Análisis de muestras fortificadas

La exactitud y precisión de los ELISAs desarrollados fue evaluada mediante el análisis de muestras de aguas fortificadas. Se doparon los cuatro tipos de aguas descritas anteriormente utilizando una disolución stock concentrada de (+)-anatoxina-a a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en DMF. Las concentraciones de fortificación fueron 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 ng/mL . Las muestras dopadas se diluyeron 1/5 y 1/100 con agua MilliQ antes de su análisis mediante los inmunoensayos ELISA previamente optimizados.

Para este estudio, el inmunoensayo en formato de anticuerpo de captura con detección directa se modificó incorporando una etapa de bloqueo. Después del tapizado, cada pocillo recibió 150 μL de disolución de BSA al 2% (p/v) en PBS y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El resto de etapas se realizaron según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2. La etapa competitiva se llevó a cabo con 50 μL por pocillo de muestra fortificada diluida o patrón más 50 μL por pocillo de disolución de anticuerpo, para el ensayo en formato indirecto, o 50 μL por pocillo de disolución de trazador enzimático, para el ensayo en formato de captura, ambos preparados en PBS2×-T. Cada punto se analizó por triplicado en pocillos adyacentes. Como control se incluyeron muestras sin fortificar. El valor promedio de la absorbancia proporcionado por cada muestra diluida se interpoló en una curva estándar de (+)-anatoxina-a preparada en agua MilliQ e incluida también por triplicado en la misma placa. Los valores de recuperación (%) se calcularon mediante la **ecuación 3** descrita en el apartado 3.7.3.

3.9. Desarrollo de ensayos inmunocromatográficos

3.9.1. Preparación de las tiras reactivas

Se prepararon tiras funcionalizadas con GAM para la línea de control y con BSA-SPh o BSA-ANc para la línea de test de los inmunoensayos para SP y anatoxina-a, respectivamente, usando membranas de nitrocelulosa para ensayos rápidos. Las líneas control y test se situaron a 15 y 10 mm de la base de la membrana, respectivamente. La velocidad de dispensación de reactivos sobre la membrana fue de 0.5 $\mu\text{L}/\text{cm}$. GAM se dispensó utilizando una disolución a 1 mg/mL en tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4, con 150 mM NaCl. Los conjugados de BSA-SPh y BSA-ANc se dispensaron empleando disoluciones a 0.5 mg/mL y 1.0 mg/mL ,

respectivamente, en el mismo tampón de dispensación que GAM. La membrana con los inmunorreactivos inmovilizados se secó a temperatura ambiente durante 1 h y se colocó sobre un soporte adhesivo a 15 mm de la base. A continuación, se pegó la almohadilla de muestra en la parte inferior de la membrana con un solapamiento de 2 mm, y en la parte superior se situó la almohadilla absorbente montando 3 mm encima de la membrana. Cuando todos los elementos de la tira estuvieron pegados, se cortaron tiras de 0.4 cm con la guillotina y se almacenaron a 4 °C en tubos opacos con desecante.

3.9.2. Preparación del bioconjugado con oro coloidal

Los anticuerpos seleccionados, que se encontraban a 1 mg/mL precipitados SAS, se diluyeron en Biostab (1/10). Las NP de oro coloidal funcionalizadas con GAM se diluyeron (1/10) en tampón HEPES 10 mM, pH 7.4. El mAb específico se marcó con las NP añadiendo una disolución de anticuerpo SPm#23 o de ANm#38 a diferentes concentraciones sobre la preparación de NP e incubando a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se añadió Tween-20 hasta alcanzar una concentración final de 0.05% (v/v). Los bioconjugados de oro coloidal resultantes (NP-mAb) se guardaron a 4 °C.

3.9.3. Optimización de las condiciones de ensayo

La mezcla (100 µL) de muestra o disolución patrón y bioconjugado NP-mAb se incubó 5 min a temperatura ambiente en un pocillo de microplaca de poliestireno. La cromatografía se desarrolló en posición vertical mediante inserción de la tira reactiva en el pocillo. Al cabo de 10 min a temperatura ambiente se extrajo la tira y se separó la almohadilla de muestra para parar el flujo. Las tiras se escanearon y la señal en el rojo, verde y azul (RGB, del inglés *Red, Green, Blue*) obtenida se leyó con el programa ImageJ v1.52a. Los valores resultantes se utilizaron para calcular primero el cociente T/C entre la señal de línea test y la de la línea control, y a continuación el porcentaje de inhibición calculado como el cociente entre el valor de T/C obtenido a una concentración determinada de analito y el valor de T/C obtenido a 0 ng/mL de analito. Se estudió la influencia de la cantidad de NP, el pH y la fuerza iónica. Para ello se llevaron a cabo ensayos a tres concentraciones de analito: una baja donde había poca inhibición, otra alta donde había aproximadamente un 50% de inhibición y finalmente el control sin analito.

Para la optimización de la cantidad de NP se ensayaron diferentes proporciones de la preparación de NP-mAb y de tampón de ensayo. La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente antes de insertar la tira.

Para la optimización del pH en los ensayos de SP, se prepararon disoluciones tampón de Tris-HCl 100 mM a diferentes valores de pH, se ajustó el pH con HCl 10 M y se añadió NaCl concentrado para mantener constante la fuerza iónica en 87 mM. Los tampones fosfato para el ensayo de anatoxina-a se prepararon mezclando una disolución de la especie ácida (NaH_2PO_4 20 mM) con otra de la especie básica (Na_2HPO_4 20 mM), hasta alcanzar el pH deseado, y a continuación añadiendo el volumen necesario de Tween-20 al 5% (v/v) y NaCl concentrado para alcanzar una concentración de Tween-20 final de 0.05% (v/v) y una fuerza iónica de 162 mM al diluir con agua MilliQ para alcanzar la concentración deseada de 10 mM del tampón fosfato.

En la optimización de la fuerza iónica del inmunoensayo de SP se prepararon también disoluciones tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con Tween-20 al 0.05% (v/v) y diferentes concentraciones de NaCl. Los tampones fosfato para el ensayo de anatoxina-a se prepararon mezclando una disolución de la especie ácida (NaH_2PO_4 20 mM) y otra de la especie básica (Na_2HPO_4 20 mM), hasta alcanzar un pH de 7.4. A continuación se añadió el volumen necesario de NaCl concentrado hasta alcanzar la concentración deseada y el volumen de Tween-20 al 5% (v/v) para alcanzar una concentración final de 0.05% (v/v).

3.9.4. Validación de los ensayos inmunocromatográficos

Las matrices seleccionadas para validar el ensayo de flujo lateral para SP fueron el vino blanco y tinto de la marca comercial Fidencio, los mismos que se emplearon para estudios de efecto matriz y de recuperaciones mediante ELISA competitivo. Las muestras se doparon con SP o SP-enol a diferentes concentraciones. Para su análisis directo se diluyeron 1/10 con tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con 60 mM NaCl y 0.05% (v/v) Tween-20. Además, muestras de vino dopadas se analizaron después de aplicar una etapa de hidrólisis. Para ello, cada día antes del análisis se diluyeron 1/5 en NaOH 40 mM, y pasados de 10 min a temperatura ambiente se diluyeron 1/100 con el tampón anterior. Finalmente, 90 μL de muestra diluida, tratada o sin tratar, se depositó en un pocillo de una microplaca de poliestireno y se añadieron 10 μL de preparación de bioconjugado NP-mAb preparado como se describe en el apartado 3.9.2.

Para validar el inmunoensayo de flujo lateral de anatoxina-a, las matrices ensayadas fueron las cuatro aguas empleadas para estudios mediante ELISA competitivo (agua de cisterna, agua de balsa de riego, agua de lago y agua de río). Las matrices filtradas se doparon a diferentes concentraciones de (+)-anatoxina-a y se diluyeron directamente 1/2 en tampón fosfato 20 mM, pH 7.4, con 100 mM NaCl y 0.05% (v/v) de Tween-20. A continuación, 80 μL de

muestra se mezclaron en un pocillo de microplaca con 20 μL de preparación de NP-mAb preparado como se ha descrito anteriormente.

Cada muestra se analizó con las tiras reactivas una o dos veces al día durante 5 días consecutivos con el fin de obtener 20 lecturas independientes para un mismo tipo de muestra (vino blanco o vino tinto para los estudios con SP, y agua para los estudios con anatoxina-a). La inmunocromatografía tuvo lugar en posición vertical durante 10 min a temperatura ambiente. Después de extraer la almohadilla de muestra se leyó la señal de la línea test y la línea control como se describe en el apartado 3.9.3. El valor umbral de la señal para distinguir entre muestras positivas y negativas se determinó siguiendo el criterio publicado por la Comisión Europea para la validación de métodos de cribado semi-cuantitativos con respuesta inversamente proporcional para el análisis de pequeñas moléculas orgánicas.¹⁵⁷

$$\text{Umbral} = R_{\text{STC}} + t\text{-valor}_{(f)} * SD_{\text{STC}} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde R_{STC} es la media de los valores de T/C de las muestras que contienen el analito a una determinada concentración de cribado (STC, del inglés *Screening Target Concentration*), t -valor es el valor de un test t -Student de una cola para una tasa f de falsos negativos con 19 grados de libertad, y SD_{STC} es la desviación estándar de R_{STC} . Para calcular la tasa de falsos sospechosos, el valor de t para métodos semi-cuantitativos con respuesta inversamente proporcional a la concentración de analito se determinó según la ecuación:

$$t\text{-valor} = (\text{media}_{\text{cero}} - \text{umbral})/SD_{\text{cero}} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde $\text{media}_{\text{cero}}$ es la media de los valores de T/C obtenidos para las muestras sin dopar y SD_{cero} es la correspondiente desviación estándar. El valor de t obtenido se empleó para determinar la tasa de falsos sospechosos para una distribución de una cola en la función DIST-T del programa Microsoft Excel (Redmond, WA, EE.UU.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE I. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS PARA SPIROTETRAMAT

4.1. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados

Existe una grande y extensa lista de referencias bibliográficas en las que se ha descrito el desarrollo de inmunoensayos con elevada sensibilidad y selectividad basados en el uso de pAbs para la determinación de residuos agroquímicos.¹⁵⁹⁻¹⁶² En la presente tesis doctoral se consideró conveniente evaluar en primer lugar la afinidad de los pAbs hacia SP y SP-enol dado que constituyen un reflejo directo de la respuesta inmunitaria del animal a un determinado inmunógeno, lo que permite establecer una correlación entre la estructura del hapteno y las características de los anticuerpos generados.

Los seis antisueros disponibles para SP – dos obtenidos con el conjugado de SPo (SPo#1 y SPo#2), dos con el de SPc (SPc#1 y SPc#2) y dos de SPm (SPm#1 y SPm#2) – fueron caracterizados mediante ELISA competitivo en diferentes formatos. Por una parte, se realizaron ensayos en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa, en los que el reconocimiento del analito se produjo sobre la superficie del soporte sólido recubierta por el anticuerpo, incorporando en la etapa de competición del ensayo el trazador enzimático. Además, se realizaron ensayos en el formato de anticuerpo de captura con detección directa, formato que incorpora una etapa adicional (pretapizado con GAR) para inmovilizar el anticuerpo indirectamente en la placa de ELISA. Asimismo, se realizaron ensayos en formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta, en los que la interacción anticuerpo-analito tuvo lugar en disolución y la actividad enzimática se introdujo por adición de un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, capaz de reconocer el anticuerpo específico retenido en la superficie del pocillo tras la etapa de competición.

La afinidad de los anticuerpos por el analito se estimó en todos los casos a partir del valor de IC₅₀. Dado que las reacciones de reconocimiento molecular en equilibrio con anticuerpos se caracterizan generalmente por constantes de asociación muy elevadas, la determinación de la afinidad se lleva a cabo con concentraciones pequeñas de anticuerpo, conjugado y analito. Para encontrar las condiciones óptimas, se llevaron a cabo ensayos ELISA competitivos bidimensionales, en los que se realizaron combinaciones variadas de la concentración de anticuerpo y de conjugado, y con cada combinación se ensayó un conjunto de patrones de SP o SP-enol compuesto por un blanco y 7 disoluciones estándar preparadas de manera seriada con un factor de dilución de 10. Para cada combinación se obtuvo una curva de inhibición con

cada analito y se determinó la IC₅₀. Los ensayos se llevaron a cabo empleando conjugados tanto homólogos (con el mismo hapteno que el conjugado de inmunización) como heterólogos (con un hapteno diferente al del inmunógeno), lo que permitió, en el primer caso (conjugado homólogo) establecer correlaciones entre la respuesta inmunitaria y las estructuras de los haptenos, y en el segundo caso (conjugados heterólogos) estudiar los grupos funcionales inmunodeterminantes en la interacción anticuerpo-conjugado, y de manera importante seleccionar las parejas anticuerpo/conjugado que proporcionan la mayor sensibilidad de los inmunoensayos.

4.1.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

Los ensayos fueron realizados en microplacas empleando diluciones 1/3000 y 1/10000 de pAb en tampón de tapizado de carbonato, pH 9.6, para el recubrimiento inicial de las superficies de los pocillos, y disoluciones de trazador enzimático a 10, 30, 100 y 300 ng/mL en la etapa de competición con los analitos SP y SP-enol. Cada combinación se situó en una de las columnas de la placa, y en cada una de ellas se ensayó la misma serie de patrones de analito preparada como se ha descrito anteriormente. De este estudio se obtuvo una colección de curvas de inhibición de las que se seleccionó la combinación anticuerpo/trazador que proporcionaba la curva de inhibición con el menor valor de IC₅₀.

De esta manera, y en primera instancia, se llevó a cabo la caracterización de los seis pAbs generados para SP y SP-enol, frente a los trazadores enzimáticos basados en los tres haptenos disponibles hasta el momento (HRP-SP_o, HRP-SP_c y HRP-SP_m). Las condiciones óptimas de inmunorreactivos y los valores de IC₅₀ obtenidos para cada par anticuerpo/trazador se muestran en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Caracterización de los anticuerpos policlonales de spirotetramat mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo con conjugados homólogos y heterólogos (n=3).

pAb	Trazadores enzimáticos											
	HRP-SP _o				HRP-SP _c				HRP-SP _m			
	[pAb] ^a	[HRP] ^b	IC ₅₀ ^c SP	IC ₅₀ SP-enol	[pAb]	[HRP]	IC ₅₀ SP	IC ₅₀ SP-enol	[pAb]	[HRP]	IC ₅₀ SP	IC ₅₀ SP-enol
SP _o #1	10	30	165	10.8	10	300	- ^d	-	10	300	-	-
SP _o #2	3	300	233	19.6	3	300	-	-	3	300	-	-
SP _c #1	10	300	-	-	3	300	-	-	10	300	-	-
SP _c #2	3	300	-	-	3	300	-	-	3	300	-	-
SP _m #1	10	300	-	-	10	300	-	-	3	300	119.7	24.6
SP _m #2	3	300	-	-	3	300	-	-	10	100	197.4	20.9

^a Factor de dilución del anticuerpo x10³. ^b Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/ml. ^c Valores expresados en nM. ^d No se obtuvo señal.

De los resultados mostrados en la **Tabla 4.1** se puede mencionar que los anticuerpos generados con BSA-SPo y BSA-SPm reconocieron al menos a su trazador homólogo, y por tanto que dichos inmunógenos fueron capaces de inducir respuesta inmunitaria. En este caso, el valor de $A_{m\acute{a}x}$ de la curva de inhibición seleccionada con el anticuerpo SPo#1 fue de 0.69, mientras que el de SPo#2 fue de 1.02. Los valores de $A_{m\acute{a}x}$ de las curvas seleccionadas con los anticuerpos de SPm estuvieron entre 0.9 y 1.3. Con estos cuatro pAbs, los valores de IC_{50} se situaron en el rango nanomolar para SP-enol, observándose una mayor afinidad hacia este metabolito que hacia SP. Por otro lado, ninguno de los dos antisueros generados con BSA-SPc reconoció a su trazador homólogo en este formato. El reconocimiento de trazadores heterólogos fue nulo en todos los casos, como es habitual en este formato de ensayo para conjugados con el brazo espaciador en posición heteróloga.

4.1.2. Formato de anticuerpo de captura con detección directa

En este formato se realizó una etapa previa conocida como el pretapizado que tuvo lugar en la placa ELISA con GAR en tampón carbonato, pH 9.6. Se estudiaron diluciones de 1/3000, 1/10000 y 1/30000 de pAb para la etapa de captura, y disoluciones de trazador enzimático a 10, 30, 100 y 300 ng/mL en la etapa de competición con los analitos SP y SP-enol. Cada combinación de inmunorreactivos se ensayó con una serie de disoluciones estándar de analito, incluyendo un blanco, como se ha descrito anteriormente, y se seleccionó la curva estándar que poseía el menor valor de IC_{50} .

De esa manera se llevó a cabo la caracterización de los pAbs generados para SP y SP-enol frente a los trazadores enzimáticos basados en los tres haptenos disponibles en aquel momento (HRP-SPo, HRP-SPc y HRP-SPm). Las condiciones óptimas de inmunorreactivos y los valores de IC_{50} obtenidos para cada par anticuerpo/trazador se muestran en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Caracterización de los anticuerpos policlonales de spirotetramat mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo de captura con conjugados homólogos y heterólogos (n=3).

pAb	Trazadores enzimáticos											
	HRP-SPo				HRP-SPc				HRP-SPm			
	[pAb] ^a	[HRP] ^b	IC_{50} ^c	IC_{50}	[pAb]	[HRP]	IC_{50}	IC_{50}	[pAb]	[HRP]	IC_{50}	IC_{50}
SPo#1	30	100	113	1.50	3	300	- ^d	-	3	300	-	-
SPo#2	3	300	381	22.7	3	300	-	-	3	300	-	-
SPc#1	3	300	-	-	3	300	-	-	3	300	-	-
SPc#2	3	300	-	-	3	300	-	-	3	300	-	-
SPm#1	3	300	-	-	3	300	-	-	10	100	122	12.2
SPm#2	3	300	-	-	3	300	-	-	10	100	83.9	25.0

^a Factor de dilución del anticuerpo $\times 10^3$. ^b Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/ml. ^c Valores expresados en nM. ^d No se obtuvo señal.

Como cabía esperar, los anticuerpos generados con los inmunógenos de SPo y SPm fueron capaces de reconocer a su trazador homólogo. En este caso, los valores de $A_{m\acute{a}x}$ de las curvas seleccionadas fueron de 1.07 y 0.56 con los anticuerpos SPo#1 y SPo#2, respectivamente. Sin embargo, como en el formato anterior, los anticuerpos derivados de BSA-SPc no reconocieron a su trazador homólogo. En cuanto a los anticuerpos de SPm, los valores de $A_{m\acute{a}x}$ se situaron entre 0.9 y 1.1. Por otro lado, los valores de IC_{50} para cada par de anticuerpos generados con el mismo inmunógeno fueron semejantes, y fueron bastante más bajos para SP-enol que para SP, independientemente del inmunógeno del que derivan. Los valores de IC_{50} encontrados para SP-enol se situaron en el rango de nanomolar. Por otro lado, los conjugados heterólogos no fueron reconocidos por los pAbs generados, como se ha observado con el formato directo sin captura. La utilización del anticuerpo de captura ha permitido mejorar el valor de IC_{50} para SP-enol con el anticuerpo SPo#1, alcanzando una sensibilidad importante.

4.1.3. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

Con el objetivo de continuar con la caracterización de los pAbs, se realizó un estudio mediante ELISA competitivo bidimensional en el formato indirecto. Para ello se ensayaron disoluciones de conjugado OVA-hapteno a 10, 100 y 1000 ng/mL para el recubrimiento de los pocillos, preparadas en tampón carbonato, pH 9.6, o en tampón fosfato, pH 7.4. Las diluciones de pAb utilizadas fueron de 1/3000, 1/10000, 1/30000 y 1/100000 para la etapa de competición con SP o SP-enol. Las diferentes combinaciones de inmunorreactivos se ensayaron como fue descrito en el formato directo, y se seleccionó la curva de inhibición que poseía el menor valor de IC_{50} y cuyo valor de $A_{m\acute{a}x}$ fue superior a 0.8 y lo más cercano posible a 1.0. Los datos obtenidos con los distintos antisueros frente a dos conjugados de diferente RM del hapteno SPo se resumen en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.3. Caracterización de los anticuerpos policlonales de spirotetramat mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con el conjugado OVA-SPO (n=3).

OVA-SPO (RM=4)										
Tapizado pH 9.6						Tapizado pH 7.4				
pAb	[pAb] ^a	[OVA] ^b	A _{máx}	IC ₅₀ ^c SP	IC ₅₀ SP-enol	[pAb]	[OVA]	A _{máx}	IC ₅₀ SP	IC ₅₀ SP-enol
SPO#1	100	10	0.92	561	36.6	100	10	1.42	n.i. ^d	97.7
SPO#2	10	10	1.32	963	56.2	10	10	1.08	805	70.3
SPc#1	3	1000	- ^e			3	1000	-		
SPc#2	3	1000	-			3	1000	-		
SPm#1	3	1000	-			3	1000	-		
SPm#2	3	1000	-			3	1000	-		

OVA-SPO (RM=0.4)										
Tapizado pH 9.6						Tapizado pH 7.4				
pAb	[pAb]	[OVA]	A _{máx}	IC ₅₀ SP	IC ₅₀ SP-enol	[pAb]	[OVA]	A _{máx}	IC ₅₀ SP	IC ₅₀ SP-enol
SPO#1	10	1000	1.15	n.i.	n.i.	100	1000	1.03	n.i.	n.i.
SPO#2	10	1000	0.99	n.i.	n.i.	30	1000	1.10	n.i.	n.i.
SPc#1	n.e. ^f					n.e.				
SPc#2	n.e.					n.e.				
SPm#1	n.e.					n.e.				
SPm#2	n.e.					n.e.				

^a Factor de dilución del anticuerpo $\times 10^3$. ^b Concentración de conjugado de OVA expresada en ng/mL. ^c Valores expresados en nM. ^d La reducción de la señal con 10^4 nM de analito fue escasa o nula. ^e No se obtuvo señal. ^f No ensayado.

Dada la inestabilidad del grupo carbonato del hapteno SPO, se evaluaron dos tampones de tapizado de diferente pH. En ambos casos se observó un elevado reconocimiento del conjugado de tapizado de RM 4 con los antiseros SPO#1 y SPO#2, por lo que fue necesario utilizar concentraciones de tapizado muy bajas (10 ng/mL), y además, para SPO#1, fueron necesarias diluciones elevadas de anticuerpo. Bajo estas condiciones, tan solo se observó inhibición destacable con SP-enol, si bien los valores de IC₅₀ fueron moderados. En consecuencia, se evaluó un conjugado menos marcado, con RM de 0.4, pero se dejó de observar inhibición con SP-enol, probablemente debido al aumento necesario de la concentración de conjugado para obtener un valor de A_{máx} cercano a 1.0. Estos resultados fueron independientes del pH del tampón de tapizado. Finalmente, se observó que los anticuerpos obtenidos con los conjugados de los haptenos SPc y SPm no reconocieron el conjugado de SPO.

Los seis anticuerpos también se ensayaron frente a los conjugados de SPc y SPm tapizando en tampón carbonato, pH 9.6, y en iguales condiciones en tampón fosfato, pH 7.4. En ambos casos se emplearon disoluciones de conjugado OVA-hapteno a 1, 10, 100, 1000 y 3000 ng/mL. Las diluciones de pAb utilizadas fueron de 1/3000, 1/10000 y 1/30000 para la etapa de competición con el analito. De todas las combinaciones y concentraciones de inmunorreactivos ensayadas, se seleccionaron las que proporcionaron un menor valor de IC₅₀

para una señal de $A_{m\acute{a}x}$ mayor de 0.8 y lo más cercana a 1.0 posible. Los resultados de dicho estudio se resumen en la **Tabla 4.4**.

El anticuerpo SPo#1 reconoció el conjugado OVA-SPc tan solo si se tapizaba a pH 7.4, mientras que el anticuerpo SPo#2 prácticamente no reconoció dicho conjugado en ningún caso. Los anticuerpos SPc#1 y SPc#2 reconocieron a su conjugado homólogo tanto tapizando a pH básico como neutro, lo que indica que la inmunización tuvo lugar con el conjugado BSA-SPc (esto no se pudo observar en los formatos directos). Los anticuerpos SPm#1 y SPm#2 reconocieron OVA-SPc si el tapizado se realizó a pH 7.4. Estos resultados parecen indicar que a pH básico el hapteno SPc probablemente se hidroliza liberando la molécula de SP-enol y quedando tan sólo el brazo espaciador unido a la proteína. En cuanto a la inhibición con SP o SP-enol, el antisero SPo#1 aportó una IC_{50} aceptable para ambos compuestos, si bien el antisero SPo#2 no lo hizo. Los anticuerpos de SPc no reconocieron ni a SP ni a SP-enol, lo que de nuevo sugiere una posible hidrólisis *in vivo*, durante la inmunización, del hapteno del conjugado inmunizante BSA-SPc. Finalmente, los valores de IC_{50} observados con los antiseros de SPm combinados con el tapizado de OVA-SPc fueron elevados.

Tabla 4.4. Caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos para spirotetramat mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con los conjugados OVA-SPc y OVA-SPm (n=3).

OVA-SPc										
Tapizado pH 9.6										
pAb	[pAb] ^a	[OVA] ^b	$A_{m\acute{a}x}$	IC_{50} ^c		Tapizado pH 7.4				
				SP	SP-enol	[pAb]	[OVA]	$A_{m\acute{a}x}$	IC_{50}	IC_{50}
SPo#1	3	3000	- ^d			3	3000	1.02	9.47	3.60
SPo#2	3	3000	-			3	3000	0.28	9.96	20.1
SPc#1	3	3000	1.06	n.i. ^e	n.i.	3	100	1.56	n.i.	n.i.
SPc#2	10	3000	1.67	n.i.	n.i.	10	100	1.03	n.i.	n.i.
SPm#1	10	3000	-			10	100	0.96	91.5	157
SPm#2	10	3000	-			10	100	1.43	122	53.2

OVA-SPm										
Tapizado pH 9.6										
pAb	[pAb]	[OVA]	$A_{m\acute{a}x}$	IC_{50}		Tapizado pH 7.4				
				SP	SP-enol	[pAb]	[OVA]	$A_{m\acute{a}x}$	IC_{50}	IC_{50}
SPo#1	3	3000	-			3	10	1.26	417	67.8
SPo#2	3	3000	-			3	100	1.35	170	25.7
SPc#1	3	3000	-			3	3000	-		
SPc#2	3	3000	-			3	3000	-		
SPm#1	30	10	1.63	n.i.	n.i.	30	10	1.57	n.i.	482
SPm#2	100	10	0.88	n.i.	n.i.	100	10	0.93	n.i.	301

^a Factor de dilución del anticuerpo $\times 10^3$. ^b Concentración de conjugado de OVA expresada en ng/mL. ^c Valores expresados en nM. ^d No se obtuvo señal. ^e La reducción de la señal con 10^4 nM de analito fue escasa o nula.

El conjugado OVA-SP m no fue reconocido por los antisueros de SP o ni SP c tapizando a pH 9.6 (**Tabla 4.4**). Tapizando a pH 7.4, tan solo los anticuerpos de SP o pasaron a reconocer este conjugado, si bien los valores de IC₅₀ observados fueron elevados para SP y modestos para SP-enol. Por otro lado, los anticuerpos de SP m reconocieron a su conjugado homólogo independientemente del pH del tampón de tapizado, pero tan solo a pH 7.4 se encontró inhibición con SP-enol, aunque con valores de IC₅₀ muy elevados.

Según estos estudios, el hapteno SP o parece ser el más indicado para obtener anticuerpos de elevada afinidad para SP, y sobre todo para SP-enol. En cambio, el hapteno SP c no fue una buena aproximación para la obtención de anticuerpos frente a dichos analitos. Por otro lado, el hapteno SP m generó anticuerpos con muy elevada afinidad hacia el conjugado, pero no hacia el analito en disolución. En cuanto a heterologías, el hapteno SP c fue una buena opción para el anticuerpo SP o #1, y fue el único reconocido por los anticuerpos de SP m . Los ensayos más sensibles, tanto para SP como para SP-enol, se obtuvieron con el anticuerpo SP o #1 combinado con el trazador homólogo en el formato que utiliza anticuerpo de captura y con el conjugado de SP c en formato indirecto.

4.2. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos policlonales y la selectividad de los inmunoensayos seleccionados

En el momento de desarrollar un inmunoensayo y desde un punto de vista analítico, el reconocimiento de compuestos no deseados diferentes al analito en estudio por parte de los anticuerpos constituye una fuente de interferencias potencial en el ensayo, y por tanto una fuente de errores a la hora de cuantificar el analito. De tal manera, es preciso asegurar que el anticuerpo reconoce de manera exclusiva a la molécula de interés, incluso en presencia de otros compuestos con estructura semejante. Una forma de poder estimar de manera cuantitativa el grado de especificidad de un anticuerpo, consiste en llevar a cabo un inmunoensayo competitivo frente al analito de interés y otro frente al compuesto con el que se quiere comparar, en igualdad de condiciones, y obtener los correspondientes valores de IC₅₀ para calcular el cociente entre ellos. Este cociente, usualmente expresado como porcentaje, se denomina reactividad cruzada (RC), y su valor es tanto más alto cuanto mayor es el reconocimiento del compuesto estudiado por parte del anticuerpo, siendo un 0% el valor mínimo correspondiente a un reconocimiento nulo de dicho compuesto. La especificidad de un anticuerpo se debe estimar utilizando un ensayo con conjugado homólogo ya que, como es sabido, la RC de los ensayos con pAbs es dependiente del conjugado empleado. Así, se procedió a determinar la capacidad del antisuero SP o #1 para reconocer otras sustancias distintas de SP. Con el resto de antisueros no se abordó el presente estudio debido a la escasa

afinidad mostrada hacia SP y SP-enol. Este estudio de RC se realizó con los cuatro principales metabolitos de SP (SP-enol, SP-ceto, SP-glu y SP-mono) en el formato de captura con trazador homólogo.

Por otro lado, se determinó la RC del otro inmunoensayo más sensible, el de formato indirecto con conjugado heterólogo con el mismo antisuero, que además en los ensayos bidimensionales presentó un reconocimiento más genérico de SP y SP-enol que el ensayo con conjugado homólogo. De esta manera, se obtuvieron los respectivos valores de RC mostrados en la **Tabla 4.5**.

Tabla 4.5. Reactividad cruzada de SPo#1 con los metabolitos de spirotetramat (n=3).

Analito	Ensayo de captura homólogo ^a			Ensayo indirecto heterólogo ^b		
	IC ₅₀ (nM)	RC 1 (%)	RC 2 (%)	IC ₅₀ (nM)	RC 1 (%)	RC 2 (%)
SP	113	100	1.3	9.47	100	38
SP-enol	1.50	7533	100	3.60	263	100
SP-glu	68.0	166	2.2	157	6.0	2.3
SP-ceto	3771	3.0	<0.1	1948	0.5	0.2
SP-mono	1563	7.2	0.1	>10000	<0.1	<0.1

^a Dilución 1/30000 del antisuero SPo#1 y trazador enzimático homólogo a 100 ng/mL. ^b Dilución 1/3000 del antisuero SPo#1 y tapizado con OVA-SPc a 3000 ng/mL con tampón a pH 7.4.

El anticuerpo SPo#1 resultó ser bastante específico de SP-enol, con una RC del 1.3% hacia SP, considerando SP-enol como el analito de referencia (RC 2 en la **Tabla 4.5**). Este antisuero reconocía ligeramente mejor a SP-glu que a SP, mientras que SP-ceto y SP-mono prácticamente no fueron reconocidos. Como cabía esperar la RC observada fue dependiente del conjugado de ensayo. En el ensayo indirecto con conjugado heterólogo, SP y SP-enol fueron reconocidos de manera más semejante, con un valor de RC para SP cercano al 40%. Desafortunadamente, SP-ceto y SP-mono presentaron valores de RC despreciables y la RC con SP-glu se mantuvo a niveles muy bajos. La utilización de un conjugado con el brazo espaciador en la posición del sustituyente etilcarbonato, permitió obtener valores de IC₅₀ más similares para SP y SP-enol que en el ensayo con conjugado homólogo (**Tabla 4.5**) si bien no se consiguió que reconociese significativamente los otros tres metabolitos.

4.3. Caracterización de inmunoensayos tipo ELISA basados en anticuerpos policlonales

Las interacciones anticuerpo-analito y anticuerpo-conjugado pueden verse afectadas de forma muy significativa por las propiedades del medio en el que tienen lugar. Parámetros como el pH, la fuerza iónica y la presencia de disolventes orgánicos, afectan habitualmente al funcionamiento de los inmunoensayos, incidiendo de forma directa sobre la sensibilidad (IC₅₀) y la señal (A_{máx}). Las muestras a analizar, ya sean ambientales o de alimentos, pueden

presentar valores de pH y fuerza iónica muy diferentes a los del tampón en el que se preparan las disoluciones patrón, por lo general un tampón fosfato formulado en condiciones fisiológicas (pH 7.4 y fuerza iónica 162 mM). Además, en el caso de plaguicidas, el procedimiento más habitual de extracción implica el uso de disolventes orgánicos, por lo que se hace necesario conocer hasta qué punto es compatible con la interacción antígeno-anticuerpo.

Los dos ensayos finalmente seleccionados a partir de los estudios de evaluación de la afinidad y especificidad de los anticuerpos empleaban el pAb SPo#1, uno en formato de captura con trazador homólogo y el otro en formato indirecto con el conjugado del hapteno heterólogo SPc. Estos inmunoensayos fueron sometidos a estudios de caracterización de diversos factores fisicoquímicos que habitualmente pueden influir en la señal y sensibilidad de un inmunoensayo. Los factores evaluados fueron la fuerza iónica, el pH y la presencia de diferentes disolventes orgánicos.

4.3.1. Estudio de la influencia del pH

Como control, todos los ensayos se realizaron previamente en un medio basado en tampón fosfato (PBS), y por tanto en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica (*I*), con valores de 7.4 y 162 mM, respectivamente. Para estudiar la influencia del pH, se prepararon curvas de inhibición en agua MilliQ y se mezclaron con disoluciones del inmunorreactivo de competición en tampón fosfato, cubriendo valores de pH de 6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 y 8.5, preparados de tal modo que en todos los casos se mantuviese la concentración del tampón (10 mM) y la fuerza iónica (162 mM).

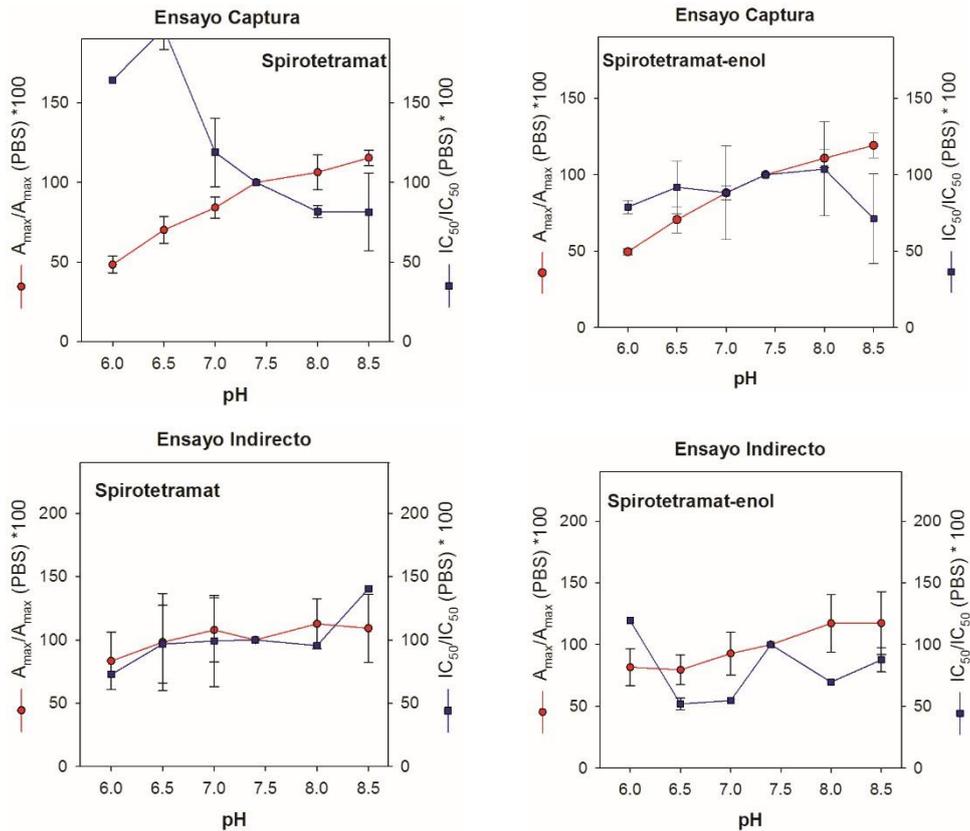


Figura 4.1. Influencia del pH en la etapa de competición sobre los valores de la $A_{m\acute{a}x}$ y de la IC_{50} de los inmunoensayos competitivos seleccionados para el insecticida SP y su metabolito SP-enol. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres experimentos independientes.

La **Figura 4.1** muestra la variación relativa de los valores de la $A_{m\acute{a}x}$ y de la IC_{50} para SP y SP-enol en los dos inmunoensayos competitivos seleccionados respecto a los valores obtenidos en PBS (pH 7.4). Obviamente, la variación de la $A_{m\acute{a}x}$ en función del pH fue la misma independientemente del analito ensayado. No obstante, se representa la $A_{m\acute{a}x}$ obtenida en ambos casos para mayor control de los resultados.

Para el ensayo de captura con conjugado homólogo (SPo#1/HRP-SPo) se presentaron variaciones significativas de la $A_{m\acute{a}x}$ a valores de pH más ácidos. Además, la IC_{50} para SP se vio incrementada de manera importante a valores de pH por debajo de 7.4. En cambio, la IC_{50} para SP-enol no se alteró marcadamente dentro del rango de pH estudiado.

En el ensayo indirecto con conjugado heterólogo (SPo#1/OVA-SPc), se observó un comportamiento más estable al aumentar o disminuir el pH respecto al ensayo en PBS (**Figura 4.1**). Así, tanto la $A_{m\acute{a}x}$ como las IC_{50} para SP y SP-enol disminuyeron ligeramente cuando el ensayo se llevó a cabo en tampón con valores de pH más bajos. Por otro lado, al aumentar el pH no se observaron diferencias significativas. Por tanto, el ensayo indirecto se mostró más robusto frente a cambios de pH que el de captura. Un dato importante a destacar es el

aumento de la $A_{\text{máx}}$ y la disminución de las IC_{50} de ambos ensayos al aumentar el pH, por lo que se podría modificar en este sentido las condiciones del ensayo para optimizar así la sensibilidad.

4.3.2. Estudio de la influencia de la fuerza iónica

Luego que se evaluó la influencia del pH sobre los valores de la $A_{\text{máx}}$ e IC_{50} de los inmunoensayos seleccionados, se realizó un estudio equivalente para determinar el efecto de la fuerza iónica. En este caso, el inmunorreactivo de competición se disolvió en tampones fosfato con concentraciones variables de NaCl preparados de tal manera que en todos los casos fuesen constantes en el ensayo tanto el pH (7.4) como la concentración total del tampón fosfato (10 mM). De esta manera se abarcó un rango de valores de concentración de NaCl en ensayo desde 25 hasta 250 mM.

En la **Figura 4.2** se representa gráficamente la influencia de esta variable sobre los inmunoensayos seleccionados. Como se ha indicado anteriormente, la variación de la $A_{\text{máx}}$ en función de la concentración de NaCl es independiente del analito ensayado. No obstante, se representa la $A_{\text{máx}}$ obtenida en ambos casos para mayor control de los resultados.

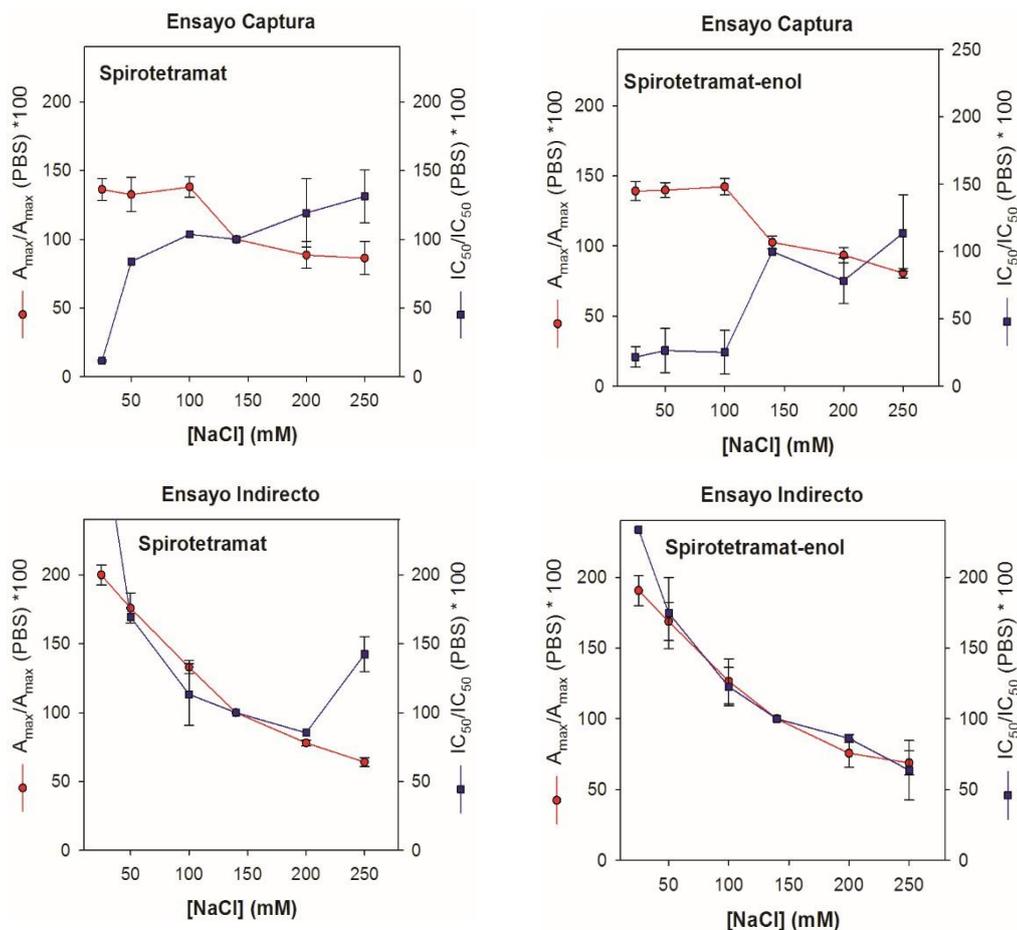


Figura 4.2. Influencia de la fuerza iónica en la etapa de competición sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} de los inmunoensayos competitivos seleccionados para el insecticida SP y su metabolito SP-enol. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres experimentos independientes.

Para el ensayo de captura (SPo#1/HRP-SPo), la disminución de la fuerza iónica indujo cambios importantes en la IC_{50} tanto para SP como para SP-enol. La $A_{m\acute{a}x}$ aumentó ligeramente mientras que los valores de IC_{50} de ambos analitos disminuyeron drásticamente. Por otro lado, la $A_{m\acute{a}x}$ disminuyó y las IC_{50} aumentaron ligeramente con el incremento de la fuerza iónica. En todo caso, modificaciones de la concentración de NaCl por encima de 140 mM no tuvieron un impacto relevante sobre el ensayo de captura. Estos resultados indican que es posible mejorar la sensibilidad de este inmunoensayo mediante la reducción de la fuerza iónica.

En el ensayo indirecto con el conjugado heterólogo (SPo#1/OVA-SPc) se observó que modificaciones de la concentración de NaCl por debajo de 140 mM aumentaron tanto la $A_{m\acute{a}x}$ como los valores de IC_{50} para SP y SP-enol (**Figura 4.2**). A valores de fuerza iónica más elevados los cambios de la $A_{m\acute{a}x}$ y las IC_{50} para ambos analitos no se vieron tan alterados.

En resumen, los dos inmunoensayos estudiados se mostraron sensibles principalmente a la disminución de la fuerza iónica, mientras que el aumento de dicho parámetro ejerció una influencia ligeramente menor sobre ambos ensayos.

4.3.3. Tolerancia a disolventes orgánicos

Se llevó a cabo un estudio de tolerancia a la presencia de dos disolventes de extracción habituales, como son el metanol y el acetonitrilo, y también se estudió la influencia del etanol dado que algunas matrices alimentarias como el vino contienen dicho compuesto.

Este estudio se realizó preparando disoluciones patrón de SP y SP-enol en agua MilliQ conteniendo diferentes concentraciones del disolvente orgánico a evaluar, mientras que las diluciones de los trazadores enzimáticos y de los anticuerpos se prepararon en PBS2x-T. Las **Figuras 4.3 y 4.4** muestran el efecto de la presencia de disolvente a varias concentraciones (0.5, 1, 2, 5 y 10% (v/v) en ensayo) sobre las características analíticas de los inmunoensayos seleccionados para la determinación de SP y SP-enol. De nuevo, se representa la variación de la $A_{m\acute{a}x}$ en función de la concentración del disolvente para ambos analitos con el fin de tener un mayor control del experimento, ya que los resultados deben ser idénticos.

El ensayo de captura con trazador homólogo para SP y SP-enol (SPo#1/HRP-SPo) resultó ser bastante tolerante a la presencia del disolvente metanol hasta un 5% (**Figura 4.3**). A concentraciones por encima de dicho porcentaje, no se observó mayor variación de la señal máxima, mientras que las IC_{50} para ambos compuestos se vieron afectadas negativamente. Respecto al etanol, concentraciones crecientes de este disolvente disminuyeron paulatinamente la $A_{m\acute{a}x}$ y aumentaron los valores de IC_{50} , sobre todo para SP-enol. Finalmente, con el disolvente acetonitrilo, la $A_{m\acute{a}x}$ se mantuvo constante hasta un 2% de disolvente, y la IC_{50} para SP aumentó de manera importante, mientras el aumento de la IC_{50} para SP-enol fue más moderado. En definitiva, para el ensayo de captura el disolvente mejor tolerado fue el metanol. Las concentraciones de etanol y acetonitrilo se deberían mantener por debajo del 1% para evitar interferencias.

El ensayo indirecto (**Figura 4.4**) con conjugado heterólogo para SP y SP-enol (SPo#1/OVA-SPc) resultó ser bastante tolerante a la presencia de metanol, etanol y acetonitrilo en el rango de concentración estudiado, ya que la presencia de hasta un 10% de ellos no dio lugar a grandes cambios en la señal máxima. Respecto a la IC_{50} , no se observaron grandes variaciones para SP con un 10% de metanol y con hasta un 5% para SP-enol. La presencia de etanol no alteró de manera importante la IC_{50} para SP, en cambio concentraciones superiores a un 2% disminuyeron la sensibilidad del ensayo hacia SP-enol. La tolerancia al acetonitrilo fue

semejante a la observada con etanol. Dado que este inmunoensayo tiene una RC aproximada del 40% para SP, se podría pensar en añadir una pequeña cantidad de disolvente al ensayo para igualar los valores de IC_{50} para SP y SP-enol.

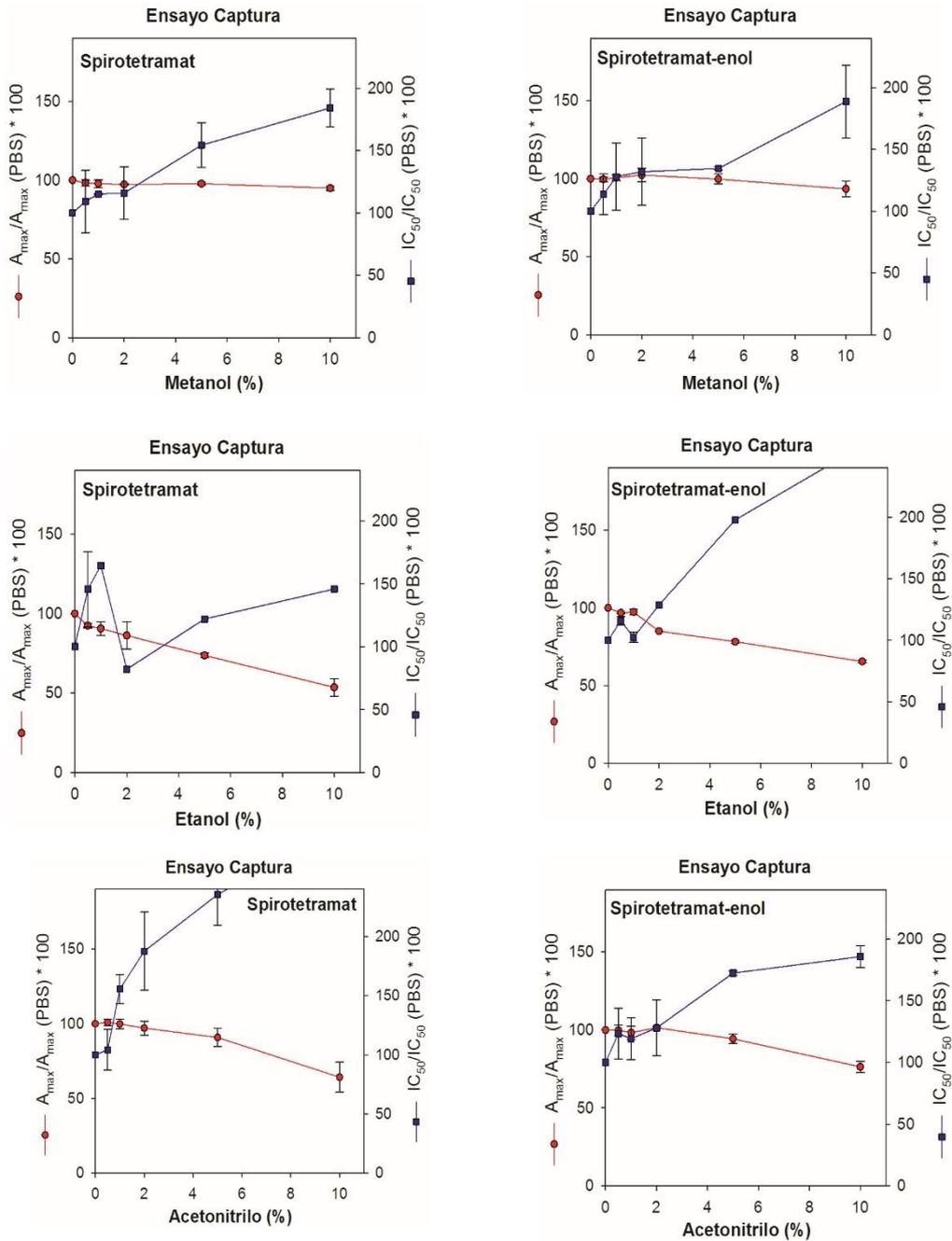


Figura 4.3. Influencia de tres disolventes orgánicos en la etapa de competición sobre los valores de A_{max} e IC_{50} en el ensayo de captura para el insecticida SP y su metabolito SP-enol. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

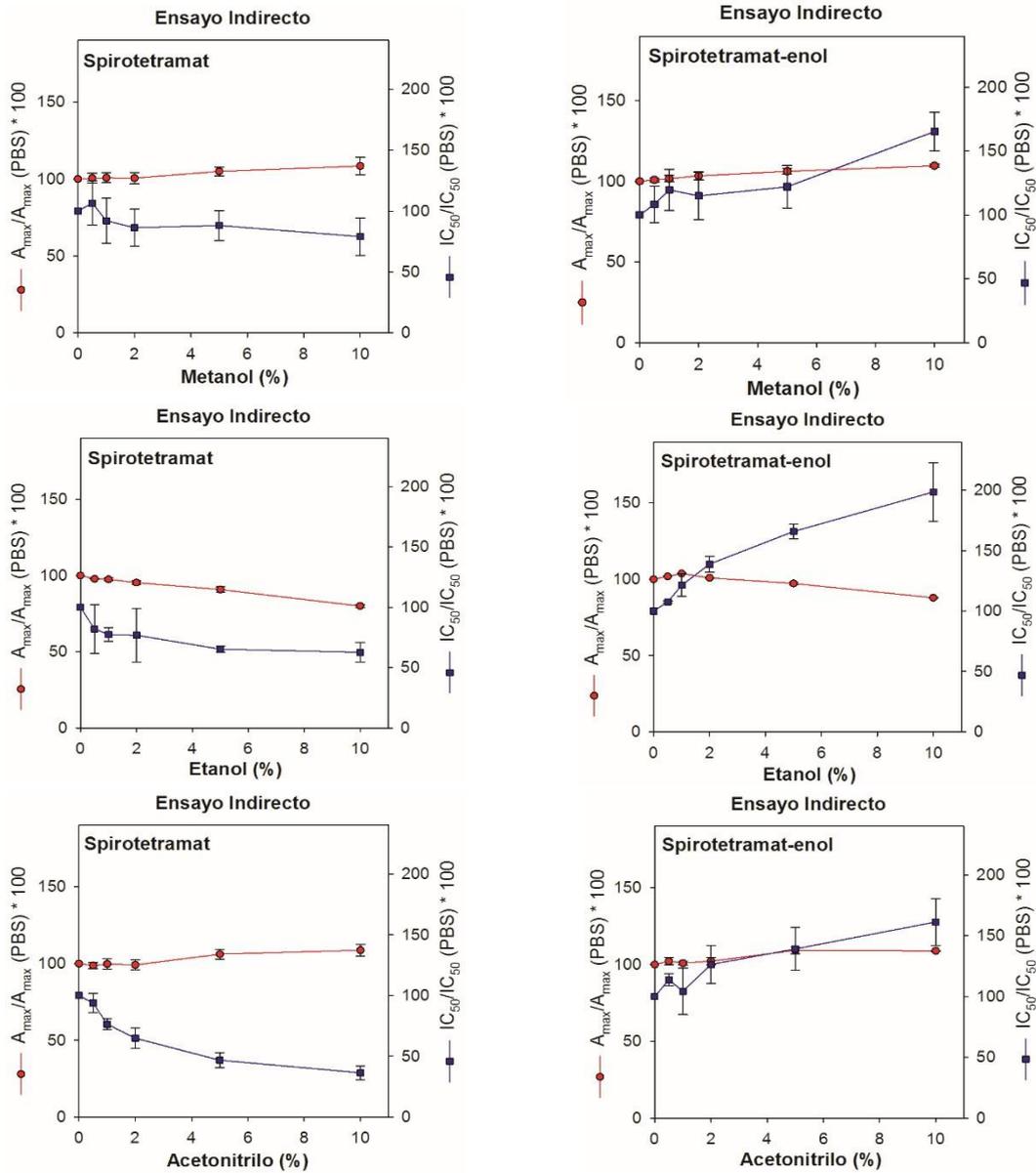


Figura 4.4. Influencias de tres disolventes orgánicos en la etapa de competición sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} en el ensayo indirecto para el insecticida SP y su metabolito SP-enol. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

4.3.4. Evaluación del efecto matriz en zumos de uva y vinos

A menudo, la propia matriz a analizar provoca interferencias en los inmunoensayos debido tanto a parámetros fisicoquímicos (pH, fuerza iónica, disolventes, etc.) como a la presencia de determinados compuestos propios del alimento que pueden interferir en el resultado del análisis, dando lugar a lo que se conoce como efecto matriz. En los inmunoensayos, los límites de detección suelen ser muy bajos, por lo que este efecto podría corregirse si la muestra se diluye lo suficiente, pudiendo o no incluir un sencillo paso de filtración para eliminar partículas en suspensión.¹⁶³⁻¹⁶⁴ Con frecuencia el pH suele ser

responsable de gran parte de los efectos matriz observados por lo que una adecuada tamponación resulta adecuado.

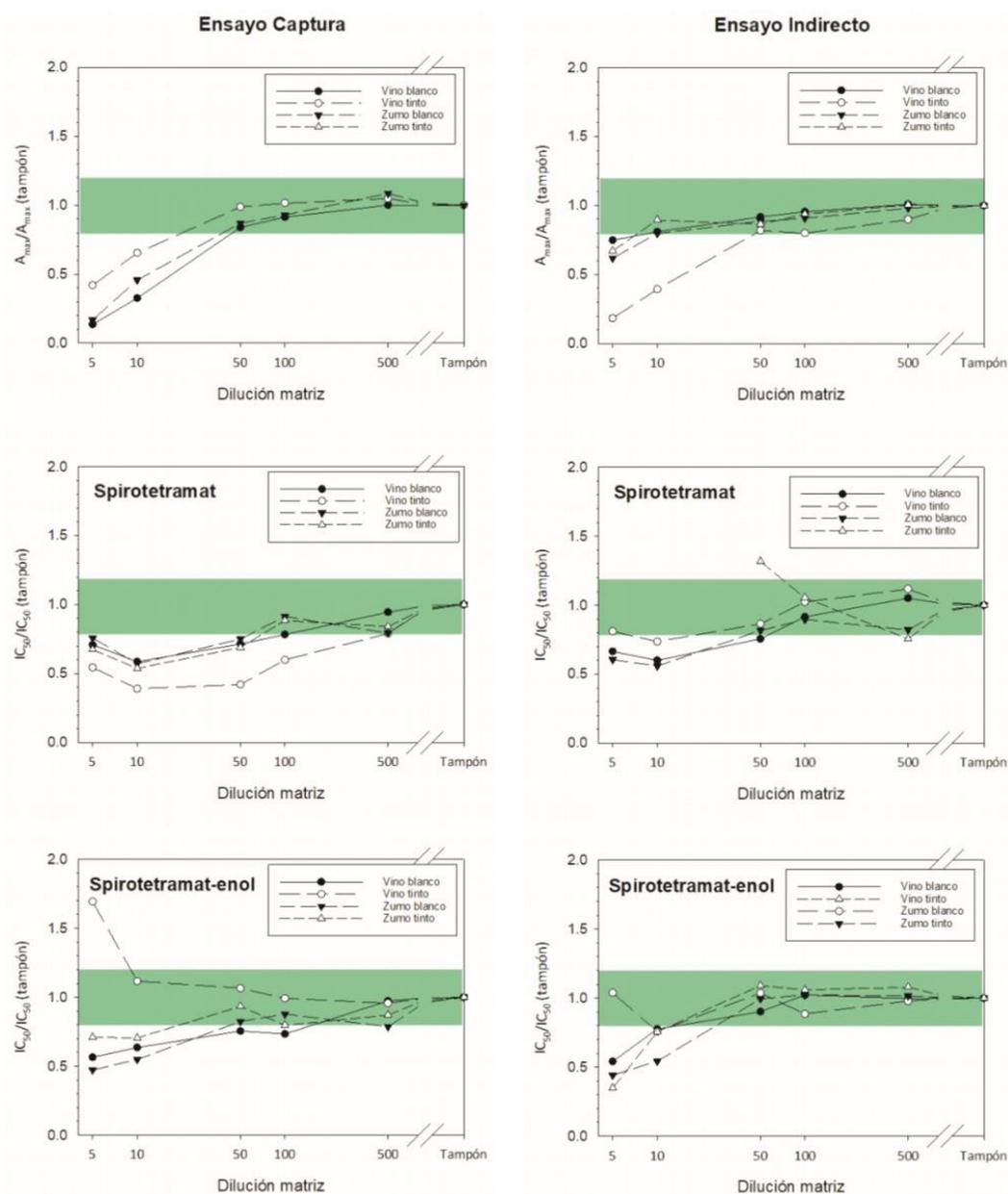


Figura 4.5. Efecto matriz para los zumos y vinos (blancos y tintos) sobre los inmunoensayos seleccionados para SP y SP-enol utilizando el pAb SPo#1. El fondo resaltado en verde corresponde al intervalo $\pm 20\%$ de variación del valor de referencia.

Con el fin de encontrar la dilución mínima de la muestra necesaria para corregir el efecto matriz en los inmunoensayos seleccionados, se ensayaron patrones de SP y SP-enol en presencia de diferentes proporciones de la muestra estudiada, y las curvas de inhibición resultantes se compararon con la curva estándar obtenida en ausencia de matriz. Se estudió el efecto matriz de vinos blancos y tintos, así como zumos blancos y tintos sobre los ensayos seleccionados. Las muestras sin analito se diluyeron 5, 10, 50, 100 y 500 veces en agua MilliQ.

La variación del valor de $A_{\text{máx}}$ y de los de las IC_{50} para SP y SP-enol, normalizados respecto a los correspondientes valores obtenidos en tampón, se muestran en la **Figura 4.5**.

Con el ensayo indirecto (SPo#1/OVA-SPc) se estudió la influencia de las mismas matrices (**Figura 4.5**). Los valores de $A_{\text{máx}}$ e IC_{50} , tanto para SP como para SP-enol, se vieron menos afectados que en el ensayo de formato de captura, si bien en general una dilución de 50 veces parecía ser recomendable para eliminar el efecto matriz. El efecto matriz sobre la IC_{50} para SP fue más acusado cuando se ensayó zumo tinto, hasta el punto que a diluciones bajas los datos no se pudieron ajustar a una curva sigmoidea.

Los inmunoensayos optimizados y caracterizados utilizando pAbs para SP no se validaron para el análisis de residuos en muestras de alimentos, ya que dichos estudios se realizaron con mAbs por ser el tipo de bioreceptores mayormente aceptados para el desarrollo de métodos inmunoanalíticos con fines prácticos. No obstante, estos resultados podrían ser interesantes para futuros estudios.

4.4. Obtención de conjugados con el hapteno SP h

Los resultados con los pAbs indicaban claramente que SPc podía ser un buen heterólogo debido a la posición del brazo espaciador. Por ello se diseñó un nuevo hapteno, SP h , análogo a SPc pero sin el grupo carbonato con el objetivo de conferirle mayor estabilidad. El hapteno SP h fue sintetizado y caracterizado por los profesores Consuelo Agulló Blanes y Antonio Abad Somovilla del Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València. Desde allí se nos aportó el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno que se disolvió en DMF para su conjugación a BSA, OVA y HRP.

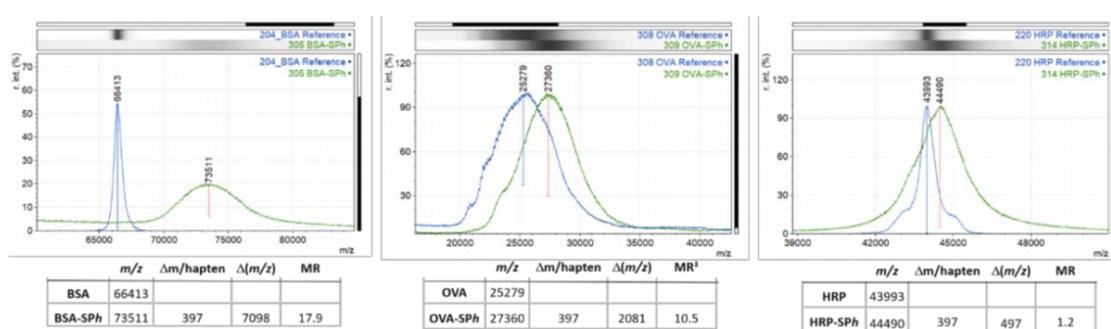


Figura 4.6. Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF de los conjugados BSA-SP h , OVA-SP h y HRP-SP h (en verde) y sus correspondientes proteínas de referencia (en azul). [‡]

Basado en los iones doblemente cargados de la proteína y del conjugado.

La relación molar hapteno-proteína determinada por MALDI-TOF/MS fue de 17.9, 10.5 y 1.2 para los conjugados BSA-SP h , OVA-SP h y HRP-SP h , respectivamente. Estos valores están

dentro del rango óptimo de densidad hapténica para conjugados empleados en ELISA y LFIA competitivos. En la **Figura 4.6** se representan los espectros obtenidos con cada conjugado.

4.5. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados

La generación de mAbs es un proceso que requiere una mayor inversión de tiempo y de dinero que la obtención de pAbs, debido a que es necesario realizar una serie de etapas de cultivo y selección de líneas celulares posteriores a la inmunización. Por ello, es importante una selección previa de aquellos inmunógenos con los que existe una mayor probabilidad de generar una buena respuesta inmunitaria, para lo que pueden servir los resultados obtenidos en la caracterización de pAbs generados a partir de los conjugados disponibles.¹¹⁶

Con el objetivo de obtener mAbs para SP, previamente a la presente tesis, se inmunizaron hembras de ratón con los conjugados BSA-SPo y BSA-SPm, ya que son los que mejores resultados aportaron con policlonales, y se realizaron dos fusiones celulares a partir de ratones inmunizados con cada inmunógeno. En total se disponía de 6 mAbs, tres obtenidos a partir del conjugado de SPo (SPo#227, SPo#237 y SPo#243) y tres a partir del de SPm (SPm#23, SPm#25 y SPm#216). La colección de mAbs se encontraba precipitada con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)], lo que garantiza su estabilidad durante años.¹⁶⁵ Además, en el momento de realizar este estudio, se disponía de conjugados de ensayo de los tres haptenos empleados para la inmunización (SPo, SPc y SPm), y también se prepararon conjugados de un nuevo hapteno (SPh) análogo a SPc. Por tanto, la caracterización de mAbs se llevó a cabo con los conjugados de SPo, SPc, SPm y SPh.

Para lograr una adecuada estimación de la afinidad fue necesario trabajar a las concentraciones de inmunorreactivos óptimas para cada anticuerpo, ya que los valores de IC₅₀ de las curvas de inhibición resultan como consecuencia de un minucioso balance de las concentraciones de los inmunorreactivos que participan en el ensayo. En este sentido, un ensayo competitivo bidimensional consiste básicamente en ensayar en una misma placa de ELISA varias disoluciones de anticuerpo a diferente concentración frente a varias disoluciones de conjugado de tapizado o de trazador enzimático a diferente concentración, dependiendo del formato empleado, y evaluando con cada combinación la respuesta a una serie de patrones de analito que den lugar a una curva de inhibición completa. De esta manera se genera una curva estándar de analito para cada combinación de reactivos, lo que propicia una estimación más precisa de la afinidad de los anticuerpos. Todos los trabajos de caracterización realizados para determinar la afinidad de los mAbs hacia los analitos de estudio se llevaron a

cabo mediante ELISA competitivo bidimensional en los tres formatos de ELISA descritos en la sección de Materiales y Métodos.

El propósito del estudio de caracterización de los mAbs fue principalmente la selección de las mejores parejas de inmunorreactivos y la búsqueda de las condiciones óptimas para el desarrollo de inmunoensayos de elevada sensibilidad, más que la evaluación de la respuesta inmunitaria, como se realizó con los pAbs. Sin embargo, de alguna manera se intentó encontrar correlaciones entre los resultados y la estructura de los haptenos de inmunización.

4.5.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

En este formato de ensayo, se emplearon disoluciones de mAb de 300 y 1000 ng/mL en tampón de tapizado, pH 9.6, para el recubrimiento inicial de la superficie de los pocillos de la placa ELISA. En la etapa de competición se emplearon los trazadores enzimáticos de los haptenos SPo, SPc, SPm y SP_h a 10, 30, 100 y 300 ng/mL. Cada una de las combinaciones resultantes se evaluó frente a una serie de siete disoluciones patrón de SP o SP-enol y un blanco. La información obtenida de todas las curvas de inhibición resultantes permitió establecer las condiciones de ensayo para lograr la mayor sensibilidad posible, relacionada con la afinidad del anticuerpo hacia el trazador y hacia el analito. Cabe recordar que, en este formato, la inmovilización directa del anticuerpo sobre la placa puede alterar la actividad del anticuerpo. De esta manera se evaluaron los mAbs generados para SP y SP-enol, obteniéndose los resultados presentados en la **Tabla 4.6**.

Tabla 4.6. Caracterización de anticuerpos monoclonales de spirotetramat mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo con conjugados homólogos y heterólogos (n=3).^a

mAb	Trazadores enzimáticos											
	HRP-SPo				HRP-SPm				HRP-SP _h			
	[mAb] ^b	[HRP] ^c	IC ₅₀ ^d SP	IC ₅₀ ^d SP-enol	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀ SP	IC ₅₀ SP-enol	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀ SP	IC ₅₀ SP-enol
SPo#227	1000	300	- ^e	-	1000	300	-	-	1000	300	-	-
SPo#237	300	30	38.2	9.87	1000	300	-	-	1000	300	-	-
SPo#243	1000	300	-	-	1000	300	-	-	1000	300	-	-
SPm#23	1000	300	-	-	300	100	21.0	2.47	300	100	9.98	0.66
SPm#25	1000	300	-	-	1000	300	-	-	1000	300	-	-
SPm#216	1000	300	-	-	1000	300	-	-	1000	300	-	-

^a Los valores de A_{máx} estuvieron entre 0.8 y 1.3. ^b Concentración del anticuerpo en ng/mL. ^c Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/mL. ^d Valores expresados en nM. ^e La señal fue inferior a 0.8.

En este formato, ningún anticuerpo reconoció el trazador de SPc por lo que los correspondientes resultados no se incluyen en la **Tabla 4.6**, y la mayoría de anticuerpos fueron incapaces de reconocer ningún trazador; tan sólo con los anticuerpos SPo#237 y SPm#23 se

alcanzaron $A_{m\acute{a}x}$ mayores de 0.8 en combinaci3n con su correspondiente conjugado hom3logo. Los anticuerpos de SPo no reconocieron los trazadores heter3logos de SPm o SP*h*, y los de SPm no reconocieron el trazador de SPo. 3nicamente el anticuerpo SPm#23 reconoci3 al trazador con el hapteno heter3logo SP*h*. Por otro lado, los valores de IC₅₀ observados fueron bastante m3s bajos para SP-enol que para SP. Con el anticuerpo SPo#237 y su trazador hom3logo, la IC₅₀ para SP-enol fue de 10 nM, mientras que con el anticuerpo SPm#23 fue de 2 nM con el trazador hom3logo y de 0.7 nM con el heter3logo HRP-SP*h*. As3 pues, el anticuerpo SPm#23 parece ser el que presenta mayor afinidad hacia SP y SP-enol, y claramente su combinaci3n con el trazador heter3logo aport3 el inmunoensayo m3s sensible en este formato.

4.5.2. Formato de anticuerpo de captura con detecci3n directa

En el formato de anticuerpo de captura con detecci3n directa, las concentraciones de mAb utilizadas fueron de 100 y 1000 ng/mL sobre microplacas pretapizadas con GAM en tamp3n de tapizado, pH 9.6. Para la etapa de competici3n se emplearon concentraciones de trazador enzim3tico de 10, 30, 100 y 300 ng/mL. Igual que en el anterior formato, cada una de las combinaciones resultantes se ensay3 frente a una serie de disoluciones patr3n de analito a siete concentraciones diferentes y un blanco. La informaci3n obtenida permiti3 establecer las condiciones de ensayo para lograr la mayor sensibilidad, relacionada con la afinidad del anticuerpo hacia el trazador y el analito, y sin la influencia de la inmovilizaci3n directa del anticuerpo a la superficie de la placa. As3, se evaluaron los mAbs generados para SP y SP-enol, obteniendo los resultados recogidos en la **Tabla 4.7**.

Tabla 4.7. Caracterizaci3n de anticuerpos monoclonales de spirotetramat mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo de captura con conjugados hom3logos y heter3logos (n=3).^a

mAb	Trazadores enzim3ticos											
	HRP-SPo				HRP-SPm				HRP-SP <i>h</i>			
	[mAb] ^b	[HRP] ^c	IC ₅₀ ^d SP	IC ₅₀ ^d SP-enol	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀ SP	IC ₅₀ SP-enol	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀
SPo#227	1000	300	- ^e	-	1000	300	-	-	1000	300	-	-
SPo#237	100	30	44.1	8.56	1000	300	-	-	1000	300	-	-
SPo#243	1000	300	n.i. ^f	8.08	1000	300	-	-	1000	300	-	-
SPm#23	1000	300	-	-	100	30	33.7	2.83	100	30	8.50	0.55
SPm#25	1000	300	-	-	1000	300	-	-	1000	300	-	-
SPm#216	1000	300	-	-	1000	300	n.i.	10.8	1000	300	-	-

^a Los valores de $A_{m\acute{a}x}$ estuvieron entre 0.8 y 1.3. ^b Concentraci3n del anticuerpo en ng/mL. ^c Concentraci3n de conjugado de HRP expresada en ng/mL. ^d Valores expresados en nM. ^e La se3al fue inferior a 0.8. ^f La reducci3n de la se3al con 10⁴ nM de analito fue escasa o nula.

De nuevo, no se obtuvo señal con el trazador de SPc por lo que no se muestra en la **Tabla 4.7**. El reconocimiento de conjugados se observó con los mismos anticuerpos que en el anterior formato; si bien, dos anticuerpos (SPo#243 y SPm#216) pudieron reconocer a los trazadores homólogos gracias a la utilización del anticuerpo de captura. Por otra parte, el reconocimiento de conjugados heterólogos fue escaso. Esta observación está relacionada con las limitaciones que suelen encontrarse en el formato directo, con o sin captura, en lo que respecta al reconocimiento de trazadores heterólogos, particularmente con heterología de posición de brazo espaciador, y que además son mucho más acusadas con mAbs que con pAbs debido probablemente al hecho de que reconocen un solo epítipo.¹¹⁶ Como cabía esperar, los valores de IC₅₀ para SP fueron mayores que para SP-enol en todos los casos también en este formato. El valor de IC₅₀ con el anticuerpo SPo#237 y su trazador homólogo, fue aproximadamente de 9 nM para SP-enol; mientras que con el anticuerpo SPm#23 la IC₅₀ para SP-enol fue de casi 3 nM con su trazador homólogo. Estos resultados parecen confirmar que el anticuerpo con mayor afinidad hacia SP y SP-enol es el SPm#23.

De manera evidente, SPm#23 con el trazador heterólogo de SP_h aportó el inmunoensayo más sensible desarrollado en este formato con mAbs, con un valor de IC₅₀ de 0.6 nM. Por lo tanto, este inmunoensayo fue escogido para estudios posteriores. La utilización del anticuerpo de captura no aportó grandes incrementos en la sensibilidad de los mejores ensayos respecto al formato directo sin captura, pero sí que permitió disminuir las concentraciones de inmunorreactivos (mAb y/o trazador).

4.5.3. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

Para la caracterización de mAbs mediante ELISA competitivo en el formato indirecto la superficie de los pocillos se recubrió inicialmente con conjugado OVA-hapteno a cuatro concentraciones (100, 300, 1000 y 3000 ng/mL) en tampón fosfato, pH 7.4, y en la etapa de competición se evaluaron las disoluciones estándar de analito frente a cuatro concentraciones de anticuerpo (10, 30, 100 y 300 ng/mL). Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 4.8**.

Todos los anticuerpos generados respondieron a la presencia del conjugado homólogo como era esperable. Los anticuerpos SPo#237, SPm#23 y SPm#25 reconocieron el conjugado de SPc (datos no mostrados en la **Tabla 4.8**). Por otro lado, el anticuerpo SPo#237 además reconoció el conjugado heterólogo OVA-SP_m, y todos los anticuerpos de SP_m reconocieron el conjugado OVA-SP_o. Como se observó en los anteriores formatos, el anticuerpo SPm#23 reconoció al conjugado heterólogo de SP_h, y además en este formato dicho conjugado también fue reconocido por el anticuerpo SPo#237. De nuevo, la inhibición observada fue mucho

mayor con SP-enol que con SP, o incluso este último no disminuyó la $A_{m\acute{a}x}$ en algunas combinaciones anticuerpo/conjugado. Según los ensayos con el conjugado homólogo, los mAbs SPo#237 y SPm#23 fueron los anticuerpos con mayor afinidad hacia SP-enol. Respecto a los ensayos con conjugados heterólogos, los valores de IC_{50} con el conjugado OVA-SPc fueron elevados para SP (> 30 nM) y de 5 nM o superiores para SP-enol (datos no mostrados en la **Tabla 4.8**). El ensayo más sensible se obtuvo con el anticuerpo SPo#237 combinado con el conjugado heterólogo OVA-SPh, cuando la IC_{50} fue de 0.8 nM para SP-enol.

Tabla 4.8. Caracterización de los anticuerpos monoclonales de spirotetramat mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos (n=3).^a

mAb	Conjugado de tapizado											
	OVA-SPo				OVA-SPm				OVA-SPh			
	[mAb] ^b	[OVA] ^c	IC_{50} ^d SP	IC_{50} ^d SP-enol	[mAb]	[OVA]	IC_{50} SP	IC_{50} SP-enol	[mAb]	[OVA]	IC_{50} SP	IC_{50} SP-enol
SPo#227	30	100	n.i. ^e	80.5	300	3000	- ^f	-	300	3000	-	-
SPo#237	30	100	174	8.93	300	3000	12.4	1.06	100	100	17.2	0.80
SPo#243	30	100	n.i.	29.4	300	3000	-	-	300	3000	-	-
SPm#23	30	3000	n.i.	4.58	30	100	n.i.	7.29	100	1000	n.i.	13.8
SPm#25	30	100	n.i.	n.i.	30	100	n.i.	n.i.	300	3000	-	-
SPm#216	300	1000	n.i.	76.1	30	100	n.i.	n.i.	300	3000	-	-

^a Los valores de $A_{m\acute{a}x}$ estuvieron entre 0.8 y 1.3. ^b Concentración del anticuerpo en ng/mL. ^c Concentración de conjugado de OVA expresada en ng/mL. ^d Valores expresados en nM. ^e La reducción de la señal con 10^4 nM de analito fue escasa o nula. ^f La señal fue inferior a 0.8.

La heterología, como era de esperar en este formato, permitió un cierto aumento de sensibilidad con algunos anticuerpos, siendo éste considerable con SPo#237, e incluso se pudieron mantener bajas las concentraciones óptimas de inmunorreactivos. En definitiva, el inmunoensayo con el mAb SPo#237 y el conjugado heterólogo OVA-SPh se seleccionó para su desarrollo y validación en muestras.

4.6. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales y la selectividad de los inmunoensayos seleccionados

Empleando la misma estrategia que se aplicó con los pAbs, se estimó la especificidad de los mAbs generados determinando su RC en ensayos con el trazador homólogo en el formato directo. Para este estudio tan solo se incluyeron los anticuerpos SPm#23 y SPo#237, ya que el resto de mAbs presentaron muy baja afinidad hacia SP o SP-enol. Se ensayaron los principales metabolitos de SP, así como otros compuestos estructuralmente relacionados o que podrían estar presentes en alimentos, tales como, dimoxystrobin, spiromesifen, boscalid, spiroxamine, propamocarb, deltametrin, cyprodinil, imidacloprid, azoxystrobin, fludioxonil, pyraclostrobin, fenhexamid, fenamidona, pyrimethanil, spirodiclofen, thiabendazol, o-fenilfenol,

chlorothalonil, mandipropamid, fenpropimorph y procimidona. Los resultados obtenidos con los metabolitos de SP se recogen en la **Tabla 4.9**.

Tabla 4.9. Reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales en el formato directo con trazador homólogo.

Analito	SPm#23			SPo#237		
	IC ₅₀ (nM)	RC 1 (%)	RC 2 (%)	IC ₅₀ (nM)	RC 1 (%)	RC 2 (%)
SP	21.0	100	11.8	38.2	100	25.8
SP-enol	2.47	850	100	9.87	387	100
SP-glu	48.3	43.5	5.11	62.4	61.2	15.8
SP-ceto	10849	0.19	0.02	2020	1.89	0.49
SP-mono	1306	1.61	0.19	2452	1.56	0.40

El comportamiento de los dos mAbs fue muy semejante en cuanto al reconocimiento de los metabolitos de SP. Como se observó anteriormente en los ensayos bidimensionales, ambos monoclonales reconocían SP-enol con mayor afinidad que SP, siendo esta diferencia más acusada con SPm#23. En el presente estudio se ha observado que la RC de SPm#23 y SPo#237 hacia SP-glu fue cercana al 50% tomando SP como referencia. En cambio, la RC con SP-ceto y SP-mono fue muy baja o despreciable. Además, ninguno de los dos anticuerpos reconoció a ninguno de los compuestos evaluados por su similitud estructural o por su potencial presencia en alimentos, mencionados en el párrafo anterior.

En paralelo se evaluó la RC de los inmunoensayos que se seleccionaron para su optimización y validación con muestras de alimentos. Los resultados se recogen en la **Tabla 4.10**.

Tabla 4.10. Reactividad cruzada de los inmunoensayos seleccionados con anticuerpos monoclonales.

Analito	Ensayo de captura ^a			Ensayo indirecto ^b		
	IC ₅₀ (nM)	RC 1 (%)	RC 2 (%)	IC ₅₀ (nM)	RC 1 (%)	RC 2 (%)
SP	8.50	100	6.47	17.2	100	4.65
SP-enol	0.55	1545	100	0.80	21.5	100
SP-glu	20.2	42.1	2.72	33.9	50.7	2.36
SP-ceto	2602	0.32	<0.1	1423	1.21	<0.1
SP-mono	1089	0.78	<0.1	1550	1.11	<0.1

^a Ensayo con SPm#23 y HRP-SPh. ^b Ensayo con SPo#237 y OVA-SPh.

En ambos inmunoensayos, SP-enol fue mucho mejor reconocido que SP y que los demás metabolitos. La RC con SP, tomando como referencia SP-enol, fue cercana al 5%, y fue muy baja o despreciable para el resto de metabolitos (**Tabla 4.10**), por lo que se puede considerar que ambos ensayos son casi selectivos de SP-enol. Debido al cambio de formato, la RC

observada con estos inmunoensayos fue ligeramente diferente que con los conjugados homólogos en formato directo, si bien se mantuvieron dentro de un mismo orden.

4.7. Caracterización de inmunoensayos tipo ELISA basados en anticuerpos monoclonales

De igual manera como se realizó con los anticuerpos policlonales, se llevó a cabo la caracterización de inmunoensayos tipo ELISA utilizando anticuerpos monoclonales de SP. Para estos estudios se escogieron dos inmunoensayos, ambos con el conjugado de SP_h, en diferentes formatos. El primero es un ensayo en formato directo con anticuerpo de captura usando el mAb SP_m#23, mientras que el segundo es un ensayo indirecto con el monoclonal SP_o#237. Se estudió la influencia de factores como el pH, la fuerza iónica y la presencia de disolventes orgánicos sobre los principales parámetros analíticos de los inmunoensayos. Las muestras a analizar pueden presentar valores de pH y fuerza iónica muy diferentes a los del tampón en el que se preparan normalmente las disoluciones patrón. Por lo general un tampón fosfato formulado en condiciones fisiológicas (pH 7.4 y fuerza iónica 162 mM) resulta ser el más utilizado. Además, las muestras pueden contener etanol o pequeñas cantidades de disolvente empleado en la extracción de los residuos. Finalmente, cabe destacar que el estudio de todos estos factores se puede entender como un proceso de optimización en el que, además de conocer las características del ensayo, se pueden encontrar condiciones más adecuadas para el mismo.

4.7.1. Estudio de la influencia del pH

Para estudiar la influencia del pH, se prepararon disoluciones patrón del analito en agua MilliQ y se mezclaron con diferentes disoluciones del inmunorreactivo de competición en tampón fosfato, cubriendo valores de pH de 6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 y 8.5, preparados de tal modo que en todos los casos se mantuviese la concentración del tampón (10 mM) y la fuerza iónica (162 mM).

La **Figura 4.7** muestra la variación relativa sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} de los inmunoensayos competitivos seleccionados respecto a los valores obtenidos en PBS (pH 7.4), tanto para SP como para SP-enol. Obviamente, la variación de la $A_{m\acute{a}x}$ en función del pH fue la misma independientemente del analito ensayado. No obstante, se representa la $A_{m\acute{a}x}$ obtenida en ambos casos para mayor control de los resultados.

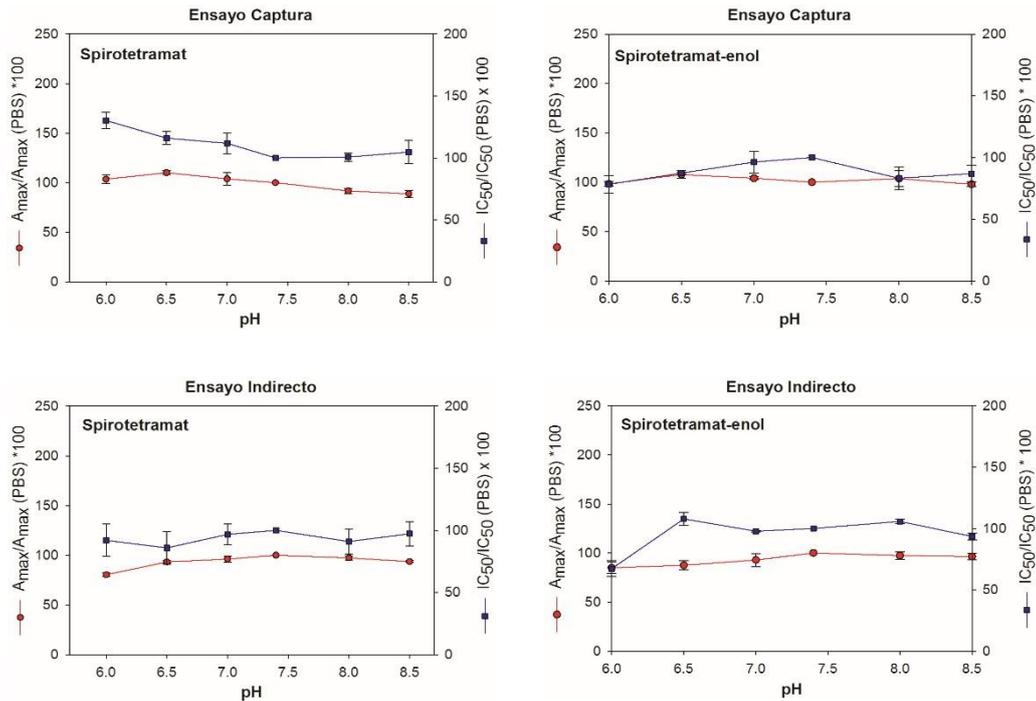


Figura 4.7. Influencia del pH en la etapa de competición sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} de los inmunoensayos competitivos seleccionados para SP y SP-enol. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres experimentos independientes.

En el ensayo de captura (SPm#23/HRP-SPh) no se presentaron variaciones significativas en los rangos de pH ensayados sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ y de IC_{50} tanto para SP como para SP-enol. Cabe mencionar que a valores de pH por debajo de 7.4 la IC_{50} aumentó ligeramente, no así con la $A_{m\acute{a}x}$ que se mantuvo casi constante. En el ensayo indirecto (SPo#237/OVA-SPh) tampoco se presentaron variaciones significativas sobre la $A_{m\acute{a}x}$ y los valores de IC_{50} para SP y SP-enol en los rangos de pH ensayados, observándose un comportamiento muy estable al aumentar o disminuir el pH respecto al ensayo en PBS. Tan solo se observó una bajada de la IC_{50} para SP-enol a pH 6.0. Con estos resultados se optó por seguir caracterizando ambos inmunoensayos a pH 7.4.

4.7.2. Estudio de la influencia de la fuerza iónica

Una vez evaluada la influencia del pH sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} de los inmunoensayos seleccionados, se realizó un estudio equivalente para determinar el efecto de la fuerza iónica. El inmunorreactivo de competición se diluyó en diferentes disoluciones tampones fosfato con concentraciones variables de NaCl, preparados de tal manera que en todos los casos fuesen constantes en el ensayo tanto el pH (7.4) como la concentración total del tampón fosfato (10 mM). El rango de concentraciones de NaCl ensayado fue desde 25 hasta 250 mM.

En la **Figura 4.8** se representa la influencia de esta variable sobre los inmunoensayos seleccionados para ambos analitos. De nuevo se representa la $A_{m\acute{a}x}$ obtenida en ambos casos para mayor control de los resultados.

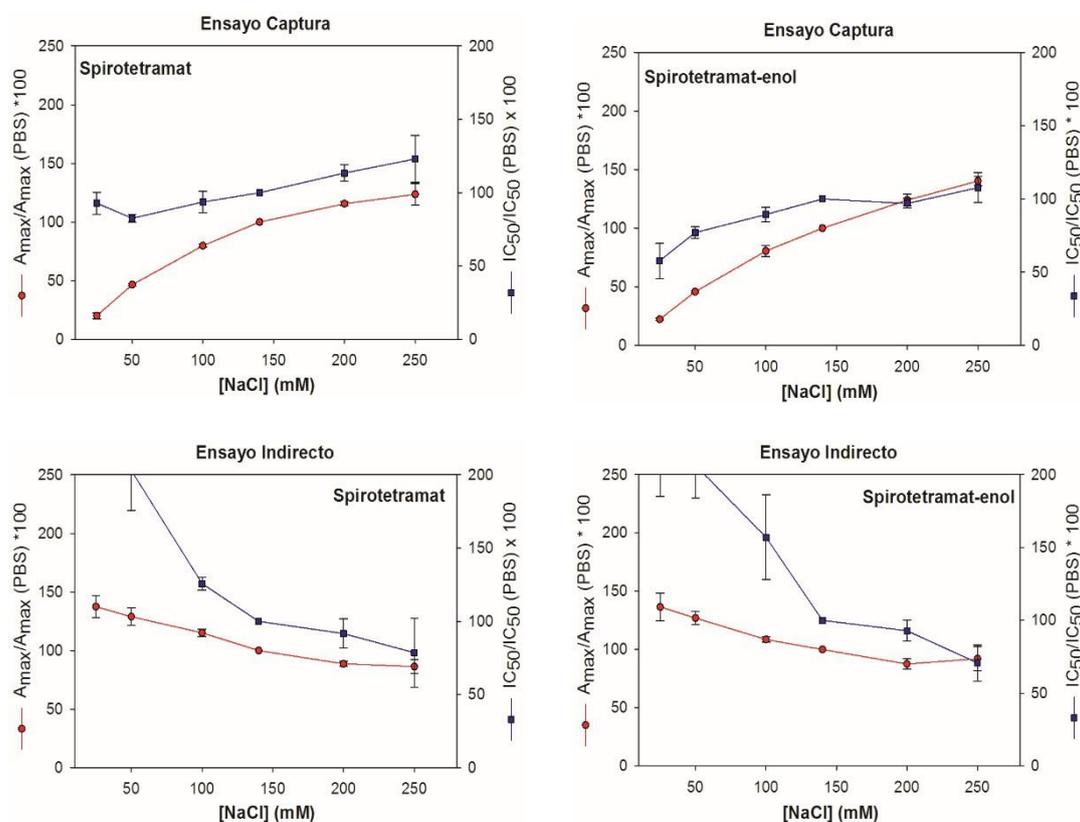


Figura 4.8. Influencia de la fuerza iónica en la etapa de competición sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} de los inmunoensayos competitivos seleccionados para SP y SP-enol. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres experimentos independientes.

En el ensayo de captura (*SPm#23/HRP-SPh*) la variación de la fuerza iónica produjo cambios significativos sobre la $A_{m\acute{a}x}$. Particularmente, el valor de la $A_{m\acute{a}x}$ fue mayor cuanto mayor era la concentración de NaCl en el tampón. En cambio, el valor de IC_{50} se vio menos afectado al variar la fuerza iónica. Tan solo a concentraciones bajas de NaCl se observó una bajada importante del valor de IC_{50} para SP-enol. En el ensayo indirecto (*SPo#237/OVA-SPh*) se observó que a concentraciones de NaCl por debajo de 140 mM, la $A_{m\acute{a}x}$ aumentaba ligeramente y la IC_{50} , tanto para SP como para SP-enol, crecía significativamente. El incremento de la concentración de NaCl por encima de la del PBS no alteró de manera importante los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} .

Con los resultados obtenidos en estos dos estudios de caracterización fisicoquímica, se puede concluir que la variación del pH o el incremento de la fuerza iónica debidos a la muestra

no deberían ser un problema para la determinación de ninguno de los dos analitos con los inmunoensayos estudiados.

4.7.3. Tolerancia a disolventes orgánicos

El objetivo principal de los inmunoensayos estudiados es su aplicación a muestras alimentarias que pudieran contener residuos del insecticida SP. El análisis mediante inmunoensayos de muestras sólidas requiere realizar previamente un proceso de extracción de los posibles residuos presentes en la muestra utilizando un disolvente orgánico, preferiblemente que sea capaz de mezclarse con el agua. Esto implica que el ensayo podrá tener lugar en presencia de una pequeña concentración del disolvente de extracción, el cual puede llegar a influir en las propiedades del ensayo. En cambio, para muestras líquidas se puede llevar a cabo el inmunoensayo mediante dilución directa de la muestra y su correcta tamponación en ensayo. No obstante, hay que tener en cuenta que algunas muestras pueden incorporar de manera intrínseca componentes similares a los disolventes de extracción, como es el caso del etanol en los vinos. Por todo lo mencionado se llevó a cabo un estudio de tolerancia a la presencia de dos disolventes de extracción habituales, como son el metanol y acetonitrilo, y también de etanol.

Este estudio se llevó a cabo preparando curvas de inhibición en agua MilliQ que contenían diferentes concentraciones del disolvente orgánico a evaluar mientras que las disoluciones de los trazadores enzimáticos y de los anticuerpos se realizaron en PBS2x-T. Las **Figuras 4.9 y 4.10** muestran el efecto de varias concentraciones de metanol, etanol y acetonitrilo sobre las características analíticas de los ensayos directo de captura e indirecto, respectivamente, seleccionados para la determinación de SP y SP-enol. Como anteriormente, se representa la $A_{m\acute{a}x}$ obtenida en los estudios con ambos analitos para mayor control de los resultados, si bien su variación es independiente del analito estudiado.

La tolerancia de este ensayo a metanol y etanol fue muy semejante (**Figura 4.9**). El valor de $A_{m\acute{a}x}$ disminuyó progresivamente al aumentar la concentración de estos disolventes. Además, el valor de IC_{50} , tanto para SP como para SP-enol, aumentó con la concentración de disolvente, sobre todo con etanol. Concentraciones de etanol o metanol de hasta el 1% (v/v) podrían ser tolerables por este inmunoensayo ya que la bajada del valor de la $A_{m\acute{a}x}$ y la subida del de la IC_{50} se mantuvo dentro del $\pm 20\%$. En cambio, el acetonitrilo tuvo una influencia más importante sobre la $A_{m\acute{a}x}$ que sobre la IC_{50} . Como con los anteriores disolventes, el aumento de la concentración de acetonitrilo provocó la caída de la señal mientras que la IC_{50} se mantuvo dentro de un rango de variación aceptable para ambos analitos. En este caso, el inmunoensayo

podría tolerar entre un 1% y un 2% (v/v) de disolvente de extracción sin que la variación del valor de $A_{m\acute{a}x}$ fuese superior al 20%.

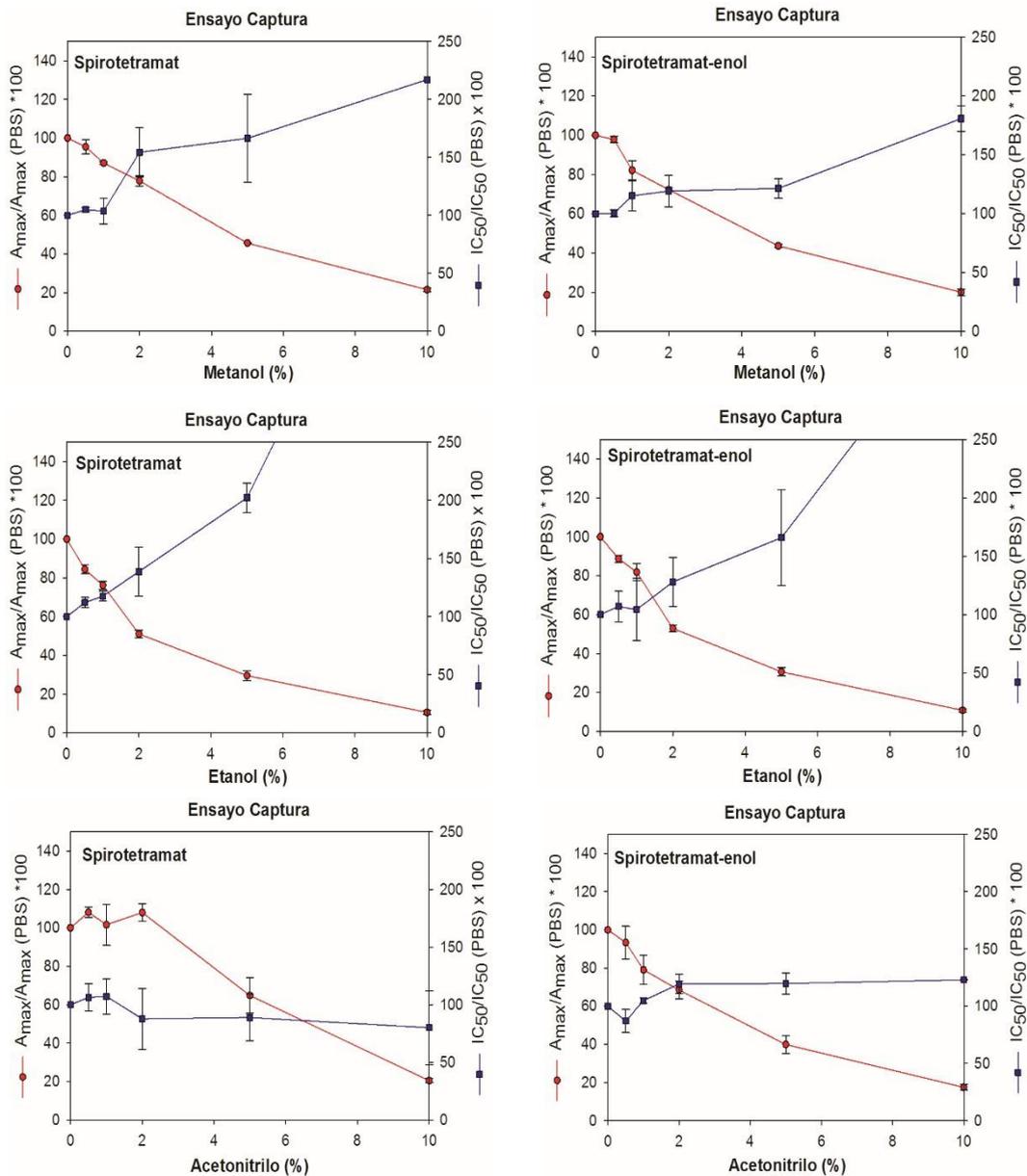


Figura 4.9. Influencia de la presencia de disolventes orgánicos en la etapa de competición sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} del ensayo de captura para SP y SP-enol. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

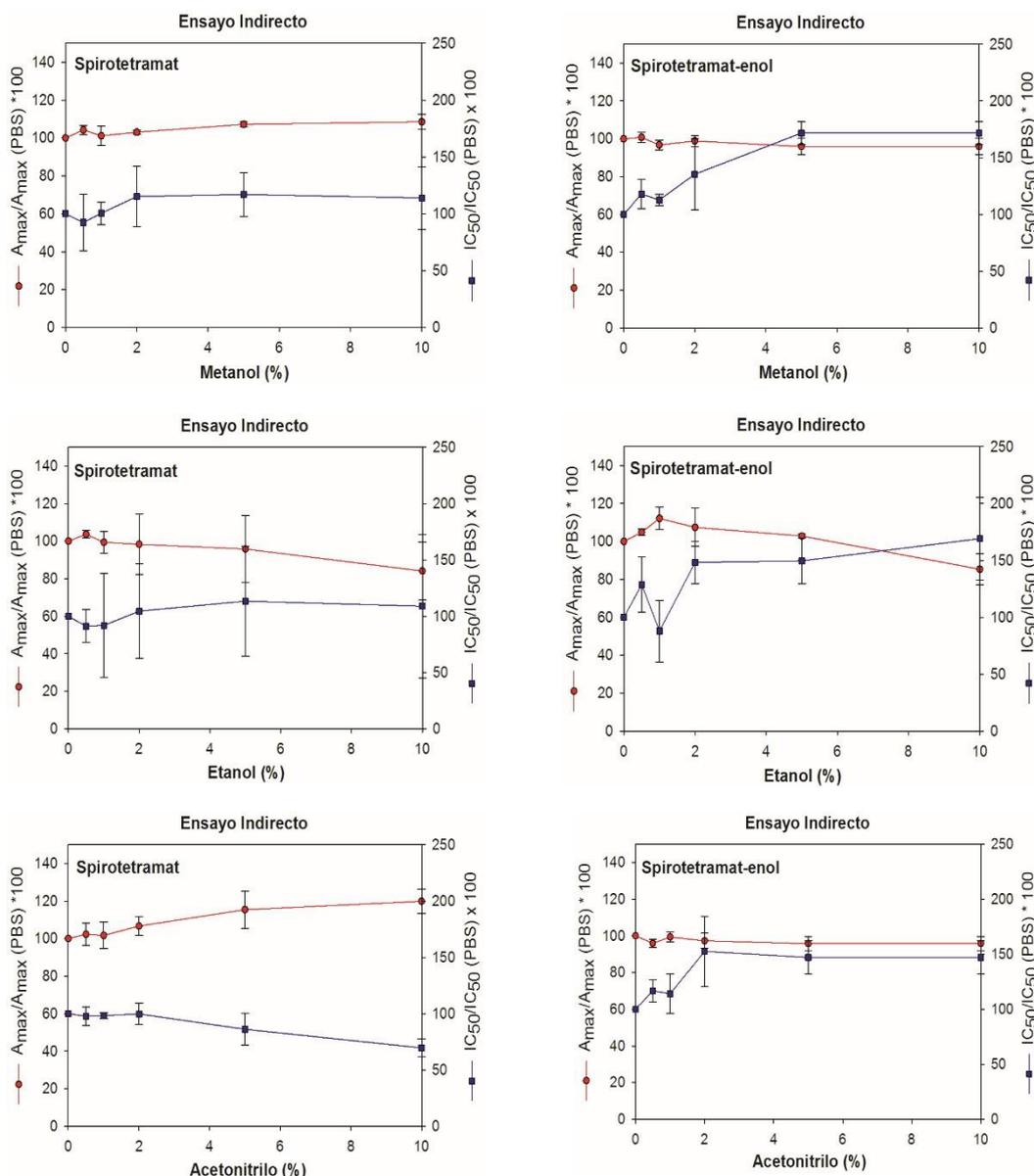


Figura 4.10. Influencia de la presencia de disolventes orgánicos en la etapa de competición sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} del ensayo indirecto para SP y SP-enol. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

Finalmente, el ensayo indirecto (SPo#237/OVA-SPh) demostró ser más tolerante a la presencia de los tres disolventes (**Figura 4.10**). El valor de $A_{m\acute{a}x}$ varió poco dentro del rango de concentración de los tres disolventes estudiados. El valor de IC_{50} para SP tampoco cambió significativamente en el rango de concentraciones de metanol y etanol estudiado. En cambio, la presencia de estos dos disolventes alteró ligeramente el valor de IC_{50} de SP-enol. En cuanto al acetonitrilo, concentraciones crecientes de disolvente disminuyeron ligeramente el valor de IC_{50} para SP y aumentaron el correspondiente valor para SP-enol. Este inmunoensayo podría tolerar hasta un 2% (v/v) o más de cualquiera de estos disolventes.

En conclusión, el ensayo en formato indirecto se reveló más tolerante a la presencia de pequeñas cantidades de etanol, metanol o acetonitrilo en la etapa de competición. Por otro lado, la elevada sensibilidad de los inmunoensayos permitirá diluir las muestras o los extractos suficientemente para que la concentración de disolvente en ensayo sea baja.

4.8. Validación de inmunoensayos tipo ELISA basados en anticuerpos monoclonales

La finalidad de un inmunoensayo es que pueda ser utilizado como método analítico para la determinación del compuesto en estudio en muestras reales. Por ello, una vez caracterizado y optimizado es necesario demostrar su aplicabilidad mediante el análisis de muestras en las que esté presente el analito de interés. En este sentido, en el presente trabajo se abordó la validación de los ensayos seleccionados para el análisis de residuos de SP con dos aproximaciones complementarias. Por una parte, se evaluó la exactitud y la precisión de cada inmunoensayo mediante estudios de recuperación llevados a cabo con matrices fortificadas, y por otra parte se analizaron muestras ciegas semejantes a las de campo para posteriormente comparar los resultados con los obtenidos mediante un método de referencia.

4.8.1. Obtención de muestras

Para validar los inmunoensayos desarrollados se decidió emplear muestras de uva, zumo de uva y vino, ya que SP se emplea en Europa para combatir plagas de insectos en viñedos. El LMR europeo actual para SP en uva es de 2 mg/kg. Siendo así y considerando las características de los ensayos desarrollados, debería ser posible cuantificar concentraciones de analito a dichos límites legales.

Debido a la naturaleza propia de la uva, para su análisis fue necesario emplear una técnica de extracción. Dado que actualmente la mayoría de los trabajos descritos para la determinación de SP y SP-enol utilizan el método QuEChERS para la extracción de ambos compuestos de las matrices alimentarias,⁵⁹⁻¹⁶⁶⁻¹²⁸ éste fue el método de extracción seleccionado.

El extracto de uva se obtuvo a partir de las correspondientes muestras homogenizadas. El método QuEChERS consta de una primera etapa de extracción con acetonitrilo, en la que se añade acetato sódico y sulfato de magnesio, de donde luego de agitar la mezcla vigorosamente y su posterior centrifugación, se recoge el sobrenadante. En la segunda etapa, la fase orgánica se seca nuevamente empleando sulfato de magnesio y se limpia mediante extracción en fase sólida dispersa (dSPE) utilizando PSA, donde nuevamente se agita y se centrifuga dicha mezcla. De esta manera se consigue un extracto purificado en acetonitrilo que contiene los residuos de

plaguicidas de la muestra original. Estos extractos se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras de zumo y vino no siguieron tratamiento de extracción alguno. Tanto los extractos de uva como las muestras de zumo y vino se diluyeron para su análisis mediante los inmunoensayos seleccionados.

4.8.2. Estudios para la hidrólisis controlada de spirotetramat

Dado que los inmunoensayos seleccionados presentaban una elevada sensibilidad hacia SP-enol y una RC de aproximadamente el 5% con SP, se decidió poner a punto un procedimiento para hidrolizar SP, de modo que la totalidad del residuo de dicho insecticida presente en el ensayo estuviese en forma de SP-enol. Cabe recordar que la definición de residuo de SP en productos vegetales con fines analíticos es la suma de la concentración de SP más SP-enol.²⁴ Además, es sabido que SP se hidroliza rápidamente a pH básico mientras que SP-enol es más estable.¹⁶⁷

Para el estudio de la hidrólisis controlada de SP se puso a punto un procedimiento que permitiese transformar SP en SP-enol rápidamente y con elevada eficiencia, realizando el menor número de etapas posible. En primer lugar, se buscó una disolución alcalina con un pH suficiente para hidrolizar SP en poco tiempo y que pudiese ser tamponada después de la etapa de hidrólisis para llevar el pH cercano a la neutralidad, necesario para el correcto funcionamiento del inmunoensayo. Para la hidrólisis se descartó el uso del tampón glicina, pH 12, ya que dificultaba poder bajar el pH después de la etapa de hidrólisis para realizar el inmunoensayo. Para la tamponación se descartó el uso de tampones fosfato porque la elevada concentración de sales de fosfato necesaria (200 mM aproximadamente) hubiese incrementado mucho la fuerza iónica (cerca de 450 mM). Por tanto, se escogió diluir las muestras en una disolución de NaOH para hidrolizar SP de manera controlada, y utilizar tampón Tris-HCl 200 mM, pH 8.0, para la tamponación posterior de las muestras. La fuerza iónica de dicho tampón es de 53.5 mM por lo que se puede ajustar a una fuerza iónica próxima a la del PBS añadiendo NaCl. El aumento del pH de ensayo de 7.4 (PBS) a 8.0 no debería ser un problema para el correcto funcionamiento de los inmunoensayos seleccionados, como se vio en los estudios de caracterización de la influencia del pH.

En primer lugar, se determinó la mínima concentración de NaOH necesaria para alcanzar un pH cercano a 12 al diluir extracto de uva, vino y zumo de uva en una disolución alcalina, ya que a este pH la hidrólisis de SP es rápida y completa. Las muestras se diluyeron 1/5 y 1/50 en NaOH 20, 40, 45 o 50 mM, y se midió el pH. A continuación, se determinó el pH resultante al mezclar 1:1 la dilución alcalina con tampón Tris-HCl 200 mM, pH 8.0. Según se muestra en la **Tabla 4.11**, con la sosa 20 mM no se alcanzó un pH suficientemente alcalino en la etapa de

hidrólisis para que la reacción fuese rápida. En cambio, con sosa 40 mM se alcanzó un pH entre 11.4 y 13.0 al diluir con las muestras. En el otro extremo, con la sosa 50 mM los valores de pH obtenidos fueron muy semejantes, entre 11.7 y 13.1. Por otro lado, después de tamponar, el pH obtenido estuvo en torno a 8.2 con la muestra diluida 1/5 en sosa 40 mM, mientras que con la dilución 1/50 en la misma sosa el pH final fue aproximadamente de 8.4 – este es el mismo valor de pH que se obtiene al mezclar 1:1 NaOH 40 mM con el tampón de dilución. Resultados parecidos se observaron con las muestras diluidas 1/5 y 1/50 en sosa 45 mM y tamponadas. Finalmente, con las muestras diluidas 1/50 en sosa 50 mM el pH después de tamponar fue cercano a 8.5. Con estos resultados, se escogió la disolución de NaOH 40 mM para diluir las muestras y obtener así la hidrólisis de SP, y el tampón Tris para bajar el pH antes del ensayo.

Tabla 4.11. Valores de pH de las muestras diluidas en disoluciones de NaOH a diferente concentración y después tamponadas por dilución 1/2 con Tris-HCl 200 mM, pH 8.0.

Dil. ^a	Muestra	20 mM		40 mM		45 mM		50 mM	
		H ^b	T ^c	H	T	H	T	H	T
1/5	Vino blanco	8.36	8.02	12.55	8.21	12.75	8.22	12.80	8.24
	Vino tinto	9.80	8.01	12.56	8.22	12.70	8.22	12.80	8.23
	Zumo blanco	9.05	8.02	11.57	8.22	11.70	8.22	11.80	8.23
	Zumo tinto	8.17	8.02	11.40	8.23	11.57	8.22	11.70	8.23
	Extracto uva	12.46	8.07	12.70	8.21	12.70	8.25	12.80	8.30
1/50	Vino blanco	- ^d	-	13.00	8.38	13.07	8.40	13.07	8.48
	Vino tinto	-	-	13.01	8.38	13.07	8.42	13.07	8.46
	Zumo blanco	-	-	12.92	8.40	13.00	8.42	13.02	8.47
	Zumo tinto	-	-	12.92	8.38	13.00	8.42	13.02	8.47
	Extracto uva	-	-	12.55	8.33	12.60	8.41	12.61	8.45

^a Factor de dilución de la muestra en disolución alcalina. ^b Etapa de hidrólisis. ^c Etapa de tamponación. ^d No ensayado.

A continuación, se estudió el proceso de hidrólisis de SP mediante ELISA competitivo, empleando disoluciones patrón de dicho analito a diferente concentración preparadas en agua MilliQ. Cada disolución se diluyó 1/5 con NaOH 40 mM y se incubó 10, 30 o 60 min a temperatura ambiente. Como control positivo se analizaron disoluciones patrón de SP-enol preparadas del mismo modo, y como control negativo se emplearon disoluciones patrón de SP no tratadas con sosa (diluidas en agua MilliQ). Después de la etapa de hidrólisis, cada patrón se diluyó 1/2 con tampón Tris de dilución (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, con NaCl 280 mM) y se ensayaron mediante los inmunoensayos ELISA optimizados. La disolución de anticuerpo y la de trazador enzimático se prepararon en tampón Tris de ensayo (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con NaCl 140 mM y Tween-20 al 0.05%). De este modo la etapa de competición en ELISA se llevó a cabo a pH 8.1 y con una fuerza iónica aproximada de 171 mM.

Como se puede ver en la **Figura 4.11**, la curva de inhibición obtenida después de hidrolizar SP durante 10 min es prácticamente equivalente a la curva de SP-enol preparada del mismo modo. A tiempos de incubación mayores no se observaron diferencias. Por lo tanto, el procedimiento de hidrólisis optimizado consistirá en diluir las muestras en NaOH 40 mM e incubar a temperatura ambiente, y transcurridos 10 min diluir 1/2 con tampón Tris de dilución.

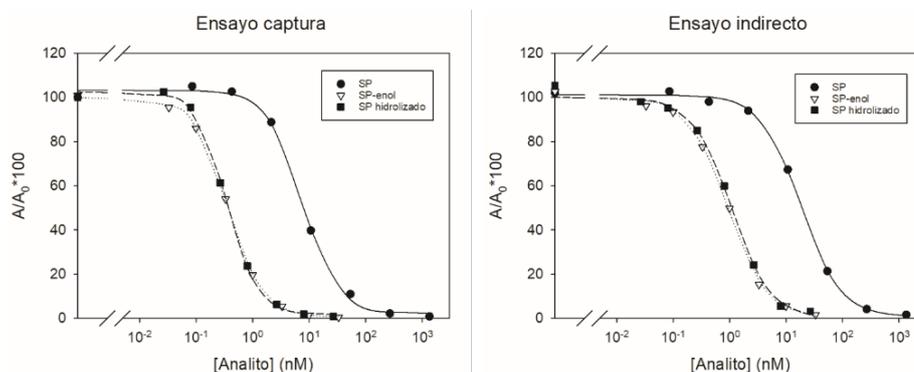


Figura 4.11. Estudio de hidrólisis de SP empleando una disolución alcalina para diluir los patrones y tamponando con Tris de dilución.

La hidrólisis de SP y la obtención de SP-enol mediante el procedimiento optimizado se verificó por HPLC-MS/MS. En este estudio se utilizó ácido cítrico para bajar el pH con el objetivo de obtener un valor lo suficientemente bajo que nos asegurara la parada de la reacción de hidrólisis y no interfiriese con la fase móvil. En la **Tabla 4.12** se observa el resultado de aplicar el procedimiento de hidrólisis optimizado a una disolución de SP (muestra A). Claramente se puede observar como SP se transforma casi por completo en SP-enol, con una recuperación del 93%. En cambio, con el control de SP no hidrolizado (muestra B) se recuperó aproximadamente un 90% en forma de SP. Los controles llevados a cabo con disoluciones de SP-enol siguiendo el mismo procedimiento de hidrólisis (muestra C) o sin el tratamiento (muestra D) revelaron que el patrón inicial se mantenía intacto, con recuperaciones del 120% y 115%, respectivamente. De esta manera se demostró la eficiencia del procedimiento optimizado para transformar SP en SP-enol mediante hidrólisis en medio alcalino.

Tabla 4.12. Concentración de SP y sus metabolitos (ng/mL) en muestras de agua fortificada después del tratamiento con NaOH y analizadas por HPLC-MS/MS.^a

	A	B	C	D
Spirotetramat	0.03	109.4	0.02	0.00
SP-enol	116.7	1.44	149.1	142.8
SP-ceto	0.09	0.08	0.39	0.43
SP-mono	0.01	0.12	0.02	0.02
Recuperación (%)	93.4	88.8	119.6	114.6

^a A: SP hidrolizado; B: SP sin hidrólisis; C: SP-enol hidrolizado; D: SP-enol sin hidrólisis.

4.8.3. Evaluación del efecto matriz de extractos de uva, zumos de uva y vinos

Como característica común a todos los métodos analíticos que hacen uso de curvas de calibrado, la diferencia de composición existente entre dichos patrones y las muestras a analizar es una fuente de error. Ello se debe a que ciertos componentes de la muestra pueden interferir de manera notable en el resultado del análisis, dando lugar a lo que se conoce como efecto matriz. Además, el tratamiento con NaOH para la hidrólisis de SP, puede ser el origen de interferencias. En el caso de los inmunoensayos, los límites de detección son generalmente muy bajos por lo que el efecto debería poder corregirse si la muestra se diluye lo suficiente.¹¹⁶

De esta manera y con el fin de obtener la dilución mínima de la muestra necesaria para corregir el efecto matriz en los inmunoensayos desarrollados, se ensayaron diferentes disoluciones patrón de SP-enol preparadas en cada matriz o en agua MilliQ como control. Para este estudio se evaluó el efecto matriz de 5 muestras: extracto de uvas blancas de origen Chile, vino blanco, vino tinto, zumo blanco y zumo tinto. Cada disolución patrón se diluyó 1/5, 1/10, 1/20, 1/50 y 1/100 con NaOH 40 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. El control en agua sin matriz se diluyó 1/2 con NaOH 80 mM. A continuación, cada disolución, incluido el control, se diluyó 1/2 en tampón de dilución. En consecuencia, la concentración de NaOH en muestra durante la etapa de hidrólisis osciló entre 32 mM y 40 mM, como en el estudio de pH de la **Tabla 4.11**, por lo que las diferencias del pH y de la fuerza iónica en ensayo serán despreciables. No obstante, estas pequeñas diferencias no se esperaba que tuviesen efectos significativos sobre la $A_{m\acute{a}x}$ o la IC_{50} del ensayo, según los estudios de caracterización de la influencia de dichos parámetros fisicoquímicos llevados a cabo con anterioridad.

Por otro lado, en estudios preliminares se observó que los efectos de la matriz del vino se podían disminuir mediante el tratamiento con PVPP, por lo que se determinó la cantidad de PVPP necesaria y suficiente para limpiar las muestras de zumos y vinos luego de ser hidrolizadas y tamponadas. Se ensayaron proporciones de 1%, 3% y 5% (p/v) de PVPP para el tratamiento de la muestra.

Para evaluar el efecto matriz se compararon las curvas de inhibición resultantes en presencia de matriz con la curva estándar obtenida en ausencia de matriz. Debido a la importancia que tiene la $A_{m\acute{a}x}$ y la IC_{50} , conviene realizar una representación gráfica de la variación de dichos parámetros en función del factor de dilución de la matriz, la cual permita estimar la mínima dilución recomendable. Para ello se determinaron los cocientes $A_{m\acute{a}x}/A_{m\acute{a}x}$ en tampón e IC_{50}/IC_{50} en tampón. De este modo se observó que con 3% o 5% (p/v) de PVPP los efectos matriz de los zumos y los vinos eran menores que con 1%. Las **Figuras 4.12** y **4.13** muestran los resultados obtenidos con los ensayos optimizados en formato de anticuerpo de

captura e indirecto cuando las muestras se trataron con una disolución alcalina para la hidrólisis de SP, después se tamponaron y finalmente las muestras de zumos y vinos se limpiaron con 3% (p/v) de PVPP.

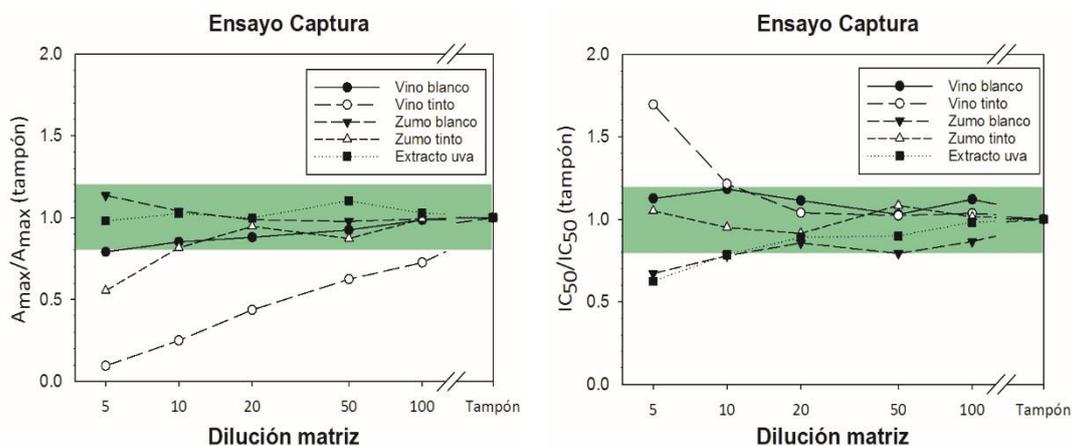


Figura 4.12. Efecto matriz de los vinos y zumos (blancos y tintos) y del extracto de uvas sobre el ensayo en formato de captura. El fondo resaltado en verde representa el intervalo 0.8-1.2 de la variación de los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} , tomando como referencia la curva estándar obtenida en tampón.

De este modo se observó que el efecto matriz del extracto de uva, de los zumos blancos y tintos y del vino blanco sobre los principales parámetros analíticos del ensayo de captura fue muy bajo. Con tan solo una dilución 1/10 fue posible disminuir su influencia sobre la $A_{m\acute{a}x}$ y la IC_{50} para SP-enol. En cambio, el vino tinto mostró un mayor efecto matriz sobre la señal máxima de este inmunoensayo. No obstante, la variación del valor de IC_{50} se mantuvo dentro de límites razonables a partir de una dilución 1/10.

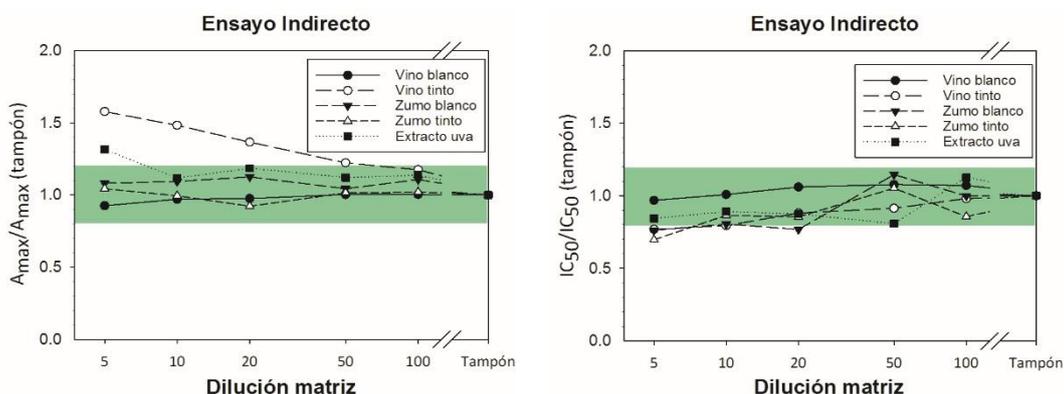


Figura 4.13. Efecto matriz de los vinos y zumos (blancos y tintos) y del extracto de uvas sobre el ensayo en formato indirecto. El fondo resaltado en verde representa el intervalo 0.8-1.2 de la variación de los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} , tomando como referencia la curva estándar obtenida en tampón.

Por su parte, el efecto matriz de los vinos, zumos y extracto de uva sobre los principales parámetros analíticos del ensayo indirecto (**Figura 4.13**) para SP-enol fue prácticamente nulo con las diluciones estudiadas, a excepción del vino tinto, donde presentó un importante efecto matriz sobre la señal máxima. Sin embargo, no se observó efecto matriz significativo del vino tinto sobre la IC_{50} para SP-enol si la muestra se diluía al menos 5-10 veces. Con los resultados obtenidos, se puede concluir que los inmunoensayos de captura e indirecto desarrollados para SP-enol son adecuados para el análisis de muestras de los alimentos estudiados.

4.8.4. Curvas estándar y condiciones óptimas de ensayo

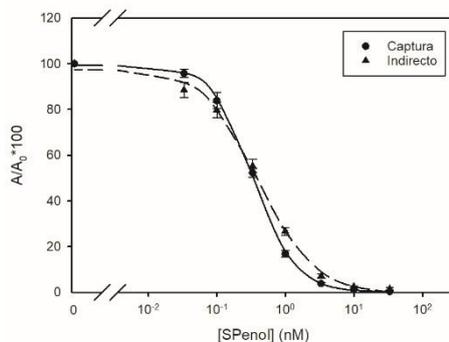
En resumen, la preparación de la muestra consistirá en las siguientes etapas:

- a) Extracción de muestras de uva según el método QuEChERS.
- b) Dilución de extractos de uva, zumos y vinos en NaOH 40 mM e incubación durante 10 min a temperatura ambiente.
- c) Dilución 1/2 en tampón de dilución (Tris-HCl 200 mM, pH 8.0, con 280 mM NaCl).
- d) Limpieza con 3% (p/v) de PVPP, solo para muestras de zumos y vinos.

En base a los resultados para la hidrólisis controlada de SP y el procedimiento optimizado para eliminar los efectos matriz, y teniendo en cuenta los resultados de caracterización fisicoquímica de los inmunoensayos, se establecieron las condiciones óptimas de ensayo y se determinaron los parámetros analíticos de las curvas estándar de SP-enol resultantes para los dos inmunoensayos seleccionados.

En la **Tabla 4.13** se resumen los principales parámetros analíticos para la determinación de residuos de SP como SP-enol mediante ELISA competitivo. Ambos inmunoensayos presentaron una elevada sensibilidad hacia SP-enol, con valores de IC_{50} muy semejantes, en el orden de subnanomolar. La pendiente del ensayo en formato indirecto es más cercana a la unidad que la del ensayo de captura, lo que hace que el LOD calculado sea aproximadamente de la mitad (0.01 ng/mL) y el rango dinámico más amplio. No obstante, el ensayo en formato de captura se reveló ligeramente más preciso que el indirecto con CV intra e interdía para la $A_{máx}$ y la IC_{50} por debajo del 10%.

Tabla 4.13. Condiciones de ensayo y parámetros analíticos de los inmunoensayos optimizados usando patrones de SP-enol diluidos 1/5 en disolución alcalina (n=5).



Formato	Directo con captura	Indirecto
mAb	SPm#23	SPo#237
	100 ng/mL	30 ng/mL
Conjugado	HRP-SPh	OVA-SPh
	30 ng/mL	100 ng/mL
Tampón de ensayo	100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20	100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20
$A_{m\acute{a}x}$	0.901 ± 0.044	0.957 ± 0.126
IC_{50} SP-enol (nM)	0.414 ± 0.005	0.403 ± 0.040
IC_{50} SP-enol (ng/mL)	0.125 ± 0.007	0.120 ± 0.013
Pendiente	-1.430 ± 0.112	-1.041 ± 0.095
A_{min}	0.001 ± 0.003	-0.010 ± 0.012
LOD (ng/mL) (IC_{10})	0.022 ± 0.004	0.014 ± 0.004
Rango dinámico (ng/mL) (IC_{20} - IC_{90})	0.048-0.318	0.031-0.913
Precisión entre días		
$A_{m\acute{a}x}$ (%)	4.7	13.1
IC_{50} (%)	7.9	9.2
Precisión intradía		
$A_{m\acute{a}x}$ (%)	2.9	15.3
IC_{50} (%)	9.7	10.4

4.8.5. Análisis de muestras fortificadas

Una vez estudiado el efecto matriz de los extractos de uvas, zumos y vinos, y establecidas las condiciones óptimas de ensayo, se procedió a la determinación de la exactitud y precisión de los inmunoensayos seleccionados. Esto se llevó a cabo mediante el análisis de muestras dopadas con cantidades conocidas de SP, SP-enol o una mezcla 1:1 de los dos analitos. A las muestras citadas se les añadió diferentes cantidades del analito en estudio en cada caso. Posteriormente se diluyeron 5, 25 o 50 veces en NaOH 40 mM, y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, cada una de las diluciones se tamponaron diluyendo 1/2 con tampón Tris de dilución, y las muestras de zumo y vino fueron tratadas con un 3% (p/v) de PVPP. Se recogió el sobrenadante y se analizó mediante los inmunoensayos desarrollados.

Se consideró como límite de cuantificación (LOQ) la concentración más baja ensayada con la que se obtuvo una recuperación en el intervalo de 80% a 120%, y a su vez con un coeficiente de variación inferior al 20%. Las **Tablas 4.14** y **4.15** resumen los valores de recuperaciones encontrados en los extractos de uva, vinos y zumos, tanto para SP, SP-enol y la mezcla, en los ensayos de captura e indirecto, respectivamente.

El ensayo de captura (**Tabla 4.14**) con el anticuerpo SPm#23 y el trazador heterólogo HRP-SPh mostró una elevada capacidad para cuantificar SP, SP-enol o la mezcla de ambos en un amplio rango de concentraciones en las muestras de alimentos estudiadas. Los valores de recuperación estuvieron fundamentalmente en el rango de 80-120%, con coeficientes de variación inferiores al 20%. El ensayo mostró un excelente comportamiento en el análisis de zumos y vinos siendo posible el análisis entre 2.5 y 500 ng/mL de analito en todos los casos. Para los extractos de uva el LOQ fue de 5 ng/mL. Estos valores están muy por debajo de los LMR europeos para SP en uva (2 µg/mL).

Tabla 4.14. Valores de recuperación y coeficientes de variación obtenidos con muestras fortificadas para el ensayo competitivo de captura (n = 3).

Muestra	[A] ^a	SP			SP-enol			SP+SP-enol (1:1)		
		f.d. ^b	R ^c (%)	CV (%)	f.d.	R (%)	CV (%)	f.d.	R (%)	CV (%)
Extracto uvas	2.5	25	- ^d	-	25	-	-	25	-	-
	5.0	25	113.9	10.3	25	121.7	8.3	25	121.3	7.3
	10	25	99.7	9.3	25	113.4	12.0	25	113.9	18.3
	25	25	107.2	12.8	25	112.9	5.5	25	116.5	14.2
	50	50	92.7	6.6	50	99.9	7.1	50	94.2	17.1
	100	50	98.1	10.9	50	99.6	8.3	50	98.8	18.9
	250	50	85.6	8.5	50	98.3	7.1	50	91.2	13.9
	500	50	83.7	1.7	50	96.2	9.6	50	91.9	14.6
Zumoblanco	2.5	5	88.4	2.7	5	116.5	4.8	5	81.5	6.3
	5.0	5	90.6	4.5	5	113.6	6.8	5	84.9	2.2
	10	5	98.5	13.4	5	114.0	5.8	5	88.7	10.8
	25	5	99.9	11.5	5	112.5	10.3	5	88.5	17.3
	50	50	102.0	6.5	50	106.4	5.2	50	83.7	3.1
	100	50	115.3	11.3	50	109.3	8.6	50	89.4	9.1
	250	50	102.8	10.8	50	97.0	7.5	50	83.8	13.9
	500	50	85.4	8.4	50	97.3	10.8	50	89.8	6.8
Zumotinto	2.5	5	98.4	5.2	5	112.9	1.7	5	92.3	15.3
	5.0	5	92.0	4.3	5	115.2	2.7	5	88.5	15.6
	10	5	101.5	8.0	5	115.5	3.7	5	87.8	6.5
	25	5	103.0	4.7	5	118.0	1.3	5	82.8	7.1
	50	50	109.9	9.8	50	106.6	2.2	50	88.5	7.2
	100	50	109.6	3.4	50	105.5	3.5	50	89.7	2.8
	250	50	103.7	3.0	50	103.3	1.4	50	82.8	8.7
	500	50	86.1	3.0	50	115.0	3.7	50	85.4	2.0
Vino blanco	2.5	5	115.4	2.9	5	113.2	10.3	5	115.9	5.6
	5.0	5	106.8	5.9	5	113.9	11.3	5	104.3	16.6
	10	5	106.6	2.2	5	115.3	14.1	5	89.6	13.4
	25	5	100.8	9.2	5	105.4	8.5	5	82.9	4.5
	50	50	93.2	8.8	50	104.5	10.9	50	95.0	2.5
	100	50	102.1	4.3	50	103.4	6.1	50	88.3	7.5
	250	50	93.3	3.8	50	104.7	2.0	50	81.1	6.4
	500	50	86.2	10.3	50	91.1	1.2	50	81.7	9.0
Vino tinto	2.5	5	108.3	10.1	5	107.8	14.7	5	120.4	5.9
	5.0	5	97.6	11.4	5	107.2	15.4	5	117.9	16.8
	10	5	96.9	14.2	5	113.3	18.6	5	103.1	8.7
	25	5	93.0	10.8	5	109.7	5.6	5	92.6	8.7
	50	50	89.6	14.2	50	96.9	14.2	50	101.0	10.9
	100	50	91.7	10.5	50	104.3	10.5	50	98.5	9.9
	250	50	88.2	11.3	50	107.3	18.1	50	94.0	10.8
	500	50	88.1	2.3	50	98.4	1.3	50	94.5	20.0

^a Concentración de analito en ng/mL. ^b Dilución de la matriz en NaOH. ^c Valores de recuperación. ^d Fuera de rango.

Tabla 4.15. Valores de recuperación y coeficientes de variación obtenidos con muestras fortificadas para el ensayo competitivo indirecto (n = 3).

Muestra	[A] ^a	SP			SP-enol			SP+SP-enol (1:1)		
		f.d. ^b	R ^c (%)	CV (%)	f.d.	R (%)	CV (%)	f.d.	R (%)	CV (%)
Extracto uvas	2.5	25	101.5	8.3	25	110.7	10.2	25	94.1	15.0
	5.0	25	101.9	8.9	25	87.1	13.1	25	113.0	8.6
	10	25	89.6	1.5	25	96.9	3.4	25	95.9	15.9
	25	25	88.4	7.7	25	97.4	7.2	25	91.1	15.2
	50	50	83.7	11.1	50	103.7	14.8	50	87.8	5.1
	100	50	80.8	0.5	50	101.4	16.0	50	98.8	16.5
	250	50	88.8	15.1	50	99.9	15.1	50	90.3	15.9
	500	50	91.4	6.6	50	102.4	19.3	50	88.2	0.4
Zumoblanco	2.5	5	120.0	14.2	5	115.2	5.7	5	-	-
	5.0	5	110.3	4.5	5	113.3	6.1	5	120.0	8.9
	10	5	113.3	6.6	5	118.4	5.5	5	116.2	4.0
	25	5	113.5	6.9	50	100.8	7.2	50	104.8	6.0
	50	50	107.4	0.9	50	94.3	9.3	50	107.7	9.0
	100	50	115.2	7.9	50	99.0	17.8	50	97.9	5.9
	250	50	119.4	16.6	50	100.9	9.3	50	108.7	17.5
	500	50	-	-	50	109.1	5.7	50	119.8	14.7
Zumotinto	2.5	5	109.6	24.1	5	115.4	1.6	5	-	-
	5.0	5	102.7	13.2	5	113.0	3.9	5	-	-
	10	5	103.1	13.6	5	119.0	1.1	5	-	-
	25	5	118.7	9.0	5	119.3	4.5	50	117.9	14.6
	50	50	104.1	19.1	50	97.0	9.7	50	111.5	3.1
	100	50	98.2	13.7	50	91.5	19.3	50	111.9	5.1
	250	50	110.8	4.8	50	100.0	21.8	50	113.2	3.4
	500	50	117.2	10.5	50	111.1	5.9	50	113.0	8.8
Vino blanco	2.5	5	89.4	34.3	5	86.1	19.1	5	99.3	13.7
	5.0	5	90.0	15.6	5	83.4	8.5	5	99.8	16.8
	10	5	97.2	12.6	5	89.8	17.5	5	108.6	8.4
	25	5	102.9	13.6	5	97.5	8.5	5	118.8	8.3
	50	50	101.9	17.5	50	94.9	17.5	50	98.3	16.0
	100	50	96.5	4.3	50	86.9	4.8	50	105.4	7.4
	250	50	88.2	20.0	50	80.7	17.8	50	116.7	9.5
	500	50	101.2	5.6	50	91.8	6.5	50	111.8	11.1
Vino tinto	2.5	5	83.1	28.6	5	80.5	16.8	5	111.1	5.9
	5.0	5	83.9	21.0	5	80.5	11.8	5	109.1	4.6
	10	5	98.5	11.8	5	83.5	2.2	5	115.7	12.9
	25	5	99.9	8.8	5	104.1	3.3	5	117.1	6.9
	50	50	83.7	17.6	50	87.4	19.9	50	113.7	10.0
	100	50	94.6	14.9	50	83.2	1.7	50	98.0	9.7
	250	50	98.0	9.9	50	87.7	8.3	50	95.1	16.3
	500	50	85.0	8.3	50	102.0	15.4	50	122.6	16.6

^a Concentración de analito en ng/mL. ^b Dilución de la matriz en NaOH. ^c Valores de recuperación. ^d Fuera de rango.

En el ensayo indirecto (**Tabla 4.15**) con el anticuerpo SPo#237 y el conjugado heterólogo OVA-SPh los valores de recuperación para el extracto de uvas fueron excelentes en el rango de fortificación estudiado. Esta muestra pudo cuantificarse de manera exacta y precisa hasta 2.5

ng/mL de SP, SP-enol y la mezcla de SP+SP-enol. Para la determinación en zumos (blancos y tintos), se observaron mayores interferencias. Así, los valores de recuperación obtenidos con la mezcla de analitos a bajas concentraciones estuvieron fuera de rango particularmente con el zumo tinto. En cualquier caso, los valores de recuperación fueron muy buenos en el rango de fortificación entre 25 y 250 ng/mL, tanto para SP como para SP-enol y la mezcla de los dos analitos en ambos zumos. Finalmente, para los vinos (blancos y tintos) los valores de recuperación fueron muy buenos en todo el rango de fortificación estudiado, si bien a 2.5 ng/mL de SP los coeficientes de variación fueron algo elevados. Este formato de ensayo también mostró una elevada capacidad para cuantificar SP y SP-enol en extractos de uva alcanzando un LOQ de 2.5 ng/mL. Para zumos el LOQ fue mayor (25 ng/mL), mientras que para vinos el LOQ se podría fijar en 5 ng/mL. De nuevo, estos valores están muy por debajo de los LMR autorizados en uva.

4.8.6. Estudio comparativo con HPLC-MS/MS usando muestras ciegas

Muestras de uva tinta de origen Alicante fueron rociadas con un preparado comercial de SP (muestras ciegas) y fueron ensayadas mediante ELISA competitivo, utilizando el inmunoensayo desarrollado en formato directo con anticuerpo de captura, y mediante HPLC-MS/MS como método de referencia. Se aplicaron tres tratamientos durante dos días consecutivos con el fin de obtener muestras con una variedad de contenidos de residuos. Además, cada muestra se diluyó 1/10 para tener muestras menos concentradas. En total se obtuvieron 13 muestras: tres del primer tratamiento (M1-M3) y tres del segundo (M4-M6) más las diluciones de cada una de ellas (M7-M12) y un blanco (M0). Los extractos QuEChERS se emplearon para el análisis cromatográfico y se prepararon siguiendo el procedimiento optimizado de hidrólisis para ELISA. Los resultados encontrados se incluyen en la **Tabla 4.16**.

En todos los casos, la concentración de residuo de SP encontrada estuvo por debajo del LMR europeo. Considerando que el LOQ del método de referencia es 7.7 ng/mL (calculado como 10 veces la desviación estándar del cero), parece que existe una ligera sobreestimación con este método. Por otro lado, el elevado CV obtenido con M0 (68%) por ELISA es una indicación de que la concentración de la muestra se encuentra fuera del rango de cuantificación, como es el caso de M0. Según el método de referencia, la concentración de residuo en el conjunto de muestras, medida como la suma de SP+SP-enol, varió entre 15 y 1200 ng/mL, aproximadamente. Según el método inmunoquímico, la concentración de residuo osciló entre 11 y 1190 ng/mL. El sesgo entre ambos métodos se mantuvo mayoritariamente dentro del rango 80%-120%, tan solo en dos puntos el sesgo fue de aproximadamente del 75%.

Tabla 4.16. Análisis comparativo de resultados obtenidos mediante ELISA competitivo y HPLC-MS/MS en muestras de uva ciegas.

Muestra	HPLC-MS/MS (n=3)		ELISA competitivo (n=5)		Sesgo (%)
	[R] ^a (ng/mL)	CV (%)	[R] (ng/mL)	CV (%)	
M0	8.60	8.95	9.59	67.99	111.6
M1	441.81	6.18	400.79	7.03	90.7
M2	299.42	4.08	251.03	6.79	83.8
M3	138.88	4.47	106.37	3.80	76.6
M4	1205.60	7.29	1187.15	4.69	98.5
M5	712.02	6.04	732.49	7.48	102.9
M6	216.35	1.69	187.72	6.10	86.7
M7	41.37	3.19	37.82	6.80	91.3
M8	28.89	3.43	24.29	3.95	84.1
M9	15.11	4.37	11.27	5.06	74.8
M10	128.19	1.05	109.69	1.02	85.6
M11	69.82	0.74	66.52	5.46	95.3
M12	21.36	2.29	17.98	4.00	84.1

^a Concentración de residuo medida como la suma de SP+SP-enol.

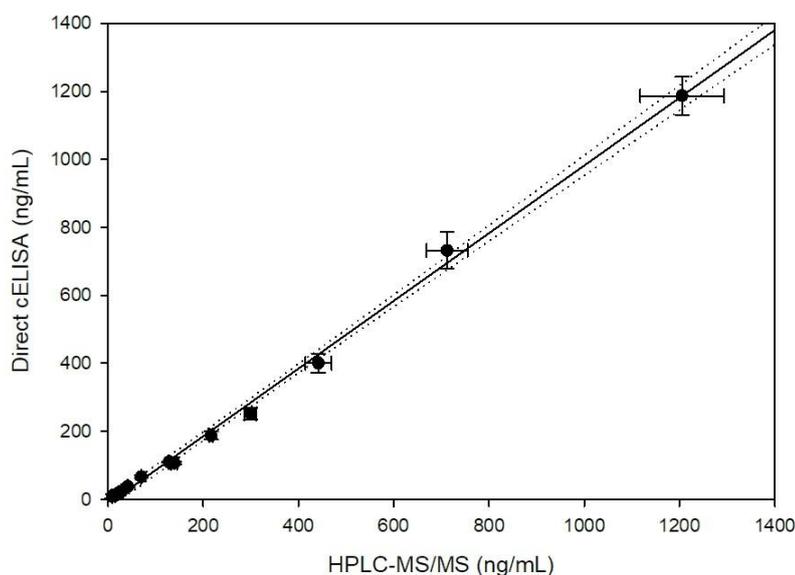


Figura 4.14. Regresión lineal e intervalo de confianza del 95% de los resultados obtenidos por ELISA competitivo (n=5) y un método de referencia (n=3) a partir del análisis de extractos de uva contaminada con SP.

Los resultados obtenidos por ELISA competitivo se compararon mediante regresión lineal con los del método de referencia (**Figura 4.14**). La fórmula de la recta resultante tuvo una ordenada en el origen de -13.05 y una pendiente de 0.995. El intervalo de confianza del 95% para la ordenada en el origen fue entre -28.400 y 2.299, y el de la pendiente estuvo entre 0.959 y 1.031. Por lo tanto, el rango de confianza de la ordenada en el origen incluye el valor 0 y el de la pendiente incluye el valor 1. Estos resultados validan el método inmunoquímico desarrollado para el análisis de residuos de SP en uva.

4.9. Desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral

4.9.1. Preparación de las tiras inmunorreactivas y del anticuerpo marcado con oro coloidal

La línea control de las tiras se preparó dispensando sobre la membrana de nitrocelulosa una disolución de GAM a 1 mg/mL, mientras que para la línea de test con el conjugado BSA-SP_h se ensayaron dos disoluciones de 0.5 y 1 mg/mL. La dispensación de GAM y del conjugado sobre la tira se llevó a cabo empleando disoluciones de cada inmunorreactivo en tampón fosfato de elevada fuerza iónica ($I = 373$ mM). Por otro lado, el bioconjugado NP-mAb se preparó añadiendo pequeños volúmenes de dilución del mAb SP_m#23 sobre la preparación diluida de las NPs, e incubando a temperatura ambiente. La dilución del anticuerpo se preparó en Biostab (0.1 mg/mL) diluyendo directamente del lote que se encontraba precipitado en SAS a 1 mg/mL. Las NPs conjugadas a GAM se diluyeron 1/10 en HEPES 10 mM, pH 7.4. Se ensayaron tres concentraciones de anticuerpo (200, 500 y 1000 ng/mL). La cantidad de NP-mAb estudiada para la fase móvil fue de 10, 15 y 25 μ L, las cuales se mezclaron en un pocillo de microplaca con el tampón que contenía SP o SP-enol y se incubaron 5 min a temperatura ambiente antes de insertar la tira inmunorreactiva. El volumen final en el pocillo de dicha mezcla donde ocurrió la reacción anticuerpo-analito fue de 100 μ L.

4.9.2. Optimización del ensayo

De las dos concentraciones de conjugado BSA-SP_h ensayadas para la preparación de la línea test, la de 0.5 mg/mL aportó una señal suficientemente elevada para la lectura visual de los resultados, por lo que se seleccionó para seguir con el desarrollo del inmunoensayo. Por otro lado, el bioconjugado NP-mAb preparado a 0.5 μ g/mL de anticuerpo fue el que proporcionó los mejores resultados de señal, tanto en la línea test como en la de control cuando la inhibición de la señal de la línea test es completa. Para la optimización de la cantidad de bioconjugado NP-mAb, así como de los diferentes parámetros fisicoquímicos estudiados, la señal de cada línea se leyó con un escáner, se calculó el cociente T/C entre la señal de la línea test (T) y la de control (C), y se determinó el porcentaje de disminución de dicho valor respecto al blanco a dos niveles de concentración de analito (0.3 y 1.0 ng/mL de SP o 0.1 y 0.3 ng/mL de SP-enol).

En primer lugar, se optimizó la cantidad de bioconjugado NP-mAb en la mezcla de reacción. Para ello se ensayaron diferentes volúmenes de la preparación del complejo con oro coloidal (5, 10, 15 y 20 μ L) en HEPES 10 mM, pH 7.4, mezclados con una disolución del analito en Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con 60 mM NaCl y 0.05% (v/v) de Tween-20. Se empleó tampón Tris ya que este fue el que se optimizó para los estudios de recuperación con los

inmunoensayos desarrollados mediante ELISA competitivo. El volumen final de la reacción fue siempre de 100 μL . En la **Figura 4.15** se representan los resultados de este estudio.

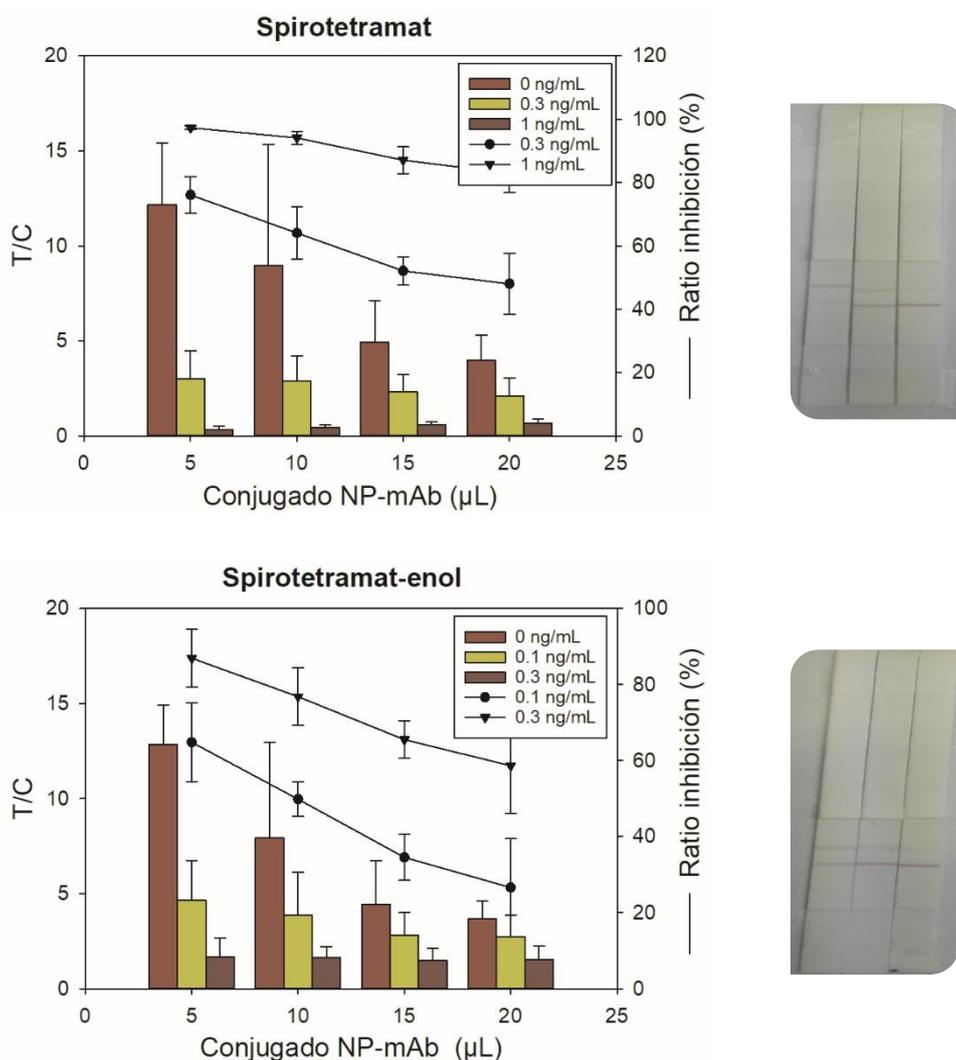


Figura 4.15. Variación del cociente T/C y del porcentaje de inhibición empleando distintas cantidades de NP-mAb. Las concentraciones de SP y SP-enol indicadas son en ensayo. Las figuras de la derecha muestran una fotografía de las tiras después del ensayo con 10 μL de preparación de bioconjugado de oro a (de izquierda a derecha) 1.0, 0.3 y 0 ng/mL de SP (figura superior) y a 0.3, 0.1 y 0 ng/mL de SP-enol (figura inferior).

El valor de T/C disminuyó cuando se emplearon cantidades crecientes de conjugado NP-mAb, debido al incremento de la señal de la línea control. Además, la mayor inhibición se observó con la cantidad más pequeña ensayada de NP. Esto indicaría que existe un exceso de anticuerpo, y por lo tanto el volumen óptimo de preparación de bioconjugado de oro sería 5 μL . Sin embargo, con dicha cantidad de NPs la señal era muy baja para ser leída *de visu*. Consecuentemente, se seleccionó un volumen de NP-mAb de 10 μL ya que aportó un elevado valor de T/C, y con un factor de inhibición cercano al 50% con 0.3 y 0.1 ng/mL de SP y de SP-enol, respectivamente. Se observó que la sensibilidad del inmunoensayo hacia SP-enol fue

ligeramente mayor que hacia SP. Como se puede observar en las fotografías la señal de la línea control es altamente dependiente de la señal de la línea test, de modo que a mayor concentración de analito aumenta el valor de C y disminuye el de T.

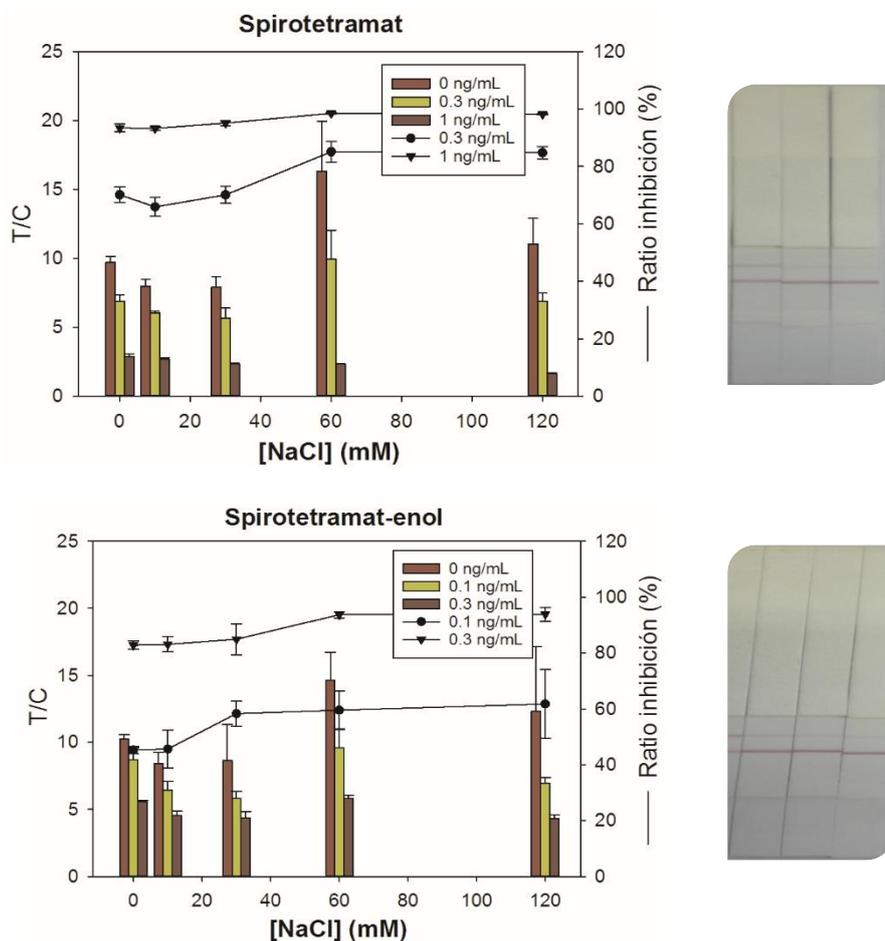


Figura 4.16. Variación del cociente T/C y del porcentaje de inhibición para las distintas concentraciones de NaCl ensayadas. Las concentraciones de SP y SP-enol indicadas son en ensayo. Las figuras de la derecha muestran una fotografía de las tiras después del ensayo con tampón conteniendo 60 mM de NaCl a (de izquierda a derecha) 1.0, 0.3 y 0 ng/mL de SP (figura superior) y a 0.3, 0.1 y 0 ng/mL de SP-enol (figura inferior).

Con el objetivo de definir la disolución tampón a utilizar en estudios posteriores, se realizó el estudio de la fuerza iónica. Para esto se ensayaron tampones Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con 0.05% (v/v) de Tween-20 conteniendo NaCl a 10, 30, 60 y 120 mM. La **Figura 4.16** recoge los resultados de este estudio. Se pudo observar la variación de la señal y de la sensibilidad del inmunoensayo en función de la concentración de NaCl. Claramente, a una concentración de NaCl de 60 mM se obtuvo el mayor cociente T/C y la mayor inhibición tanto con SP como con SP-enol. Dicho tampón presenta una fuerza iónica de 87 mM.

Finalmente se realizó un estudio de la influencia del pH del tampón de ensayo sobre la señal y la sensibilidad del inmunoensayo. Para esto se emplearon diversas disoluciones

tampón de Tris-HCl 100 mM, a diferentes valores de pH, con 0.05% (v/v) de Tween-20. Se prepararon tres disoluciones tampón ajustando el pH a 7.4, 8.0 y 8.5 con HCl 10 M, y se añadió la cantidad de NaCl correspondiente para alcanzar una concentración de NaCl de 35 mM para el de pH 7.4, de 60 mM para el de pH 8.0 y de 92 mM para el de pH 8.5. Para el cálculo se tuvo en cuenta la cantidad de HCl empleada para ajustar el pH. De este modo todos los tampones presentaron una fuerza iónica constante.

La **Figura 4.17** recoge los resultados obtenidos para el estudio del pH. Se observó poca variación del cociente T/C y del porcentaje de inhibición en función del pH, dentro del rango estudiado. Nuevamente la inhibición cercana al 50% tuvo lugar a 0.3 ng/mL para SP y a 0.1 ng/mL para SP-enol. Por ello se decidió continuar con el tampón Tris-HCl 100 mM a pH 8.0.

En conclusión, el inmunoensayo de flujo lateral optimizado para la determinación de residuos de SP utiliza tiras inmunocromatográficas preparadas con GAM (línea control) y con el conjugado BSA-SP h (línea test) como se ha descrito anteriormente. La fase móvil es una mezcla de 10 μ L de preparación de bioconjugado NP-mAb (OD=1.0), preparado a una concentración de anticuerpo de 0.5 μ g/mL, y de 90 μ L de muestra diluida en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con 60 mM de NaCl y 0.05% (v/v) de Tween-20. Antes de insertar la tira reactiva, la mezcla se debe incubar 5 min a temperatura ambiente. La inmunocromatografía se desarrolla durante 10 min en posición vertical, y para finalizar el ensayo se retira la almohadilla de muestra. Antes de leer la señal de cada línea, como se ha descrito con anterioridad, se debe secar la membrana con un flujo de aire a temperatura ambiente.

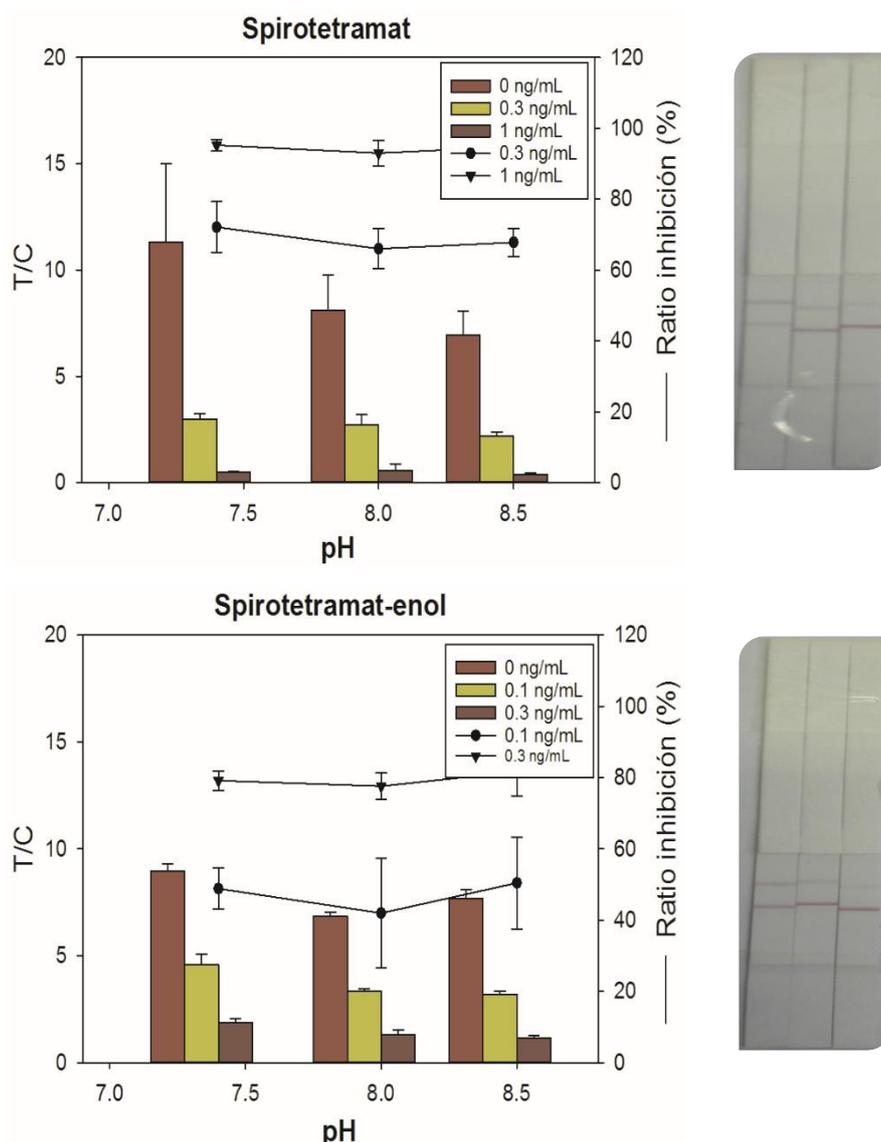


Figura 4.17. Variación del cociente T/C y del porcentaje de inhibición para los distintos valores de pH ensayados. Las concentraciones de SP y SP-enol indicadas son en ensayo. Las figuras de la derecha muestran una fotografía de las tiras después del ensayo con tampón de pH 8.0 a (de izquierda a derecha) 1.0, 0.3 y 0 ng/mL de SP (figura superior) y a 0.3, 0.1 y 0 ng/mL de SP-enol (figura inferior).

En la **Figura 4.18**, se presenta un ejemplo de la variación de la señal de las líneas test y control, así como la variación del cociente T/C en función de la concentración de analito. Bajo estas condiciones, y a partir de las curvas de inhibición de T/C para SP y SP-enol, la media de los valores de IC_{50} de cinco experimentos independientes fue de 0.45 y 0.38 ng/mL, respectivamente. En este estudio se pudo observar que la señal de la línea control es muy baja en ausencia de analito.

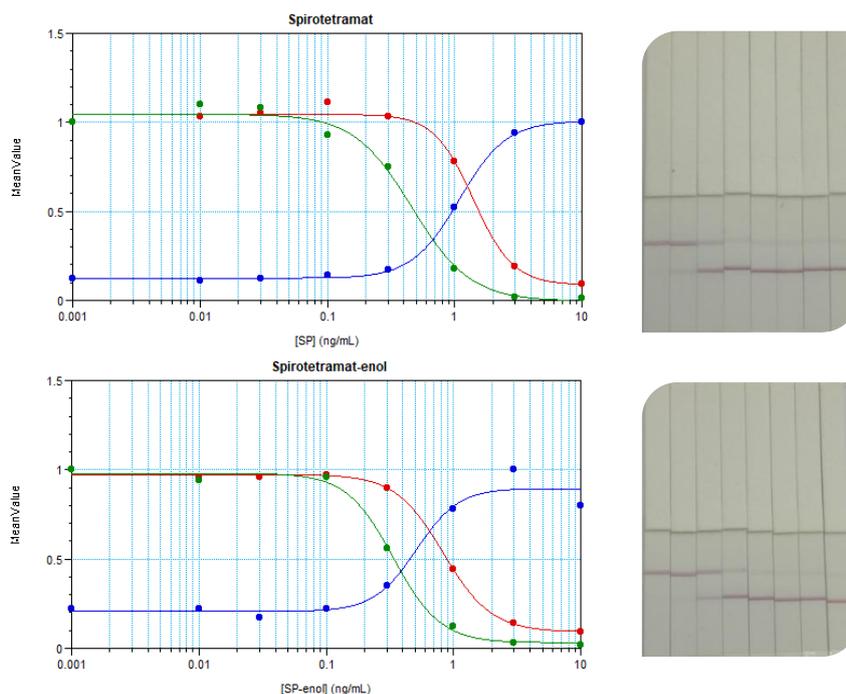


Figura 4.18. Variación de la señal de la línea control (azul), línea test (rojo) y del cociente T/C (verde) en función de la concentración de SP (gráfico superior) y SP-enol (gráfico inferior). A la derecha se muestran las tiras reactivas después del ensayo en orden decreciente (de izquierda a derecha) de concentración de analito a 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 y 0 ng/mL.

4.9.3. Validación con muestras de vino

La validación de los inmunoensayos de flujo lateral se llevó a cabo con dos muestras de vino blanco y dos de vino tinto siguiendo las directrices de la UE para la validación de métodos de cribado semi-cuantitativos para el análisis de pequeñas moléculas orgánicas.¹⁵⁷ Según este documento, los resultados del estudio se deben ajustar a un intervalo de confianza del 95%; es decir, el porcentaje de falsos negativos y de falsos sospechosos no debe superar el 5%.

Con este fin se llevaron a cabo dos estudios, uno a bajas concentraciones de analito para evaluar el efecto matriz de la muestra sobre el inmunoensayo y otro a concentraciones elevadas, equivalentes a los niveles legales de residuos. El objetivo en cada caso fue determinar el umbral de corte del cociente T/C, es decir, el valor de la señal expresada como T/C que nos permitirá distinguir entre muestras negativas y muestras sospechosas de contener residuos por encima de una concentración determinada de analito que llamamos concentración de cribado, o STC (del inglés *Screening Target Concentration*).

El primer estudio se realizó con vinos blancos y tintos dopados a 20 y 10 ng/mL con SP o SP-enol, respectivamente. Las muestras se diluyeron 1/10 con tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con 60 mM NaCl y 0.05% (v/v) Tween-20, y a continuación se mezcló 90 μ L de dicha

dilución con 10 μL de la preparación de conjugado NP-mAb. Cada muestra de vino, dopada o sin dopar, se analizó dos veces al día durante cinco días consecutivos ($n=20$) según se recomienda en la Regulación Europea mencionada. Las señales de las líneas test (T) y control (C) se utilizaron para determinar el cociente T/C. La **Figura 4.19** representa los valores de T/C obtenidos para las muestras de vino blanco y tinto sin analito y a los niveles de fortificación mencionados con cada analito, así como los umbrales de corte resultantes.

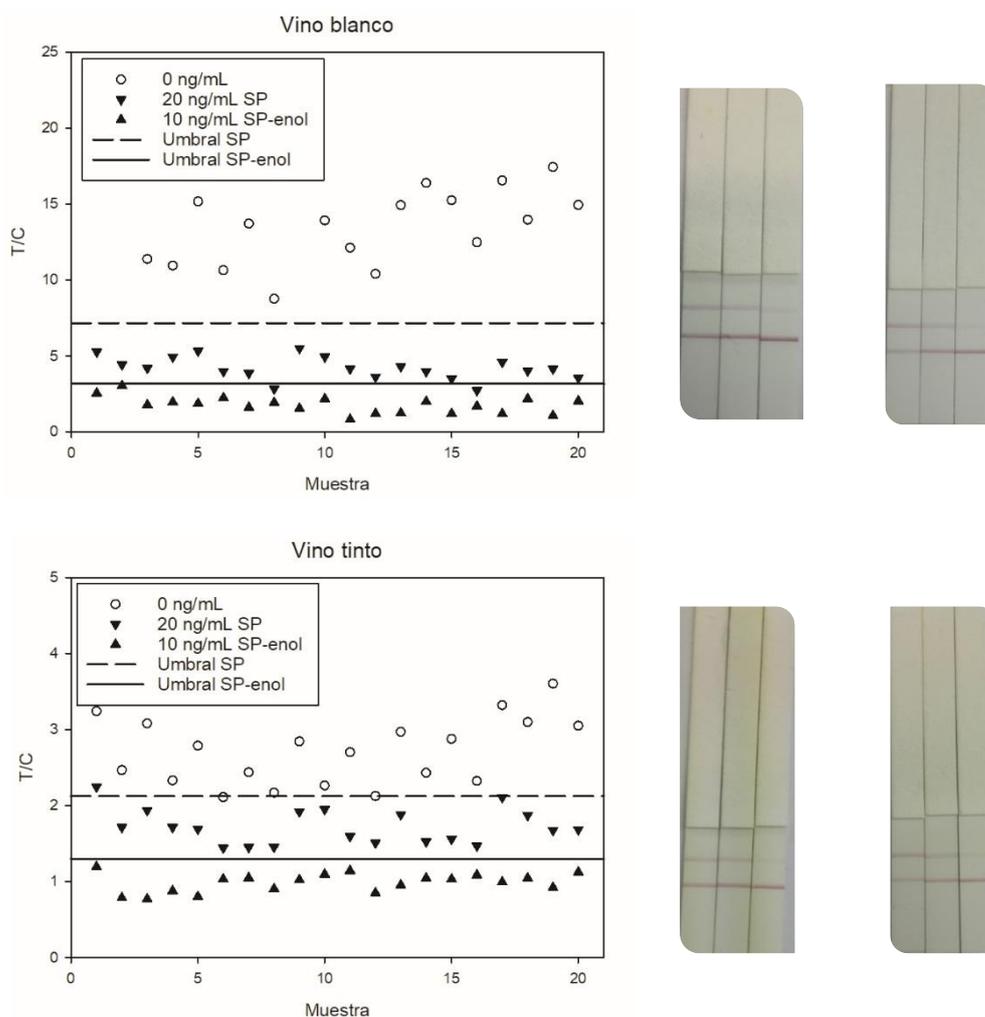


Figura 4.19. El gráfico muestra los umbrales de corte y los valores de T/C para muestras de vino blanco y de vino tinto sin dopar y dopadas con SP o SP-enol. Las fotografías son un ejemplo de los resultados obtenidos para SP a (de izquierda a derecha) 20 y 0 ng/mL (fotografía de la izquierda) y para SP-enol a 10 y 0 ng/mL (fotografía de la derecha) para vino blanco (grupo superior) y vino tinto (grupo inferior).

El valor promedio del cociente T/C y el CV obtenido con las muestras de vino blanco sin dopar fueron de 14.5 y 25%, respectivamente. El análisis estadístico de *t*-Student de los valores de T/C obtenidos con vinos blancos reveló que para una concentración de cribado de 20 ng/mL de SP, el umbral de corte – asumiendo un 1% de falsos negativos – es de 7.2 (datos en negrita en la **Tabla 4.17**). Con esta señal de corte, la probabilidad de obtener falsos sospechosos es de

menos del 3%. Es decir, situando el umbral de corte en 7.2, la probabilidad de que una muestra de vino blanco con 20 ng/mL de SP o más sea detectada como positiva es del 99% y la probabilidad de que una muestra de vino blanco sin SP sea clasificada como sospechosa de contener dicho insecticida es muy baja. Por otro lado, para una concentración diana de 10 ng/mL de SP-enol, el umbral de T/C para distinguir las muestras sospechosas de las negativas es de 3.2 – asumiendo un 1% y menos de un 3% de falsos negativos y de falsos sospechosos, respectivamente. En la **Tabla 4.17** también se aporta el umbral de corte para el intervalo de confianza del 95%, así como la probabilidad correspondiente de obtener falsos sospechosos. En definitiva, el inmunoensayo estudiado tiene un comportamiento excelente para el análisis de SP y SP-enol a las concentraciones ensayadas en vino blanco diluido tan solo 10 veces, no solo en el intervalo de confianza del 95% de falsos negativos y falsos sospechosos, sino incluso en el intervalo de confianza del 99% para falsos negativos.

Tabla 4.17. Parámetros estadísticos para la determinación de SP y SP-enol mediante inmunocromatografía de flujo lateral en muestras de vino (n = 20).

	Vino blanco		Vino tinto	
	STC ^a	STC	STC ^a	STC
	SP 20 ng/mL	SP-enol 10 ng/mL	SP 20 ng/mL	SP-enol 10 ng/mL
Valor promedio de T/C	4.4	1.8	1.7	1.0
CV (%)	24.8	30.9	13.5	12.5
Umbral (1% falsos negativos)	7.2	3.2	2.3	1.3
Falsos sospechosos (%)	2.7	2.7	18.7	2.0
Umbral (5% falsos negativos)	6.3	2.7	2.1	1.2
Falsos sospechosos (%)	1.6	2.2	9.8	1.0

^a Concentración de cribado, del inglés *Screening Target Concentration*.

Respecto a los vinos tintos, la media de los valores de T/C en las muestras sin analito fue de 2.7, con un CV muy bueno del 16%. Esta baja señal puso en evidencia las interferencias de los vinos tintos sobre el inmunoensayo. Con estos vinos, el umbral del cociente T/C para muestras con SP a una concentración de cribado de 20 ng/mL – asumiendo un porcentaje de falsos negativos del 5% – fue de 2.1 (**Tabla 4.17**). Con dicho umbral, la probabilidad de falsos sospechosos fue un poco más elevada que con los vinos blancos, de casi el 10%. En cambio, el umbral de la señal para vinos dopados con SP-enol a 10 ng/mL fue de 1.3, con una probabilidad muy baja de falsos negativos y falsos sospechosos, del 1% y 2%, respectivamente. El inmunoensayo mide bien SP-enol a la concentración ensayada con tan solo una dilución de 10 veces del vino tinto, pero requeriría diluciones mayores para determinar adecuadamente 20 ng/mL de SP.

A continuación, se llevó a cabo la validación del inmunoensayo a niveles de concentración de analito equivalentes a los exigidos por la legislación. Dado que el LMR europeo para SP en uva de vinificación es de 2000 ng/mL y que el factor de transferencia de la uva al vino es de aproximadamente 0.5, la concentración de cribado (STC) se fijó en 1000 ng/mL. Además, dado que el inmunoensayo presentaba una sensibilidad diferente hacia SP y SP-enol, y que la definición de residuo para fines analíticos es la suma de ambos compuestos, se empleó el procedimiento de hidrólisis optimizado para los estudios con ELISA.

De este modo, con el objetivo de determinar el valor de la señal (T/C) que nos sirva como umbral de corte para detectar muestras de vino sospechosas de contener residuos de SP a niveles no permitidos, determinados como la suma de SP+SP-enol, se doparon dos vinos blancos y dos tintos con SP o SP-enol y se diluyeron 1/5 en NaOH 40 mM. Después de incubar 10 min a temperatura ambiente, las muestras se diluyeron 1/100 en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con 60 mM de NaCl y 0.05% (v/v) de Tween-20, y cada muestra se analizó dos veces al día durante cinco días consecutivos (n=20). En la **Figura 4.20** se muestran los valores de T/C obtenidos con las muestras libres de analito y con las muestras dopadas con SP a una concentración igual a la STC (1000 ng/mL) y a 1/2 de la STC (500 ng/mL), así como el umbral de corte resultante para cada tipo de vino.

El valor promedio de T/C de las muestras de vino blanco sin residuos fue de 10.5 y el CV fue de 37%. Cuando la concentración de insecticida era igual a la concentración de cribado (STC), la inhibición fue prácticamente completa (**Figura 4.20**), tal y como estaba calculado, con un valor promedio de T/C de 0.3 (casi ausencia de señal). El análisis estadístico de *t*-Student de los valores de T/C obtenidos con vinos blancos reveló que, para una concentración diana de 1000 ng/mL, el umbral de corte para dicho cociente es de 0.6 – asumiendo un 1% de falsos negativos. Es decir, la probabilidad de que una muestra con 1000 ng/mL dé un resultado equivalente al cero es del 1% (datos en negrita en la **Tabla 4.18**). Con esta señal de corte, la probabilidad de que un vino sin residuos pueda ser clasificado como sospechoso es de menos del 2% (falsos sospechosos), y la probabilidad de que una muestra con un residuo de SP equivalente a 500 ng/mL (1/2 de STC) sea clasificada como sospechosa es descartable (de 0.03%). En la **Tabla 4.18** también se aporta el umbral de corte resultante al considerar un 5% de falsos negativos, y la probabilidad correspondiente de falsos sospechosos, como exige la legislación. En este caso, los resultados son parecidos a los obtenidos con un intervalo de confianza del 99%.

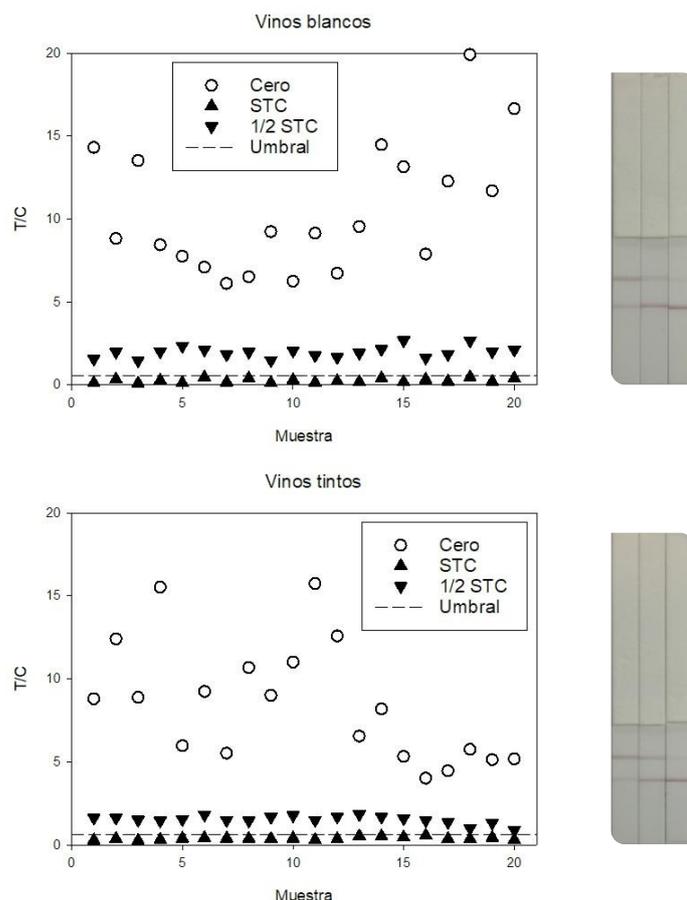


Figura 4.20. Umbrales de corte y valores de T/C para muestras de vino blanco y de vino tinto libres de residuos o dopados con SP a 1000 ng/mL (STC) y a 500 ng/mL (1/2 STC), obtenidos después de ser sometidas a una etapa de hidrólisis alcalina y una de dilución. Las fotografías son un ejemplo de los resultados obtenidos con vinos dopados con SP a (de izquierda a derecha) 1000, 500 y 0 ng/mL.

Tabla 4.18. Validación del inmunoensayo de flujo lateral para determinar residuos de SP como la suma de SP+SP-enol en muestras de vino dopadas con SP (n = 20).

	Vino blanco		Vino tinto	
	STC ^a	1/2 STC	STC	1/2 STC
Valor promedio de T/C	0.3	2.0	0.4	1.5
CV (%)	45.7	17.0	22.0	16.0
Umbral (1% falsos negativos)	0.6	2.8	0.6	2.1
Falsos sospechosos (%) del cero	1.7	3.4	2.0	4.5
Falsos sospechosos (%) de 1/2 STC	0.03	-	0.06	-
Falsos negativos parciales (%) de STC	-	0.00	-	0.00
Umbral (5% falsos negativos)	0.5	2.8	0.5	1.9
Falsos sospechosos (%) del cero	1.7	3.1	1.9	4.1
Falsos sospechosos (%) de 1/2 STC	0.01	-	0.03	-
Falsos negativos parciales (%) de STC	-	0.00	-	0.00

^a La concentración de cribado, del inglés *Screening Target Concentration*, se fijó en 1000 ng/mL.

Asimismo, cuando el analito se encontraba a 1/2 de la concentración diana en vinos blancos, se observó una disminución de señal importante ($T/C = 2.0$) respecto al cero, que además visualmente fue claramente diferente de la inhibición total (**Figura 4.20**). Finalmente, la probabilidad de que un vino blanco sin residuos sea clasificado entre los que contienen residuos – pero por debajo de la concentración de cribado – es del 3.4% (falsos sospechosos del cero con 1/2 de STC), en el intervalo de confianza del 99% para los falsos negativos. En el caso contrario, la probabilidad de que un vino blanco con 1000 ng/mL sea clasificado entre los que contienen residuos – pero a niveles por debajo de la concentración de cribado (falso negativo parcial) – es nula en cualquiera de los intervalos de confianza estudiados.

En cuanto al vino tinto, la media de T/C y el CV en el cero fueron de 8.5 y 42.0%, respectivamente. Con estos vinos, el valor promedio de la señal a la concentración de cribado fue ligeramente mayor que con los vinos blancos, aunque sigue siendo muy baja ($T/C = 0.4$), prácticamente sin señal; es decir, inhibición casi completa como se esperaba (**Figura 4.20**). De este modo, el umbral de corte para un 1% de falsos negativos a 1000 ng/mL fue de 0.6, con una probabilidad de falsos sospechosos del 2% (**Tabla 4.18**). En otras palabras, si fijamos el umbral de corte en un valor de $T/C = 0.6$, la probabilidad de que un vino tinto con una concentración de residuos de SP que supera los límites legales dé como una muestra que no contiene residuos es del 1%, mientras que la probabilidad de que una muestra sin residuos sea clasificada como sospechosa es del 2%. Estos resultados son equivalentes a los obtenidos con los vinos blancos, por lo que se podría aplicar el mismo umbral de corte para ambas matrices alimentarias. En la **Tabla 4.18** también se aporta el umbral de corte para vinos tintos resultante al considerar un 5% de falsos negativos, y la probabilidad correspondiente de falsos sospechosos, según exige la legislación. En este caso, los resultados son muy semejantes a los obtenidos con el intervalo de confianza del 99% para falsos negativos.

Con los vinos tintos, la probabilidad de que una muestra que contiene residuos de SP a una concentración equivalente a 1/2 de la concentración diana sea clasificada como sospechosa es del 0.06%, es decir casi nula, en el intervalo de confianza del 99% (**Tabla 4.18**). El promedio de la señal a 1/2 de la STC fue de 1.5, por lo tanto, visualmente diferente del cero y de la inhibición completa (**Figura 4.20**). Finalmente, la probabilidad de que un vino tinto sin residuos de SP sea clasificado entre los que contienen residuos – pero por debajo de la concentración de cribado – es del 4.5% (falsos sospechosos del cero con 1/2 de STC), en el intervalo de confianza del 99% para los falsos negativos. En el caso contrario, la probabilidad de que un vino tinto con 1000 ng/mL sea clasificado entre los que contienen residuos – pero a

niveles por debajo de la concentración de cribado (falso negativo parcial) – es cero en cualquiera de los intervalos de confianza estudiados.

En definitiva, si una muestra de vino blanco o tinto, analizada siguiendo el procedimiento establecido, da un valor de T/C de 0.6 o inferior, podemos decir que la muestra contiene residuos de SP a una concentración igual o superior a 1000 ng/mL con una confianza del 99%. Por otro lado, si una muestra da un valor de T/C entre 0.6 y 3.1 en vinos blancos y entre 0.6 y 2.1 en vinos tintos, muy probablemente contiene residuos de SP, pero no incumple la normativa. En términos visuales, una inhibición completa o casi completa de la señal indica que con toda seguridad la muestra incumple los límites legales, mientras que, si hay una inhibición parcial de la señal, podemos estar seguros que la muestra contiene residuos de SP por lo que quizá sea necesario determinar su concentración mediante un método cuantitativo.

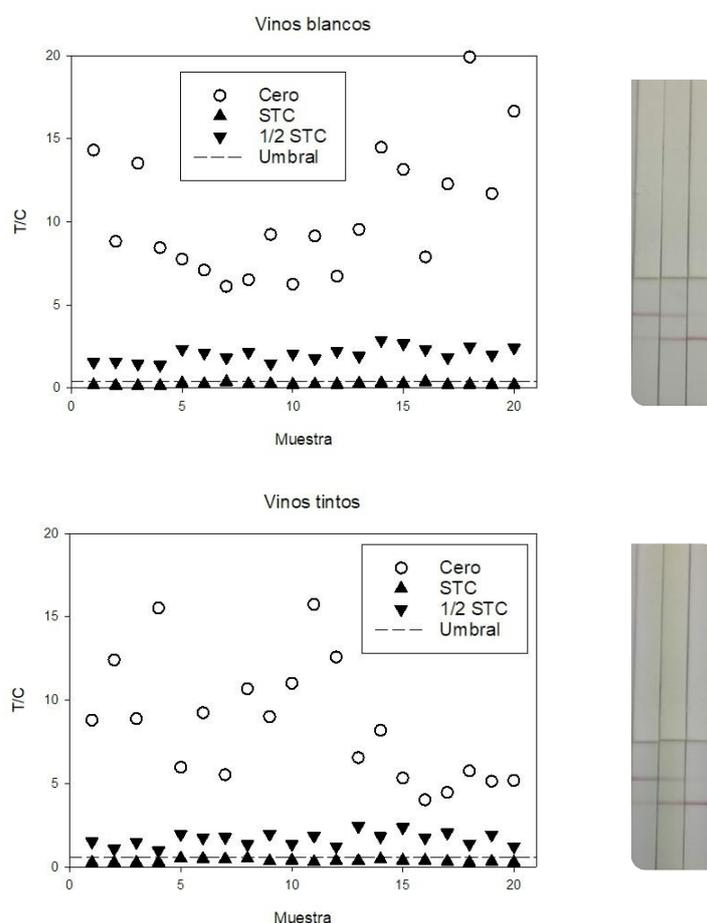


Figura 4.21. Umbrales de corte y valores de T/C para muestras de vino blanco y de vino tinto libres de residuos o dopados con SP-enol a 1000 ng/mL (STC) y a 500 ng/mL (1/2 STC), obtenidos después de ser sometidas a una etapa de hidrólisis alcalina y una de dilución. Las fotografías son un ejemplo de los resultados obtenidos con vinos dopados con SP-enol a (de izquierda a derecha) 1000, 500 y 0 ng/mL.

En paralelo también se llevó a cabo el mismo estudio con muestras de vino blanco y tinto, dopadas con SP-enol y siguiendo el mismo tratamiento de hidrólisis y dilución. En la **Figura 4.21** se muestran los resultados obtenidos y en la **Tabla 4.19** se enumeran los valores de los umbrales de corte y las probabilidades de falsos negativos y falsos sospechosos calculadas en dos intervalos de confianza (95% y 99%) para muestras de vino blanco y tinto dopadas con SP-enol a 500 y 1000 ng/mL.

Tabla 4.19. Validación del inmunoensayo de flujo lateral para determinar residuos de SP como la suma de SP+SP-enol en muestras de vino dopadas con SP-enol (n = 20).

	Vino blanco		Vino tinto	
	STC ^a	1/2 STC	STC	1/2 STC
Valor promedio de T/C	0.2	2.0	0.4	1.7
CV (%)	27.3	20.7	25.7	24.4
Umbral (1% falsos negativos)	0.4	3.1	0.6	2.7
Falsos sospechosos (%) del cero	0.9	3.6	0.3	2.5
Falsos sospechosos (%) de 1/2 STC	0.05	-	0.8	-
Falsos negativos parciales (%) de STC	-	0.00	-	0.00
Umbral (5% falsos negativos)	0.4	2.8	0.5	2.4
Falsos sospechosos (%) del cero	0.8	3.0	0.3	1.8
Falsos sospechosos (%) de 1/2 STC	0.04	-	0.5	-
Falsos negativos parciales (%) de STC	-	0.00		0.00

^a La concentración de cribado, del inglés *Screening Target Concentration*, se fijó en 1000 ng/mL.

Los resultados obtenidos al dopar con SP-enol fueron muy semejantes a los obtenidos cuando los vinos se doparon con SP. Por lo tanto, podemos afirmar que el método desarrollado permite determinar de manera semi-cuantitativa residuos de SP como la suma de SP+SP-enol. Por otro lado, el LOD visual (vLOD) de este inmunoensayo, definido como la concentración de analito que produce una disminución casi total de la señal de la línea test, se puede establecer en 1000 ng/mL (**Figuras 4.20 y 4.21**). Estos resultados demuestran la validez del inmunoensayo de flujo lateral desarrollado para detectar de manera rápida y sencilla muestras de vinos con residuos del insecticida SP a niveles equivalentes a los LMR, tal y como establece la legislación vigente en la Unión Europea.

PARTE II. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS PARA ANATOXINA-A

4.10. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados

Los cuatro mAbs disponibles en el laboratorio (ANm#38, ANm#39, ANm#44 y ANm#325) para anatoxina-a se ensayaron mediante ELISA competitivo bidimensional. La evaluación de la afinidad de los mAbs hacia anatoxina-a se llevó a cabo en base a los valores de IC₅₀ obtenidos con el trazador homólogo (HRP-ANm) en el formato directo y el formato de captura, ya que el trazador de ANc no fue reconocido. Además, basándose en un estudio preliminar los cuatro anticuerpos se ensayaron frente al conjugado heterólogo OVA-ANc en el formato indirecto debido a que fue el conjugado con el que se observó mayor sensibilidad hacia la cianotoxina en este formato. Como habitualmente, para cada combinación anticuerpo/conjugado se determinaron las condiciones óptimas para obtener una curva estándar con el menor valor de IC₅₀ y cuyo valor de A_{máx} fuese superior a 0.8 y lo más cercano posible a 1.0.

4.10.1. Formato de anticuerpo inmovilizado y anticuerpo de captura con detección directa

Para el formato de anticuerpo inmovilizado se empleó una disolución de mAb a 1000 ng/mL en tampón de tapizado, pH 9.6, para el recubrimiento de la superficie de los pocillos de la placa ELISA. En el formato de anticuerpo de captura, la placa ELISA se pretapizó con una disolución de GAM a 1000 ng/mL en el mismo tampón, y las disoluciones de mAb estudiadas se prepararon a 300, 500 y 1000 ng/mL. Para la etapa de competición se emplearon disoluciones de trazador enzimático a 30 y 100 ng/mL. Cada una de las combinaciones resultantes se ensayó frente a un conjunto de patrones de (+)-anatoxina-a preparados por dilución en serie del primer patrón, más un blanco.

Tabla 4.20. Caracterización de anticuerpos monoclonales de anatoxina-a mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo y de captura con conjugado homólogo (n=3).^a

mAb	Formato directo			Formato de captura		
	[mAb] ^b	[HRP-ANm] ^c	IC ₅₀ ^d	[mAb]	[HRP-ANm]	IC ₅₀
ANm#38	1000	30	8.42	500	30	3.61
ANm#39	1000	30	11.0	300	100	4.24
ANm#44	1000	100	5.91	300	30	2.15
ANm#325	1000	30	8.66	1000	30	3.50

^a Los valores de A_{máx} fueron mayores de 0.8. ^b Concentración del anticuerpo en ng/mL. ^c Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/mL. ^d Valores expresados en nM.

La información extraída de las curvas de inhibición obtenidas permitió establecer las concentraciones óptimas de inmunorreactivos para lograr la mayor sensibilidad, relacionada con la afinidad del anticuerpo hacia el analito y hacia el conjugado. De esta manera, se evaluaron los cuatro mAbs disponibles para anatoxina-a con el trazador homólogo, obteniéndose los resultados resumidos en la **Tabla 4.20**.

Los resultados obtenidos demuestran que todos los mAbs presentaron una elevada afinidad hacia la (+)-anatoxina-a, con valores de IC_{50} del orden de nanomolar. La sensibilidad de los inmunoensayos fue mayor en formato de captura que en formato directo. Además, en general el consumo de anticuerpo y/o de trazador enzimático fue menor también en dicho formato. El anticuerpo ANm#44 aportó los ensayos más sensibles para (+)-anatoxina-a en ambos formatos, con valores de IC_{50} entre 2 y 6 nM. Con estos resultados, se escogió los inmunoensayos con los anticuerpos ANm#38 y ANm#44 en formato de captura para llevar a cabo estudios posteriores de caracterización fisicoquímica y validación con muestras.

4.10.2. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

En el formato indirecto, la caracterización de mAbs mediante ELISA competitivo se realizó con el conjugado heterólogo OVA-ANc a partir de disoluciones en tampón de tapizado a tres concentraciones (30, 100 y 1000 ng/mL), y en la etapa de competición se evaluaron disoluciones de anticuerpo a tres concentraciones distintas (30, 100 y 1000 ng/mL) frente a una serie de disoluciones patrón de (+)-anatoxina-a, más un blanco. Los resultados obtenidos a partir de este estudio se resumen en la **Tabla 4.21**.

Tabla 4.21. Caracterización de anticuerpos monoclonales de anatoxina-a mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugado heterólogo (n=3).^a

mAb	[mAb] ^b	[OVA-ANc] ^c	IC_{50} ^d
ANm#38	100	100	3.52
ANm#39	25	300	3.26
ANm#44	50	2000	1.37
ANm#325	1000	30	4.78

^a Los valores de $A_{m\acute{a}x}$ fueron mayores de 0.8. ^b Concentración del anticuerpo en ng/mL. ^c Concentración de conjugado de OVA expresada en ng/mL. ^d Valores expresados en nM.

Tal y como se esperaba, todos los mAbs fueron capaces de reconocer al hapteno heterólogo en gran medida. Los valores de IC_{50} obtenidos fueron muy semejantes con los cuatro anticuerpos. Cabe señalar que las concentraciones óptimas de conjugado OVA-ANc con el anticuerpo ANm#44 y de anticuerpo ANm#325 fueron elevadas. Finalmente, los

inmunoensayos con los anticuerpos ANm#39 y ANm#44 fueron seleccionados en este formato para continuar con los estudios de caracterización fisicoquímica y validación con muestras.

4.11. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales y la selectividad de los inmunoensayos seleccionados

La especificidad de los mAbs de anatoxina-a se evaluó en ELISA competitivo en el formato de anticuerpo de captura con el trazador homólogo. En todos los casos se emplearon las condiciones óptimas determinadas para cada combinación anticuerpo/trazador. Para ello se determinó la RC frente al enantiómero (-)-anatoxina-a y los análogos (+)-homoanatoxina-a y (-)-homoanatoxina-a con respecto a (+)-anatoxina-a. Los resultados obtenidos se recogen en la

Tabla 4.22.

Tabla 4.22. Reactividad cruzada (%) de los anticuerpos monoclonales en formato de captura con trazador homólogo (n=3).

Analito	ANm#38		ANm#39		ANm#44		ANm#325	
	IC ₅₀ (nM)	RC (%)						
(+)-Anatoxina-a	3.61	100	4.24	100	2.15	100	3.50	100
(-)-Anatoxina-a	1045	0.35	1124	0.38	643	0.33	990	0.35
(+)-Homoanatoxina-a	2.54	142	2.75	154	1.84	117	2.13	164
(-)-Homoanatoxina-a	417	0.87	441	0.96	316	0.68	332	1.05

Los cuatro anticuerpos monoclonales fueron altamente específicos del enantiómero dextrógiro de cada toxina, con valores de RC con el levógiro por debajo del 1% mayoritariamente. Además, todos ellos reconocieron ligeramente mejor la (+)-homoanatoxina-a que la propia (+)-anatoxina-a, un resultado lógico dada la estructura del hapteno ANm.

Dado que no se disponía de estándares analíticos de otras cianotoxinas, la evaluación de la selectividad de los inmunoensayos seleccionados frente a sustancias potencialmente presentes en muestras de agua se limitó a la (+)-homoanatoxina-a. La RC de los inmunoensayos seleccionados en formato indirecto con conjugado heterólogo fue semejante a la referida en la **Tabla 4.22** como cabía esperar, ya que la RC de los anticuerpos monoclonales es independiente del formato y del conjugado de ensayo.

4.12. Caracterización de inmunoensayos tipo ELISA

Siguiendo la misma mecánica de trabajo realizada en la Parte I de la presente tesis doctoral con los mAbs del insecticida SP, se llevó a cabo la caracterización de inmunoensayos en microplaca para anatoxina-a. Se caracterizaron cuatro inmunoensayos tipo ELISA

competitivo, dos en formato de captura (mAbs ANm#38 y ANm#44 con el trazador homólogo HRP-ANm) y dos en indirecto (mAbs ANm#39 y ANm#44 con el conjugado heterólogo OVA-ANc). Se evaluaron factores fisicoquímicos como el pH, la fuerza iónica y la presencia de disolventes orgánicos (metanol y acetonitrilo) que pueden afectar de manera directa la sensibilidad (IC_{50}) y la señal máxima ($A_{m\acute{a}x}$) del inmunoensayo. Se tomó como tampón de referencia el PBS (pH 7.4 y fuerza iónica 162 mM). El estudio de estos factores ayuda al proceso de optimización conociendo así las características del ensayo y estableciendo las condiciones más idóneas para el mismo.

4.12.1. Estudio de la influencia del pH y de la fuerza iónica

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones patrón de (+)-anatoxina-a en agua MilliQ y se mezclaron con disoluciones del inmunorreactivo de competición en tampón fosfato, cubriendo valores de pH de 6.0, 6.5, 7.0, 7.4 y 8.5, y concentraciones de NaCl en el rango desde 25 hasta 250 mM. Al preparar los tampones con diferente pH, la fuerza iónica se igualó mediante la adición de NaCl. Los patrones de analito se prepararon en agua MilliQ y el trazador enzimático o el anticuerpo se prepararon en cada uno de los tampones ensayados. Estas disoluciones tampón fueron preparadas de tal manera que mantuvieran en todos los casos la concentración del tampón fosfato (10 mM) en ensayo. Las **Figuras 4.22 y 4.23**, representan la variación relativa de los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} observada en cada uno de los inmunoensayos competitivos seleccionados para anatoxina-a respecto a los valores obtenidos en PBS.

En los ensayos con formato de captura (**Figura 4.22**) no se observaron variaciones de la $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} en el intervalo de pH ensayado, revelándose de este modo la robustez de estos inmunoensayos a cambios de pH. Asimismo, el aumento de la fuerza iónica no presentó cambios importantes ni en la $A_{m\acute{a}x}$ ni en la IC_{50} con el anticuerpo ANm#38, y tan solo produjo un ligero aumento de la IC_{50} a valores extremos con el anticuerpo ANm#44. Por otro lado, a bajas concentraciones de NaCl tanto la $A_{m\acute{a}x}$ como la IC_{50} del ensayo con ANm#38 disminuyeron, mientras que la $A_{m\acute{a}x}$ aumentó y la IC_{50} disminuyó en el ensayo con ANm#44.

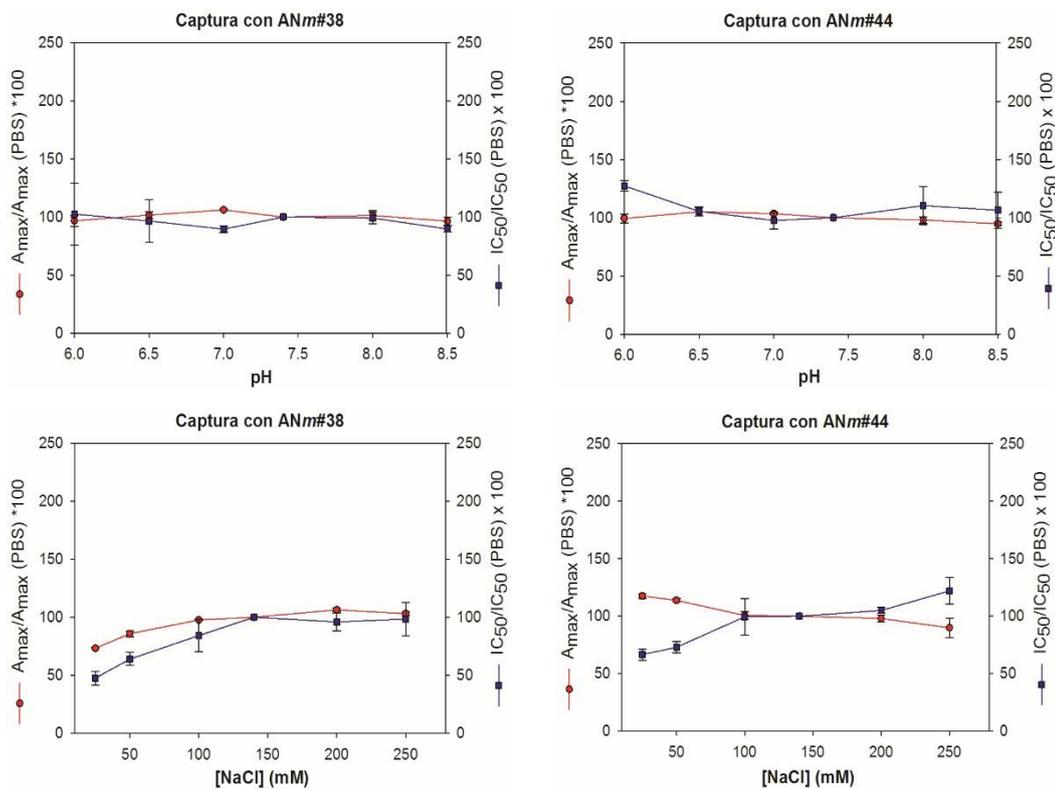


Figura 4.22. Influencia del pH y de la concentración de NaCl en la etapa de competición sobre los valores de $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} en los ensayos seleccionados para anatoxina-a en formato directo con captura con los anticuerpos ANm#38 y ANm#44. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres experimentos independientes.

En el formato indirecto (**Figura 4.23**) se observaron diferencias importantes de comportamiento frente al pH y la fuerza iónica entre los inmunoensayos seleccionados. La $A_{m\acute{a}x}$ y la IC_{50} del inmunoensayo con el anticuerpo ANm#39 disminuyeron en la misma medida conforme aumentó el pH del tampón. En cambio, el inmunoensayo con ANm#44 se reveló más robusto en el intervalo de pH estudiado. Las diferencias más relevantes se encontraron en el estudio de la fuerza iónica. Mientras que el inmunoensayo con ANm#39 fue sensible a la variación de la concentración de NaCl, el ensayo con ANm#44 solo vio modificada la $A_{m\acute{a}x}$ y la IC_{50} a los valores más extremos ensayados.

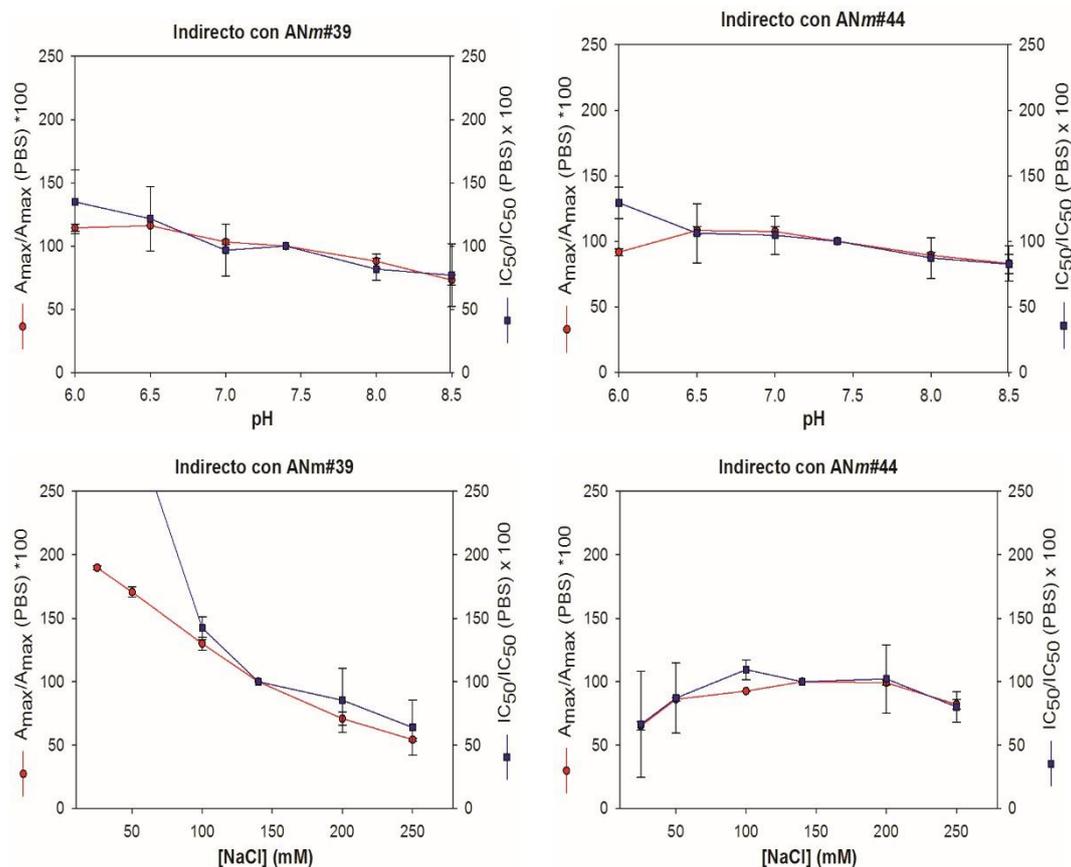


Figura 4.23. Influencia del pH y de la concentración de NaCl en la etapa de competición sobre los valores de $A_{máx}$ e IC_{50} en el ensayo indirecto para anatoxina-a. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres experimentos independientes.

4.12.2. Tolerancia a disolventes orgánicos

Dependiendo de las condiciones en que pudiera encontrarse anatoxina-a podría ser necesario aplicar procesos de extracción mediante disolventes orgánicos. Por ello se realizó un estudio de tolerancia de los inmunoensayos seleccionados a la presencia de disolventes de extracción habituales como son el metanol y acetonitrilo. Este estudio se realizó preparando los patrones de (+)-anatoxina-a en agua MilliQ conteniendo diferentes concentraciones del disolvente orgánico a evaluar, mientras que las disoluciones del trazador enzimático para los ensayos de captura y las de los anticuerpos para los ensayos indirectos se realizaron en PBS2x-T. Las **Figuras 4.24** y **4.25** resumen el efecto de ambos disolventes sobre las características analíticas de los inmunoensayos en los diferentes formatos.

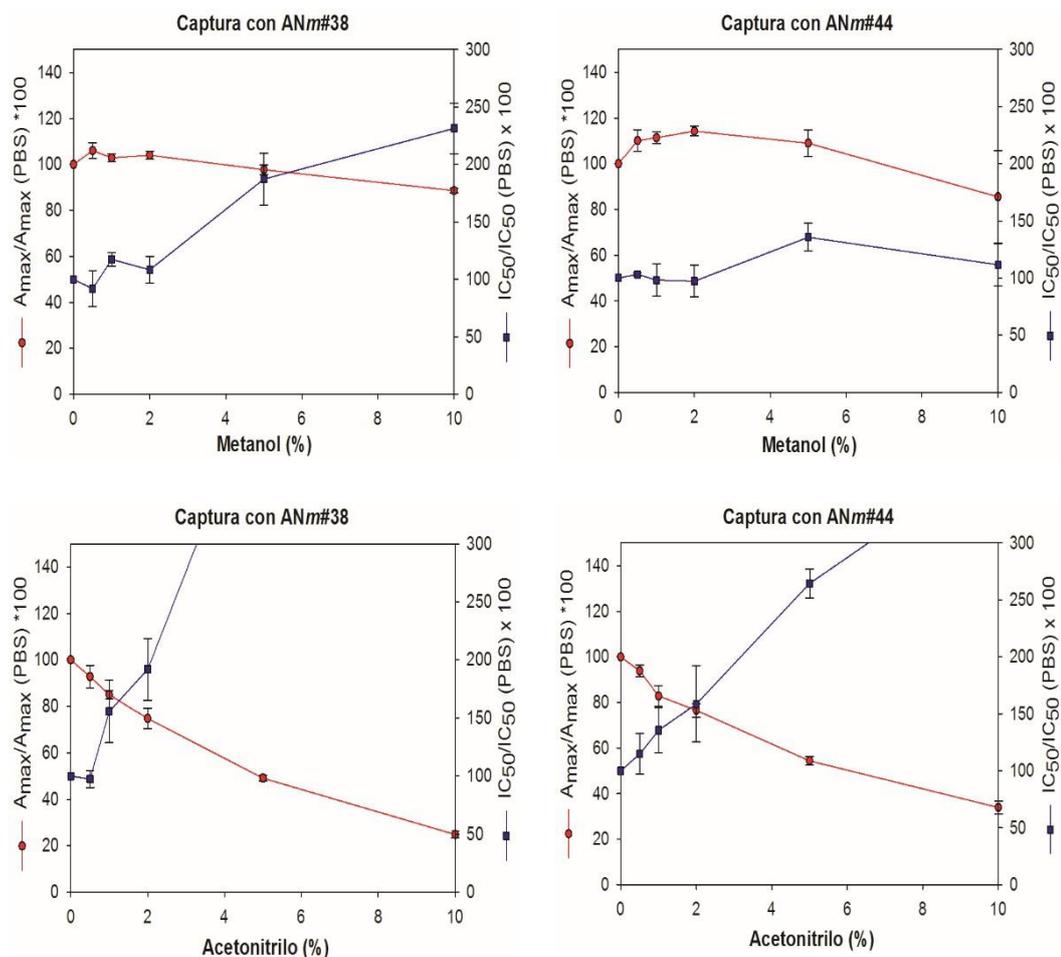


Figura 4.24. Tolerancia a los disolventes orgánicos en la etapa de competición sobre los valores de la $A_{máx}$ e IC_{50} en el ensayo de captura para anatoxina-a. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

En cuanto a los ensayos en formato de captura (**Figura 4,24**), se observó una mayor tolerancia al metanol que al acetonitrilo. El anticuerpo ANm#38 resultó tolerar hasta un 2% de metanol, en cambio el anticuerpo ANm#44 toleró hasta un 10% de metanol con pocas variaciones en la $A_{máx}$ y la IC_{50} . Por el contrario, ninguno de los dos inmunoensayos toleró mucho más de un 0.5% de acetonitrilo, como es habitual con este disolvente.

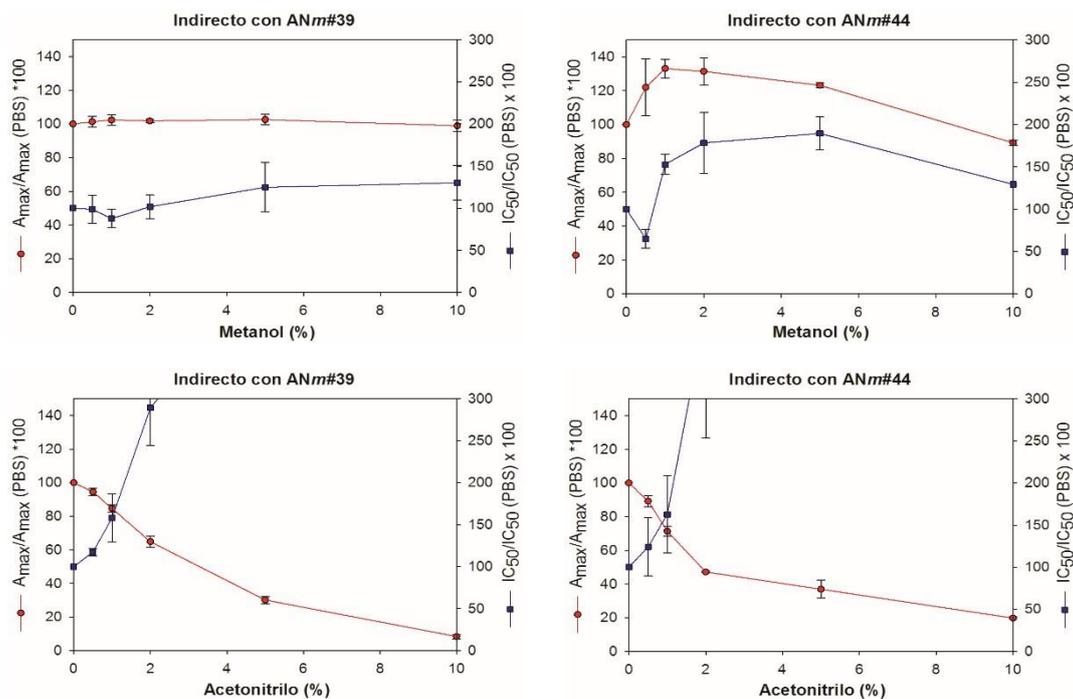


Figura 4.25. Tolerancia a los disolventes orgánicos en la etapa de competición sobre los valores de la $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} en el ensayo indirecto para anatoxina-a. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

En cuanto a los inmunoensayos seleccionados en formato indirecto (**Figura 4.25**), el anticuerpo ANm#39 resultó ser muy tolerante a la presencia del disolvente metanol, mientras que con el anticuerpo ANm#44 la variación de la $A_{m\acute{a}x}$ y la IC_{50} fue mayor a 1% que a 10% de metanol. De igual manera que en los ensayos con el anterior formato, el disolvente acetonitrilo fue muy mal tolerado disminuyendo rápidamente la $A_{m\acute{a}x}$ y aumentando la IC_{50} .

4.13. Validación de inmunoensayos tipo ELISA

El objetivo de un inmunoensayo es que pueda ser empleado como método analítico para la determinación del compuesto en estudio en muestras. Por ello, una vez caracterizados y optimizados los ensayos seleccionados, fue necesario demostrar su aplicabilidad mediante el análisis de muestras en las que esté presente el compuesto de interés.

4.13.1. Obtención de muestras

Para proceder con la validación de los inmunoensayos desarrollados se emplearon cuatro muestras de agua de diferente procedencia (agua de cisterna, agua de balsa de riego, agua de lago y agua de río). Dadas las características de estas muestras, se decidió hacer una etapa de filtración con el objetivo de eliminar cualquier partícula en suspensión, obteniendo una

muestra más limpia para ser ensayada. Las aguas fueron filtradas utilizando filtros Millipore Millex-HV hidrófilos de PVDF de 0.45 μm de poro, y después se guardaron a 4 $^{\circ}\text{C}$ para posteriormente ser ensayadas mediante los ELISA seleccionados en las condiciones y en los formatos establecidos previamente.

4.13.2. Evaluación del efecto matriz de muestras de agua

Para corregir el efecto matriz en los inmunoensayos desarrollados se decidió diluir la muestra en agua MilliQ. De este modo, se determinó la dilución mínima necesaria. Se ensayaron una serie de patrones de (+)-anatoxina-a en presencia de diferentes diluciones de cada matriz estudiada, para posteriormente comparar los parámetros de las curvas estándar obtenidas con los de la curva estándar obtenida en ausencia de matriz. Cada muestra se diluyó en agua MilliQ a 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500, y con dichas diluciones se prepararon las disoluciones patrón. Las **Figuras 4.26** y **4.27** resumen los resultados del efecto matriz sobre la $A_{\text{máx}}$ (gráficos situados a la izquierda) y la IC_{50} (gráficos situados a la derecha).

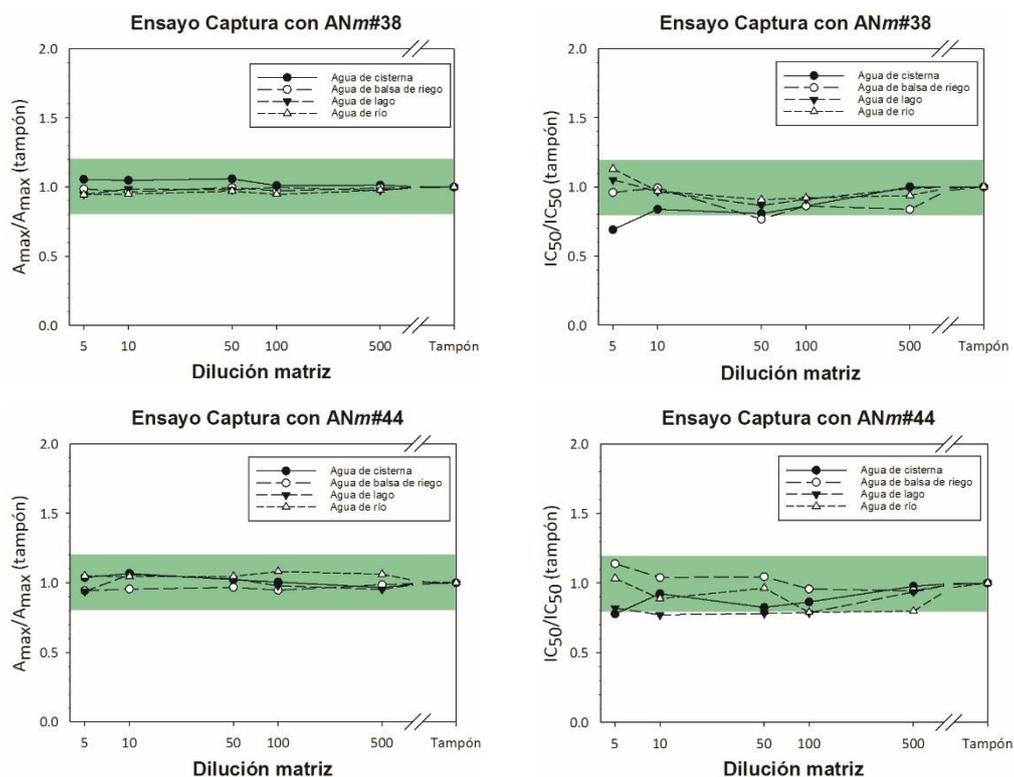


Figura 4.26. Efecto matriz de diferentes tipos de aguas sobre los parámetros analíticos de los inmunoensayos seleccionados en formato directo con captura para anatoxina-a. El fondo resaltado en verde corresponde al intervalo $\pm 20\%$ de variación.

En los ensayos en formato de captura (**Figura 4.26**) para anatoxina-a no se observó efecto matriz de ninguna de las cuatro muestras de agua sobre la $A_{m\acute{a}x}$ ni sobre la IC_{50} , incluso a bajas diluciones en la mayoría de las muestras, en ninguno de los dos inmunoensayos evaluados.

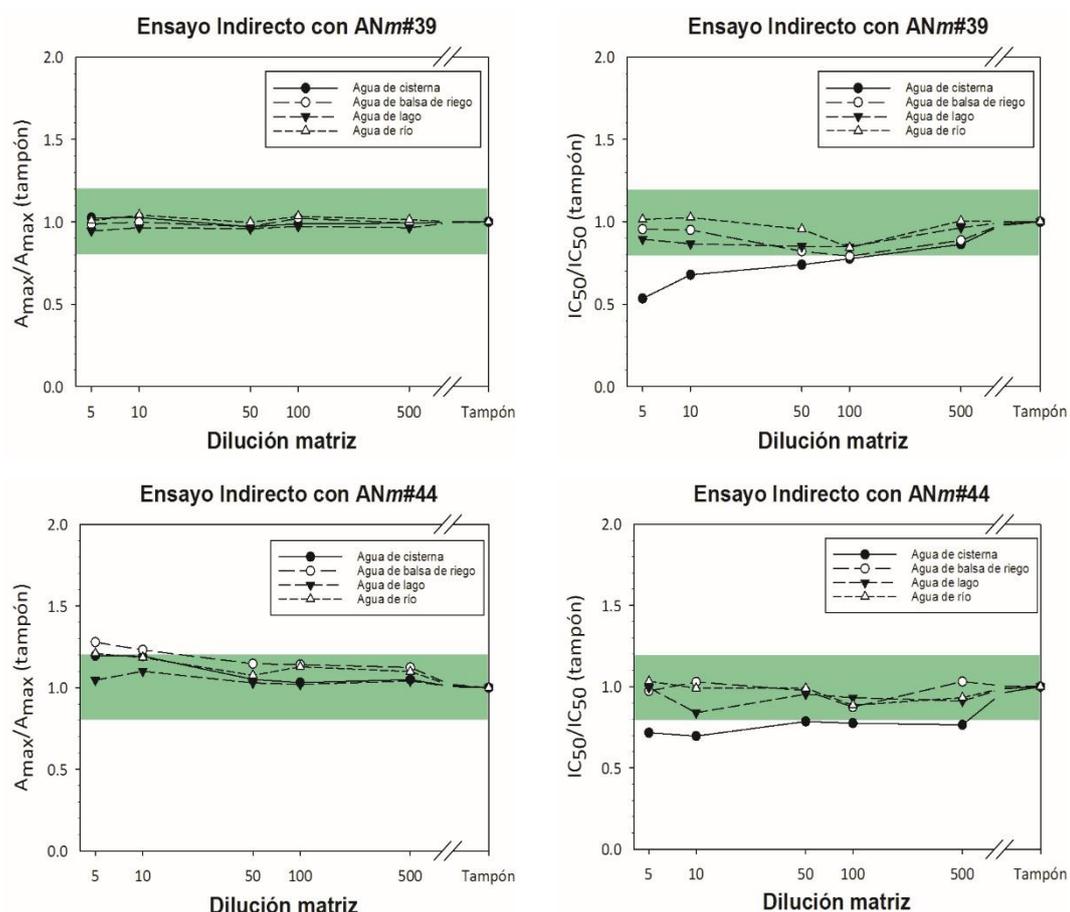


Figura 4.27. Efecto matriz de diferentes tipos de aguas sobre los parámetros analíticos de los inmunoensayos seleccionados en formato indirecto para anatoxina-a. El fondo resaltado en verde corresponde al intervalo $\pm 20\%$ de variación.

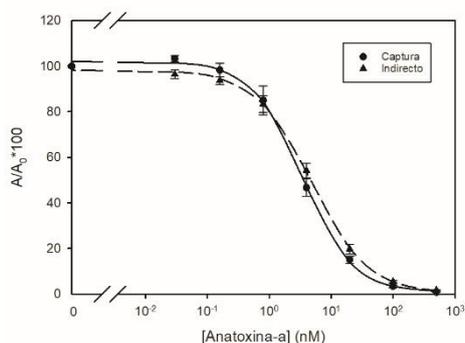
Finalmente, en los ensayos de formato indirecto (**Figura 4.27**) para anatoxina-a tampoco se observó efecto matriz de las muestras de agua ensayadas sobre la $A_{m\acute{a}x}$ de ninguno de los ensayos estudiados. Respecto a la IC_{50} se observó un ligero efecto matriz en el agua de cisterna en ambos inmunoensayos.

4.13.3. Curva estándar y parámetros analíticos

De los cuatro inmunoensayos caracterizados, se seleccionaron dos en formatos diferentes para su validación con muestras: el de captura con el anticuerpo ANm#38 y el indirecto con el

anticuerpo ANm#39. En la **Tabla 4.23** se muestran las curvas estándar obtenidas en condiciones optimizadas y se enumeran las condiciones de ensayo y los parámetros analíticos que los caracterizan.

Tabla 4.23. Condiciones de ensayo y parámetros analíticos de los inmunoensayos optimizados para anatoxina-a (n=4).



Formato mAb	Directo con captura ANm#38	Indirecto ANm#39
Conjugado	500 ng/mL HRP-ANm	25 ng/mL OVA-ANc
Tampón de ensayo	70 ng/mL 10 mM fosfato, pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20	300 ng/mL 10 mM fosfato, pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20
$A_{m\acute{a}x}$	1.136 ± 0.108	1.072 ± 0.058
IC_{50} (nM)	3.411 ± 0.562	4.814 ± 0.661
IC_{50} (ng/mL)	0.688 ± 0.113	0.971 ± 0.133
Pendiente	-1.083 ± 0.127	-0.962 ± 0.083
A_{min}	0.009 ± 0.013	0.003 ± 0.012
LOD (ng/mL) (IC_{10})	0.093 ± 0.033	0.099 ± 0.022
Rango dinámico (ng/mL) (IC_{20} - IC_{90})	0.191-5.776	0.228-9.921
Precisión entre días		
$A_{m\acute{a}x}$ (%)	9.5	5.5
IC_{50} (%)	16.5	13.7
Precisión intradía		
$A_{m\acute{a}x}$ (%)	10.6	3.7
IC_{50} (%)	6.0	1.7

Ambos inmunoensayos mostraron valores de IC_{50} en el orden de nanomolar y pendientes de aproximadamente 1.0, y con rangos dinámicos de más de un orden de magnitud. Los valores de LOD calculados para estos ensayos estuvieron alrededor de 0.1 ng/mL. Finalmente, la precisión de los parámetros $A_{m\acute{a}x}$ e IC_{50} fue muy buena, tanto en medidas entre días como intradía, particularmente con el ensayo indirecto.

4.13.4. Análisis de muestras fortificadas

La determinación de la precisión y exactitud del método se llevó a cabo mediante un estudio de recuperaciones en muestras fortificadas. Para ello, de los cuatro inmunoensayos caracterizados, se seleccionaron dos en formatos diferentes: el de captura con el anticuerpo ANm#38 y el indirecto con el anticuerpo ANm#39. En primer lugar, se doparon las cuatro muestras de agua con cantidades conocidas de (+)-anatoxina-a (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 ng/mL). Seguidamente, las muestras dopadas fueron diluidas 5 y 100 veces en agua MilliQ, y se analizaron mediante los inmunoensayos desarrollados comparando las concentraciones encontradas respecto a las reales mediante el cálculo de los coeficientes de recuperación. Se consideró como límite de cuantificación la concentración más baja ensayada con la que se obtuvo una recuperación en el intervalo de 80% a 120%, y a su vez con un coeficiente de variación inferior al 20%. La **Tabla 4.24** recoge los valores de recuperaciones encontrados en los ensayos seleccionados para anatoxina-a en formato de captura e indirecto.

En todas las muestras de agua, ambos ensayos mostraron una elevada capacidad para cuantificar anatoxina-a entre 0.5 y 10 ng/mL con una dilución de 5 veces, y entre 25 y 500 ng/mL con una dilución de 100 veces, con valores de recuperación en el rango de 80-120% y coeficientes de variación inferiores al 20%. Por lo tanto, el límite de cuantificación de esta toxina con los dos inmunoensayos evaluados se puede establecer en 0.5 ng/mL. Por lo tanto, los inmunoensayos desarrollados son completamente válidos para monitorizar la presencia de dicho contaminante a concentraciones realmente bajas en muestras de agua de manera sencilla y rápida.

Tabla 4.24. Valores de recuperación y coeficientes de variación obtenidos con muestras fortificadas para los ensayos competitivos de captura e indirecto (n = 3).

Muestra	[A] ^a	f.d. ^b	Ensayo de captura		Ensayo Indirecto	
			R ^c (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Agua de cisterna	0.5	5	117.4	9.9	103.8	7.8
	1.0	5	103.3	5.1	92.9	5.9
	2.5	5	98.0	9.4	95.9	8.9
	5.0	5	94.8	8.9	96.5	14.1
	10	5	95.1	11.6	nr ^d	
	25	100	93.1	4.6	89.6	4.8
	50	100	94.2	8.1	89.2	8.9
	100	100	89.8	5.6	90.6	12.7
	250	100	90.9	14.6	97.3	14.7
	500	100	85.9	19.7	100.2	9.9
Agua de balsa de riego	0.5	5	107.7	14.7	109.9	11.9
	1.0	5	105.3	9.8	101.1	10.5
	2.5	5	98.5	10.1	98.5	7.9
	5.0	5	95.2	9.1	99.1	8.8
	10	5	93.1	7.4	nr	
	25	100	91.2	11.0	88.7	7.8
	50	100	100.9	10.1	87.3	6.0
	100	100	96.6	10.3	85.9	4.1
	250	100	95.8	11.0	91.9	2.2
	500	100	90.9	14.9	88.8	5.4
Agua de lago	0.5	5	106.4	15.7	101.2	9.9
	1.0	5	92.1	11.2	94.8	8.9
	2.5	5	96.3	2.9	94.4	12.3
	5.0	5	94.8	4.7	98.8	11.8
	10	5	98.3	6.6	nr	
	25	100	96.2	8.8	82.9	8.7
	50	100	102.4	3.3	86.6	10.0
	100	100	98.8	8.6	90.2	10.9
	250	100	102.1	10.4	95.7	9.8
	500	100	100.8	13.7	98.6	3.9
Agua de río	0.5	5	112.3	15.4	105.9	7.4
	1.0	5	86.3	13.8	94.1	5.3
	2.5	5	99.1	11.8	92.1	7.3
	5.0	5	100.1	8.0	93.5	8.2
	10	5	97.1	5.6	nr	
	25	100	102.2	17.2	84.1	5.4
	50	100	104.7	11.5	86.3	8.9
	100	100	97.5	6.6	82.0	11.9
	250	100	96.4	3.1	85.2	7.8
	500	100	95.3	8.7	86.9	11.4

^a Concentración de analito en ng/mL. ^b Factor de dilución de la matriz en agua MilliQ. ^c Valores de recuperación. ^d Determinaciones no realizadas.

4.14. Desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral

4.14.1. Preparación de las tiras y del anticuerpo marcado con oro coloidal

EL procedimiento de preparación para la línea control de las tiras se llevó a cabo dispensando sobre la membrana de nitrocelulosa una disolución de GAM a 1 mg/mL, mientras que para la línea de test con el conjugado BSA-ANc a dos concentraciones, 0.5 y 1 mg/mL. La dispensación de GAM y del conjugado sobre la tira se llevó a cabo empleando disoluciones de cada inmunorreactivo en tampón fosfato de elevada fuerza iónica ($I = 373$ mM). Por otro lado, el bioconjugado NP-mAb se preparó añadiendo pequeños volúmenes de dilución del mAb ANm#38 sobre la preparación diluida de las NPs, e incubando a temperatura ambiente. La dilución del anticuerpo se preparó en Biostab (0.1 mg/mL) diluyendo directamente del lote que se encontraba precipitado en SAS a 1 mg/mL. Las NPs con GAM se diluyeron 1/10 en HEPES 10 mM, pH 7.4. Se ensayaron tres concentraciones de anticuerpo (500, 1000 y 2000 ng/mL). El volumen final en el pocillo de dicha mezcla donde ocurrió la reacción anticuerpo-analito fue de 100 μ L.

4.14.2. Optimización del ensayo

En primer lugar, se ensayaron diferentes volúmenes de la preparación del conjugado NP-mAb (entre 10 y 25 μ L) que se mezclaron con la disolución que contenía (+)-anatoxina-a a una determinada concentración en PBS, hasta alcanzar un volumen total de 100 μ L. Se leyó la señal con ayuda de un escáner y se representó el cociente de la señal de las líneas test y control (T/C) y el porcentaje de inhibición en función del volumen de coloide de NPs empleado. Las **Figuras 4.28, 4.29 y 4.30** resumen los resultados cuando el estudio se llevó a cabo en presencia de 0.8 y 4 ng/mL de (+)-anatoxina-a, más un blanco.

Según se muestra en la **Figura 4.28**, en ausencia de analito, el cociente T/C fue prácticamente constante, mientras que el valor de T/C a 0.8 ng/mL de anatoxina-a aumentó al aumentar la cantidad de NPs debido principalmente al incremento de la señal de la línea test. La mayor inhibición a 0.8 ng/mL de analito se obtuvo con 10 μ L de preparado de NP-mAb; sin embargo, se optó por utilizar 20 μ L para poder tener una buena lectura *de visu*. En estas condiciones se obtuvo una inhibición en torno al 50% cuando la reacción se realizó con 0.8 ng/mL de analito. Con 4 ng/mL, la inhibición fue prácticamente total, como se puede observar en la fotografía situada a la derecha. En cambio, a 0.8 ng/mL la intensidad de la línea control fue claramente superior a la de la línea test.

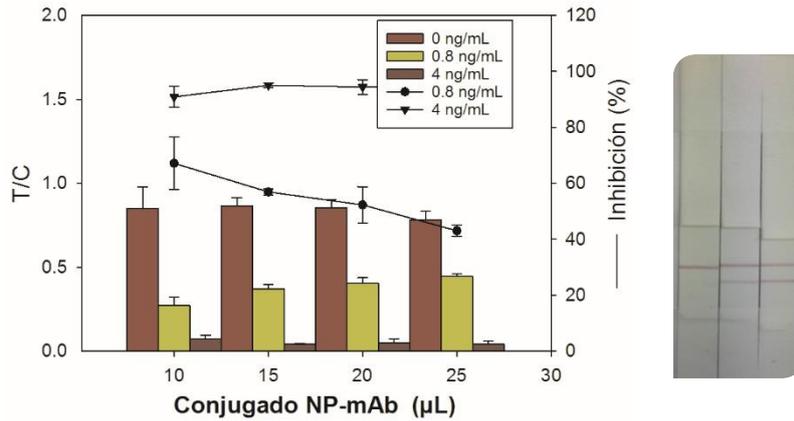


Figura 4.28. Variación del cociente T/C y del porcentaje de inhibición para las distintas cantidades de NP-mAb ensayadas. Las concentraciones de analito son en ensayo. En la fotografía de la derecha se muestra el resultado obtenido con 20 µL de preparación de conjugado NP-mAb a, de izquierda a derecha, 4, 0.8 y 0 ng/mL de anatoxina-a.

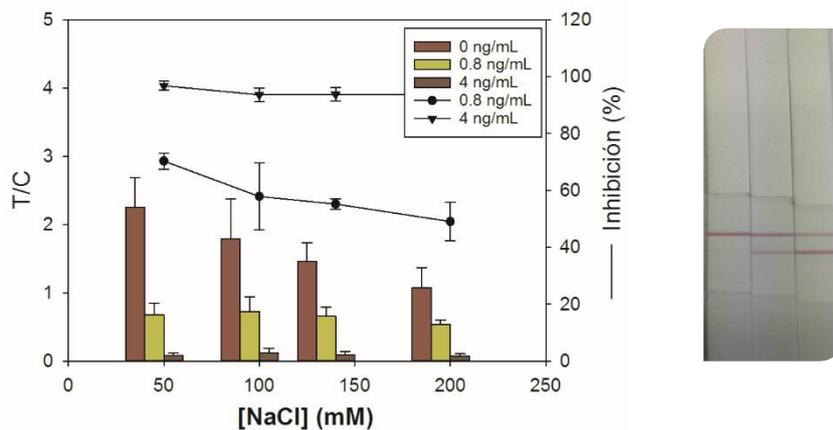


Figura 4.29. Variación del cociente T/C y del porcentaje de inhibición en función de la concentración de NaCl en el tampón. Las concentraciones de analito son en ensayo. En la fotografía de la derecha se muestra el resultado obtenido con un tampón que contenía 50 mM de NaCl y, de izquierda a derecha, 4, 0.8 y 0 ng/mL de anatoxina-a.

Asimismo, se llevó a cabo un estudio de la influencia de la fuerza iónica, empleando tampones fosfato 10 mM, pH 7.4, con NaCl a 50, 100, 140 y 200 mM. El estudio se realizó en presencia de (+)-anatoxina-a a 0.8 y 4 ng/mL, más un blanco (**Figura 4.29**). En este estudio se observó un efecto negativo creciente al aumentar la concentración de NaCl. A 50 mM de NaCl el valor de T/C en ausencia de analito fue mayor, ya que se obtuvo la mayor señal en la línea test. Dicha concentración de NaCl, la mínima estudiada, fue óptima ya que el porcentaje de inhibición a 0.8 ng/mL de anatoxina-a fue el más elevado. Por otro lado, el aumento de la concentración de NaCl disminuyó ligeramente el valor T/C en presencia de dicha concentración

de analito. A 4 ng/mL la inhibición fue prácticamente completa a cualquier concentración de NaCl ensayada, como se puede observar a modo de ejemplo en la fotografía de la derecha.

Definida la concentración de NaCl en 50 mM para el tampón fosfato 10 mM, se llevó a cabo el estudio de la influencia del pH. Para esto se prepararon varios tampones fosfato con valores de pH de 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 y 8.5, manteniendo constante la fuerza iónica, y posteriormente se ensayaron de manera simultánea en las condiciones fijadas previamente frente a dos concentraciones de (+)-anatoxina-a, más un blanco (**Figura 4.30**).

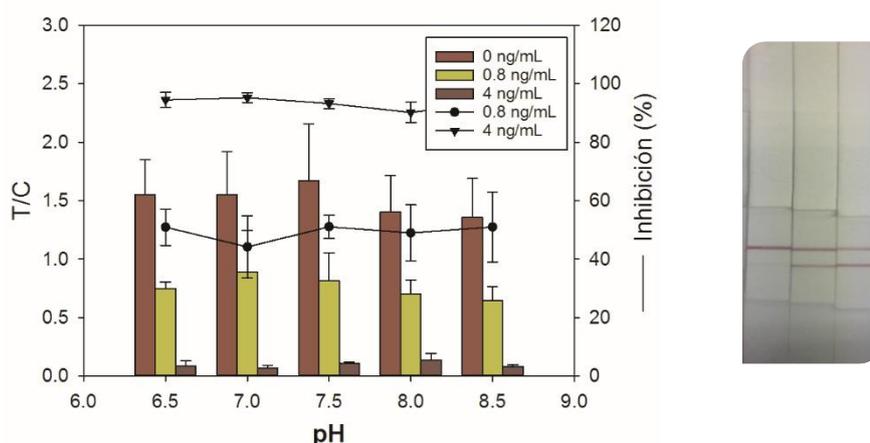


Figura 4.30. Variación del cociente T/C y del porcentaje de inhibición para los distintos valores de pH ensayados. Las concentraciones de analito son en ensayo. En la fotografía de la derecha se muestra el resultado obtenido con un tampón de pH 7.4 conteniendo, de izquierda a derecha, 4, 0.8 y 0 ng/mL de anatoxina-a.

Según este estudio se observa que la variación del pH en el rango estudiado no tuvo influencia sobre el cociente de la señal de las líneas test y control del inmunoensayo, así como sobre el porcentaje de inhibición a dos concentraciones de anatoxina-a. Bajo estas condiciones se observó una inhibición cercana al 50% con 0.8 ng/mL de analito. De esta manera, el tampón fosfato 10 mM, pH 7.4, con 50 mM de NaCl podría considerarse como el tampón óptimo para el análisis de anatoxina-a mediante el inmunoensayo desarrollado.

En conclusión, el inmunoensayo de flujo lateral optimizado para la determinación de anatoxina-a utilizará tiras inmunocromatográficas preparadas con GAM (línea control) y con el conjugado BSA-ANc (línea test), como se ha descrito anteriormente. La fase móvil constará de una mezcla de 20 μ L de preparación de bioconjugado NP-mAb (OD = 1.0), preparado a una concentración de anticuerpo de 1 μ g/mL, y de 80 μ L de muestra diluida en tampón. Antes de insertar la tira reactiva, la mezcla se deberá incubar 5 min a temperatura ambiente. La cromatografía se desarrollará durante 10 min en posición vertical, y para finalizar el ensayo se

retirará la almohadilla de muestra. Previo a la lectura de la señal de cada línea, como se ha descrito con anterioridad, se deberá secar la membrana con un flujo de aire a temperatura ambiente.

En la **Figura 4.31**, se presenta un ejemplo de la variación de la señal de las líneas test y control, así como la variación del cociente T/C en función de la concentración de analito. Bajo estas condiciones, y a partir de la curva de inhibición de T/C para anatoxina-a, la media de los valores de IC_{50} de cinco experimentos independientes fue de 0.6 ng/mL. En este estudio se pudo observar una cierta dependencia de la señal de la línea control, de modo que, aunque su señal es menor, sigue presentando señal incluso en ausencia de analito cuando la señal de la línea test es máxima.

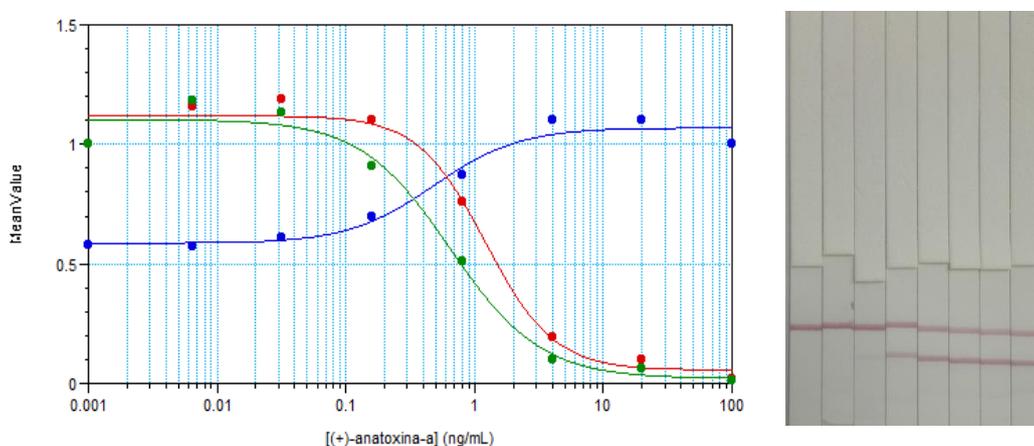


Figura 4.31. Variación de la señal de la línea control (azul), línea test (rojo) y del cociente T/C (verde) en función de la concentración de anatoxina-a. A la derecha se muestran las tiras reactivas después del ensayo en orden decreciente, de izquierda a derecha, de concentración de analito a, 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032, 0.006 y 0 ng/mL.

4.14.3. Validación con diferentes tipos de agua

La validación del inmunoensayo de flujo lateral desarrollado para el análisis de anatoxina-a en muestras de agua se llevó a cabo siguiendo las directrices de la UE para la validación de métodos de cribado semi-cuantitativos para determinar pequeñas moléculas orgánicas (Regulación (EU) No 519/2014). Cada una de las muestras de agua filtrada se fortificó a 1 y 2 ng/mL con (+)-anatoxina-a. Las muestras se diluyeron 1/2 con tampón fosfato 20 mM, pH 7.4, con 100 mM NaCl y 0.05% (v/v) Tween-20, y cada dilución (80 μ L) se mezcló con la preparación de conjugado NP-mAb (20 μ L). El ensayo se llevó a cabo, con las cuatro muestras dopadas y con un blanco, una vez al día durante cinco días consecutivos (n=20). La señal de las líneas test y control se utilizó para determinar el cociente T/C. La **Figura 4.32** representa los valores

obtenidos de T/C para las cuatro muestras sin analito y a los dos niveles de fortificación mencionados.

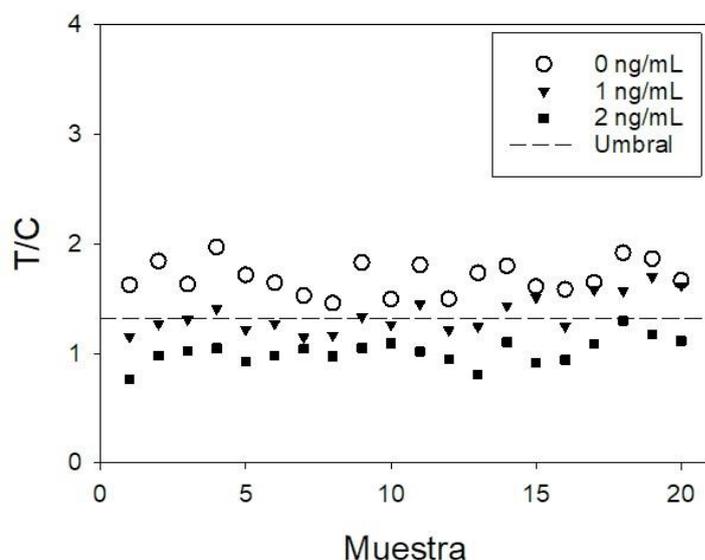


Figura 4.32. Valores de T/C y umbral de corte para muestras de agua que contienen anatoxina-a a 1 y 2 ng/mL, y sin la toxina.

El valor promedio del cociente T/C y el CV obtenido con las muestras de agua libres de toxina fueron de 1.69 y 8.7%, respectivamente. Los correspondientes valores alcanzados con las muestras contaminadas con anatoxina-a a 1 y 2 ng/mL se muestran en la **Tabla 4.25**. El análisis estadístico de *t*-Student de los valores de T/C indicó que, si consideramos una concentración de cribado (STC) de 1 ng/mL y un intervalo de confianza del 95%, el umbral de corte de la señal es de 1.7. No obstante, con dicho umbral casi un 38% de muestras sin cianotoxina se clasificarían como sospechosas de contener anatoxina-a (falsos sospechosos). En cambio, si el umbral de T/C se establece en un valor de 1.3, el ensayo permite distinguir como positiva una muestra con 2 ng/mL de dicha cianotoxina con una probabilidad en ambos sentidos del 99%; es decir, con tan solo un 1% de falsos negativos y con un 1% de falsos sospechosos. Además, con dicho umbral, el 41% de las muestras con 1 ng/mL serían etiquetadas como sospechosas (datos en negrita en la **Tabla 4.25**), lo que aumentaría la probabilidad de detectar muestras que contienen anatoxina-a.

Tabla 4.25. Validación del inmunoensayo de flujo lateral para anatoxina-a en muestras de agua (n = 20).

	STC ^a	STC
	1 ng/mL	2 ng/mL
Valor promedio de T/C	1.4	1.0
CV (%)	12.4	11.8
Umbral (1% falsos negativos)	1.8	1.3
Falsos sospechosos (%) del cero	72.2	1.0
Falsos sospechosos (%) de 1 ng/mL	-	41.3
Falsos negativos parciales (%) de 2 ng/mL	0.00	-
Umbral (5% falsos negativos)	1.7	1.2
Falsos sospechosos (%) del cero	37.6	0.2
Falsos sospechosos (%) de 1 ng/mL	-	21.6
Falsos negativos parciales (%) de 2 ng/mL	0.00	-

^a Concentración de cribado, del inglés "Screening Target Concentration".

El inmunoensayo con tiras reactivas desarrollado permite analizar de manera semi-cuantitativa la presencia de anatoxina-a a bajas concentraciones en tan solo 10 min. Cualquier muestra que aporte un valor de T/C inferior a 1.3 será sospechosa de contener esta cianotoxina. La cuantificación exacta y precisa de dichas muestras se podría llevar a cabo mediante uno de los ELISA competitivos desarrollados en este estudio.

Finalmente, como se puede ver en la **Figura 4.33**, el límite de detección visual (vLOD) – definido como la mínima cantidad de analito que produce un cambio evidente a simple vista de las señales del ensayo – fue de 3 ng/mL, lo que valida el inmunoensayo desarrollado para su utilización *in situ* como método cualitativo de análisis.

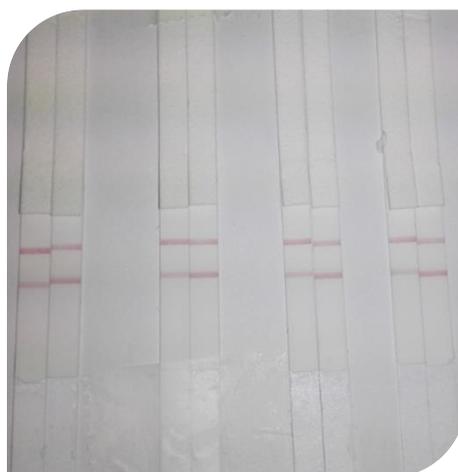


Figura 4.33. Límite de detección visual para, de izquierda a derecha, agua de cisterna, balsa de riego, lago y río, a 3 ng/mL (tira de la izquierda) y 0 ng/mL (tira de la derecha) de anatoxina-a.

5. CONCLUSIONES

En general, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral demuestran que el principal objetivo se pudo cumplir, ya que se desarrollaron inmunoensayos tipo ELISA competitivo y LFIA para el análisis del insecticida spirotetramat en alimentos, y para la cianotoxina anatoxina-a en agua. Dichos inmunoensayos proporcionaron una elevada sensibilidad y selectividad, con exactitud y precisión a niveles comparables a los métodos analíticos establecidos, y con límites de cuantificación o concentración de cribado adecuados a la legislación europea.

Se observó que la especificidad de los anticuerpos policlonales generados se dirigió principalmente hacia el metabolito spirotetramat-enol, si bien spirotetramat también fue reconocido en determinadas condiciones. Los estudios con anticuerpos policlonales permitieron seleccionar los conjugados de los haptenos *SPo* y *SPm* como candidatos más idóneos para la inmunización de animales y la generación de anticuerpos monoclonales. Además, estos estudios condujeron al diseño de un nuevo hapteno heterólogo (*SPh*) que fue fundamental para el desarrollo de inmunoensayos de elevada sensibilidad para el análisis de spirotetramat.

Se ha demostrado la aptitud de dos anticuerpos monoclonales (*SPo*#237 y *SPm*#23) en el desarrollo de inmunoensayos tipo ELISA en diferentes formatos para la determinación de residuos de spirotetramat, con valores de IC_{50} en el orden de subnanomolar. Como era de esperar en base a los resultados con policlonales, los anticuerpos monoclonales también reconocieron spirotetramat-enol con mayor afinidad que spirotetramat.

Se ha puesto a punto un procedimiento de hidrólisis controlada de spirotetramat para transformarlo de manera rápida y cuantitativa en spirotetramat-enol, y así poder cuantificar simultáneamente en forma de spirotetramat-enol los residuos de este insecticida en muestras de alimentos, tal y como exige la legislación europea para la determinación de residuos de spirotetramat con fines de control de calidad en alimentos de origen vegetal.

Los inmunoensayos tipo ELISA competitivo desarrollados permiten la cuantificación de spirotetramat, spirotetramat-enol y mezclas de ambos compuestos de manera exacta y precisa, con límites de cuantificación de 2.5 ng/mL en uva, zumo de uva y vinos, tanto blancos como tintos. Estos valores están muy por debajo de los límites máximos de residuos establecidos en la legislación europea para spirotetramat en uva (2000 ng/mL), lo que demuestra la aplicabilidad de los inmunoensayos desarrollados.

Se ha validado un inmunoensayo tipo ELISA competitivo en formato directo con anticuerpo de captura para la cuantificación de residuos del insecticida spirotetramat en forma de spirotetramat-enol en muestras de uva, empleando muestras ciegas contaminadas con spirotetramat en un amplio rango de concentración y mediante comparación de los resultados con los obtenidos con un método analítico de referencia como es HPLC-MS/MS.

Adicionalmente, se ha desarrollado un inmunoensayo de tipo LFIA para el análisis rápido y portátil de residuos de spirotetramat en muestras de vino, con un tratamiento sencillo de la muestra, de manera que se permite identificar visualmente, como la suma de spirotetramat más spirotetramat-enol, muestras contaminadas a una concentración de cribado de 1000 ng/mL – equivalente al límite máximo de residuos europeo extrapolable a este alimento –, y ajustándose al intervalo de confianza del 95% exigido por la legislación para métodos de cribado semi-cuantitativos.

En el caso de anatoxina-a, se han desarrollado inmunoensayos en diferentes formatos de ELISA competitivo con valores de IC_{50} del orden de nanomolar. Estos inmunoensayos reconocieron el esteroisómero natural de anatoxina-a y el de su análogo, la homoanatoxina-a, pero no los correspondientes isómeros levógiros no naturales, demostrando la elevada estereoespecificidad de los anticuerpos monoclonales de nuestra colección.

Mediante el análisis de muestras de agua de diferente procedencia fortificadas con anatoxina-a, y sin más tratamiento de muestra que una simple filtración, se demostró la capacidad de los inmunoensayos desarrollados para el análisis de esta toxina con elevada exactitud y precisión, y con un límite de cuantificación de 0.5 ng/mL, en ensayo ELISA competitivo tanto en formato directo como indirecto.

Finalmente, se ha desarrollado un inmunoensayo tipo LFIA para el análisis rápido y semi-cuantitativo de la cianotoxina anatoxina-a en muestras de agua de diferente procedencia, con un umbral de corte instrumental que permite detectar muestras con 2 ng/mL de dicha toxina con una fiabilidad del 99%, y muestras con 1 ng/mL con una probabilidad del 40%, mientras que el límite de detección visual fue de 3 ng/mL.

6. REFERENCIAS

1. Pérez, B.S. Residuos y contaminantes de los alimentos. In A. de número de la R.A. de Farmacia, p. 46.
2. Cassarett L Doull J. The basic science of poisons. *Toxicol.* **1975**. DOI: 10.1136/oem.33.4.282-b.
3. FAO. Definición plaguicidas. <http://www.fao.org/3/W1604S/w1604s04.htm#TopOfPage>. Published 1990.
4. Del Puerto A, Suárez S, Palacio D. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* **2014**, 52(3), 372-387.
5. OMS & OPS. La Salud En Las Américas. Washington DC, 2, **2002**.
6. Ramírez J, Lacasaña M. Plaguicidas : clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor.* **2001**, 4(2), 67-75.
7. Cisneros F. Control de Plagas Agrícolas. **1995**:304.
8. Krämer W, Schirmer U, Jeschke P, Witschel M. *Modern Crop Protection Compounds.* **2011**.
9. Krämer W, Schirmer U. Modern Crop Protection Compounds. **2008**, 1, DOI: 10.1002/9783527619580.
10. Kuck K, Gisi U. FRAC Mode of Action Classification and Resistance Risk of Fungicides. **2008**.
11. García J. Mecanismo de acción de los fungicidas. *Rev Vent al Campo.* **2011**, 193-202.
12. Viennot-Bourgin C. FARC Mode of Action Classification and Resistance Risk of Fungicides. **1985**.
13. Kuck A, Heinz K, Leadbeater A. FRAC Mode of Action Classification and Resistance Risk of Fungicides. **2012**.
14. Still I, Drewery M. Synthesis of 2-Butenolide and Tetronic Acid Analogues of Thiolactomycin. *J Org Chem.* **1989**, 54(2), 290-295. DOI:10.1021/jo00263a007.
15. Salazar N, Aldana M, Silveira M, Aguiar J. Spirotetramat — An Alternative for the Control of Parasitic Sucking Insects and its Fate in the Environment. *Insectic Resist.* **2016**. DOI:10.5772/61322.
16. Falcón M, Silveira M, Robles R, Canett R, Ramos R, López G, Rodríguez G, Gutiérrez L, Aldana M. Spirotetramat induce cambios histológicos y bioquímicos en rata wistar. *Rev Toxicol.* **2013**, 30(2), 215-217.
17. Casida J. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22(4), 609-619 DOI:10.1021/tx8004949.
18. Nauen R, Bretschneider T. New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook.* **2002**, 13(6), 241-245. DOI:10.1039/b211171n.
19. Nauen R, Reckmann U, Thomzik J, Thielert W. Biological profile of spirotetramat

- (Movento)-a new two way systemic (amimobile) insecticide against sucking pests
 Studies on the susceptibility of *Tuta absoluta* to novel and diamide insecticides View
 project Biological profile of spirotetramat (Movento®. *Bayer Crop J.* **2007**, 61(February
 2015). <https://www.researchgate.net/publication/267198550>.
20. Ponce G, Cantú P, Flores A, Badii M, Zapata R, López B, Fernández I. Modo de acción de los insecticidas. *Rev Salud Publ Nutr.* **2006**, 7(4).
 21. Assessment C for RECA. *Background Document to the Opinion Proposing Harmonised Classification and Labelling at Community Level of Spirotetramat (ISO).* **2013**.
 22. Rosell M. NTP 725: Seguridad en el laboratorio: Almacenamiento de productos químicos. **2001**.
 23. OMS. Consecuencias Sanitarias Del Empleo de Plaguicidas En La Agricultura. Ginebra; **1992**.
 24. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance spirotetramat. *EFSA J.* **2013**, 11(6), 1-90. DOI:10.2903/j.efsa.2013.3243.
 25. Abdourahime H, Anastassiadou M, Brancato A, Brocca D, Carrascto L, De Lentdecker C, Ferreira L, Greco L, Jarrah S, Kardassi D, Leuschner R, Lostia A, Lythgo C, Medina P, Miron I, Molnar T, Nave S, Pedersen R, Raczky M, Reich H, Ruocco S, Sacchi A, Santos M, Stanek A, Sturma J, Tarazona J, Theobald A, Vagenende B, Verani A, Villamar L. Modification of the existing maximum residue levels for spirotetramat in various crops. *EFSA J.* **2019**, 17(1), 1-27. DOI:10.2903/j.efsa.2019.5589.
 26. Aldana-Madrid M. Dissipation of spirotetramat and spirotetramat-enol in leaf and fruit of grape variety red globe (*Vitis Vinifera* L). **2015**.
 27. FAO. Pesticide Residues in Food. **2015**. Genova.
 28. Hacker K, Bauer N, Schüle E, Wieland M, Scherbaum E. Pesticide Residues in Wine : Organic versus Conventional. **2010**.
 29. Elizondo A, Murgido C. Control químico spirotetramat , nuevo insecticida para el control. *Fitosanidad.* **2010**, 14(4), 229-234.
 30. Salifu A, Grogan K, Spreen T, Roka F. Economic analysis of strategies to combat HLB in Florida citrus *J Chem Inf Model.* **2013**, 53(9), 1689-1699. DOI:10.1017/CBO9781107415324.004.
 31. Hamido S, Morgan K, Kadyampakeni D. The effect of huanglongbing on young citrus tree water use. *Horttechnology.* **2017**, 27(5), 659-665. DOI:10.21273/HORTTECH03830-17.
 32. Commission The. L 312/28. **2013**, 11 (1177).
 33. EFSA. *Modification of the Existing Maximum Residue Levels for Spirotetramat in Varius Crops.* **2016**.
 34. Kotak B, Zurawell R. Cyanobacterial toxins in Canadian freshwaters: A review. *Lake Reserv Manag.* **2007**, 23(2), 109-122. DOI:10.1080/07438140709353915.
 35. Spivak C, Waters J, Witkop B, Albuquerque EX. Potencies and channel properties induced by semirigid agonists at frog nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.*

- 1983, 23(2), 337-343.
36. Devlin J, Edwards O, Gorham P, Hunter N, Pike R, Stavric B. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can. J. Chem.* **1977**, 1367, 1-5.
 37. Graham J, Loftin K, Meyer M, Ziegler A. Cyanotoxin Mixtures and Taste-and-Odor Compounds in Cyanobacterial Blooms from the Midwestern United States. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44(19), 7361-7368. DOI: 10.1021/es1008938.
 38. Gugger M, Lenoir S, Berger C, Ledreux A, Druart J, Humbert J, Guette C, Bernard C. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon.* **2005**, 45(7), 919-928. DOI:10.1016/j.toxicon.2005.02.031.
 39. Rodriguez I, Alfonso C, Alfonso A, Otero P, Meyer T, Breitenbach U, Botana L. Toxin profile in samples collected in fresh and brackish water in Germany. *Toxicon.* **2014**, 91, 35-44. DOI:10.1016/j.toxicon.2014.10.018.
 40. Giannuzzi L, Sedan D, Echenique R, Andrinolo D. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar Drugs.* **2011**, 9(11), 2164-2175. DOI:10.3390/md9112164.
 41. Hitzfeld C, Höger S, Dietrich D. Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ Health Perspect.* **2000**, 108(1), 113-122. DOI:10.2307/3454636.
 42. Paerl H. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnol Oceanogr.* **1988**, 33(4), 823-843. DOI:10.4319/lo.1988.33.4part2.0823.
 43. Uriza E, Martínez A, Sanjurjo M. Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiologica.* **2017**, 27(2), 241-251.
 44. Matuła J, Pietryka M, Richter D, Wojtuń B. Cyanoprokaryota and algae of arctic terrestrial ecosystems in the Hornsund area, Spitsbergen. *Polish Polar Res.* **2007**, 28(4), 283-315.
 45. Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon.* **2010**, 56(5), 813-828. DOI:10.1016/j.toxicon.2009.07.036.
 46. Reyes G. Síntesis de haptenos y bioconjugados de anatoxina-a para el desarrollo de métodos inmunoquímicos. **2016**.
 47. Aráoz R, Nghiêm H, Rippka R, Palibroda N, Tandeau de Marsac N, Herdman M. Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: Coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology.* **2005**, 151(4), 1263-1273. DOI:10.1099/mic.0.27660-0.
 48. Bumke C, Mailahn W, Chorus I. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environ Toxicol.* **1999**, 14(1), 117-125. DOI:10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<117::AID-TOX15>3.0.CO;2-V.
 49. Lehtimäki J. Characterisation of Cyanobacterial Strains Originating from the Baltic Sea with Emphasis on *Nodularia* and Its Toxin. *Nodularin.* **2000**.
 50. Meriluoto J, Blaha L, Bojadzija G, Bormans M, Brient L, Codd G, Drobac D, Faasen E,

- Fastner J, Hiskia A, Ibelings B, Kaloudis T, Kokocinski M, Kurmayer R, Pantelié D, Quesada A, Salmaso N, Tokodi N, Triantis T, Visser P, Svireev Z. Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in European waters - recent progress achieved through the CYANOCOST action and challenges for further research. *Adv Oceanogr Limnol.* **2017**, *8*(1), 161-178. DOI:10.4081/aiol.2017.6429
51. Hardy J. Washington State Recreational Guidance for Microcystins (Provisional) and Anatoxin-a (Interim/Provisional). **2008**, (July): 1-19. <http://www.doh.wa.gov/Portals/1/Documents/4400/334-177-recguide.pdf>.
 52. Ibelings B, Backer L, Kardinaal W, Chorus I. Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. *Harmful Algae.* **2015**, *49*, 63-74. DOI: 10.1016/j.hal.2014.10.002.
 53. Ibelings B, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater seafood and its consequences for public health: A review. *Environ. Pollut.* **2007**, *150*(1), 177-192. PubMed: 17689845.
 54. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Espectrometría de absorción atómica (AAS). **2012**, 33-39.
 55. Juan A, Picó Y, Font G. Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Rev Toxicol.* **2003**, *20*(3), 166-175.
 56. Mohapatra S, Deepa M, Lekha S, Nethravathi B, Radhika B, Gourishanker S. Residue dynamics of spirotetramat and imidacloprid in/on mango and soil. *Bull Environ Contam Toxicol.* **2012**, *89*(4), 862-867. DOI:10.1007/s00128-012-0762-0.
 57. Chahil G, Mandal K, Sahoo S, Singh B. Risk assessment of mixture formulation of spirotetramat and imidacloprid in chilli fruits. *Environ Monit Assess.* **2015**, *187*(1). DOI:10.1007/s10661-014-4105-y.
 58. Singh B, Mandal K, Kumar S, Bhardwaj U, Singh R. Development and validation of an HPLC method for determination of spirotetramat and spirotetramat cis enol in various vegetables and soil. *J AOAC Int.* **2013**, *96*(3), 670-675. DOI:10.5740/jaoacint.11-185.
 59. Mohapatra S, Kumar S, Prakash S. Residue evaluation of imidacloprid, spirotetramat, and spirotetramat-enol in/on grapes (*Vitis vinifera* L.) and soil. *Environ Monit Assess.* **2015**, *187*(10). DOI:10.1007/s10661-015-4859-x.
 60. Azevedo J, Osswald J, Guilhermino L, Vasconcelos V. Development and validation of an SPE-HPLC-FL method for the determination of anatoxin-a in water and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anal Lett.* 2011, *44*(8), 1431-1441. DOI:10.1080/00032719.2010.512682.
 61. Aráoz R, Guérineau V, Rippka R, Palibroda N, Herdman M, Laprevote O, Döhren H, Marsac N, Erhard M. MALDI-TOF-MS detection of the low molecular weight neurotoxins anatoxin-a and homoanatoxin-a on lyophilized and fresh filaments of axenic *Oscillatoria* strains. *Toxicon.* **2008**, *51*(7), 1308-1315. DOI:10.1016/j.toxicon.2008.02.018.
 62. Vasas G, Gáspár A, Páger C, Surányi G, Máthé C, Hamvas M, Borbely G. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* **2004**, *25*(1), 108-115. DOI:10.1002/elps.200305641.
 63. Kaminski A, Bober B, Lechowski Z, Bialczyk J. Determination of anatoxin-a stability

- under certain abiotic factors. *Harmful Algae*. **2013**, *28*, 83-87. DOI:10.1016/j.hal.2013.05.014.
64. Fernández González A, Guardia L. Reconocimiento molecular mediante materiales biomiméticos: impresión molecular. *An la Real Soc Española Química*. **2007**, *103*(2):14-22.
 65. Edwards A. Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. *Genetics*. **2000**, *154*(4), 1419-1426.
 66. Nilsson G, Simon J, Yalow R, Berson S. Plasma gastrin and gastric acid responses to sham feeding and feeding in dogs. *Gastroenterology*. **1972**, *63*(1), 51-59 DOI: 10.1016/S0016-5085(19)33348-7.
 67. Berson S, Yalow R, Aurbach G, Potts J. Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci*. **1963**, *49*(5), 613-617. DOI:10.1073/pnas.49.5.613.
 68. Vijay H, Mendoza C, Lavergne G. Production of homocytotropic antibodies (IgE) to malathion in the Rat. *Toxic and Applied Pharmac*. **1978**, *44*(1), 137-142. DOI:10.1016/0041-008X(78)90292-2.
 69. Jung F, Jane S, Harrison R, Goodrow M, Karu A, Braun A, Li Q, Hammock B. Use of immunochemical techniques for the analysis of pesticides. *Pestic Sci*. **1989**, *26*(3), 303-317. DOI:10.1002/ps.2780260309.
 70. Ercegovich C, Vallejo R, Gettig R, Woods L, Bogus E, Mumma R. Development of a radioimmunoassay for parathion. *J Agric Food Chem*. **1981**, *29*(3), 559-563. DOI:10.1021/jf00105a032.
 71. Engvall E, Perlmann P. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*. **1989**, *16*.
 72. Schuurs A, Weemen B. Enzyme-immunoassay. *Clin Chim Acta*. **1977**, *81*(1), 1-40. DOI:10.1016/0009-8981(77)90410-7.
 73. Nichkova M, Marco M. A High-Throughput screening immunochemical protocol for biological exposure assessment of chlorophenols in urine samples. *Pestic Protoc*. **2006**, *19*, 133-145. DOI:10.1385/1-59259-929-x:133.
 74. Michanie S. Métodos alternativos, precisos y rápidos para el control microbiológico de alimentos. *Methods*. **2005**, *71*, 64-71.
 75. Fundora H, Puig Y, Chiroles S, Rodríguez A, Gallardo J, Milián Y. Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. **2013**, *51*(1), 84-96.
 76. Koo J, Chan K, Suk O, Young S, Hammock B. Development of an ELISA for the detection of the residues of the insecticide imidacloprid in agricultural and environmental samples. *J Agric Food Chem*. **2001**, *49*(5), 2159-2167. DOI:10.1021/jf001140v.
 77. Calatayud P, Calatayud F, Simó E, Picó Y. Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environ Pollut*. **2018**, *241*, 106-114. DOI:10.1016/j.envpol.2018.05.062.
 78. Shreder K. Synthetic haptens as probes of antibody response and immunorecognition.

- Methods*. **2000**, 20(3), 372-379. DOI:10.1006/meth.1999.0929.
79. Mercader J V., Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Synthesis of site-heterologous haptens for high-affinity anti-pyraclostrobin antibody generation. *Org Biomol Chem*. **2011**, 9(5), 1443-1453. DOI:10.1039/c0ob00686f.
 80. Mercader J V., Parra J, Esteve-Turrillas F, Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Development of monoclonal antibody-based competitive immunoassays for the detection of picoxystrobin in cereal and oilseed flours. *Food Control*. **2012**, 26(1), 162-168. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.01.021.
 81. Kindt T. *Inmunología de Kuby*. Mc Graw-Hill, ed. Sexta. **2007**, 23, 697. DOI:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
 82. Wang S, Allan R, Skerritt J, Kennedy I. Development of a Class-Specific Competitive ELISA for the Benzoylpheylurea Insecticides. *J Agric Food Chem*. **1998**, 46(8), 3330-3338. DOI:10.1021/jf9800920.
 83. Stoddard PJ. *Immunochemical Assays*. **1989**, 51-57. DOI:10.1021/bk-1989-0442.ch006.
 84. Ceballos-Alcantarilla E, Abad-Fuentes A, Aloisio V, Agulló C, Abad-Somovilla A, Mercader J V. Haptens, bioconjugates, and antibodies for penthiopyrad immunosensing. *Analyst*. **2014**, 139(21), 5358-5361. DOI:10.1039/c4an00828f.
 85. Abad A, Manclús J, Mojarrad F, Mercader J, Miranda M, Primo J, Guardiola, Montoya A. Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to DDT and Related Compounds. *J Agric Food Chem*. **1997**, 45(9), 3694-3702. DOI:10.1021/jf704219.
 86. Gueguen F, Boisdé F, Queffelec A, Haelters J, Thouvenot D, Corbel B, Nodet P. Hapten Synthesis for the Development of a Competitive Inhibition Enzyme-Immunoassay for Thiram. *J Agric Food Chem*. **2000**, 48(10), 4492-4499. DOI:10.1021/jf0003378g.
 87. De Voer R, Van Der Klis F, Engels C, Rijkers G, Sanders E, Berbers G. Development of a Fluorescent-Bead-Based Multiplex Immunoassay to Determine Immunoglobulin G Subclass Responses to *Neisseria meningitidis* Serogroup A and C Polysaccharides. *Clin Vaccine Immunol*. **2008**, 15(8), 1188-1193. DOI:10.1128/CVI.00478-07.
 88. García A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*. **2011**, 26(5):301-306. DOI:10.1016/j.nrl.2010.10.005.
 89. O'Kennedy R. *Rapid Antibody-Based Technologies in Food Analysis*. Cambridge, **2019**, 343.
 90. Ayyar B, Arora S, Murphy C, O'Kennedy R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*. **2012**, 56(2), 116-129. DOI:10.1016/j.ymeth.2011.10.007.
 91. De Marco A. Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. *Microb Cell Fact*. **2015**, 14(1), 1-17. DOI:10.1186/s12934-015-0320-7.
 92. Arora S, Saxena V, Ayyar B. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods*. **2017**, 116, 84-94. DOI:10.1016/j.ymeth.2016.12.010.
 93. Little M, Kipriyanov S, Le F, Moldenhauer G. Of mice and men: Hybridoma and

- recombinant antibodies. *Immunol Today*. **2000**, 21(8), 364-370. DOI:10.1016/S0167-5699(00)01668-6.
94. Kahlert H, Cromwell O. Monoclonal antibodies. *Methods Mol Med*. **2008**, 138, 183-196. DOI:10.1016/b978-0-12-416974-6.00004-1.
 95. Nar B, Jun G, Siew Y, Beng E, Ismail A, Soon T. Principles and application of antibody libraries for infectious diseases. *Biotechnol Lett*. **2014**, 36(12), 2381-2392. DOI:10.1007/s10529-014-1635-x.
 96. Koivunen M, Krogsrud R. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Lab Med*. **2006**, 37(8), 490-497. DOI:10.1309/mv9rm1fdlwauwq3f.
 97. Crowther R. J. The ELISA Guidebook. New Jersey. **2001**.
 98. Liu X, Dai Q, Austin L, Coutts J, Knowles G, Zou J, Chen H, Huo Q. A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. *J Am Chem Soc*. **2008**, 130(9), 2780-2782. DOI:10.1021/ja711298b.
 99. Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, Giraudi G. Homogeneous immunoassay based on gold nanoparticles and visible absorption detection. *Anal Bioanal Chem*. **2009**, 394(2), 507-512. DOI:10.1007/s00216-009-2722-z.
 100. González-Techera A, Vanrell L, Last J, Hammock B, González-Sapienza G. Phage anti-immune complex assay: General strategy for noncompetitive immunodetection of small molecules. *Anal Chem*. **2007**, 79(20), 7799-7806. DOI:10.1021/ac071323h.
 101. Jiménez C, León D. Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Vitae*. **2009**, 16(1), 144-154.
 102. Barrio M. Desarrollo de (nano) biosensores enzimáticos de fluorescencia dirigidos a la monitorización mínimamente invasiva de glucosa. **2014**.
 103. Wood R. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Proc Phys Soc London*. **1901**, 18(1), 269-275. DOI:10.1088/1478-7814/18/1/325.
 104. Gibbs J. Immobilization Principles – Selecting the Surface. *Corning Inc Life Sci*. **2001**, (1), 1-8.
 105. Wright R, Dudas D, Gavin B, Dottavio D, Hexham J, Lake P. high-capacity alkaline phosphatase reporter system for the rapid analysis of specificity and relative affinity of peptides from phage-display libraries. *J Immunol Methods*. **2001**, 253(1-2), 223-232. DOI:10.1016/S0022-1759(01)00390-8.
 106. Light J, Lerner R. Phophabs: Antibody-phage-alkaline phosphatase conjugates for one step ELISAS without immunization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **1992**, 2(9), 1073-1078. DOI:10.1016/S0960-894X(00)80621-6.
 107. Langen H, Taylor J. Alkaline phosphatase-somatostatin hybrid proteins as probes for somatostatin-14 receptors. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. **1992**, 14(1), 1-9. DOI:10.1002/prot.340140103.
 108. Rosario López Moreno. Desarrollo de Métodos Inmunoquímicos para el Análisis de los

Fungicidas Estrobilurínicos Kresoxim-methyl y Trifloxystrobin. **2012.**

109. Shan G, Lipton C, Gee S, Hammock B. Immunoassay, biosensors and other nonchromatographic methods. *Handb residue Anal methods Agrochem.* **2002**, 623-679.
110. Suárez-Pantaleón C, Mercader J V., Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Production and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to forchlorfenuron. *J Agric Food Chem.* **2008**, 56(23), 11122-11131. DOI:10.1021/jf802261x.
111. Mercader J V., Suárez-Pantaleón C, Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to the strobilurin pesticide pyraclostrobin. *J Agric Food Chem.* **2008**, 56(17), 7682-7690. DOI:10.1021/jf801340u.
112. Mercader J V., Suárez-Pantaleón C, Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Hapten synthesis and monoclonal antibody-based immunoassay development for the detection of the fungicide kresoxim-methyl. *J Agric Food Chem.* **2008**, 56(5), 1545-1552. DOI:10.1021/jf073039x.
113. Mercader J V., Suárez-Pantaleón C, Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Hapten synthesis and monoclonal antibody-based immunoassay development for detection of the fungicide trifloxystrobin. *J Agric Food Chem.* **2008**, 56(8), 2581-2588. DOI:10.1021/jf800157s.
114. Moreno M, Abad A, Montoya A. Production of monoclonal antibodies to the N-methylcarbamate pesticide propoxur. *J Agric Food Chem.* **2001**, 49(1), 72-78. DOI:10.1021/jf0009596.
115. Parra J, Mercader J V., Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Synthesis of azoxystrobin transformation products and selection of monoclonal antibodies for immunoassay development. *Toxicol Lett.* **2012**, 210(2), 240-247. DOI:10.1016/j.toxlet.2011.07.030.
116. Eric Ceballos Alcantarilla. Desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis en alimentos de fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa. **2017.**
117. Shelver W, Keum Y, Kim H, Rutherford D, Hakk H, Bergman A, Li Q. Hapten syntheses and antibody generation for the development of a polybrominated flame retardant ELISA. *J Agric Food Chem.* **2005**, 53(10), 3840-3847. DOI:10.1021/jf047863m.
118. Zhe Y, Jung Y, Ah Y, Sung H, Hammock B, Tae Y. Development of ELISAs for the class-specific determination of organophosphorus pesticides. *J Agric Food Chem.* **2009**, 57(21), 10004-10013. DOI:10.1021/jf901998y.
119. Zhao L, Li J, Li Y, Wang T, Jin X, Wang K, Rahman E, Xing Y, Ji B, Zhou F. Preparation of monoclonal antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for ornidazole detection. *Food Chem.* **2017**, 229, 439-444. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.02.100.
120. Jee Y, Young A, Eun H, Yong T, Lee H. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the organophosphorus insecticide EPN. *J Agric Food Chem.* **2008**, 56(24), 11551-11559. DOI:10.1021/jf8019198.
121. Fang Y, Ming Y, Beier R, Tao H, Lei H, Gee S, Hammock B, Wang H, Wang Z, Sun X, Dong

- Y, Yi J, Lin Z. Immunochemical techniques for multianalyte analysis of chemical residues in food and the environment: A review. *TrAC - Trends Anal Chem.* **2017**, *88*, 25-40. DOI:10.1016/j.trac.2016.12.010.
122. Ahn K, Watanabe T, Gee S, Hammock B. Hapten and antibody production for a sensitive immunoassay determining a human urinary metabolite of the pyrethroid insecticide permethrin. *J Agric Food Chem.* **2004**, *52*(15), 4583-4594. DOI:10.1021/jf049646r.
123. Parra J, Mercader J V, Agulló C, Abad-fuentes A, Abad-Somovilla A. *Concise and Modular Synthesis of Regioisomeric Haptens for the Production of High-Affinity and Stereoselective Antibodies to the Strobilurin Azoxystrobin.* *Tetrahedron.* **2011**, *67*(3), 624-635. DOI:10.1016/j.tet.2010.11.054.
124. Esteve-Turrillas FA, Agulló C, Abad-Somovilla A, Mercader J V., Abad-Fuentes A. Fungicide multiresidue monitoring in international wines by immunoassays. *Food Chem.* **2016**, *196*, 1279-1286. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.102.
125. Xu Z, Deng H, Deng X, Yang J, Jiang Y, Zeng D, Huang F, Shen Y, Lei H, Wang H, Sun Y. Monitoring of organophosphorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC-MS/MS. *Food Chem.* **2012**, *131*(4), 1569-1576. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.10.020.
126. Sun J, Dong T, Zhang Y, Wang S. Development of enzyme linked immunoassay for the simultaneous detection of carbaryl and metolcarb in different agricultural products. *Anal Chim Acta.* **2010**, *666*(1-2), 76-82. DOI:10.1016/j.aca.2010.03.051.
127. Stanker L, Beier R. Introduction to Immunoassays for Residue Analysis: Concepts, Formats, and Applications. *ACS Symp Ser.* **1996**, 621.
128. Anastassiades M, Lehotay S, Štajnbaher D, Schenck F. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and. *J AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431. DOI:10.2478/s11687-011-0011-9.
129. Lehotay S, O'Neil M, Tully J, Valverde A, Contreras M, Mol H, Heinke V, Anspach T, Lach G, Fussell R, Mastovska K, Erecius M, Brown A, Hammack W, Marie J, Alder K, Lindtner K, Gamón M, Hopper M, De Kok A, Hiemstra M, Schechk F, Williams A, Parker A. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. *J AOAC Int.* **2007**, *90*(2), 485-520. DOI:10.1093/jaoac/90.2.1sup.
130. Fu Q, Liang J, Lan C, Zhou K, Shi C, Tang Y. Development of a novel dual-functional lateral-flow sensor for on-site detection of small molecule analytes. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *203*, 683-689. DOI:10.1016/j.snb.2014.06.043.
131. Yee C, Yong G, Lim A, Husni E, Yin S, Falero-Diaz G, Otero O, Rodríguez I, Reyes F, Acosta A, Sarmiento M, Ghosh S, Ramamurthy T, Yean C, Lalitha P, Ravichandran M. Dry-reagent gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for the simultaneous detection of *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139. *J Microbiol Methods.* **2011**, *86*(3), 277-282. DOI:10.1016/j.mimet.2011.04.020.
132. Bahadır E, Sezgintürk M. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC - Trends Anal Chem.* **2016**, *82*, 286-306. DOI:10.1016/j.trac.2016.06.006.
133. Andreo F, Domínguez J, Ruíz-Manzano J, Prat C, Blanco S, Lores L, Sánchez M, Latorre I, Giménez M, Ausina V. Usefulness of pneumococcal antigen detection in pleural fluid

- samples by immunochromatographic assay for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* **2006**, *12*, 682-684. DOI:10.1111/j.1469-0691.2006.01484.x.
134. Lönnberg M, Drevin M, Carlsson J. Ultra-sensitive immunochromatographic assay for quantitative determination of erythropoietin. *J Immunol Methods.* **2008**, *339*(2), 236-244. DOI:10.1016/j.jim.2008.09.022.
 135. Miyoshi-akiyama T, Narahara K, Mori S, Kitajima H, Kase T, Morikawa S, Kirikae T. Development of an Immunochromatographic Assay Specifically Detecting Pandemic H1N1 (2009) Influenza Virus. *J. Clin Microb.* **2010**, *48*(3), 703-708. DOI:10.1128/JCM.02262-09.
 136. Gandhi S, Caplash N, Sharma P, Raman C. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. *Biosens Bioelectron.* **2009**, *25*(2), 502-505. DOI:10.1016/j.bios.2009.07.018.
 137. Min Kim Y, Wook Oh S, Young Jeong S, Jin Pyo D, Yul Choi E. Development of an Ultrarapid One-Step Fluorescence Immunochromatographic Assay System for the Quantification of Microcystins. *Environ Sci Technol.* **2003**, *37*(9), 1899-1904. DOI:10.1021/es026191i.
 138. Kaur J, Vikas K, Boro R, Thampi K, Raje M, Varshney G, Raman C. Immunochromatographic Dipstick Assay Format Using Gold Nanoparticles Labeled Protein - Hapten Conjugate for the Detection of Atrazine. *Environ Sci Technol.* **2007**, *41*(14), 5028-5036. DOI:10.1021/es070194j.
 139. Aldus C, Van A, Ariëns R, Peck M, Wichers J, Wyatt G. Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic Escherichia coli. *Journal of Applied Microb.* **2003**, *95*, 380-389. DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.01989.x.
 140. Campbell K, Fodey T, Flint J, Danks C, Danaher M, O'Keeffe M, Glenn D, Elliott C. Development and Validation of a Lateral Flow Device for the Detection of Nicarbazin Contamination in Poultry Feeds. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*(6), 2497-2503. DOI:10.1021/jf062811d.
 141. Lisa M, Chouhan R, Vinayaka A, Manonmani H, Thakur M. Gold nanoparticles based dipstick immunoassay for the rapid detection of dichlorodiphenyltrichloroethane: An organochlorine pesticide. *Biosens Bioelectron.* **2009**, *25*(1), 224-227. DOI:10.1016/j.bios.2009.05.006.
 142. Blažková M, Mičková-Holubová B, Rauch P, Fukal L. Immunochromatographic colloidal carbon-based assay for detection of methiocarb in surface water. *Biosens Bioelectron.* **2009**, *25*(4), 753-758. DOI:10.1016/j.bios.2009.08.023.
 143. Wang L, Lu D, Wang J, Du D, Zou Z, Wang H, Smith J, Timchalk C, Liu F, Lin Y. A novel immunochromatographic electrochemical biosensor for highly sensitive and selective detection of trichloropyridinol, a biomarker of exposure to chlorpyrifos. *Biosens Bioelectron.* **2011**, *26*(6), 2835-2840. DOI:10.1016/j.bios.2010.11.008.
 144. Kong D, Liu L, Song S, Kuang H, Xu C. Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of folic acid in energy drinks and milk samples. *Food Agric. Immun.* **2016**, *27*(6), 841-854. DOI:10.1080/09540105.2016.1183600.

145. Pan R, Jiang Y, Sun L, Wang R, Zhuang K, Zhao Y, Wang H, Aslam M, Xu H, Man C. Gold nanoparticle-based enhanced lateral flow immunoassay for detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *J Dairy Sci.* **2018**, *101*(5), 3835-3843. DOI:10.3168/jds.2017-14265.
146. Zhang G, Wang X, Yang J, Yang Y, Xing G, Li Q, Zhao D, Chai S, Guo J. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist Clenbuterol residues. *J Immunol. Methods.* **2006**, *312*(1-2), 27-33. DOI:10.1016/j.jim.2006.02.017.
147. Wang J, Wang Q, Zheng Y, Peng T, Yao K, Xie S, Zhang X, Xia X, Li j, Jiang H. Development of a quantitative fluorescence-based lateral flow immunoassay for determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk. *Food Agric Immunol.* **2018**, *29*(1), 56-66. DOI:10.1080/09540105.2017.1359498.
148. Zhang G, Wang X, Zhi A, Yang Y, Qu M, Luo J, Li Q, Guo J, Wang Z, Yang J, Xing G, Chai S, Shi T, Liu Q. Development of a lateral flow immunoassay strip for screening of sulfamonomethoxine residues. *Food Addit Cont.* **2008**, *25*(4), 413-423. DOI:10.1080/02652030701561452.
149. Chen Y, Chen Q, Han M, Zhou J, Gong L, Niu Y, Zhang Y, He L, Zhang L. Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut. *Food Chem.* **2016**, *213*, 478-484. DOI:10.1010/j.foodchem.2016.06116.
150. Zhi A, Li B, Liu Q, Hu X, Zhao D, Hou Y, Deng R, Chai S, Zhang G. Development of a lateral-flow immunochromatographic test device for the rapid detection of difloxacin residues. *Food Agric Immunol.* **2010**, *21*(4), 335-345. DOI:10.1080/09540105.2010.504766.
151. Sajid M, Kawde A, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *J Saudi Chem Soc.* **2015**, *19*(6), 689-705. DOI:10.1016/j.jscs.2014.09.001.
152. Ellington A, Szostak J. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* **1990**, *346*(6287), 818-822. DOI:10.1038/346818a0.
153. Gubala V, Harris L, Ricco A, Tan M, Williams D. Point of care diagnostics: Status and future. *Anal Chem.* **2012**, *84*(2), 487-515. DOI:10.1021/ac2030199.
154. Kavosi B, Hallaj R, Teymourian H, Salimi A. Au nanoparticles/PAMAM dendrimer functionalized wired ethyleneamine–viologen as highly efficient interface for ultra-sensitive α -fetoprotein electrochemical immunosensor. *Biosens Bioelectron.* **2014**, *59*, 389-396. DOI:10.1016/j.bios.2014.03.049.
155. Delmulle B, De Saeger S, Sibanda L, Barna-Vetro I, Van Peteghem C. Development of an Immunoassay-Based Lateral Flow Dipstick for the Rapid Detection of Aflatoxin B1 in Pig Feed. *Food Chem.* **2005**, *53*(9), 3364-3368. DOI:10.1021/jf0404804.
156. Gabaldón J, Maquieira A, Puchades R. Current trends in immunoassay-based kits for pesticide analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **1999**, *39*(6), 519-538. DOI:10.1080/10408699991279277.
157. Commission THEE. COMMISSION REGULATION (EU) No 519/2014 of 16 May 2014. **2014**;(519).

158. Quiñones-Reyes G, Agulló C, Mercader J V., Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Synthetic Haptens and Monoclonal Antibodies to the Cyanotoxin Anatoxin-a. *Angew Chemie - Int Ed.* **2019**, 58(27), 9134-9139. DOI:10.1002/anie.201904002.
159. Goodrow M, Hammock B. Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAS for environmentally deleterious small molecules. *Anal Chim Acta.* **1998**, 376(1), 83-91. DOI:10.1016/S0003-2670(98)00433-4.
160. Schneider P, Goodrow M, Gee S, Hammock B. A Highly Sensitive and Rapid ELISA for the Arylurea Herbicides Diuron, Monuron, and Linuron. *J Agric Food Chem.* **1994**, 42(2):413-422. DOI:10.1021/jf00038a033.
161. Cevallos-Cedeño RE, Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A, Mercader J V. Hapten Design and Antibody Generation for Immunoanalysis of Spirotetramat and Spirotetramat-enol. *ACS Omega.* **2018**, 3(9), 11950-11957. DOI:10.1021/acsomega.8b01784.
162. Suárez-Pantaleón C, Mercader J V., Agulló C, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Hapten synthesis and polyclonal antibody-based immunoassay development for the analysis of forchlorfenuron in kiwifruit. *J Agric Food Chem.* **2010**, 58(15), 8502-8511. DOI:10.1021/jf101660z.
163. Mercader J V., Abad-Fuentes A. Monoclonal antibody generation and direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay evaluation for the analysis of the fungicide fenhexamid in must and wine. *J Agric Food Chem.* **2009**, 57(12), 5129-5135. DOI:10.1021/jf900867u.
164. Jiménez V, Adrian J, Guiteras J, Marco M, Companyó R. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting sulfonamides in feed resources. *J Agric Food Chem.* **2010**, 58(13), 7526-7531. DOI:10.1021/jf1011616.
165. Montoya A, Castell J. Long-term storage of peroxidase-labelled immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. *J Immunol Methods.* **1987**, 99(1), 13-20. DOI:10.1016/0022-1759(87)90026-3.
166. López F, García M, Fernández S. Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas. *Univ Politec Val.* **2010**.
167. Cheng J, He X, Wang Z, Zhang G, Zhao J, Zhu G. Metabolism-based synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship analysis of spirotetramat analogues as potential lipid biosynthesis inhibitors. *Pest Manag Sci.* **2013**, 69(10), 1121-1130. DOI:10.1002/ps.3473.