

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 fisicoquímicas</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. <i>Disoluciones y tampones</i>	65
3.1.4. <i>Haptenos, bioconjugados y anticuerpos</i>	65
3.1.5. <i>Materiales para los inmunoensayos en microplaca</i>	66
3.1.6. <i>Materiales para los inmunoensayos de flujo lateral</i>	67
3.1.7. <i>Muestras de alimentos y aguas</i>	67
3.2. Preparación de bioconjugados del hapteno SP_h	68
3.2.1. <i>Preparación del conjugado de BSA</i>	68
3.2.2. <i>Preparación del conjugado de OVA</i>	68
3.2.3. <i>Preparación del conjugado de HRP</i>	68
3.3. Procedimientos de ELISA competitivo	69
3.3.1. <i>Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa</i>	69
3.3.2. <i>Formato de anticuerpo de captura con detección directa</i>	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 bioconjugados 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
<u>PARTE I. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS PARA SPIROTETRAMAT.....</u>	<u>83</u>
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 SP_h.....	99

4.5. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados.....	100
4.5.1. <i>Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa.....</i>	101
4.5.2. <i>Formato de anticuerpo de captura con detección directa.....</i>	102
4.5.3. <i>Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta.....</i>	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. <i>Estudio de la influencia del pH.....</i>	106
4.7.2. <i>Estudio de la influencia de la fuerza iónica.....</i>	107
4.7.3. <i>Tolerancia a disolventes orgánicos.....</i>	109
4.8. Validación de inmunoensayos tipo ELISA basados en anticuerpos monoclonales.....	112
4.8.1. <i>Obtención de muestras.....</i>	112
4.8.2. <i>Estudios para la hidrólisis controlada de spirotetramat.....</i>	113
4.8.3. <i>Evaluación del efecto matriz de extractos de uva, zumos de uva y vinos</i>	116
4.8.4. <i>Curvas estándar y condiciones óptimas de ensayo.....</i>	118
4.8.5. <i>Análisis de muestras fortificadas.....</i>	120
4.8.6. <i>Estudio comparativo con HPLC-MS usando muestras ciegas.....</i>	123
4.9. Desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral.....	125
4.9.1. <i>Preparación de las tiras inmunorreactivas y del anticuerpo marcado con oro coloidal.....</i>	125
4.9.2. <i>Optimización del ensayo.....</i>	125
4.9.3. <i>Validación con muestras de vino.....</i>	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. <i>Formato de anticuerpo inmovilizado y anticuerpo de captura con detección directa.....</i>	138
4.10.2. <i>Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta.....</i>	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. <i>Estudio de la influencia del pH y de la fuerza iónica.....</i>	141
4.12.2. <i>Tolerancia a disolventes orgánicos.....</i>	143
4.13. Validación de inmunoensayos tipo ELISA.....	145
4.13.1. <i>Obtención de muestras.....</i>	145
4.13.2. <i>Evaluación del efecto matriz de muestras de agua.....</i>	146
4.13.3. <i>Curva estándar y parámetros analíticos.....</i>	147
4.13.4. <i>Análisis de muestras fortificadas.....</i>	149
4.14. Desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral.....	151
4.14.1. <i>Preparación de las tiras y del anticuerpo marcado con oro coloidal.....</i>	151
4.14.2. <i>Optimización del ensayo.....</i>	151
4.14.3. <i>Validación con diferentes tipos de agua.....</i>	154

5. CONCLUSIONES.....	157
6. REFERENCIAS.....	159