



Universidad Politécnica de Valencia

Departamento de Química

Tesis Doctoral

INMUNOENSAYOS RÁPIDOS PARA LA DETERMINACIÓN
DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS
EN ACEITE DE OLIVA

Marta Garcés García

Directores

Dr. Ángel Maquieira Catalá - Dra. Rosa Puchades Pla

Valencia, 2008

1. Introducción

1.1. Plaguicidas: medio ambiente y seguridad alimentaria

La contaminación del medio ambiente y de los alimentos es un problema general que afecta a todo el mundo. Parte de dicha contaminación es debida a la aplicación de productos fitosanitarios, especialmente plaguicidas, en agricultura, horticultura y silvicultura.

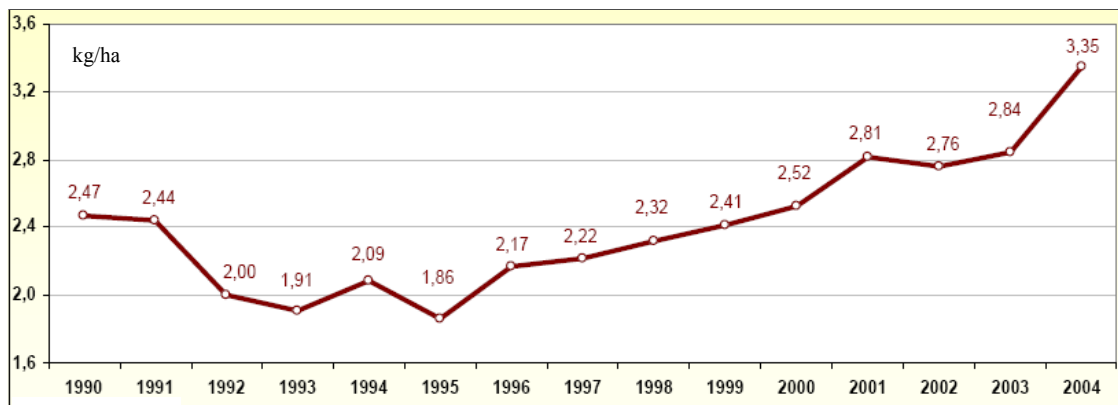
Los plaguicidas son sustancias que sirven para combatir los parásitos de los cultivos, del ganado, de los animales domésticos, y del hombre y su ambiente (1). Aunque estas sustancias se conocen desde la antigüedad, fue a partir de la década 1920-1930, y especialmente después de la Segunda Guerra Mundial, cuando se extendió su empleo -con la aparición de los plaguicidas orgánicos-, con el fin de aumentar la producción de alimentos.

En España, desde mediados de los años noventa el uso de plaguicidas experimentó un incremento que vino a romper el fuerte descenso iniciado a finales de la década de los ochenta. Aunque la aplicación de las reformas de la Política Agraria Común (PAC) de 1992 contribuyó parcialmente a reducir su uso, la implantación de sistemas de intensificación agraria aumentó su consumo, agravando el problema. Así, desde 1995 se está produciendo un incremento del uso de plaguicidas, en estrecha relación con la producción agrícola; como puede apreciarse en la Figura 1, en el año 2004 en España se alcanzó la cifra de 3,35 kg por ha (2).

La desigual intensificación de la agricultura en las diferentes comunidades autónomas se refleja también en el uso de plaguicidas (Figura 2), que es mucho mayor en Canarias (125,05 kg/ha), Cantabria (28,14 kg/ha) y en las regiones hortícolas, sobresaliendo la Comunidad Valenciana (26,41 kg/ha), la Región de Murcia (22,15 kg/ha) y La Rioja (21,13 kg/ha), como se muestra en la Tabla 1. Los datos del consumo de plaguicidas que se presentan están referidos a venta de producto, sin especificar la composición de su materia activa.

El uso indebido de los productos fitosanitarios (dosis excesivas, aplicación reiterada, utilización de productos no permitidos, incumplimiento de los plazos de seguridad, etc.) y la contaminación cruzada entre cultivos puede dar lugar a que las producciones agrícolas contengan residuos de plaguicidas, que potencialmente pueden llegar al consumidor (3, 4). Debe tenerse en cuenta que todos los plaguicidas, como biocidas que son, presentan cierta toxicidad y, por tanto, sus residuos suponen un riesgo para los consumidores si se superan determinados límites.

1. Introducción



	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Total Fitosanitarios (t)	39.562	39.147	31.839	29.406	31.243	27.852	33.236
Total superficie (1000 ha)	16.010	16.034	15.911	15.415	14.953	14.983	15.284

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Total Fitosanitarios (t)	34.023	35.070	36.332	38.027	40.894	40.727	41.586	47.445
Total superficie (1000 ha)	15.327	15.102	15.076	15.082	14.533	14.749	14.628	14.182

Figura 1. Consumo de productos fitosanitarios (kg de ingrediente activo/ha) en España en los últimos quince años.

Fuente: MAPA, AEPLA

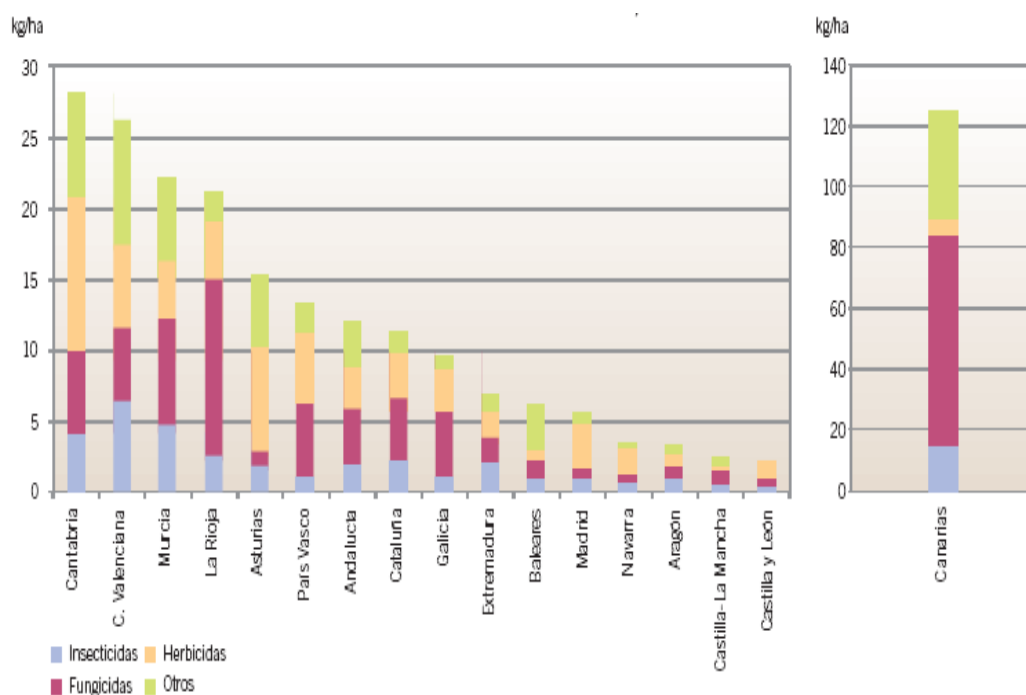


Figura 2. Distribución del consumo de fitosanitarios por comunidades autónomas en 2004. Fuente: MAPA, AEPLA

Tabla 1. Dosis (kg/ha) de fitosanitarios aplicados por comunidades autónomas en 2004*

<i>CC.AA.</i>	<i>Insecticidas</i>	<i>Fungicidas</i>	<i>Herbicidas</i>	<i>Otros</i>	<i>Total</i>
Andalucía	1,93	3,84	2,86	3,42	12,05
Aragón	0,85	0,79	1,18	0,35	3,17
Asturias	1,72	1,00	7,54	4,92	15,18
Baleares	0,80	1,20	0,86	3,30	6,16
Canarias	14,67	68,38	6,76	35,25	125,05
Cantabria	4,09	5,60	11,02	7,43	28,14
Castilla La Mancha	0,47	0,81	0,71	0,38	2,37
Castilla y León	0,20	0,54	1,36	0,14	2,25
Cataluña	2,14	4,46	3,09	1,67	11,36
C. Valenciana	6,41	5,09	5,90	9,01	26,41
Extremadura	1,97	1,76	1,78	1,35	6,86
Galicia	1,02	4,56	2,91	0,99	9,48
La Rioja	2,48	12,48	4,11	2,06	21,13
Madrid	0,83	0,71	3,01	0,91	5,46
Murcia	4,65	7,52	4,12	5,86	22,15
Navarra	0,48	0,57	1,95	0,39	3,40
País Vasco	0,98	5,26	5,00	2,10	13,33
ESPAÑA	1,42	2,44	2,07	1,86	7,79

* Datos referidos a la venta de productos formulados

Fuente: MAPA, AEPLA

Para proteger el medio y, especialmente, la salud de los consumidores, muchos países han restringido el uso de plaguicidas, estableciendo directrices sobre los límites máximos de residuos (LMRs) que pueden aceptarse en diferentes productos (5, 6). El límite máximo de residuo es la cantidad máxima de un determinado plaguicida que puede presentar un producto agrícola.

El marco legislativo sobre el uso de plaguicidas se recoge en la Orden PRE / 266 / 2006, de 6 de febrero, que transpone diversas directivas europeas. Esta legislación establece las condiciones que han de cumplir los productos fitosanitarios para su aprobación y uso, a través -entre otros límites- de los LMR admitidos para los diferentes productos agrícolas. De este modo se protege al consumidor, y se crean las bases para un mercado único y homologado en la Unión Europea. También proporciona a los productores la garantía de que, utilizando los fitosanitarios correctamente, sus productos tienen cabida en el mercado.

En general, el contenido máximo de residuos de plaguicidas en alimentos se sitúa en 0,01 mg/kg. Este límite de referencia es aplicable “por defecto”, es decir, en todos los casos en que no se haya fijado un LMR de forma específica para un producto o tipo de producto.

1. Introducción

La Unión Europea también ha elaborado un catálogo de productos fitosanitarios considerados peligrosos para el medio acuático, estableciendo una lista -popularmente conocida como “Lista Negra”- formada por 39 plaguicidas (76/464/EEC) (7); de ellos (Tabla 2), 19 pertenecen a la familia de los organofosforados -por ejemplo, fentión y malatión-, 8 son organoclorados, 2 triazinas, 2 fenilureas y 5 fenoxiácidos. Por otro lado, la Directiva comunitaria sobre calidad de aguas (8) fija los productos químicos prioritarios a controlar en las mismas.

Tabla 2. Lista de plaguicidas considerados peligrosos para el medio acuático

Aldrín	Disulfotón	Monolinurón
Atrazina	Endosulfan	Ometoato
Azinfos-etil	Endrín	Oxidemetón-metil
Azinfos-metil	Fenitrotión	Paratión-etil
Clordano	Fentión	Paratión-metil
Coumafos	Heptaclor	Phoxim
2,4-D	HCB	Propanilo
DDT	Linurón	Pirazona
Demetón	Malatión	Simazina
Diclorpop	MCPA	2,4,5-T
Diclorvos	Mecoprop	Triazofos
Dieldrín	Metamidofos	Triclorfon
Dimetoato	Mevinfos	Trifluralina

Fuente: Directiva 76/464/ECC de la Unión Europea (“Lista Negra”)

Los planes de seguridad alimentaria han de garantizar la inocuidad de los alimentos y la incorporación de elementos de control en todos los eslabones de la cadena alimentaria, de forma habitual, periódica y programada. Por ello, existen programas de vigilancia de residuos de plaguicidas que requieren la existencia de una red de laboratorios públicos y privados acreditados que cubran un amplio abanico de determinaciones analíticas.

1.1.1. Determinación de residuos de plaguicidas

La aplicación de programas de control y vigilancia de residuos de plaguicidas en alimentos implican la determinación de los niveles residuales en los productos a controlar, de forma periódica y por muestreo. Para ello, hay que utilizar metodologías analíticas contrastadas capaces de identificar y cuantificar mínimas cantidades de plaguicidas (del orden de $\mu\text{g}/\text{kg}$) en matrices complejas.

En general, la determinación de residuos de plaguicidas conlleva diferentes etapas: toma y preparación de las muestras para el análisis, extracción de los residuos, purificación o limpieza del extracto, y finalmente, la etapa de determinación.

Las metodologías analíticas utilizadas para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos son muy variadas dependiendo del tipo de producto, y la clase y número de plaguicidas que se quieran analizar. No obstante, los métodos rutinariamente aplicados en los laboratorios de control son los denominados métodos multiresiduo, caracterizados por ser aplicables a una gran variedad de alimentos y determinar, de forma simultánea, un gran número de plaguicidas.

Las técnicas cromatográficas son ampliamente usadas para la determinación de plaguicidas y sus metabolitos en muestras medioambientales y alimentos. Así, la cromatografía de gases (GC) es la más utilizada, especialmente en el caso de plaguicidas organofosforados y organoclorados (9-11), mientras que la cromatografía líquida (LC) es más utilizada para determinar plaguicidas polares y termodegradables (12-14).

En la actualidad, la cromatografía gaseosa (GC) acoplada a la espectrometría de masas (MS) es la técnica de referencia empleada para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos. La mayoría de estos procedimientos utilizan espectrometría de masas en modo SIM (15-18), trampa de iones, o en tándem (MS/MS) (19-21). El uso de GC acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (QqQ) es una alternativa más rápida para la determinación de niveles traza de plaguicidas.

Además, también se utiliza la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) (22, 23) para compuestos polares, no volátiles, térmicamente inestables o de alto peso molecular, que no pueden ser determinados mediante GC-MS.

Otras técnicas instrumentales como la cromatografía en capa fina (24) o la electroforesis capilar (25, 26) también son aplicadas.

Además, existen otros métodos, denominados bioensayos, que permiten la detección del analito por su toxicidad, inhibición de determinadas enzimas (27), o por la presencia de sus metabolitos en sangre u orina.

Aunque las técnicas cromatográficas son extraordinariamente útiles para la determinación de residuos de plaguicidas, su aplicación a programas de control medioambiental y de seguridad alimentaria no está exenta de importantes inconvenientes, entre los que cabe destacar los derivados del elevado coste de la instrumentación y el alto precio de los análisis (ver Tabla 3), la necesidad de personal

1. Introducción

altamente cualificado y los dilatados tiempos de análisis, que incluyen etapas de limpieza (28-30) y derivatización (31-33) de la muestra. Además, el uso de protocolos con múltiples etapas conlleva problemas de pérdida de analito y falta de reproducibilidad. También es problemático el uso de disolventes orgánicos por su toxicidad y elevado precio (34, 35), y la termolabilidad de algunos analitos (36).

Tabla 3. Precios públicos por la realización de análisis de muestras agroalimentarias. Identificación y cuantificación de residuos fitosanitarios y otros productos similares

<i>Actividad a realizar</i>	<i>Precio/muestra (€)</i>
Preparación de muestras para el análisis (extracción, destilación, mineralización, etc.)	19
Identificación o cuantificación de una sustancia, o grupo de sustancias, por cromatografía en capa fina	25
Identificación o cuantificación de una sustancia mediante técnicas espectrofotométricas (UV/V, IR, AES, AAS, etc.)	25
Identificación o cuantificación de una sustancia, o grupo de sustancias, mediante técnicas separativas (GC, LC, SFE, CE, etc.)	49
Determinación de una sustancia mediante kits específicos (análisis enzimáticos, inmunoensayo, etc.)	49
Identificación o cuantificación de una sustancia, o grupo de sustancias, mediante GC-MS	61
Identificación o cuantificación de una sustancia, o grupo de sustancias, mediante LC-MS	240
Identificación o cuantificación de una sustancia mediante técnicas cromatográficas combinadas con técnicas inmunológicas de purificación	73

Fuente: Orden SCO/47/2004, de 14 de enero, por la que se fijan los precios públicos por la realización de actividades del Centro Nacional de Alimentación. Agencia Española de Seguridad Alimentaria

Así pues, alcanzar estándares elevados en seguridad alimentaria exige, entre otras cosas, disponer de una metodología analítica efectiva que permita manejar un gran número de muestras, tener tiempos de respuesta cortos, operar en condiciones de campo (37) y ofrecer bajos precios de análisis.

1.2. Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OFs) son ésteres, amidas o tioderivados del ácido fosfórico, fosfónico, fosforotioico o fosfonotioico que controlan una gran variedad de plagas. La fórmula estructural de estos compuestos, que se caracterizan por

la presencia de tres funciones éster, se muestra en la Figura 3, en la que R_1 y R_2 son radicales alquilo, generalmente metilo o etilo. El grupo X es característico de cada especie química; frecuentemente es un radical arilo y suele contribuir de forma importante a las propiedades físicas, químicas y biológicas de este tipo de compuestos. Por otra parte, el número de grupos químicos se ve incrementado por la gran variedad de radicales que pueden presentar, ya que si bien dos de ellos son siempre metilo o etilo, el tercer radical es diferente en cada clase de plaguicidas (38).

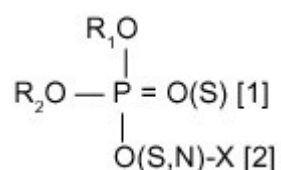


Figura 3. Estructura genérica de los compuestos organofosforados

En función de la posición que ocupan los diferentes grupos en la molécula, los organofosforados se pueden dividir en 14 familias; los más importantes son: fosfatos, con un O en las posiciones [1] y [2]; O-fosfortioatos (o tionatos), con un S en [1] y un O en [2]; S-fosfortioatos (o tiolatos), con un S en [2] y un O en [1]; fosforditioatos (o tiolotionatos), con un S en las posiciones [1] y [2]; fosfonatos, con R_1 (en lugar de R_1O), O o S en [1] y O en [2]; y fosforoamidatos, con un O en [1] y un N en [2].

A lo largo de los últimos años se ha producido un profundo cambio en las prácticas agrícolas, de modo que los plaguicidas OFs han reemplazado ampliamente a los organoclorados (OCs), convirtiéndose -junto a los piretroides- en los insecticidas más utilizados (Figura 4) en la actualidad.

La mayor actividad de los OFs es como insecticida, aunque algunos de ellos presentan también actividad nematocida, fungicida o herbicida. Estos compuestos tienen un espectro de acción más estrecho que los OCs, por lo que su efecto es más selectivo. Los plaguicidas OFs son, en general, sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo, y que forman parte del grupo de insecticidas llamados “de contacto”, al ser absorbidos por medio de los lípidos del exoesqueleto (caparazón) de los insectos (39).

Algunos OFs poseen baja presión de vapor, incluso a temperatura ambiente, por lo que los insectos toman o inhalan estos productos a través de la piel o el tubo digestivo. En los animales de sangre caliente y en el hombre, se introducen en el cuerpo por

ingestión, contacto con la piel o por vía respiratoria (vapores, polvos o nebulizadores), distribuyéndose rápidamente por el torrente sanguíneo (40).

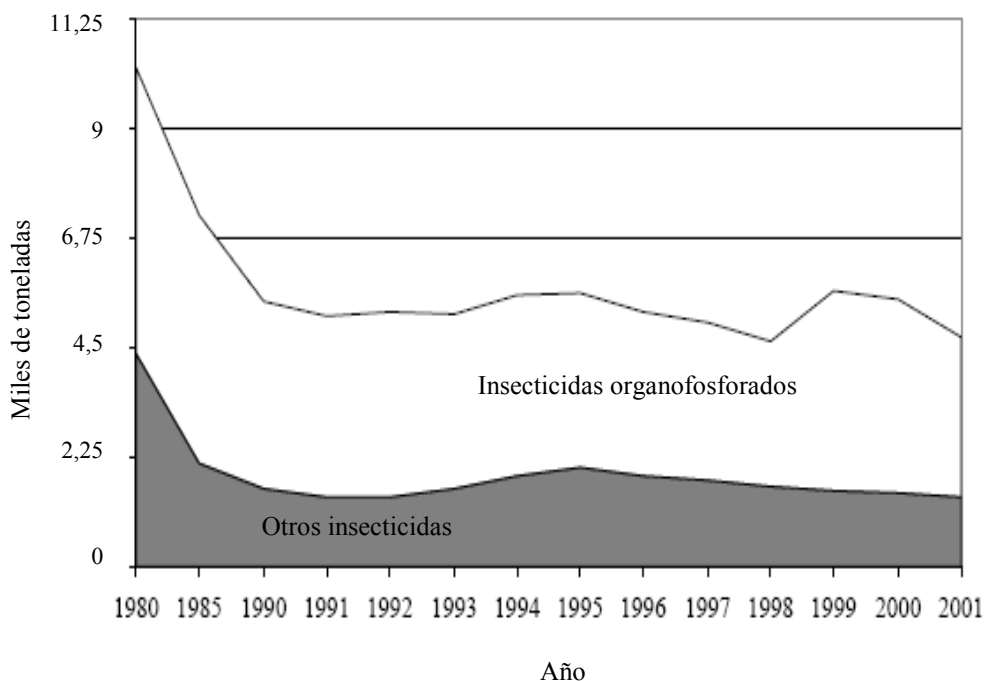


Figura 4. Consumo (en miles de toneladas) de ingredientes activos de organofosforados y otros insecticidas en EE.UU. (1980-2001).

Fuente: U.S. Environmental Protection Agency. Pesticides Industry, Sales and Usage. 2000 and 2001 Market Estimates

En general, los OFs son productos de elevada reactividad química, lo que les confiere ciertas ventajas; al tratarse de compuestos muy activos, las dosis aplicadas son bajas. Además, se degradan con relativa facilidad, bien mediante reacciones de hidrólisis que dan lugar a productos inocuos para el medio ambiente, o por reacciones de oxidación que conducen a metabolitos más o menos tóxicos, pero más fáciles de hidrolizar. Por último, son productos cuya toxicidad aguda es, en general, mayor que la de los OCs, mientras que la crónica es inferior, ya que tienden a hidrolizarse en lugar de acumularse en las grasas (38).

Los ésteres de los organofosforados son muy susceptibles a la hidrólisis, que es la vía de degradación más común. Uno de los factores más importantes que afecta a la hidrólisis es el pH del medio. Así, por ejemplo, el diazinón se hidroliza rápidamente a valores altos o bajos de pH (41). Por otro lado, el malatión es un clásico ejemplo de la complejidad que presenta el estudio de sus productos de hidrólisis, ya que, además de

los compuestos esperados, pueden formarse otros como malaoxón, dietiltiosuccinato, ácido O,O-dimetilfosfotónico, etc. (42).

1.2.1. Usos y toxicidad

Desde 1942 se han sintetizado más de 50.000 compuestos organofosforados, incluyendo derivados. Su uso está muy extendido (43), al ser utilizados tanto en el medio agrícola como en el doméstico (44), en la industria, medicina, e incluso como armamento químico, aunque su aplicación más relevante es en la agricultura como insecticidas.

En medicina, los compuestos OFs se han utilizado -debido a su acción anticolinesterásica- para el tratamiento del íleo paralítico y atonía vesical, enfermedades neurológicas degenerativas (45), miastenia grave, parálisis motriz postanestésica, glaucoma y, más recientemente, para tratar la retinitis por citomegalovirus (46) y algunos tumores (47).

A pesar de estar prohibidos (48, 49) a nivel mundial, los OFs todavía se utilizan en algunos países como armas de guerra química (gases nerviosos: sarín, tabún, trilonos, gas GB, gas nervino, etc.) o en acciones terroristas; es el “armamento de los países pobres”, por su elevado potencial mortífero y bajo precio.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el manejo incorrecto de los insecticidas organofosforados es el responsable de gran número de intoxicaciones agudas -caracterizadas por el desarrollo de síndrome colinérgico- y de múltiples complicaciones crónicas, siendo la neuropatía retardada una de las más representativas. Poseen alta toxicidad, y muchos de ellos son extremadamente dañinos para la salud humana y el ecosistema, al inhibir irreversiblemente la actividad de la acetilcolinesterasa (ACE) (50-53).

Los organofosforados actúan sobre insectos y mamíferos por fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas (es decir, por la unión o enlace químico de la molécula del organofosforado con la ACE). Esta enzima tiene un papel importante en la transducción del impulso nervioso, siendo imprescindible para el control normal de la transmisión de dichos impulsos desde las fibras nerviosas hasta las células musculares y glandulares, así como hacia otras células nerviosas de los ganglios autónomos y del sistema nervioso central.

Algunos organofosforados son sistémicos (ver Tabla 4), es decir, son adsorbidos por las plantas (ya sea a través del follaje o las raíces) e introducidos en el sistema vascular de los vegetales. Posteriormente, son translocados -en su forma original o modificada- a las diferentes partes de la planta por medio de la savia, siendo su modo de acción más eficaz contra insectos chupadores, actuando también sobre las personas que ingieren el alimento, aunque éste se lave previamente.

Tabla 4. Principales plaguicidas organofosforados utilizados en agricultura

<i>Tipo</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Nombre comercial</i>
No Sistémicos	Azinfos-metil	Guthion, Gusathion
	Clorpirifos	Dursban, Lorsban
	Diazinón	Basudin, Diacide, Diazil
	Diclorvos	Lainsec, Vapona
	Fenitrotión	Sumithion, Folithion
	Leptofos	Phosvel, Abar
	Malatión	Malathion, Cythion
	Paratión	Folidol
	Paratión-metil	Folidol-M, Metacide
Triclorfón	Dipetrex, Neguron, Dylox	
Sistémicos	Dimetoato	Cygon, Perfektion
	Fentión	DMTP, Lebaycid, Fenthion 4E
	Forato	Thimet
	Metamidofos	Monitor, Tamarón
	Mevinfos	Phosdrin
	Oxidemetón-metil	Metasyst ox
	Glifosato (Herbicida)	Roundrup

Una vez en el interior del organismo, los OFs son activados por desulfuración oxidativa, transformando los grupos P=S en P=O (54). Estos derivados P=O atacan al sistema nervioso y, más concretamente, a la ACE, enzima encargada de hidrolizar la acetilcolina en colina y ácido acético a nivel de la sinapsis nerviosa. La población afectada por la acción tóxica de estos plaguicidas presenta inhibición de la actividad enzimática de la ACE al encontrarse ésta fosforilada, lo que provoca desde anoxia y dolores de cabeza a dosis bajas, hasta náuseas, contracciones musculares e incluso la muerte por fallo respiratorio y paro cardíaco, a mayores dosis (55).

Por otra parte, la biotransformación de la mayor parte de los plaguicidas tiene lugar por combinación de varias reacciones químicas, desarrollándose -generalmente- en dos fases (56, 57):

-Fase I- incluye reacciones de preconjugación basadas en oxidación, reducción e hidrólisis, que permiten introducir un grupo polar (OH, NH₂, COOH y SH) en la molécula.

-Fase II- consiste fundamentalmente en reacciones de conjugación de los productos resultantes de la fase I con una o varias moléculas endógenas (ácido glucurónico, sulfato, glicina, etc.), dando lugar a productos hidrosolubles que pueden ser excretados por vía renal o hepática (orina o bilis, respectivamente).

Aunque este metabolismo es muy rápido en el caso de los OFs, es posible detectar los productos iniciales en sangre y orina, sobre todo en casos de intoxicaciones agudas o exposiciones continuadas. De este modo, su cuantificación indicará el nivel de afección del individuo o de la población expuesta.

Los organofosforados difieren mucho en su toxicidad, distinguiéndose tres categorías:

Categoría I (LD₅₀: 0-50 mg/kg)

Dicrotofos, DDVP (Vapona), Paratión-etil, Metamidofos, Azinfos-metil, Ometoato, Monocrotofos, Quinalfos, Fenamifos, Clofenvinfos y otros

Categoría II (LD₅₀: 50-500 mg/kg)

Dimetoato, Fentión, Metidatión, Paratión-metil, Triclorfón, Etión, Clorpirifos, Fenitrotión y otros

Categoría III (LD₅₀ >500 mg/kg)

Mercaptotión, Malatión, Diazinón

1.2.2. Métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados

La bibliografía indica que la determinación de residuos de organofosforados se efectúa principalmente mediante técnicas cromatográficas, además de utilizando biosensores enzimáticos y métodos inmunoquímicos (estos últimos se discutirán más adelante).

Los métodos cromatográficos requieren procesos de preparación de muestra, basados, generalmente, en extracción líquido-líquido (LLE) (58, 59) y en fase sólida (SPE) (60, 61). Estas técnicas consumen mucho tiempo y grandes cantidades de

disolventes orgánicos, por lo que -actualmente- se han desarrollado nuevos procedimientos como la microextracción en fase sólida (SPME) (62) o la extracción mediante adsorción en barras magnéticas (SBSE), acoplados a CG-MS, para la cuantificación de cantidades traza de estos compuestos en muestras acuosas (63).

Utilizando SPME pueden alcanzarse límites de detección en el intervalo de $\mu\text{g/L}$ a ng/L (64). Las fibras para SPME son relativamente caras y frágiles, pudiendo deteriorarse durante el proceso de extracción (60, 61, 65, 66). En ocasiones, para matrices complejas se requieren etapas de limpieza previas al uso de las fibras SPME, o desarrollar métodos de protección de las mismas (67, 68).

La SBSE es un método desarrollado recientemente, basado en la agitación de la muestra con una barra magnética recubierta con polidimetilsiloxano (PDMS). Debido al gran volumen de material de recubrimiento (69), pueden alcanzarse límites de detección para compuestos volátiles o semivolátiles del orden de ng/L o inferiores (70).

Finalmente, la microextracción en fase líquida (LPME) puede ser también una alternativa atractiva, por su facilidad de uso, rapidez y automatización (71).

Para la determinación de residuos de OFs se utilizan métodos basados en cromatografía gaseosa (GC) con diferentes detectores (72-74), caracterizados por presentar bajos límites de detección, alta sensibilidad y precisión -por ejemplo los métodos oficiales de la AOAC (75)-, HPLC con detección UV (76, 77), o espectrometría de masas (SIM) para la detección de niveles traza (78-80). Sin embargo, estos métodos presentan los mismos inconvenientes expuestos previamente en la sección 1.1.1., así como la imposibilidad de realizar determinaciones *in situ*.

Por otro lado, diferentes biosensores basados en la inhibición de la colinesterasa han sido desarrollados para la detección de plaguicidas. Algunos se basan en la determinación del ácido acético producido por la hidrólisis de la acetiltiocolina, bien por medidas conductimétricas (81, 82), o utilizando un sensor de fibra óptica que detecta el cambio de color de un indicador de pH (83). Un electrodo de pH modificado con una organofosforado hidrolasa inmovilizada también se ha utilizado para la determinación potenciométrica directa de insecticidas organofosforotiónatos y fosfatos (84, 85). Estos biosensores electroquímicos, aunque son sensibles (detectan niveles de ng/mL de organofosforados en agua), presentan como principal limitación su baja selectividad. La detección espectrofotométrica (86) ha sido también utilizada en biosensores usando acetiltiocolina como sustrato de la acetilcolinesterasa, de modo que la tiocolina producida reacciona con el reactivo de Ellman (87) para dar un color amarillo.

El principal biosensor descrito se basa en la oxidación directa de tiocolina a bajos potenciales, usando detección amperométrica (88-90). Este tipo de detección es generalmente más sensible (manteniéndose en niveles de ng/mL), sin embargo, presenta el inconveniente de la inhibición que sufren las enzimas, lo que limita sus posibles usos. Además, la actividad enzimática se puede modificar por la presencia de disolventes orgánicos.

En la bibliografía se han descrito sistemas más elaborados basados en biosensores bi-enzima (91-93), utilizando un sistema de tres enzimas con detección amperométrica (94) o fluorométrica tras una etapa de derivatización previa (95).

Una considerable mejora de los sensores se produce usando un sistema en flujo continuo. Así, Jeanty *et al.* (96) detectan la presencia de clorpirifos en agua a niveles de 24 ng/mL en 16 minutos.

1.3. Técnicas inmunoquímicas

En las últimas décadas se ha incrementado considerablemente el interés por mejorar las normas de calidad y los sistemas de control sobre toda la cadena alimentaria. En materia de inocuidad, los códigos de prácticas recomendados por el Códex Alimentario se basan en la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Higiene, y Buenas Prácticas de Manufactura o de Fabricación.

El concepto de buenas prácticas agrícolas (BPAs) ha ido evolucionando en los últimos años como resultado del interés y compromiso de un amplio sector interesado en mejorar la producción, seguridad y calidad alimentarias, y a la mayor sostenibilidad ambiental de la agricultura. La aplicación de estas prácticas permite a los agricultores dar un mayor valor añadido a sus productos, y a los consumidores, alimentos más seguros y de mejor calidad.

El control de productos frescos que se consumen sin procesar es crítico, ya que, por definición, son los alimentos con mayor probabilidad de afectar a la salud de los consumidores.

Los aspectos arriba enunciados, junto con el establecimiento de Límites Máximos de Residuos cada vez más bajos y el desarrollo de Planes de Vigilancia más efectivos, deben conducir a mantener una elevada seguridad alimentaria. Sin embargo, en la práctica no basta con disponer de normativas, también tienen que haber herramientas que aseguren la efectividad de las mismas. Por ello, es necesario disponer de

metodologías analíticas alternativas a las oficiales (básicamente cromatográficas), que sean rápidas, sensibles, selectivas, de bajo coste, con gran capacidad de trabajo y que permitan realizar determinaciones *in situ*. En este sentido, las técnicas inmunoquímicas pueden aportar soluciones muy válidas (32, 33, 97).

La bibliografía recoge un gran número de artículos sobre la aplicación de estas técnicas a la determinación de residuos de plaguicidas, aunque su aceptación depende de la calidad y validez obtenida en comparación con las técnicas de referencia. La duración excesiva de los ensayos y el elevado coste de las técnicas analíticas clásicas limitan su capacidad de trabajo. Existe pues una necesidad real de desarrollar técnicas analíticas de campo que sean rápidas, fáciles de usar, robustas, sensibles y de bajo coste. Por estos motivos, y por su simplicidad, los inmunoensayos se han convertido en un instrumento popular para el monitoreo rápido de componentes minoritarios, incluyendo contaminantes orgánicos en el medio ambiente y alimentos (98-104).

1.3.1. Principios generales de las técnicas inmunoquímicas

Las técnicas inmunoquímicas son métodos simples, sensibles, selectivos, rápidos y baratos, muy establecidos en el área clínica. El primer inmunoensayo fue desarrollado para la determinación de insulina en sangre por Yalow y Berson en 1960 (105). Desde entonces, los inmunoensayos han sido usados en Química Clínica para la detección de innumerables compuestos como hormonas, fármacos, drogas y virus.

Actualmente, los métodos inmunoquímicos son ampliamente usados tanto en análisis de rutina como en investigación, especialmente en el área Química, en Medicina, Microbiología, Medio Ambiente y en la industria alimentaria (106-109). Entre los métodos inmunoquímicos, el ensayo tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ocupa una posición dominante, representando aproximadamente el 90% del total de determinaciones efectuadas (110).

Los métodos inmunoquímicos se basan en el uso de anticuerpos, que se caracterizan por presentar en sus estructuras sitios de reconocimiento que les permiten establecer interacciones altamente específicas con los antígenos (32), cuya extensión depende de la intensidad de la interacción antígeno/anticuerpo.

Las principales ventajas analíticas de los inmunoensayos son la simplicidad y rapidez de las determinaciones, su alta sensibilidad y selectividad, y el bajo coste del análisis en relación con los métodos cromatográficos de referencia, con resultados

comparables (111); además, la preparación de muestra es simple, tienen gran capacidad de trabajo, y presentan posibilidad de automatización y aplicación para análisis de rutina en condiciones de campo (112, 113).

A pesar de sus importantes ventajas, los ensayos inmunoquímicos no están exentos de limitaciones. Hay que tener en cuenta los posibles efectos de los factores medioambientales en los resultados (114); los ensayos pueden estar afectados por la matriz de la muestra (materia orgánica, pH, sales, etc.) necesitando, por tanto, un intervalo de condiciones óptimas de trabajo (115, 116). Además, la respuesta del método a compuestos análogos, metabolitos u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra, es otro problema a tener en cuenta. Así pues, la selectividad (reactividad cruzada) y el efecto matriz son los dos factores que proporcionan mayor incertidumbre a los métodos inmunoquímicos.

1.3.2. Obtención y características de los anticuerpos

Los anticuerpos son glicoproteínas pertenecientes al grupo de las γ -globulinas, de ahí el nombre de inmunoglobulinas (Igs), que son producidas por el sistema inmunitario de los vertebrados en respuesta a una sustancia (antígeno) extraña al organismo. Las inmunoglobulinas están formadas por varias cadenas polipeptídicas; su masa molecular oscila entre 150-900 kDa, con un contenido en hidratos de carbono del 2 al 15%, y un punto isoeléctrico (pI) comprendido entre 4,4 y 9,5. En su forma soluble, se encuentran fundamentalmente en el suero sanguíneo, pero también están presentes en otros fluidos corporales, tejidos y células como lágrimas, saliva, intestino, leche, huevos, etc.

Las inmunoglobulinas se dividen en cinco clases o isotipos, en función de su estructura (diferente tipos de cadena pesada: α , μ , γ , δ , ϵ , distinta composición de aminoácidos, carga y tamaño), actividad funcional, etapa de la reacción en la que aparecen y lugar donde se encuentran (sangre, leche, saliva, etc.): IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. En mamíferos, las inmunoglobulinas IgGs son las que se encuentran en mayor proporción (80% del total) y las más utilizadas en el análisis inmunoquímico.

La mayoría de anticuerpos, excepto los producidos por camélidos y escualos, tienen una estructura básica similar formada por cuatro cadenas polipeptídicas, iguales dos a dos. La Figura 5 esquematiza la estructura básica de una IgG, con dos cadenas ligeras (L) iguales y dos cadenas pesadas (H) también iguales. Las cadenas pesadas están unidas entre sí mediante dos puentes disulfuro; cada una de ellas está unida a su vez a

una cadena ligera por otro puente disulfuro. En la región constante, las cadenas pesadas tienen hidratos de carbono como grupo prostético.

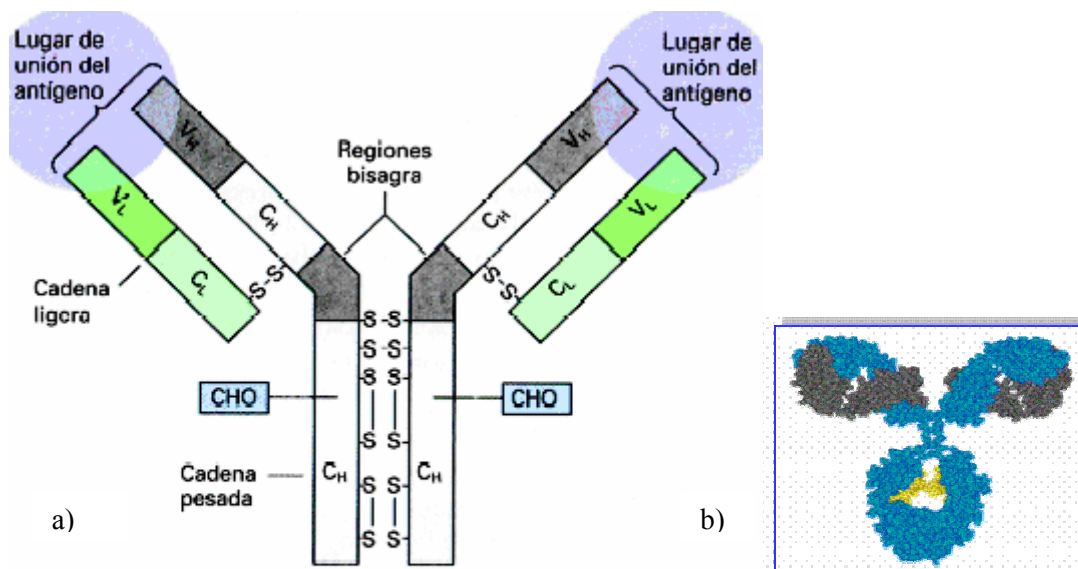


Figura 5. Estructura básica de una IgG

a) Esquema bidimensional

b) Representación tridimensional

En un anticuerpo pueden diferenciarse claramente dos regiones, tanto en la cadena pesada como en la ligera:

- La región variable, V, en el extremo amino terminal de la molécula, constituye la zona del anticuerpo que interacciona con el antígeno. Estos sitios de reconocimiento específicos y activos del anticuerpo (paratopos) interaccionan con la región del antígeno capaz de unirse al anticuerpo (epítopo), y su secuencia de aminoácidos es distinta en función del tipo de IgG.
- La región constante, C, en el extremo carboxilo, es diferente en función de la clase de inmunoglobulina, y sirve de anclaje a los receptores de determinadas células.

La obtención de anticuerpos que reconozcan específicamente a un antígeno requiere la inmunización de un animal con dicha sustancia.

Si el analito es macromolecular, con masa molecular mayor de 5000 Da, la inyección directa del mismo en el organismo productor de anticuerpos genera la respuesta inmune, y los linfocitos del animal producen IgGs capaces de unirse selectivamente al agente inyectado. Si el analito es una molécula pequeña -caso de los

plaguicidas-, es necesario conjugarlo covalentemente a una sustancia (generalmente una proteína) ajena al organismo inmunizado, e inyectar este conjugado al animal para provocar la respuesta inmune (ver Figura 6).

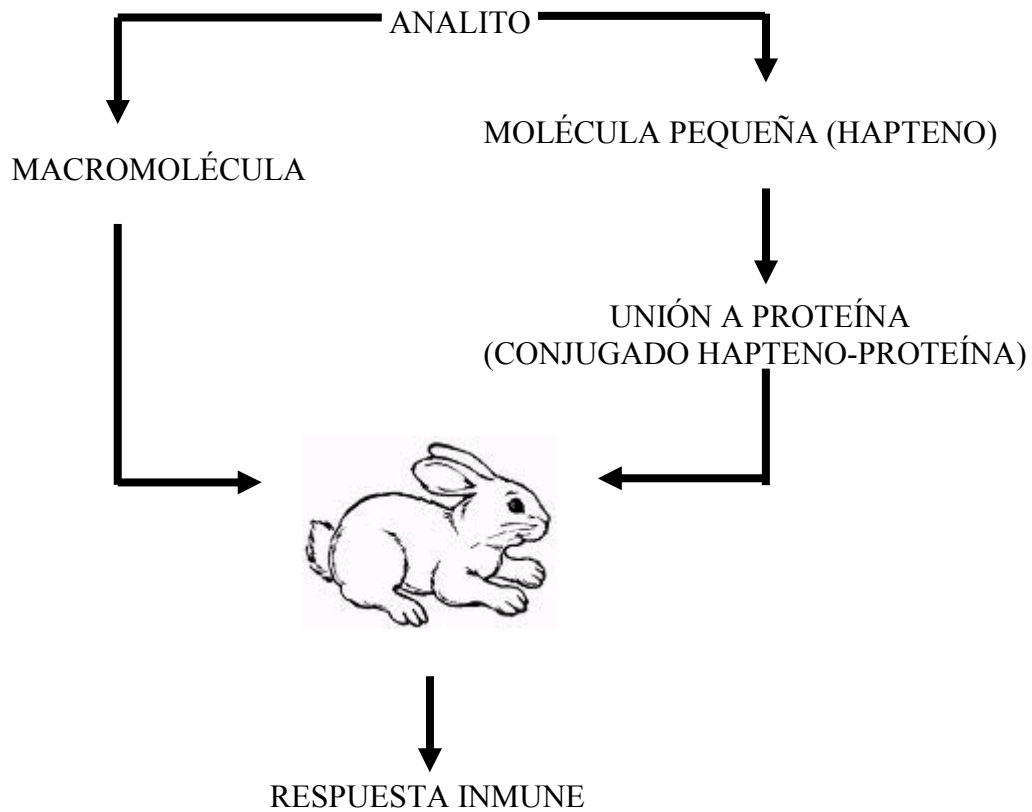


Figura 6. Esquema del proceso seguido para la obtención de anticuerpos policlonales

En la terminología utilizada habitualmente, a los compuestos de baja masa molecular que se unen covalentemente a una sustancia inmunogénica (generalmente una proteína), se les denomina haptenos. Los conjugados hapteno-proteína capaces de producir respuesta inmune son los inmunógenos.

La generación de anticuerpos para moléculas pequeñas requiere llevar a cabo las siguientes etapas:

1. Diseño de moléculas derivadas del analito que contengan un grupo funcional apropiado (hapteno) para su unión al transportador
2. Síntesis de haptenos
3. Conjugación covalente del hapteno al transportador
4. Purificación del inmunógeno
5. Inmunización del animal

Los principios básicos para el diseño de haptenos han sido ampliamente descritos (117-120). El hapteno tiene que ser lo más similar posible al analito en estructura y geometría, distribución electrónica y capacidad de establecer puentes de hidrógeno, así como en sus propiedades hidrofóbicas (117).

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es la introducción de un brazo espaciador que disponga en su extremo un grupo adecuado para su unión directa a la proteína transportadora, como por ejemplo $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$. Este brazo debe estar posicionado lo más lejos posible de los sitios de reconocimiento del hapteno para favorecer la exposición del hapteno al sistema inmunitario. Es generalmente aceptado que la longitud del brazo espaciador es un factor importante en la producción de anticuerpos con alta afinidad por el analito, y que la sensibilidad del inmunoensayo mejora al aumentar la longitud del mismo (33, 121, 122). Un brazo espaciador largo puede evitar el enmascaramiento del hapteno por la proteína, pero si es demasiado largo puede conducir al plegamiento del hapteno y reducir su exposición al sistema inmunitario (33, 122). Sin embargo, los resultados experimentales que soportan estas hipótesis son limitados y contradictorios.

En algunos estudios, los haptenos con brazo espaciador de tamaño medio (3-6 átomos de carbono) dieron lugar a los ensayos más sensibles comparados con aquellos que utilizaban un brazo espaciador más corto (123-125), con los que se obtuvieron resultados contrarios (126-128).

En el caso de plaguicidas organofosforados aromáticos, el brazo espaciador puede unirse tanto al grupo tiofosfato como al anillo aromático. Generalmente, los haptenos derivatizados por el grupo tiofosfato usan un aminoácido como brazo espaciador. McAdam *et al.* (129, 130) desarrollaron un método general para sintetizar este tipo de haptenos, que ha sido aplicado con éxito al desarrollo de ELISAs para varios plaguicidas organofosforados (126, 131-134). Este método se basa en la unión del brazo espaciador al grupo tiofosfato, e implica varios pasos de protección y desprotección del mismo. La aplicación de esta metodología a la síntesis de haptenos para diazinón ha demostrado no ser viable, ya que el intermedio final se hidroliza en el paso de desprotección que conduce al hapteno. Por ello, Beasley *et al.* (135) adoptaron una estrategia diferente, utilizando un aminoalcohol como brazo espaciador para obtener anticuerpos policlonales contra diazinón. Actualmente, hay trabajos que usan un brazo aminocarboxílico que no requiere demasiadas etapas de protección y desprotección (136).

Así, y para cada tipo de compuesto, deben sintetizarse diferentes moléculas que, manteniendo la estructura base, estén funcionalizadas para su unión directa a proteínas transportadoras (inmunógenos) o a los marcadores correspondientes (trazadores), con el fin de obtener los reactivos necesarios para efectuar los ensayos.

Como ya se ha comentado, para estimular la producción de anticuerpos frente a moléculas no inmunogénicas es necesario ligarlas a una proteína transportadora capaz de provocar la respuesta inmune. Las proteínas más utilizadas para este fin son: seroalbúmina bovina (BSA), seroalbúmina humana (HSA), ovoalbúmina (OVA), hemocianina del molusco *Megathura crenulata* (KLH) o IgGs de diferentes especies. Los criterios de selección de una proteína u otra se basan en su poder inmunizante (cantidad de determinantes antigénicos), solubilidad y facilidad de conjugación. Además de proteínas, también pueden utilizarse polipéptidos sintéticos como la poli-L-lisina o polisulfona funcionalizada, azúcares, e incluso carbón activo y oro coloidal.

El hapteno debe unirse covalentemente a la proteína transportadora, proceso que generalmente se lleva a cabo utilizando una carbodiimida -que da lugar a un enlace amida entre un carboxilo del hapteno y un grupo amino de la proteína-, entre otros métodos de conjugación ampliamente descritos (137).

Cuando se administra un inmunógeno *in vivo* a un animal, se produce la estimulación de distintas células del sistema inmunitario (como macrófagos, linfocitos T y B) del mismo. Los linfocitos B activados y diferenciados a células plasmáticas, secretan una mezcla de anticuerpos derivados de la activación de numerosos clones de linfocitos B. Este tipo de respuesta se denomina policlonal, y al suero de un animal que contiene una mezcla de anticuerpos frente a un inmunógeno se le denomina antisuero policlonal. Los sueros policlonales suelen obtenerse en conejos, aunque también se emplean otros animales como ratones, ovejas, cabras, gallinas, etc. La producción de anticuerpos policlonales (PABs) es sencilla, y no requiere equipamiento sofisticado o medios especiales. Su principal inconveniente radica en la diferente respuesta entre animales. Un antisuero policlonal es una mezcla heterogénea de anticuerpos de diferentes clases en proporciones arbitrarias, y con diferentes afinidades y selectividades hacia el analito para el que se ha obtenido.

Una alternativa a los Pabs son los anticuerpos monoclonales (MAbs) (33, 138). Estos anticuerpos se obtienen utilizando el sistema inmunitario de ratón o rata (actualmente, incluso conejos), seguido de la aplicación de la tecnología de hibridomas. La técnica original (ver Figura 7), diseñada por Köhler y Milstein (139), fusiona

1. Introducción

linfocitos B de animales inmunizados -capaces de producir anticuerpos- con una célula tumoral (mieloma), dando finalmente células híbridas inmortales o hibridomas, que pueden clonarse *in vitro*. El desarrollo de estos anticuerpos ha significado un enorme avance de las técnicas inmunológicas, su comercialización por distintas compañías, y un extraordinario desarrollo en campos como la Medicina, Medioambiente, Inmunología, Microbiología, Parasitología, y otras ciencias afines.

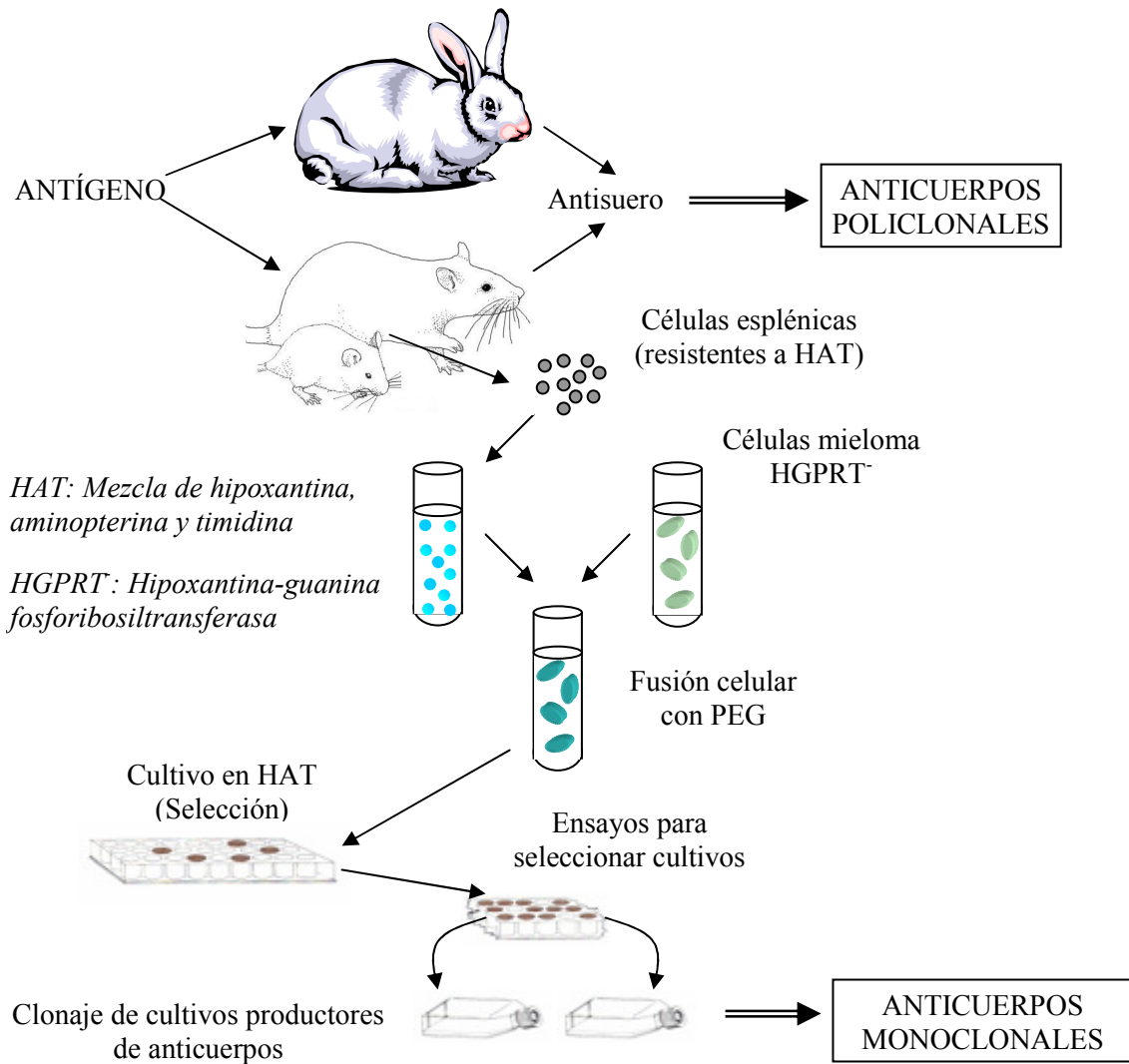


Figura 7. Esquema de la producción de anticuerpos monoclonales

Los MAbs son una mezcla homogénea de inmunoglobulinas producidas por un grupo de células genéticamente idénticas (clon), de modo que todas tienen exactamente las mismas propiedades. Se pueden producir en cantidad teóricamente ilimitada, a diferencia de los PAbs para los que no puede asegurarse la repetición de propiedades como afinidad y selectividad, incluso reproduciendo exactamente todas las fases de

obtención de los mismos. La Tabla 5 resume las principales propiedades de los anticuerpos policlonales y monoclonales.

Tabla 5. Principales características de los anticuerpos policlonales y monoclonales

<i>Policlonales</i>	<i>Monoclonales</i>
Mezcla heterogénea de Igs	Mezcla homogénea de Igs
Suministro limitado	Suministro ilimitado
Propiedades variables	Propiedades idénticas
Bajos costes de producción	Altos costes de producción
Obtención en tres meses	Obtención en seis meses

Usando MAbs se han desarrollado ELISAs para la determinación de un gran número de plaguicidas, como por ejemplo fenitrotión, paratión-metil, 2,4-D, molinato, clorpirifos, carbaril, atrazina, etc. (140-143).

Una tercera posibilidad surge de los avances en las técnicas de ingeniería genética, que han propiciado el desarrollo de anticuerpos recombinantes. En las tecnologías recombinantes, se generan colecciones o series de proteínas de bajo peso molecular con propiedades similares a los anticuerpos y capacidad de reconocimiento de un compuesto dado. Su producción se consigue mediante la expresión de regiones funcionales de los Abs en sistemas huésped, relativamente simples y baratos (144), así como por modificación genética a nivel del ADN. Las aproximaciones de la genética molecular permiten expresar secuencias de aminoácidos en la superficie de un bacteriófago y después cribar las secuencias mediante un ensayo tipo ELISA. Ahora es posible clonar no sólo anticuerpos, sino también fragmentos conteniendo los sitios de unión del antígeno (regiones hipervariables de los anticuerpos), en un sistema celular simple como *E. coli* (145). Las tecnologías recombinantes hacen posible obtener anticuerpos más específicos y afines, mejorar -en algunos casos- la sensibilidad de los inmunoensayos y la estabilidad de los anticuerpos (146), y alcanzar límites de detección y selectividades similares a los alcanzados con MAbs y PAbs (147). Por ejemplo, se han usado anticuerpos recombinantes para la determinación de atrazina (146), clorpirifos (147), 2,4-D (148) y metamidofos (149). No obstante, los resultados aún no son totalmente satisfactorios.

Junto con los anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes, en los últimos años también se han utilizado anticuerpos sintéticos (150), también llamados polímeros de impronta molecular (*molecularly imprinted polymers*, MIPs). Estos productos se preparan por polimerización de monómeros especiales en un medio que

también contiene el analito. Una vez solidificado el polímero, se elimina el analito, de modo que los polímeros resultantes contienen cavidades con formas y funcionalidad química capaces de unir selectivamente las moléculas de analito.

Las principales ventajas de los MIPs son su estabilidad en una gran variedad de ambientes, su comodidad, coste, tiempo y reproducibilidad de preparación, capacidad de carga de muestra, y durabilidad del material. Además, algunos de estos polímeros presentan elevadas selectividades y constantes de afinidad, comparables a las de los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, sus principales inconvenientes están relacionados con la heterogeneidad de los sitios impresos y la dependencia de los disolventes orgánicos durante su síntesis y utilización.

Los MIPs se han usado ampliamente para la determinación de residuos de plaguicidas utilizando ensayos tipo ELISA, cromatografía de inmunoafinidad e inmunosensores (150-153).

La comparación de las técnicas de obtención y las propiedades de los diferentes tipos de anticuerpos (policlonales, monoclonales, recombinantes y de impronta molecular), conduce a la conclusión de que a pesar de los inconvenientes señalados más arriba, la utilización de PAbs está más que justificada por la sencillez de la técnica y la calidad de los anticuerpos obtenidos, cuya sensibilidad y selectividad son, generalmente, similares o superiores a las de los recombinantes y MAbs. Por ello, en esta Tesis se han utilizado anticuerpos policlonales.

1.3.3. Tipos de inmunoensayos

Dada la amplitud del concepto de inmunoensayo, el número de posibles configuraciones que puede adoptar un inmunoanálisis es enorme, hasta el punto de que su clasificación y terminología es incluso confusa (154).

Basándonos en conceptos generales, los inmunoensayos se pueden clasificar atendiendo a distintos factores (Tabla 6):

- Según el desarrollo de la interacción antígeno-anticuerpo, pueden ser **homogéneos** -cuando la reacción inmunoquímica se produce en el seno de la disolución sin que haya separación física entre el analito y el resto de componentes de la matriz- o **heterogéneos** -cuando la interacción tiene lugar en la interfase entre un soporte sólido y la disolución, permitiendo la separación del analito del resto de la matriz-. Como soporte pueden emplearse plásticos (PMMA, poliestireno, etc.), vidrio, silicio y materiales similares en

diferentes presentaciones (placas, láminas, membranas, partículas, tubos, etc.). De todos ellos, las placas de poliestireno de 96 pocillos (placa ELISA) son las más empleadas.

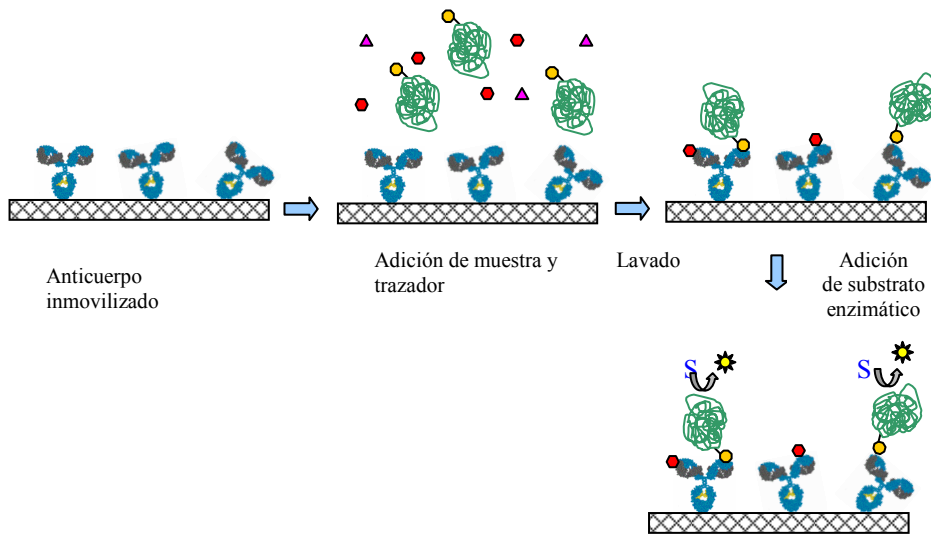
Tabla 6. Clasificación de distintos tipos de inmunoensayos

Separación Ab libre y enlazado	Sí No	Heterogéneo Homogéneo
Reactivo limitante	Sí No	Competitivo Desplazamiento No competitivo
Especie inmovilizada	Ab Conjugado hapteno-proteína	Directo Indirecto
Marcador	Enzima Isótopo radiactivo Fluoróforo Otros	EIA RIA FIA

- En función del diseño, los inmunoensayos pueden ser **competitivos** (o de reactivo limitado) -cuando el analito rivaliza con un homólogo marcado por los sitios específicos del anticuerpo, que se encuentra en cantidad limitante-, por **desplazamiento** -cuando el antígeno marcado se incubaba con el anticuerpo (reactivo limitante) y después se añade el antígeno, que desplaza al antígeno marcado del complejo- y **no competitivos** (o de reactivo en exceso) -incluye todos los ensayos sin etapa competitiva-. Los inmunoensayos no competitivos se basan en la medida de los sitios ocupados al usar un exceso de anticuerpo. Los anticuerpos no marcados se inmovilizan, mientras que los anticuerpos marcados se añaden al medio. Esta configuración sólo puede utilizarse cuando el analito de interés posee al menos dos sitios de unión y, por tanto, no es apropiado para moléculas de baja masa molecular como los plaguicidas.

- Según el desarrollo del formato competitivo, los inmunoensayos pueden ser **directos** (Figura 8A) -cuando el analito y un hapteno de estructura similar marcado se encuentran en disolución y compiten por unirse al anticuerpo, que se encuentra inmovilizado en un soporte sólido-, o **indirectos** (Figura 8B) -cuando el conjugado hapteno-proteína se encuentra inmovilizado, y el analito y el anticuerpo se añaden en disolución -.

A) FORMATO DIRECTO



B) FORMATO INDIRECTO

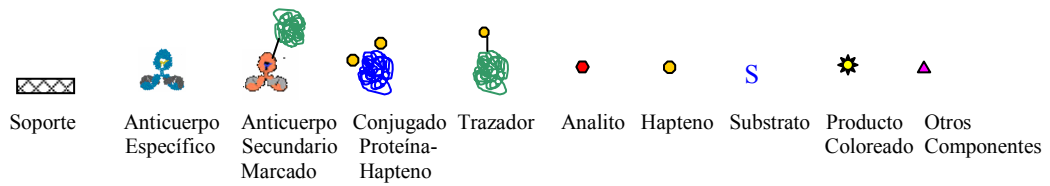
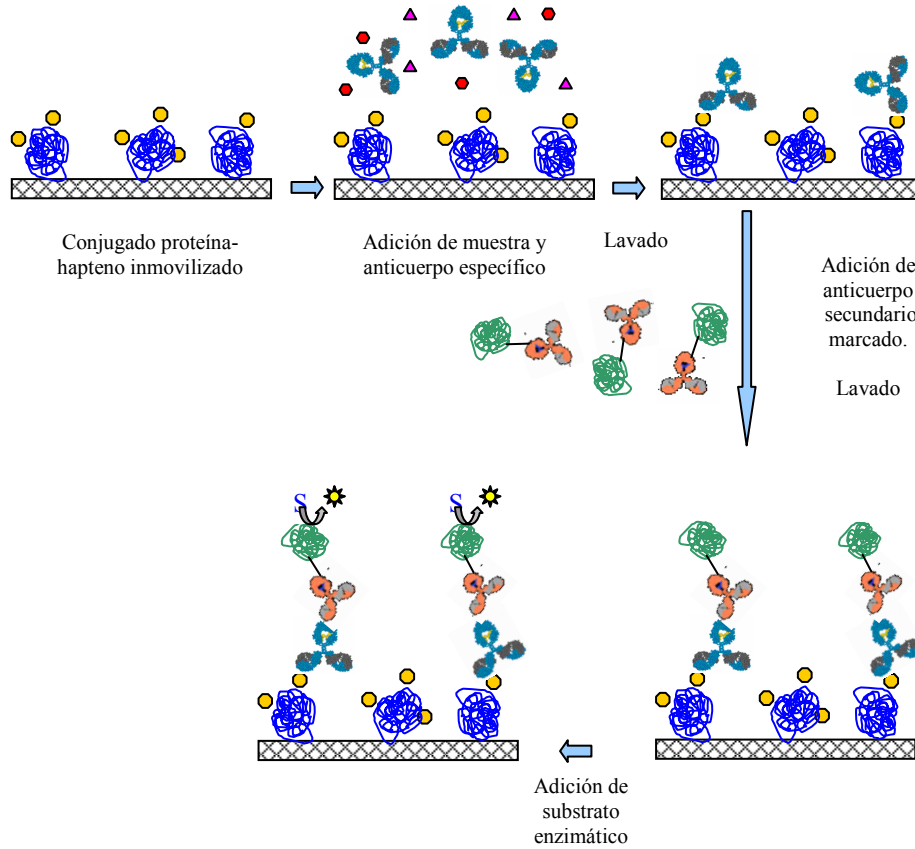


Figura 8. Esquema de un inmunoensayo heterogéneo competitivo en formato directo (A) e indirecto (B)

Debido a que la absorción directa de un antígeno de bajo peso molecular en la superficie de las placas de poliestireno es difícil, la inmovilización (tapizado) se lleva a cabo utilizando un conjugado proteína-hapteno, el cual se adsorbe en la superficie sólida. Con el fin de disminuir las interacciones inespecíficas, el conjugado de tapizado debe usar una proteína diferente a la empleada en la síntesis del inmunógeno (por ejemplo, KLH para el inmunógeno y OVA para el tapizado).

- Según el tipo de marcaje, los inmunoensayos se denominan **enzimáticos** (EIAs) cuando utilizan una enzima, **radioinmunoensayos** (RIAs) si las medidas son radioquímicas, y **fluoroimunoensayos** (FIAs) si el marcador es un fluoróforo o una molécula quimioluminiscente (155).

Además, existen otros tipos de marcadores como los particulados (látex, oro, puntos cuánticos *-quantum dots-*), complejos metálicos (Tb^{3+} , Eu^{3+}), cofactores enzimáticos (FAD), etc., y otros tipos de detección *-másica, electroquímica, etc.-*.

Aunque los marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes han ganado popularidad en los últimos años, los enzimáticos como la peroxidasa de rábano picante (HRP) o la fosfatasa alcalina (AP) son los más utilizados. Además, poseen gran variedad de sustratos (cromogénicos, fluorescentes y bioluminiscentes), alcanzándose sensibilidades iguales o mejores a las obtenidas con otros marcadores.

El inmunoensayo enzimático en fase heterogénea (**ELISA**) ha sido el más utilizado para la realización de diversos tipos de análisis. Los ELISAs están basados en el uso de trazadores enzimáticos y están disponibles en diferentes soportes: tubos, partículas magnéticas o microplacas, permitiendo el análisis de un gran número de muestras simultáneamente (32, 156).

En los inmunoensayos competitivos, la cuantificación se efectúa mediante interpolación en la curva patrón del analito de interés (156). Las curvas de calibrado dosis-respuesta representan la señal obtenida (absorbancia, fluorescencia, etc.) frente al logaritmo de la concentración de patrón. Existen diferentes modelos para ajustar matemáticamente los resultados experimentales (157); utilizando el ajuste de cuatro parámetros se obtienen curvas sigmoidales, presentando una zona lineal próxima a la IC_{50} (concentración que provoca un 50% de la disminución de la señal respecto al blanco) (32). Otros puntos importantes de la curva son el límite de detección (LD, concentración de analito que origina una disminución de la señal respecto al blanco del 10%) y el de cuantificación. Los límites de detección y cuantificación de los ensayos más sensibles alcanzados para haptenos de bajo peso molecular son del orden de ng/L,

mientras que los límites superiores varían entre 10 y 100 $\mu\text{g/L}$ (158). En este tipo de curvas de calibrado (Figura 9), el intervalo de trabajo o “rango dinámico” se define como el intervalo de concentraciones de analito que produce una señal entre el 80% y el 20% del intervalo definido por las asíntotas máxima y mínima (A_{max} y A_{min}).

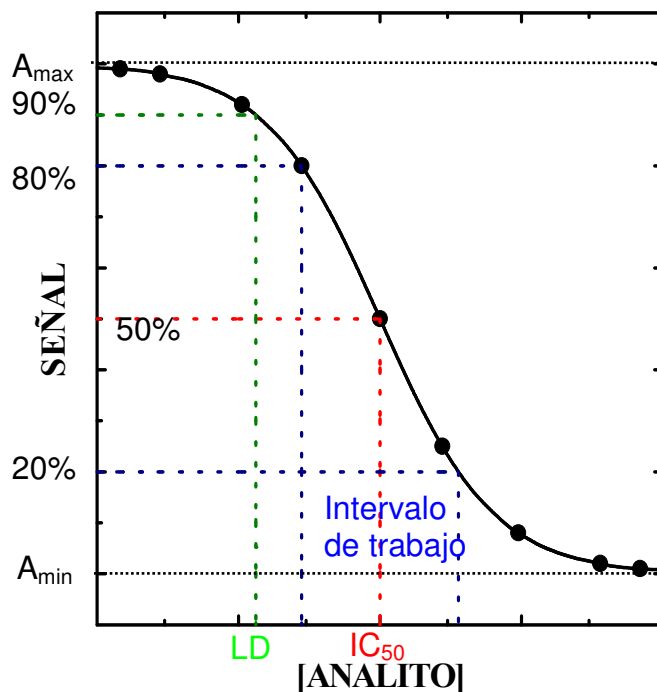


Figura 9. Curva de calibrado típica de un inmunoensayo competitivo

1.3.4. Métodos de barrido (*Screening*)

En análisis de rutina, un elevado porcentaje de muestras puede no contener los compuestos buscados, siendo muy interesante disponer de metodologías que proporcionen respuestas binarias tipo sí/no, positivo/negativo o presencia/ausencia. Estos métodos indican, mediante barrido rápido, si el compuesto diana está presente por encima o por debajo de un umbral de concentración pre-establecido.

La evaluación de las técnicas analíticas más usadas en la actualidad en términos de productividad, coste y exactitud, demuestra que los métodos inmunoquímicos son muy convenientes para el monitoreo de muestras naturales (159-162) con confidencialidad y minimización de errores, debido al escaso o nulo tratamiento de muestra. Así, la aplicación de estos métodos como *tests de screening* -“método analítico que es capaz de llevar a cabo la selección de aquellas muestras cuyo contenido es similar o mayor que

uno previamente establecido como umbral” (163)- permite eliminar las muestras negativas y, si es pertinente, confirmar las positivas mediante un método de referencia que, en la mayoría de los casos, es cromatográfico, lo que supone un ahorro de tiempo y costes.

En el campo del análisis inmunoquímico de plaguicidas, la mayoría de los métodos directos de monitoreo descritos en la bibliografía se han aplicado a matrices medioambientales (164-166). En el caso de matrices más complejas como los alimentos, numerosos kits comerciales para la determinación de plaguicidas (Tabla 7) necesitan efectuar un pre-tratamiento de muestra, lo que supone una cierta traba para estos procedimientos como métodos de barrido. Otro inconveniente es que las metodologías inmunoquímicas sólo permiten la determinación de uno o dos analitos simultáneamente (167-169).

1.3.4.1. Inmunofiltración-Ensayos en membrana

Entre los inmunoensayos denominados de barrido se incluyen los basados en inmunofiltración, cuya principal ventaja es su facilidad de uso sin una excesiva preparación de muestra. Este formato de inmunoensayo es muy apropiado para ser aplicado fuera del laboratorio, y por personal no especializado.

De entre los diferentes formatos destaca el denominado ELIFA (*Enzyme-Linked Immunoflow Assay*) (Figura 10), que combina las características del ELISA y del *Western blotting*. En un ELIFA, las proteínas se adsorben en una membrana -en lugar de en una placa de poliestireno- y las disoluciones se filtran a vacío. Ello permite concentrar tanto reactivos como analitos; además, la filtración ayuda también a reducir el tiempo de análisis (170).

Las membranas utilizadas como soporte tienen una composición (nylon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno, etc.) adecuada para inmovilizar los inmunorreactivos y desarrollar el ensayo, permitiendo la determinación visual directa (interpretación del color) de los resultados (171).

Tabla 7. Aplicación de kits comerciales basados en inmunoensayo para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos

<i>Análito</i>	Alacloro	Alacloro	Aldicarb	Atrazina	Atrazina	Benomilo (MCB/TBZ)	Benomilo	Benomilo	Carbaryl	Carbendazima
<i>Matriz</i>	Alimentos	Carnes	Alimentos	Alimentos	Carnes	Frutas y vegetales	Frutas y vegetales	Carnes	Alimentos	Alimentos
<i>Pretratamiento de muestra</i>	SPE, ACN como modificador de la matriz	SFE dinámica, limpieza SPE y extracción ACN/HX	SPE, ACN como modificador de la matriz	SPE, ACN como modificador de la matriz	SFE dinámica, limpieza SPE y extracción ACN/HX	Extracción MeOH/H ₂ O (1/10)	Extracción acetona y kit preparación de alimentos	SFE dinámica, limpieza SPE y extracción ACN/HX	SPE, ACN como modificador de la matriz	SPE, ACN como modificador de la matriz
<i>Formato</i>	PM	PM	PM	PM	PM	Placa	PM	PM	PM	PM
<i>Fabricante</i>	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Millipore	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics
<i>LD</i>		1 ppb		1 ppb	1 ppb	0,02 mg/Kg	0,38 ppb	5 ppb		
<i>RD</i>		1-14 ppb		1-14 ppb	1-14 ppb	62-1.200 ppb	1-14 ppb			
<i>R(%)</i>	108	100	86,5	100	74,6	≅ 100	100		68,5	

LD: límite de detección, RD: rango dinámico, R: recuperación, PM: partículas magnéticas, SPE: extracción en fase sólida, SFE: extracción con fluido supercrítico, ACN: acetonitrilo, MeOH: metanol, HX: hexano

Tabla 7. cont.

<i>Análito</i>	Carbofurano	Carbofurano	Cianazina	Clorpirifos	Clorpirifos para bebes	Clorpirifos-metil	Clorpirifos-metil	2,4-D	2,4-D	2,4-D
<i>Matriz</i>	Alimentos	Carnes	Alimentos	Frutas y granos	Alimentos para bebes	Granos	Granos	Frutas y vegetales	Alimentos	Carnes
<i>Pretratamiento de muestra</i>	SPE, ACN como modificador de la matriz	SFE dinámica, limpieza SPE y extracción ACN/HX	SPE, ACN como modificador de la matriz	Extracción con ACN o MeOH	SPE, ACN como modificador de la matriz	Extracción MeOH y concentración a 10 mL	70% de alcohol isopropílico y agitación 2 min	Extracción con MeOH/H ₂ O (1/10)	SPE, ACN como modificador de la matriz	SFE dinámica, limpieza SPE y extracción ACN/HX
<i>Formato</i>	PM	PM	PM	PM	PM	Placa	Tubo	Placa	PM	PM
<i>Fabricante</i>	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Millipore	Millipore	Millipore	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics
<i>LD</i>		3 ppb		0,1 ppb				0,2 ppm		14 ppb
<i>RD</i>		1-14 ppb		0,22- 3 ppb		0,01-2 ppm	0,5-10 ppb			
<i>R(%)</i>	79,5	100	30,4		100		97,8-104			140

LD: límite de detección, RD: rango dinámico, R: recuperación, PM: partículas magnéticas, SPE: extracción en fase sólida, SFE: extracción con fluido supercrítico, ACN: acetonitrilo, MeOH: metanol, HX: hexano

Tabla 7. cont.

<i>Análito</i>	Diazinón	Dieldrin	Fenitrothion	Metolaclo-ro	PCP	Pirimifos-metil	Procimidona	Procimidona	Procimidona	Triazinas
<i>Matriz</i>	Frutas y vegetales	Carnes	Granos	Alimentos	Leche	Granos	Vino	Vino	Pimiento	Leche
<i>Pretratamiento de muestra</i>	Extracción MeOH y limpieza SPE	SPE y solubilización con 2 mL de 0,01% Tween 20	Extracción MeOH y concentrado a 10 mL	SPE, ACN como modificador de la matriz	Sin tratamiento	Extracción MeOH y concentrado a 10 mL	Dilución de la muestra	Sin tratamiento, filtración	Extracción Na ₂ SO ₄ , etilacetato, evaporación, reconstrucción en éter de petróleo y SPE	Sin tratamiento
<i>Formato</i>	Placa	Tubo	Placa	PM	Tubo	Placa	PM	PM	Tubo	Placa
<i>Fabricante</i>	Strategic Diagnostics	Abraxis	Millipore	Strategic Diagnostics	Millipore	Millipore	Strategic Diagnostics	Strategic Diagnostics	Millipore	Millipore
<i>LD</i>	0,5 ppb							2 ppb	0,6 ppb	
<i>RD</i>	30-500 ppt		0,3-3 ppm			0,5-2 ppm	2-100 ppb		5-80 ppb	
<i>R(%)</i>	87			72,6		>100	109		70,2-102,9	

LD: límite de detección, RD: rango dinámico, R: recuperación, PM: partículas magnéticas, SPE: extracción en fase sólida, SFE: extracción con fluido supercrítico, ACN: acetonitrilo, MeOH: metanol, HX: hexano

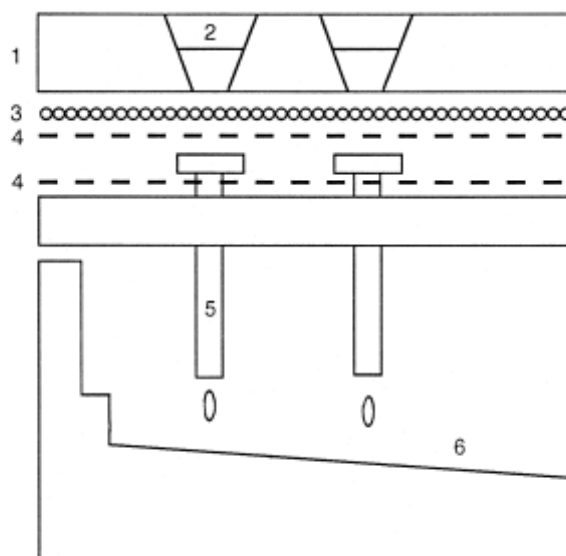


Figura 10. Esquema de un sistema ELIFA. (1: placa de aplicación de la muestra, 2: pocillo de la muestra, 3: membrana, 4: juntas de silicona, 5: cánulas de transferencia, 6: cámara de recolección)

Inicialmente, la inmunofiltración se utilizó para la detección de anticuerpos específicos contra proteínas cuyas conformaciones podrían verse afectadas por la adsorción a diferentes superficies (172, 173). Sin embargo, la inmunofiltración es muy versátil, y se ha usado para la selección y caracterización de soportes para el desarrollo de inmunosensores (174), habiéndose aplicado con profusión en el campo clínico y en el medioambiental. Por ejemplo, se ha usado para ensayos semicuantitativos de proteínas humanas (175), para la detección de estreptomicina en leche (176) o fumonisim B1 en alimentos conteniendo maíz (177), la determinación de 2,4,6-trinitrotolueno en agua y suelos (178), sulfonamidas (179) y sulfametacina en orina porcina (180), y atrazina en aguas y suelos (181).

Otro formato ampliamente utilizado dentro de los inmunoensayos rápidos en membrana es el basado en tiras reactivas (*strips* de flujo lateral, *dipsticks*, *lateral flow immunoassays* o inmunocromatografía). En los inmunoensayos de flujo lateral todos los reactivos se sitúan en un soporte sólido y mediante el flujo capilar de la muestra líquida se determina la presencia o ausencia de un determinado analito. Este formato presenta importantes ventajas para su aplicación en *screening*. Entre ellas destacan su facilidad de uso, rapidez y versatilidad, con costes competitivos.

Existen gran cantidad de tests comerciales que utilizan formato en tiras para diagnóstico veterinario y humano: test de embarazo, hormonas, alérgenos, detección de toxinas (182) y drogas (183); también se utilizan para detectar organismos modificados

genéticamente, y en el monitoreo medioambiental. Su uso como herramienta de diagnóstico para detección de plaguicidas se está introduciendo paulatinamente (184-191), y sus aplicaciones son diversas (192-195). En el ámbito agroalimentario se han utilizado para determinar atrazina (196) y 2,4-D (187) en aguas, naranjas y orina. También se han usado para determinar carbaril (197) y paratión-metil (198) en muestras vegetales, con un límite de detección visual de 10 µg/L en ambos casos, y tiempos de ensayo de 15 y 30 minutos para carbaril y paratión-metil, respectivamente. Usando un lector basado en medidas de reflectancia, el límite de detección es de 0,3 µg/L para paratión-metil. Las tiras reactivas también se han aplicado a la determinación de residuos de organofosforados, concretamente de fentión (199) en arroz y lechuga -tras triturar, filtrar y diluir el extracto acuoso-, con recuperaciones entre el 87% y el 116%. Este ensayo presenta un límite de detección de 0,5 µg/L utilizando medidas de reflectancia.

1.4. El aceite de oliva

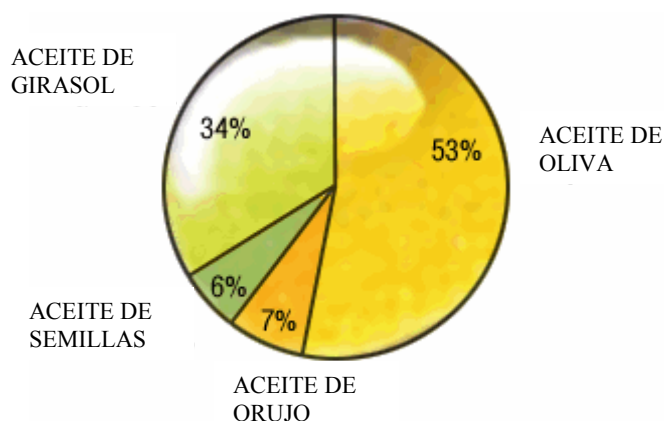
Un aceite vegetal es un extracto orgánico obtenido a partir de semillas o frutos de plantas como la aceituna, soja, maíz, girasol, colza, pepitas de uva, etc. Según el Departamento de Agricultura de EE.UU., el consumo mundial de aceites vegetales en el año 2000 fue de 84 millones de toneladas (Tabla 8). En el año 2006, el consumo de aceite de oliva se situó entre un 1,8% y un 2,2% del total de aceites vegetales, aunque en España y otros países mediterráneos como Italia y Grecia, el porcentaje era considerablemente mayor (>60%), con un consumo aproximado de 13 litros por habitante y año.

Tabla 8. Consumo mundial de aceites vegetales en el año 2000

<i>Aceite</i>	<i>Consumo (t)</i>
Soja	26.000
Palma	23.300
Colza	13.100
Girasol	8.600
Cacahuete	4.200
Semilla de algodón	3.600
Hueso de palma	2.700
Oliva	2.500

Fuente: Departamento de Agricultura de EE.UU.

En España, el consumo de aceite, tanto en usos domésticos como industriales, se reparte, principalmente, entre aceite de oliva (53%) y aceite de girasol (34%) (Figura 11).



ACEITE	CONSUMO TOTAL (t)
Aceite de OLIVA	475.000
Aceite de ORUJO	65.000
Aceite de GIRASOL	310.000
Otros aceites de SEMILLAS	50.000
TOTAL	900.000

Fuente: Anierac. Año 2006

Figura 11. Consumo de aceites comestibles en España

El aceite de oliva posee un aroma, sabor y color característico que lo diferencia de otros aceites vegetales (200); su consumo está en alza debido a sus excelentes cualidades nutritivas y organolépticas, y a la creciente preferencia de los consumidores por los alimentos mínimamente procesados.

Este producto tiene una gran importancia en la economía de diferentes regiones del área mediterránea. En España, el cultivo del olivar ocupa una superficie de 2.400.000 ha, lo que la sitúa como líder mundial entre los países productores de este aceite, con una producción de 829.475 t en la campaña 2006/2007 (201).

Aunque son trece las comunidades autónomas que cultivan el olivar en España, la producción se concentra en Andalucía, con un 82,1% de la producción total española, seguida de Castilla-La Mancha (5,2%) y Extremadura (5,2%), Cataluña (2,7%), Comunidad Valenciana (2,2%) y Aragón (1,1%) (Tabla 9). Hay que tener en cuenta que el cultivo del olivar se caracteriza por ser muy artesanal, existiendo realidades oleícolas muy diferentes en función de su ubicación geográfica, que hay que contemplar desde un

punto de vista económico, sin olvidar los aspectos sociales, culturales, paisajísticos y agronómicos.

Tabla 9. Producción española de aceite de oliva (t) por comunidades autónomas

<i>CC.AA.</i>	<i>Campaña 2006/2007</i>
Andalucía	681.360
Castilla La Mancha	43.459
Extremadura	43.207
Cataluña	22.093
Comunidad Valenciana	18.040
Aragón	9.239
Otras comunidades	12.077
Total	829.475

Fuente: MAPA. Año 2007

La producción de aceite de oliva reúne una serie de particularidades que la diferencian de la mayor parte de aceites y grasas vegetales: está muy localizada, el aceite de oliva es un producto natural que puede consumirse tal como se extrae del fruto y, además, su volumen es proporcionalmente muy pequeño.

El aceite de oliva representa sólo el 3,3 % de la producción total de aceites y grasas vegetales, y su producción se concentra en la cuenca del Mediterráneo. En la Figura 12 puede apreciarse que, aproximadamente, el 75% de esta producción proviene de países de la Unión Europea, y que solo España e Italia producen más del 50% del aceite de oliva mundial, aunque las cifras varían según las cosechas.

La evolución de la producción mundial de aceite de oliva en los diez últimos años (Figura 13) muestra una tendencia global al alza. Además, como muestra la Figura 14, los principales países consumidores son también los mayores productores. El consumo en los países de la Unión Europea representa el 71% del consumo mundial, y el 77% en los países de la cuenca mediterránea. El resto de países consumidores son Estados Unidos, Canadá, Australia y Japón. Finalmente, es de destacar que países no recogidos en el gráfico están incrementando su producción, especialmente Australia y Estados Unidos.

El paralelismo observado entre las curvas de consumo mundial y europeo (Figura 15) indica la importancia del consumo de este producto en la Unión Europea. Hay que tener en cuenta que la distancia entre estas curvas se ha incrementado en los últimos años debido a la apertura de nuevos mercados para el aceite de oliva.

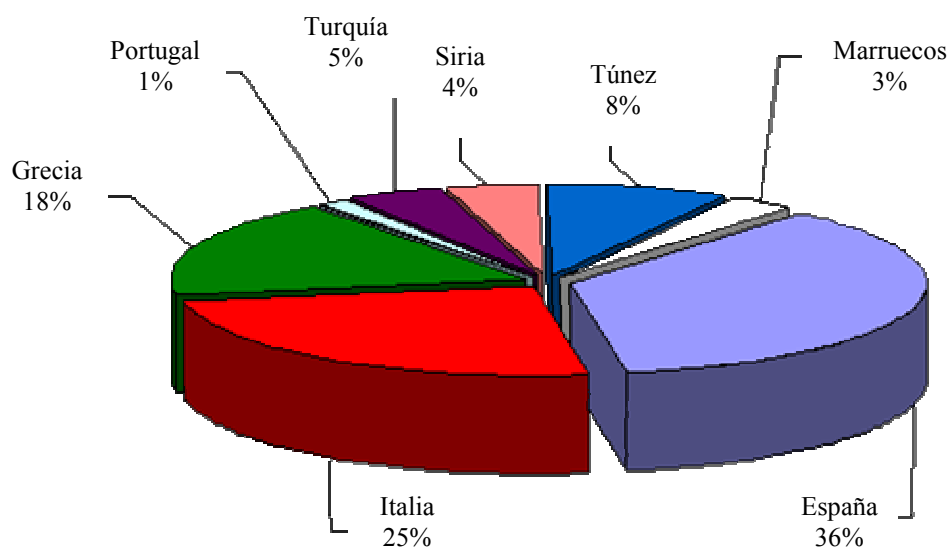


Figura 12. Principales países productores de aceite de oliva y porcentajes de producción en 2005.

Fuente: Secretariado de la UNCTAD. Datos del Consejo Oleícola Internacional. Año 2006

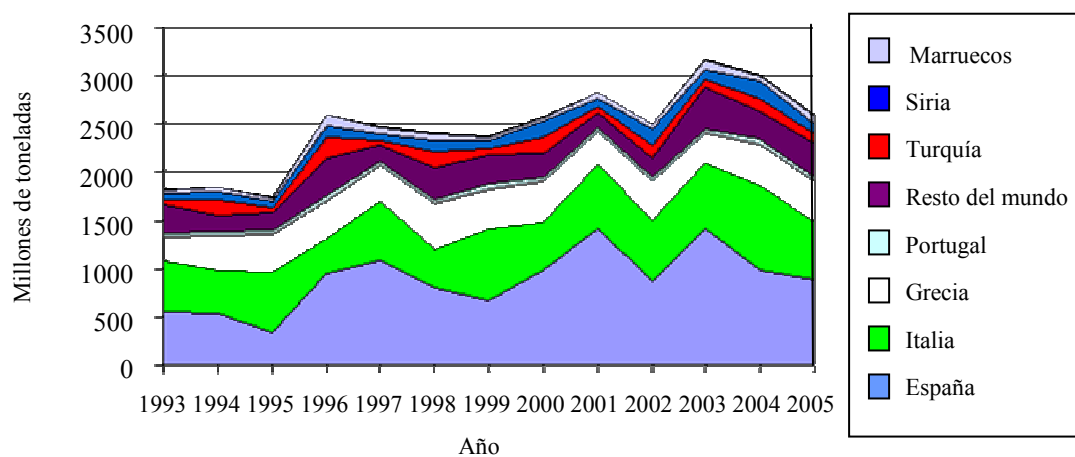


Figura 13. Producción de aceite de oliva (millones de t) en el periodo 1993-2005.

Fuente: Secretariado de la UNCTAD. Datos del Consejo Oleícola Internacional. Año 2006

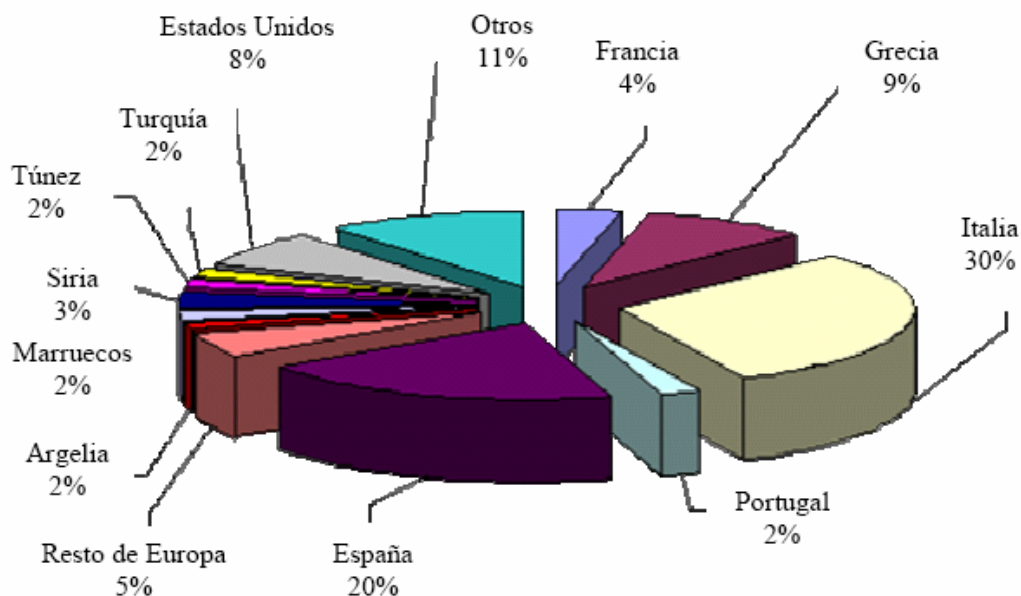


Figura 14. Principales países consumidores de aceite de oliva y porcentajes de consumo en 2005.

Fuente: Secretariado de la UNCTAD. Datos del Consejo Oleícola Internacional. Año 2006

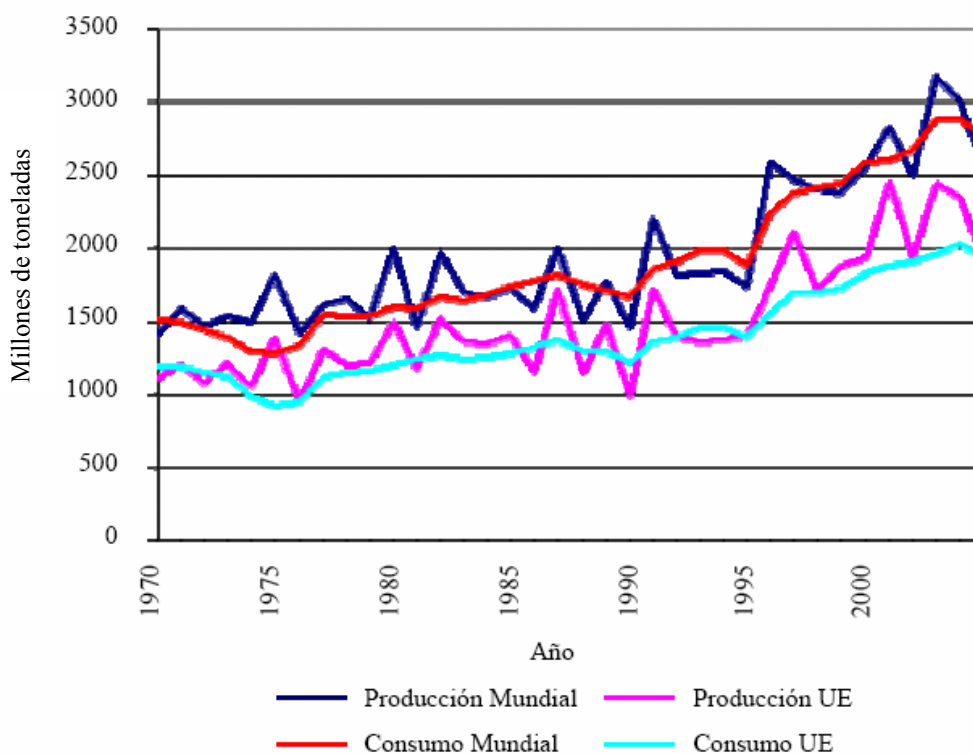


Figura 15. Producción y consumo de aceite de oliva (millones de t) a nivel mundial y en la Unión Europea (periodo 1970-2005).

Fuente: Secretariado de la UNCTAD. Datos del Consejo Oleícola Internacional. Año 2006

Los componentes del aceite de oliva pueden clasificarse en dos grupos, la fracción saponificable y la insaponificable. La primera está constituida por triglicéridos (ésteres de ácidos grasos y glicerina) y ácidos grasos libres. Entre los ácidos grasos más abundantes (Tabla 10) se encuentran el ácido oleico monoinsaturado y, en menor proporción, los ácidos poliinsaturados linoleico y linolénico. Los ácidos grasos saturados se encuentran en cantidades similares -o incluso menores- a las de otros aceites vegetales.

Tabla 10. Contenido en los principales ácidos grasos de los aceites vegetales más consumidos

<i>Tipo de aceite</i>	<i>Porcentaje de ácidos grasos</i>		
	Oleico	Linoleico	Linolénico
Oliva	61-83	2-18	≤ 1,5
Girasol	15-38	50-72	≤ 0,2
Maíz	22-40	45-65	≤ 1,5
Soja	20-35	45-60	6-10

La fracción insaponificable incluye diversos grupos de compuestos: ésteres de ácidos grasos no glicéridos, hidrocarburos, esteroides, alcoholes triterpénicos, tocoferoles, fenoles, fosfolípidos, clorofilas y compuestos aromáticos. Entre los terpenos se encuentra el escualeno. Los carotenos suponen de 0,5 a 10 mg/kg y constituyen el factor provitamina A del aceite, siendo responsables, junto a la clorofila, de la coloración verde-amarilla de éste. El contenido en α -tocoferol representa el 90-95% de los tocoferoles totales y es el más activo por su acción como vitamina E.

1.4.1. Tipos, obtención y producción del aceite de oliva

La legislación española distingue diversos tipos de **aceite de oliva** atendiendo al modo de obtención:

- **Aceite de oliva virgen extra:** se obtiene de las aceitunas por medios mecánicos sin ningún otro tratamiento, pudiendo ser consumido sin refinar. Su acidez debe ser $<0,8^\circ$.

- **Aceite de oliva virgen:** se obtiene mediante métodos mecánicos y no es refinado, pero posee mayor acidez que el extra. La acidez oscila desde $0,8^\circ$ hasta 2° para el fino y hasta $3,3^\circ$ para el corriente. Si supera dicha acidez, se denomina aceite lampante y no es apto para el consumo.

- **Aceite de oliva:** se obtiene a partir de aceite de oliva refinado al que se añade un 15% de aceite de oliva virgen extra. Esta denominación da lugar a frecuentes confusiones. El aceite refinado es normalmente aceite lampante tratado en una refinería (de ahí su nombre) para, por procedimientos químicos y físicos, mejorar sus propiedades indeseables (acidez, olor, sabor, etc.). El aceite obtenido no tiene -prácticamente- sabor o aroma, razón por la que se le añade aceite de oliva virgen o virgen extra.

- **Aceite de orujo de oliva:** Se obtiene mediante extracción con disolventes, a partir del orujo de aceituna -residuo sólido procedente de la extracción del aceite virgen (huesos, pieles y pulpa)-. En la etapa de envasado se le adiciona una pequeña cantidad de aceite de oliva virgen.

En una almazara, la extracción del aceite de oliva virgen se puede llevar a cabo, fundamentalmente, por dos métodos: presión y centrifugación. El sistema clásico es el de presión, en el que la pasta procedente de las aceitunas molidas se reparte en capachos, obteniéndose por prensado. En una almazara moderna la pasta es batida y se centrifuga en un equipo de eje horizontal, obteniéndose tres fases -aceite, alpechín y orujo- (Figura 16).

En los últimos años se ha asistido a un cambio tecnológico en el sistema continuo de centrifugación, obteniendo sólo dos fases. Se ha demostrado que utilizando este nuevo sistema de extracción, el rendimiento industrial es similar y la calidad del aceite comparable al que proporciona tres fases.

Desde un punto de vista económico, el sistema clásico de presión no puede competir con el sistema continuo o de centrifugación, debido -fundamentalmente- a los elevados costes de elaboración (requiere más mano de obra), a la discontinuidad de la producción, y al elevado coste de los materiales filtrantes.

1.4.2. El aceite de oliva y los plaguicidas

El olivar se ve atacado por una gran variedad de insectos y plagas, principalmente la mosca de la fruta de la oliva -*Bactocera (Dacus) oleae*- que afecta a la producción tanto en cantidad como en calidad, y que está considerada una de las plagas más importantes y temibles del olivo. La mosca adulta pone sus huevos en el fruto y la larva se desarrolla en el interior alimentándose del mesocarpio, lo que provoca la caída de las aceitunas y

la disminución del peso (20%), y por tanto del rendimiento. Pero lo más importante es el daño indirecto que causa en la calidad del aceite de la aceituna atacada. El desarrollo de la larva origina en los frutos un gran número de galerías y agujeros, por donde penetran hongos (*Gloeosporium olivarium*) y bacterias que alteran gravemente la calidad de los aceites -aumento de acidez y deterioro de las características organolépticas-.

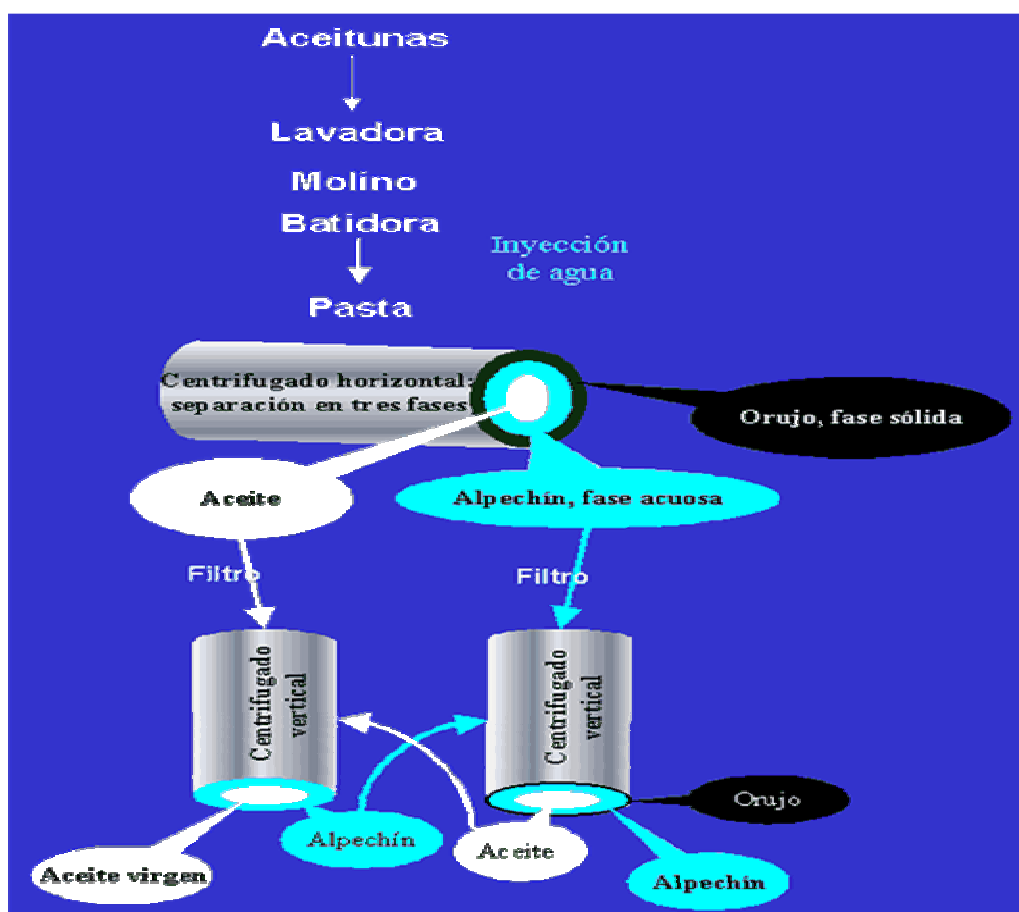


Figura 16. Esquema del proceso de obtención del aceite de oliva

Fuente: UNCTAD. Año 2005

Los productos fitosanitarios más aplicados en los olivares de los países mediterráneos son los herbicidas y los insecticidas. Algunos de los plaguicidas utilizados para controlar las plagas pueden persistir hasta la recolección y son lipofílicos, con altos valores de coeficientes de partición n-octanol-agua (k_{ow}), lo que favorece que sus residuos se concentren en el aceite durante el proceso de extracción, provocando la contaminación del mismo. El uso de plaguicidas puede determinar su

presencia en las aceitunas y, consecuentemente, en el aceite de oliva, el cual debe de ser controlado regularmente (202-205).

Los insecticidas más usados en el cultivo del olivar son los organofosforados (206), principalmente dimetoato, diazinón, paratión-metil y clorpirifos -se usa en combinación con endosulfán- (ver Tabla 11). Además, otros plaguicidas como fentión y malatión han sido ampliamente utilizados en algunos de los países productores (204) como, por ejemplo, Grecia. Actualmente, algunos de los fitosanitarios recomendados que aparecen en la Tabla 11 han sido prohibidos. Su sustitución no está bien resuelta a la hora de evaluar su eficacia como plaguicidas para el olivo.

La Unión Europea, y la Comisión del Codex Alimentario de la Organización para los Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), han establecido límites máximos de residuos (LMRs) para plaguicidas en aceitunas y aceite de oliva (5). Actualmente, se están llevando a cabo varios programas de control de residuos de plaguicidas en aceite de oliva para establecer nuevas y más rigurosas regulaciones concernientes al límite máximo de residuos en este producto (207).

1.4.3. Determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva

La determinación de residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos (por ejemplo PCBs, dibenzodioxinas cloradas y dibenzofuranos) en muestras grasas requiere diferentes etapas de preparación de muestra, básicamente extracción y limpieza (*clean up*) o purificación de los extractos.

El aceite de oliva es más complejo de analizar que otros aceites vegetales -soja, girasol y germen de trigo-. Esto se debe, en parte, a la presencia relativamente elevada de lípidos que eluyen en la etapa de limpieza, y a los componentes potencialmente interferentes (por ejemplo los pigmentos) que co-eluyen cuando se realiza la determinación cromatográfica (208). Así pues, se requieren diferentes tratamientos con el fin de eliminar las interferencias de la matriz (209). Además, son bien conocidos los problemas analíticos asociados con la determinación de plaguicidas en matrices grasas, ya que incluso pequeñas cantidades de lípidos pueden causar daños en columnas y detectores, haciendo imposible la confirmación inequívoca de la identidad del analito.

Tabla 11. Principales plagas del olivo y tratamientos fitosanitarios recomendados *

<i>Plaga</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Fecha de aplicación</i>
Mosca del olivo (<i>Dacus oleae</i>)	Dimetoato, diazinón , deltametrín, malatión , triclorfón, formotión, metidatión, fosmet, fentión	Julio
Polilla del olivo (<i>Prays oleae</i>)	Dimetoato, carbaril, endosulfan, triclorfón, clorpirifos , diazinón , formotión, fosmet, metidatión	Antes de la floración y eventualmente sobre las aceitunas en fase de crecimiento
Arañuela del olivo (<i>Liothrips oleae</i>)	Dimetoato, formotión, malatión , triclorfón	Primavera y verano
Escarabajo picudo (<i>Coenrrhinus cribipennis</i>)	Ésteres fosfóricos	Inmediatamente después del cuajado del fruto
Barrenillo del olivo (<i>Phloeotribus scarabaeoides</i>)	Formotión, dimetoato, metidatión	
Cochinilla del tizne (<i>Saissetia oleae</i>)	Carbaril, fosmet, pirimifos-metil	Agosto
Abichado del olivo (<i>Euzophera pinguis</i>)	Fosmet, clorpirifos , fentitrotión	Abril-mayo y octubre
Serpeta (<i>Lepidosaphes ulmi</i>)	Malatión	Verano
Polilla del Jazmín o Glifodes (<i>Margaronia unionalis</i>)	Carbaril, dimetoato	Primavera
Algodón del olivo (<i>Euphyllura olivina</i>)	Dimetoato y malatión	Cuando existan poblaciones superiores a 10 insectos por inflorescencia

*Actualmente se han prohibido algunos de los fitosanitarios recomendados. Su sustitución no está bien resuelta a la hora de evaluar su eficacia como plaguicidas para el olivo; de aquí la necesidad de implementar programas efectivos de vigilancia de la calidad del aceite de oliva.

En la Tabla 12 se muestran los niveles de residuos de diferentes plaguicidas encontrados en aceite de oliva. De aquí, la necesidad de implementar programas efectivos de vigilancia de la calidad del aceite de oliva.

Tabla 12. Residuos de plaguicidas encontrados en aceite de oliva

<i>Analito</i>	<i>Tratamiento de muestra / Técnica de determinación</i>	<i>Concentración (µg/kg)</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Ref.</i>
Acefato	SPE/GC-NPD	10	España	214
Azinfos-etil	SPE/GC-NPD	90	Italia	116
Carbaril	Extracción líquido-líquido, limpieza con GPC/ GC-MS/MS	9	España	246
Clorpirifos-metil	SPE/GC-NPD	80	Italia	116
Diazinón	SPE/GC-NPD	83	Italia	116
Diurón	Extracción líquido-líquido, limpieza con GPC/ GC-MS/MS	31	España	246
Dimetoato	SPE/GC-NPD	61	Italia	116
Dimetoato	HS-SPME/GC-FTD	33	Grecia	254
Endosulfán	Extracción líquido-líquido, limpieza en columna Sep-Pack alumina-N/ GC-ECD	570	Grecia	226
Endosulfán sulfato	Extracción líquido-líquido, limpieza con GPC/ GC-MS/MS	31	España	246
Etión	HS-SPME/GC-FTD	51	Grecia	254
Fentión	SPE/GC-NPD	73	Italia	116
Fentión	HS-SPME/GC-FTD	93	Grecia	254
Fentión	Extracción líquido-líquido/ GC-FPD	350	Italia	255
Fentión sulfóxido	HS-SPME/GC-FTD	93	Grecia	254
Formotión	SPE/GC-NPD	82	Italia	116
Malaoxon	HS-SPME/GC-FTD	22	Grecia	254
Metidatió	SPE/GC-NPD	63	Italia	116
Ometoato	HS-SPME/GC-FTD	33	Grecia	254
Paratió	SPE/GC-NPD	80	Italia	116
Paratió-metil	SPE/GC-NPD	56	Italia	116

El método preferido para la determinación de plaguicidas volátiles en aceites es la cromatografía gaseosa (GC), debido a su elevada eficiencia de separación y a la variedad de métodos de detección disponibles. Entre ellos destacan el detector de nitrógeno-fósforo (NPD) -denominado también detección termoiónica específica (TSD)- para compuestos que contienen N o P (75, 117, 204, 210), y el detector de fotometría de llama (FPD) (211, 212) -más apropiado para compuestos que contienen P (213)-.

Sin embargo, desde hace algunos años, la espectrometría de masas (MS) es el tipo de detección más utilizado, normalmente en modo monitorización de iones (SIM) (214-218).

Alternativamente, para alcanzar altos niveles de selectividad y bajos límites de detección en extractos secos (219), puede utilizarse MS en tandem (MS/MS), con trampa de iones (220) o triple cuadrupolo (221).

En general, la determinación de residuos en aceites presenta varios problemas: el primero deriva de la complejidad y diversidad de la matriz; otro problema es el debido a los propios plaguicidas, a sus metabolitos y productos de degradación. El tercero es consecuencia de la baja concentración en la que generalmente se encuentran estos compuestos. Además, los métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos grasos deben cumplir otro objetivo: ser capaces de identificar, cuantificar y confirmar su presencia a los niveles de tolerancia establecidos por la legislación.

Por todo ello, los métodos cromatográficos multiresiduo son los más adecuados para el análisis de aceites. En general, los métodos multiresiduo utilizan un protocolo de cuatro etapas, a saber: extracción de los plaguicidas de la matriz, limpieza del extracto, preconcentración de los analitos y determinación cromatográfica.

El método general multiresiduo de la AOAC para la determinación de organofosforados y organoclorados en alimentos grasos (75) usa extracción líquido-líquido, seguido de una etapa de limpieza con columnas convencionales de florisil -para eliminar la grasa residual de los extractos- antes de la determinación por cromatografía gaseosa. Esta técnica es laboriosa, consume mucho tiempo y requiere grandes volúmenes de disolvente orgánico (acetato de etilo), además de personal entrenado.

Lentza-Rizos *et al.* (211) realizaron una revisión de los distintos métodos multiresiduo propuestos para plaguicidas utilizando diferentes técnicas de limpieza, especialmente los aplicados al aceite de oliva. Algunos se basan en extracción líquido-

líquido (75, 210, 222), cromatografía de permeación en gel (GPC) (212, 213), extracción en fase sólida (117, 214, 223, 224) con diferentes adsorbentes -florisil (225), alúmina neutra (226) o C₁₈ (227)-, microextracción en fase sólida (SPME) (228-233) usando fibras de sílice fundida recubiertas con diferentes fases [polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB), PDMS, carboxeno-polidimetilsiloxano (CARPDMS), DVB-CAR-PDMS, etc.], dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) (215, 234-236), extracción con microondas (237, 238) o extracción con fluidos supercríticos (SFE) (239, 240).

La extracción líquido-líquido se usa para eliminar sustancias insolubles o poco solubles en agua, no requiere equipamiento especial y es fácil de realizar. Sin embargo, presenta desventajas como: elevado consumo de disolventes, posibilidad de formación de emulsiones en la interfase disolvente-muestra, bajo rendimiento de extracción, pérdidas de analito durante las operaciones de transferencia y evaporación, y dificultad de automatización (241). La extracción “tradicional” tipo Soxhlet es una técnica mejorada de extracción líquida de matrices sólidas (237) que utiliza un extractor especial, en el cual se depositan generalmente de 5 a 10 g de muestra y 100 mL de disolvente orgánico, y cuya duración varía entre 4 y 48 horas. Actualmente se utilizan métodos acelerados de extracción con disolventes (Soxhlet “semi-automatizado”) que acortan el proceso usando disolventes a elevada presión y temperatura, permitiendo una extracción más rápida y segura, a la vez que se reduce la cantidad de disolvente utilizada.

La cromatografía de permeación en gel (GPC) es un procedimiento de limpieza basado en la exclusión molecular, que utiliza disolventes orgánicos y un gel hidrofóbico (generalmente un copolímero entrecruzado de divinilbenceno-estireno) para separar macromoléculas. La GPC se usa para eliminar interferencias de alto peso molecular, y se recomienda para separar lípidos, polímeros, proteínas, pigmentos, resinas naturales y componentes celulares de una muestra antes de su análisis.

Un ejemplo es el GPC AutoPrep 2000 system de OI Analytical (Figura 17). Este sistema comercial posee un muestreador automático para inyectar hasta 60 muestras y recoger las fracciones purificadas. La metodología recomienda usar GPC para separar grasas o aceites de matrices alimenticias antes del análisis de plaguicidas usando GC, ya que si se inyectan extractos de muestras con alto contenido en lípidos, tanto el puerto de inyección como la propia columna se contaminan fácilmente, provocando baja

recuperación y cromatogramas pobres. Un ejemplo de cromatograma obtenido con una muestra de aceite de oliva pretratada mediante esta técnica se muestra en la Figura 18.



Figura 17. Imagen de un sistema GPC comercial.
Reproducción de O.I. Analytical, Inc.

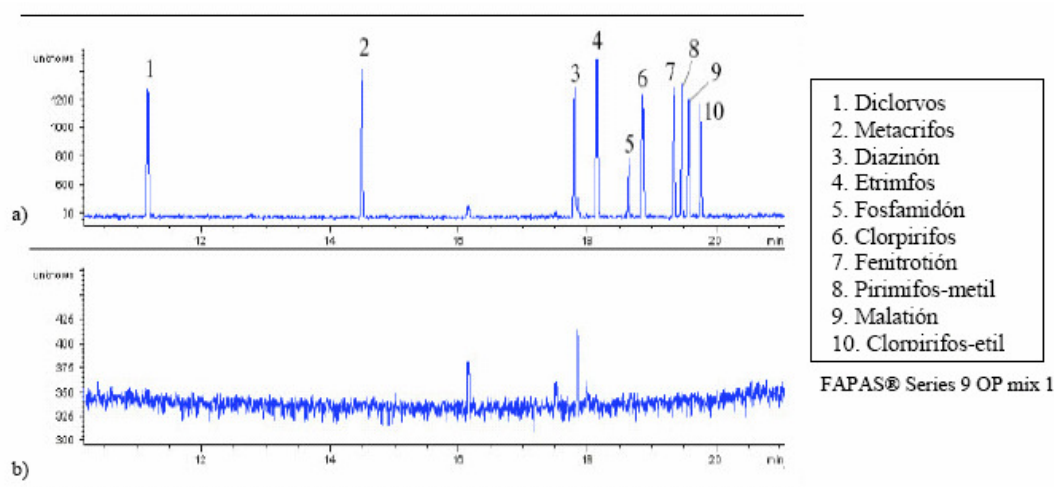


Figura 18. Cromatogramas GC-PPFD de aceite de oliva tras una etapa de limpieza mediante GPC. a) muestra dopada con 50 ng/mL de FAPAS® Series 9 OP mix 1. b) muestra de aceite de oliva sin dopar.
Reproducción de O.I. Analytical, Inc.

En las últimas décadas, la extracción en fase sólida (SPE) se ha convertido en la principal alternativa frente a la extracción líquido-líquido. La SPE se basa en la adsorción de una sustancia en un sólido bajo la acción de fuerzas no covalentes (normalmente hidrofóbicas) (242). La SPE combina las etapas de preconcentración y extracción de compuestos orgánicos del agua (243, 244). La muestra líquida se pone en

contacto con el adsorbente (C₁₈, C₈, sílice, divinilbenceno, estireno, etc.) dispuesto en cartuchos, discos, etc., y, posteriormente, se lava el sólido y se eluye el analito con el disolvente apropiado. La miniaturización de la SPE ha dado lugar al desarrollo de la denominada microextracción en fase sólida (SPME), que utiliza agujas o barras agitadoras recubiertas de Carbowax, divinilbenceno, Carboxeno o PDMS, para la adsorción y preconcentración de los analitos (245).

Entre los métodos multiresiduo aplicados a plaguicidas organofosforados, destaca por su sencillez el descrito por Cabras *et al.* (210) -para 13 compuestos-, que realiza una extracción con acetonitrilo como única etapa de limpieza. Para niveles de dopaje de aproximadamente 100 µg/kg y utilizando GC-NPD, obtiene recuperaciones del 94% para diazinón y 98% para fentión.

Dugo *et al.* (246) describen un método para plaguicidas organofosforados en aceite de oliva basado en extracción con acetonitrilo y centrifugación. La determinación se realiza mediante GC-FPD y el límite de detección para fentión es 3 µg/kg. Sin embargo, estos métodos acortan la vida de las columnas y del sistema cromatográfico, haciendo necesaria una mayor limpieza de los extractos.

Hiskia *et al.* (204) realizan el análisis por GC utilizando diferentes detectores (FPD y NPD), tras la extracción de la muestra con hexano y limpieza mediante partición entre hexano y acetonitrilo. Con GC-FPD alcanzan límites de detección de 0,5 µg/kg para diazinón y malatión, y 0,1 µg/kg para fentión y clorpirifos.

Entre las metodologías que utilizan GPC para determinación de estos compuestos, encontramos la descrita por Guardia-Rubio *et al.* (247). Tras extraer con hexano saturado en acetonitrilo y concentrar el extracto, realizan GPC seguida de GC-TSD (5 µg/kg de LD y 97% de recuperación para diazinón, y 2 µg/kg de LD y 87% y 97% de recuperación para malatión y clorpirifos, respectivamente) o GC-ECD (5 µg/kg de LD, y recuperaciones de 100% para malatión y 98% para diazinón). Las muestras positivas se confirmaron por GC-MS/MS (2 µg/kg de LD y 99% de recuperación para diazinón, y 0,2 µg/kg de LD y 105% de recuperación para clorpirifos).

Vreuls *et al.* (213) utilizan GPC, transfiriendo el eluido “*on-line*” al sistema cromatográfico, alcanzando recuperaciones del 100% para diazinón y fentión a niveles entre 20 y 60 µg/kg. Jongenotter *et al.* (212) utilizan también un sistema automático *on-line* GPC-GC-FPD, con límites de detección de 1 µg/kg para diazinón y fentión (indican que este último se descompone lentamente) y 2 µg/kg para malatión.

Barrek *et al.* (217) utilizando GCP y GC-MS alcanzan límites de detección de 50 µg/L para malatión y fentión, y 30 µg/L para clorpirifos; las recuperaciones fueron del 99% y 92% para clorpirifos y malatión, respectivamente, pero tan sólo del 3% para fentión. Mediante HPLC-MS obtienen un LD de 200 µg/L para clorpirifos y recuperaciones del 88%. García Sánchez *et al.* (248), utilizando también GCP y espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), alcanzan límites de detección inferiores (0,4 µg/kg para malatión y 0,3 µg/kg para clorpirifos).

Rastrelli *et al.* (117) utilizan extracción en fase sólida como etapa de limpieza, con un sistema de varios cartuchos (Extrelut-3, silicagel y C₁₈) y hexano. La determinación mediante GC-NPD proporciona recuperaciones entre 82%-98% para diazinón, fentión, malatión y clorpirifos. De forma similar, usando un sistema de extracción en fase sólida en multicolumna (Extrelut-QE, C₁₈ y alúmina), Yagüe *et al.* (224) establecen intervalos de trabajo de 10-800 µg/L para clorpirifos y 5-800 µg/L para diazinón.

Tsoutsis *et al.* (249), mediante microextracción en fase sólida (HS-SPME) y detección por GC-FTD, alcanzan límites de detección entre 0,005-0,01 µg/L para nueve organofosforados (dimetoato, diazinón, fenitrotión, malatión, fentión, paratión-etil, bromofos-metil, metidatión y etión) y cuatro de sus metabolitos (ometoato, malaoxon, fentión sulfóxido y fentión sulfona) contenidos en muestras de aceite de oliva.

Recientemente, Cunha *et al.* (250) han desarrollado una metodología para la extracción de fentión y sus metabolitos en aceitunas y aceite de oliva, que utiliza dispersión en fase sólida y detección GC-NPD (recuperaciones entre 67-98% en aceite de oliva).

La extracción con fluidos supercríticos ha sido utilizada por Hopper (240) con detección GC-FPD, alcanzando recuperaciones entre 78%-85% para diazinón, malatión y clorpirifos. Sánchez *et al.* (208, 251-253) han desarrollado otro método totalmente automático, basado en cromatografía líquida en fase reversa acoplada con cromatografía gaseosa (RPLC-GC) utilizando la interfase TOTAD (*through oven transfer adsorption desorption*). Con esta metodología se alcanza un límite de detección de 0,2 mg/L para diazinón, y el aceite de oliva es inyectado directamente sin más pretratamiento que una simple filtración.

En ocasiones, las etapas de preparación de muestra se realizan por cromatografía líquida (LC), de modo que los componentes específicos de una matriz compleja (aceite de oliva) son prefraccionados y, posteriormente, transferidos en línea a un sistema GC altamente eficiente y sensible, para la separación analítica (209, 217, 251). Sin embargo,

el modo tradicional lleva a cabo el proceso de extracción y limpieza de forma separada en múltiples etapas, ya que mientras que el método de extracción normalmente depende de la matriz de la muestra, el procedimiento de limpieza podría depender en parte de la naturaleza de las especies interferentes presentes en el extracto. Por este motivo, los métodos de limpieza a bajas temperaturas (210, 226) -basados en la eliminación de las grasas mediante separación por precipitación a baja temperatura- se han aplicado tras la extracción líquido-líquido (75, 204, 211). Otros métodos propuestos utilizan una combinación de dos o más etapas de limpieza (117, 254). Así, Lentza-Rizos *et al.* (255) llevan a cabo la extracción con acetonitrilo y la limpieza del extracto mediante precipitación de los lípidos a bajas temperaturas. El análisis mediante GC-NPD proporciona recuperaciones del 85%, 86%, 78% y 94% para clorpirifos, diazinón, fentión y malatión, respectivamente, a niveles de mg/kg.

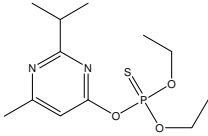
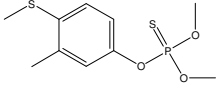
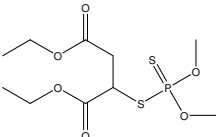
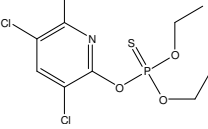
1.4.4. Plaguicidas organofosforados objeto de estudio

Como ya se ha comentado, los insecticidas organofosforados son los plaguicidas más utilizados en el tratamiento del olivar, destacando por su frecuencia de uso, volúmenes aplicados y toxicidad: diazinón, fentión, malatión y clorpirifos. La Tabla 13 muestra las características de estos compuestos, incluyendo su fórmula molecular y algunas propiedades físico-químicas como: dosis letal para mamíferos (LD_{50} para ratas), valor de ADI (Ingestión Diaria Aceptable) según la OMS -que indica la dosis diaria que el hombre puede ingerir sin que existan riesgos apreciables-, presión de vapor (P_v), solubilidad (S) en agua, y constante de distribución o partición octanol-agua (K_{ow}) (256, 257).

1.4.4.1. Diazinón

El diazinón es un insecticida organofosforado no sistémico, inespecífico, usado extensivamente en muchos cultivos para combatir a una gran variedad de insectos. Así, se ha aplicado en suelos, materia vegetal, césped, plantas ornamentales y jardinería (258, 259). Controla plagas como pulgón, chicharras, araña roja, picudos, minador de hoja, pulgas y chinches, entre otras. Es uno de los insecticidas más populares para el hogar y ha sido usado durante más de 40 años. Hasta el año 2000, se utilizaban alrededor de 5.000 toneladas / año de productos con diazinón.

Tabla 13. Características de los compuestos organofosforados objeto de estudio

Nombre	Fórmula	S (mg/L)	log K_{ow}	LD ₅₀ (mg/kg)	ADI (mg/kg)	P _v (mPa)
Diazinón (CAS:333-41-5)		60	3,11-3,3	1250	0,002	12
Fentión (CAS:55-38-9)		4,2	4,17-4,84	250	0,007	0,74
Malatión (CAS:121-75-5)		145	2,74-2,94	1375-2800	0,02	5,3
Clorpirifos (CAS:2921-88-2)		1,4	4,96-5,11	135-165	0,01	2,7

S: solubilidad en agua a 25 °C; K_{ow} : constante de distribución octanol-agua; LD₅₀: dosis letal media para ratas; ADI: dosis diaria aceptable; P_v: presión de vapor

En 2001, la U.S. EPA canceló los registros de docenas de productos utilizados en hogares y jardines que contenían diazinón (Fed. Reg., 69, 48864) (260), aunque esta decisión no afectó a sus usos agrícolas y comerciales. El acuerdo se alcanzó después de que la U.S. EPA concluyera que el diazinón presenta riesgos para los niños y para los aplicadores de este producto en el hogar. El diazinón está clasificado como moderadamente tóxico (clase II) por la Organización Mundial de la Salud (WHO).

1.4.4.2. Fentión

El fentión es un insecticida organofosforado moderadamente tóxico (clasificación de toxicidad II de la Agencia de Protección Medioambiental, U.S. EPA) utilizado contra gran cantidad de plagas, principalmente para el control de la mosca de la fruta y el mosquito adulto, aunque también se usa para matar aves (261). Algunos nombres comerciales de este plaguicida son DMTP, Lebaycid y Fenthion 4E y se estima un consumo de 100-150 toneladas / año de fentión.

El fentión se acumula en los tejidos grasos y, según el Instituto Nacional de la Salud norteamericano, es una sustancia cancerígena (262). En marzo de 2003, como resultado de la presión pública ejercida por la American Birds Conservancy (un grupo para la conservación de las aves) y debido a que la U.S. EPA requería más pruebas que

hubieran resultado costosas, la empresa fabricante (Bayer) retiró el fentiión del mercado estadounidense de forma voluntaria (261).

El fentiión es un insecticida clasificado como “Muy Tóxico” según el Real Decreto 3349/83, y los Reales Decretos 162/91 y 443/94, que establecen las normas para la fabricación, comercialización y utilización de productos fitosanitarios.

La Decisión 2004/140/CE de 11 de febrero de 2004 publicada en el Diario Oficial de la Unión Europea L 46 de 17 de febrero de 2004, hace referencia a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contuvieran esta sustancia activa. Así, en su artículo 1º, señala que el fentiión no se incluirá como sustancia activa (anexo I de la Directiva 91/414/CEE). El artículo 2º indica, además, que las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan fentiión sean retiradas antes del 11 de agosto de 2004 y que, a partir del 17 de febrero de 2004, no se conceda ni renueve (en virtud de la excepción contemplada en el apartado 2 del artículo 8 de la Directiva 91/414/CEE) ninguna autorización de productos fitosanitarios que contengan fentiión.

No obstante, España se ha reservado su uso como cebo en cítricos y melocotones, por lo que las autorizaciones de los productos que contengan fentiión podían mantenerse en vigor hasta el 30 de junio de 2007.

1.4.4.3. Malatión

El malatión es un insecticida que suele utilizarse para el control de mosquitos y otros insectos que atacan frutas, verduras, plantas ornamentales y arbustos. También se utiliza en perros y gatos para el control de pulgas, garrapatas y hormigas. Dado que el malatión es un insecticida eficaz contra la mayoría los insectos, es usado en los hogares para controlar moscas comunes, cucarachas y mosquitos, entre otros. Aplicado en paredes y tejados se utiliza también como insecticida residual para el control de la malaria. Es un compuesto moderadamente tóxico (clase III), no sistémico y de amplio espectro, desarrollado por primera vez en 1950. Los últimos datos indican que el uso agrícola estimado de este plaguicida en EE.UU. es de 1.134 toneladas / año (263).

1.4.4.4. Clorpirifos

El clorpirifos es el insecticida organofosforado más utilizado en agricultura (264) y está clasificado como moderadamente tóxico (toxicidad II) por la Agencia de Protección

Medioambiental, U.S. EPA. Es el ingrediente activo de muchas formulaciones, siendo uno de los plaguicidas más usados a nivel mundial (265), la U.S. EPA estima un consumo de 4.536 toneladas / año. Se aplica comúnmente a cultivos como algodón, cereales, frutales, alfalfa y caña de azúcar. También se utiliza para controlar garrapatas en el ganado y, en forma de rocío, para el control de plagas de cosechas. A nivel doméstico se usa para controlar cucarachas, pulgas y termitas, y en ciertos collares de animales domésticos, para el control de pulgas y garrapatas.

En Estados Unidos, el clorpirifos para uso residencial fue restringido a partir del año 2000, actualmente, está siendo eliminado progresivamente. En Europa, el clorpirifos fue re-aprobado para su uso en agricultura en el 2005.

2. Objetivos

El presente trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación que el Grupo Señal y Medida en Química de la Universidad Politécnica de Valencia viene desarrollando para la determinación de residuos de plaguicidas y contaminantes mediante métodos inmunoquímicos, tanto en el sector agroalimentario como en el medio-ambiental.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el marco del Proyecto RTA 01-115-C2 del Plan Nacional de Mejora de la Calidad del Aceite de Oliva Virgen Extra.

El objetivo general es el desarrollo de sistemas inmunoquímicos para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados -diazinón, fentión, malatión y clorpirifos- en aceite de oliva virgen extra, que puedan ser utilizados como métodos de campo. Estos métodos podrán ser utilizados para la realización de ensayos rápidos por personal no experto, además de ser fiables y permitir la monitorización de gran número de muestras en las propias almazaras.

Con este fin se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Diseño de haptenos para los plaguicidas organofosforados objeto de estudio.
2. Obtención de anticuerpos policlonales e inmunorreactivos.
3. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en placa: estudio de formatos, optimización, tolerancia a disolventes.
4. Aplicación de los inmunoensayos en placa a muestras reales y comparación de los resultados con los obtenidos por métodos cromatográficos.
5. Desarrollo de un método de extracción sencillo y rápido para la determinación inmunoquímica de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva.
6. Aplicación de las técnicas inmunoquímicas desarrolladas a la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva.
7. Validación de la metodología desarrollada.
8. Estudio de la aplicabilidad de la metodología desarrollada a otros tipos de aceites vegetales.
9. Desarrollo de un método de cribado basado en inmunofiltración para la determinación de residuos de organofosforados en aceite de oliva.

3. *Materiales y métodos*

3.1. Productos y reactivos

3.1.1. Plaguicidas

Los patrones de los plaguicidas objetos de estudio, así como de los compuestos relacionados utilizados para evaluar la selectividad de los ensayos, fueron adquiridos a Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Alemania), Riedel-de-Haën (Seelze-Hannover, Alemania), PolyScience (Niles, IL, EE.UU.) y Sigma-Aldrich Química (Madrid, España).

Atrazina, simazina e irgarol 1051 fueron cedidos por Ciba-Geigy (Barcelona, España) y clorpirifos por Laboratorios Alcotán (Sevilla, España).

Las disoluciones estándar se prepararon en metanol, acetona o dimetilsulfóxido, y se almacenaron a -80 °C.

3.1.2. Reactivos

Albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OVA), peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), caseína, gelatina, adyuvante de Freund's completo e incompleto, *o*-fenilendiamina (OPD), Tween 20, anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con HRP, anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con AP, sustrato líquido de fosfatasa alcalina BCIP/NBT, sustrato líquido de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), CDP-Star, sales sódicas de ácidos húmicos, tributilamina (TBA), cloroformiato de isobutilo (CFI), carbonildiimidazol (CDI), *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), etilendiamina, glutaraldehído, NaIO₄, NaBH₄, EuCl₃·6H₂O y óxido de trioctilfosfina (TOPO), fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Madrid, España).

La hemocianina extraída del molusco *Megathura crenulata* (KLH) y el reactivo sulfo-NHS fueron suministrados por Pierce (Rockford, IL, EE.UU.), y los reactivos *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) usados para las conjugaciones, por Boehringer (Mannheim, Alemania).

Todos los disolventes orgánicos y las sales utilizadas para la preparación de tampones fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España).

El reactivo de Bradford utilizado para la determinación de proteína fue adquirido a Bio-Rad (Barcelona, España), y la membrana de difluoruro de polivinilideno (Immobilon-P) de 0,45 μm de poro, a Millipore Corp. (Bedford, MA, EE.UU.).

3.1.3. Tampones

Tampón carbonato (CB): Na_2CO_3 15 mM y NaHCO_3 35 mM, pH 9,6

Tampón fosfato salino (PBS): Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,5

Tampón PBS-T: PBS conteniendo 0,05% de Tween 20

Tampón de revelado: citrato sódico 25 mM y fosfato sódico 62 mM, pH 5,5

Tampón MES: ácido 2-(*N*-Morfolino)etanosulfónico 0,1 M, pH 4,7

Tampón TBS: tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, NaCl 145 mM, pH 8,0

Tampón TBS-T: TBS conteniendo 0,05% de Tween 20

3.1.4. Haptenos

Los haptenos para diazinón, fentión, malatión y clorpirifos fueron diseñados y sintetizados por personal del grupo de investigación SYM, siguiendo los protocolos descritos en las publicaciones asociadas a esta Tesis.

El hapteno denominado 2d (*N*-(4-cloro-6-isopropilamino-[1,3,5]triazin-2-il)-6-ácido aminohexanoico) fue preparado siguiendo el protocolo descrito por Gascón *et al.* (266).

3.1.5. Otros materiales

Las placas ELISA de poliestireno (96 pocillos) fueron adquiridas a Costar Corporation (Cambridge, MA, EE.UU.).

Los cartuchos de extracción en fase sólida Oasis (6 mL, 200 mg) fueron cedidos por Waters (Milford, MA, EE.UU.)

Las columnas de exclusión molecular D-Salt Dextran fueron suministradas por Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, EE.UU.).

3.2. Equipos instrumentales

Lavador de placas Nunc-Immuno™ Wash 12 suministrado por Nunc Maxisorp (Roskilde, Dinamarca).

Los espectros UV-Vis fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro de fila de diodos marca Hewlett-Packard, modelo 8452 (Palo Alto, CA, EE.UU.).

Las medidas de absorbancia y fluorescencia se realizaron con un lector de placas Wallac, modelo Víctor 1420 multilabel counter (Turku, Finlandia).

Para la determinación cromatográfica de diazinón en muestras de agua y diazinón, fentión, malatión y clorpirifos en aceite de oliva, se utilizó un equipo Hewlett-Packard modelo 6890, dotado de muestreador automático y una columna capilar de fenil-metil siloxano 5% (HP-5MS), referencia 19091S-433 (30 m longitud, 250 μm diámetro y 0,25 μm de grosor de película). Para la identificación de los picos se utilizó un detector selectivo de masa modelo 5973, operando en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM).

El análisis cromatográfico de malatión en muestras de agua se efectuó mediante extracción SBSE usando barras de agitación magnética (“*stir bars*”, 20 mm longitud \times 0,5 mm grosor de capa) recubiertas con poli(dimetilsiloxano) (PDMS), una unidad de desorción TDS-2 conectada a un inyector (CIS-4) con programación de temperatura de vaporización (PTV) y un muestreador automático TDSA (Gerstel, Mulheim/Ruhr, Alemania). El inyector PTV se instaló en un sistema Agilent 6890 GC-5973 MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.).

Para la determinación de clorpirifos en aceite de oliva por GC se utilizó un equipo Hewlett-Packard 5980 series II, con una columna capilar DB-1701 (30 m largo, 250 μm diámetro y 0,25 μm grosor de película; J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) y un detector fotométrico de llama.

La cromatografía de permeación en gel (GPC) se llevó a cabo con un sistema automático (GPC VARIO, LCTech, Alemania), equipado con un bucle de 5 mL y una columna cromatográfica (500 \times 25 mm id) con relleno (50 g) de BioBeads S-X3-resina (200-400 *mesh*), de 32 cm de longitud.

Las curvas de competición de los inmunoensayos se analizaron matemáticamente con los paquetes informáticos SoftmaxPro v1.2.0 (Molecular Devices, Berkshire, Reino Unido) y Sigmaplot (Jandel Scientific, Erkrath, Alemania).

El sistema de inmunofiltración (ELIFA) fue suministrado por Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, EE.UU.). Básicamente, el ELIFA está compuesto de una placa de aplicación de muestra, un conjunto de 96 cánulas de transferencia y una cámara colectora. Las piezas están selladas con juntas de silicona para proporcionar flujos constantes en todos los pocillos. La membrana (12 x 7 cm) se sitúa entre las juntas y la placa de aplicación de muestras; un tubo de silicona conecta la válvula de vacío del

sistema a una bomba peristáltica (Minipuls-3, Wilson, Villiers LeBel, Francia), la cual controla el flujo y proporciona el vacío necesario.

Para el análisis de imagen de membranas se utilizó un escáner Epson modelo Twain 5 y el paquete informático Genepix Pro 6.0 (Molecular Devices, Berkshire, Reino Unido).

3.3. Técnicas generales

3.3.1. Conjugación de haptenos a proteínas

Los haptenos seleccionados para cada compuesto se conjugaron por sus grupos carboxilo o hidroxilo a diferentes proteínas -KLH o albúmina de suero bovino (BSA)-, utilizando el método del éster activo (267). Para ello, 100 μ moles del hapteno se disuelven en 200 μ L de *N,N*-dimetilformamida (DMF) anhidra. Por otro lado, 100 μ moles de NHS y 100 μ moles de DCC se disuelven en 300 μ L de DMF anhidra y se añaden gota a gota sobre la disolución de hapteno. La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifuga durante 15 minutos a 7500 rpm con el fin de eliminar el precipitado de dicitclohexilurea. En un vial, 30 mg de BSA o 10 mg de KLH se disuelven en 1,8 mL de tampón carbonato o tampón fosfato, respectivamente. Se añaden 200 μ L de DMF anhidra y, posteriormente, 600 μ L del hapteno activado, en alícuotas de 50 μ L cada 5 minutos. La mezcla se deja reaccionar 4 horas a temperatura ambiente, en agitación y protegida de la luz.

Finalmente, el conjugado se purifica por cromatografía de exclusión molecular y las fracciones obtenidas se cuantifican por el método de Bradford (268). La Figura 19 muestra un esquema del método de conjugación.

La síntesis de los conjugados de tapizado OVA-hapteno, y de los marcadores HRP-hapteno, se llevó a cabo (Figura 20) utilizando el método del anhídrido mixto (269). Para ello, 45 μ moles de hapteno disuelto en 300 μ L de DMF anhidra se añaden poco a poco y en constante agitación, a 50 μ moles de TBA y 50 μ moles de CFI. La mezcla se deja en agitación y protegida de la luz, durante 1 h a temperatura ambiente. Por otro lado, se pesan 20 mg de OVA y 3 mg de HRP en dos viales separados, y se disuelven en 1,5 mL de tampón carbonato. A cada vial se añaden 150 μ L de hapteno activado

(alícuotas de 10 μL y agitación constante), se deja reaccionar durante 3 h a temperatura ambiente y, posteriormente, toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Los conjugados obtenidos se purifican por cromatografía de exclusión molecular y las fracciones obtenidas se cuantifican por Bradford (268).

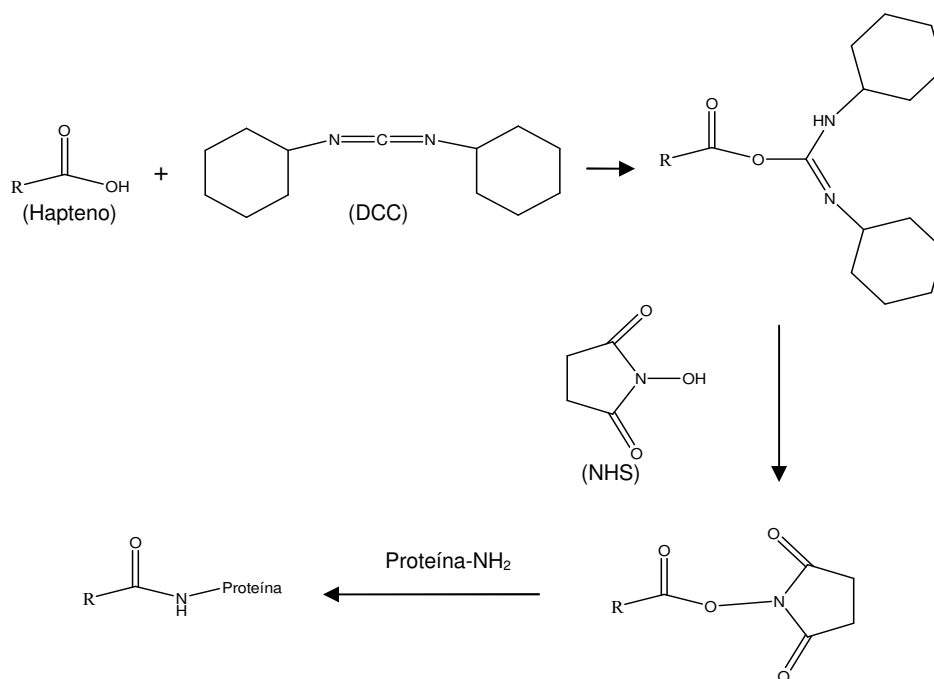


Figura 19. Conjugación proteína-hapteno mediante el método del éster activo

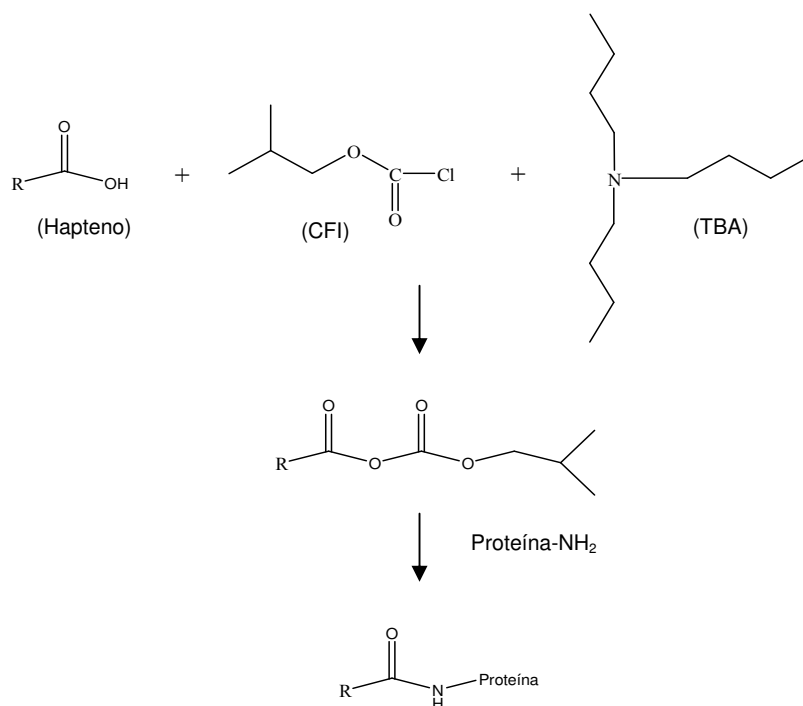


Figura 20. Conjugación proteína-hapteno mediante el método del anhídrido mixto

3. Materiales y métodos

Los haptenos que presentaban grupos hidroxilo en su estructura se conjugaron a proteínas (BSA, OVA y HRP) por el alcohol, siguiendo el método descrito por Beasley *et al.* (135). Para ello, 0,21 mmoles de hapteno se mezclan con 0,25 mmoles de CDI en 2 mL de acetonitrilo anhidro. La reacción se mantiene en agitación durante 48 h a 0 °C y bajo atmósfera de argón. A continuación, se añaden 16 mg/mL de hapteno activado en DMF a 4 mg/mL de proteína en tampón fosfato pH 9,1, dejando reaccionar la mezcla durante 48 h a 4 °C en agitación constante (Figura 21).

Los conjugados obtenidos se purifican por cromatografía de exclusión molecular y en las fracciones obtenidas se cuantifica el contenido en proteína mediante Bradford (268).

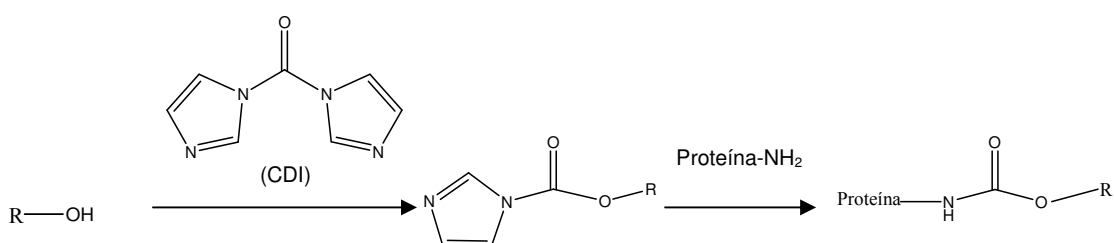


Figura 21. Esquema del método de conjugación de haptenos alcoholes a proteínas

Por otro lado, algunos haptenos se conjugaron a BSA cationizada (cBSA). La cBSA se obtuvo por reacción de BSA con etilendiamina, de modo que los carboxilatos de la proteína son modificados con una diamina para aumentar la carga neta y la proporción de aminas presentes para la posterior conjugación (Figura 22). Finalmente, la proteína modificada se purificó por cromatografía de exclusión molecular.

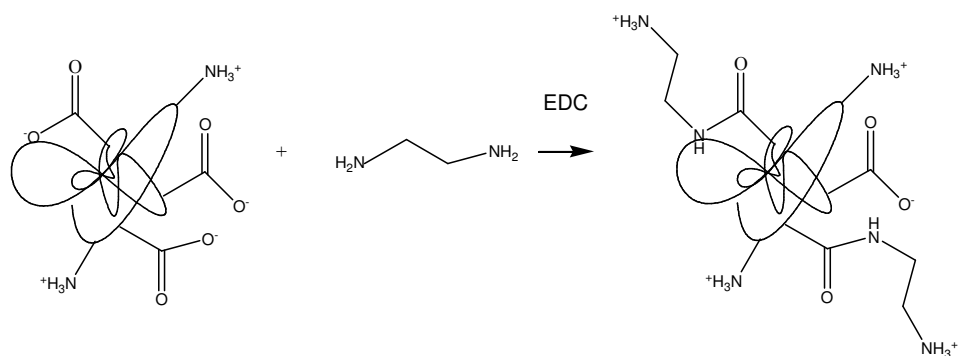


Figura 22. Esquema de la cationización de proteínas usando etilendiamina

Los haptenos se conjugaron a cBSA mediante una reacción de condensación de Mannich, siguiendo el método descrito por Hermanson (137). Para ello, se prepara una disolución de 5 mg/mL de BSA en tampón MES 0,1 M, pH 4,7, y se adiciona sobre un volumen igual de etilendiamina 1 M en el mismo tampón. Se añade EDC hasta una concentración final de 2 mg/mL y la mezcla se deja reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, a 200 μ L de una disolución conteniendo 10 mg/mL de cBSA en tampón MES 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 4,7, se le añaden 200 μ L de hapteno (10 mg/mL en el mismo tampón) que contiene un hidrógeno activo. Por último, se adicionan 50 μ L de formaldehído al 37% y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 14 horas. Los conjugados obtenidos (Figura 23) se purifican por cromatografía de exclusión molecular y las fracciones obtenidas se cuantifican por Bradford (268).

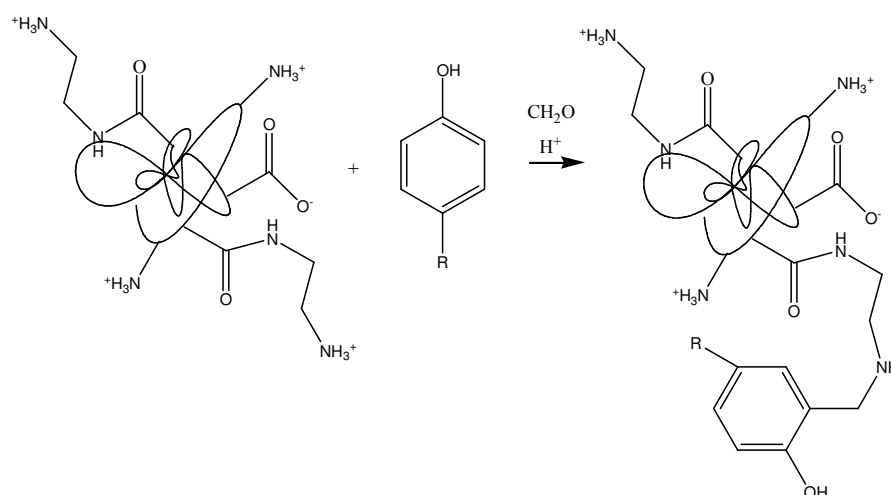


Figura 23. Esquema de la conjugación hapteno-cBSA, vía reacción de Mannich

3.3.2. Purificación de conjugados mediante cromatografía de exclusión molecular

Los conjugados se purificaron en alícuotas de 1 mL utilizando columnas D-Salt Dextran (Pierce) y tampón fosfato como eluyente. Para la cuantificación de proteína se utilizaron las diez primeras fracciones de 1 mL.

3.3.3. Cuantificación de proteína

La cantidad de proteína en los diferentes conjugados se determinó mediante Bradford, utilizando curvas patrón (0,25-200 μ g/mL) de cada proteína (BSA, OVA,

KLH) disuelta en tampón fosfato. Para ello, los patrones y las muestras (diluciones seriadas) se colocan en una placa ELISA (20 μL /pocillo), se añaden 200 μL /pocillo del reactivo de Bradford -diluido 1:5 en agua MilliQ- y, tras 5 minutos en oscuridad, se lee la absorbancia a 595 nm.

La proteína HRP se cuantificó por medida directa de la absorbancia a 404 nm.

3.3.4. Obtención de anticuerpos policlonales

0,5 mL del conjugado BSA-hapteno, KLH-hapteno o cBSA-hapteno (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se inyectan intramuscularmente en conejas New Zealand*California, con 0,5 mL de adyuvante de Freund completo en la primera inmunización, y 0,5 mL de adyuvante de Freund incompleto en las siguientes. Las inmunizaciones se realizan cada 21 días, y 10 días después de cada inmunización se llevan a cabo sangrías con el fin de conocer el título y las propiedades del suero de cada animal. Tras varios ciclos de inmunización y sangría, se recoge toda la sangre del animal y se deja coagular durante una noche a 4 °C. El suero se separa por centrifugación, y tras añadir azida sódica (0,02%) como conservante, se almacena a -80 °C.

3.4. Ensayos de titulación y competición. Enzimoanálisis en fase sólida (ELISA)

Para conocer el título de los anticuerpos se llevaron a cabo ensayos tipo ELISA no competitivos, tanto en formato directo como indirecto, siguiendo los protocolos usuales de inmunoensayo (270). Los ensayos competitivos (directos e indirectos) se realizaron con aquellas concentraciones de inmunorreactivos que dieron señales de absorbancia entre 0,5 y 1,2 unidades. A continuación se detallan los protocolos utilizados en ambos casos.

A. Ensayo de titulación en formato directo

- 1- Tapizar la placa con el suero (100 μL /pocillo a diferentes concentraciones) disuelto en tampón carbonato, 16 h a 4 °C.
- 2- Lavar la placa seis veces con PBS-T.

- 3- Añadir el trazador hapteno-HRP (100 μL /pocillo a diferentes concentraciones) e incubar 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 4- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 5- Revelar con 100 μL /pocillo de una disolución de substrato que contiene 2 mg/mL OPD y 0,012% H_2O_2 en tampón de revelado. Pasados diez minutos, detener la reacción enzimática añadiendo 50 μL /pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M. Finalmente, leer la absorbancia a 490 nm.

B. Ensayo de titulación en formato indirecto

- 1- Tapizar la placa con el conjugado OVA-hapteno (100 μL /pocillo a diferentes concentraciones) en tampón carbonato, 16 h a 4 °C.
- 2- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 3- Añadir el suero (100 μL /pocillo a diferentes concentraciones) e incubar 1 h a temperatura ambiente.
- 4- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 5- Añadir anticuerpo cabra-anticonejo-HRP (100 μL /pocillo, dilución 1:4.000 en PBS-T) e incubar 1 h a temperatura ambiente en oscuridad.
- 6- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 7- Revelar tal y como se describe en el punto 5 del apartado A.

C. Ensayo de competición en formato directo

- 1- Tapizar la placa con el suero (100 μL /pocillo a la concentración seleccionada en el ensayo de titulación) disuelto en tampón carbonato, 16 h a 4 °C.
- 2- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 3- Añadir el analito (50 μL /pocillo) y el trazador hapteno-HRP (50 μL /pocillo a la concentración seleccionada en el ensayo de titulación) e incubar 1 h a temperatura ambiente en oscuridad.
- 4- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 5- Revelar como se ha descrito anteriormente en el punto 5 del apartado A.

D. Ensayo de competición en formato directo

- 1- Tapizar la placa con el conjugado OVA-hapteno (100µL/pocillo a la concentración seleccionada en el ensayo de titulación) en tampón carbonato, 16 h a 4 °C.
- 2- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 3- Añadir el analito (50 µL/pocillo) y el suero (50 µL/pocillo a la concentración seleccionada en el ensayo de titulación) e incubar 1 h a temperatura ambiente.
- 4- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 5- Añadir anticuerpo cabra-anticonejo-HRP (100 µL/pocillo, dilución 1:4.000 en PBS-T) e incubar 1 h a temperatura ambiente en oscuridad.
- 6- Lavar la placa seis veces con PBS-T .
- 7- Revelar como se ha descrito anteriormente en el punto 5 del apartado A.

3.4.1. Optimización de los ensayos ELISA

Una vez seleccionados los inmunorreactivos y las concentraciones que dieron lugar a los ELISAs con mejores prestaciones analíticas, se procedió a la optimización de los ensayos estudiando la influencia de diferentes variables: pH, fuerza iónica, concentración de tensoactivo y tiempo de incubación en la etapa competitiva. Los analitos se prepararon en agua desionizada, mientras que el medio de dilución de los sueros dependió de la variable estudiada. Las curvas de competición realizadas para ensayar el efecto de cada variable se llevaron a cabo en una misma placa ELISA. En primer lugar, se estudió el efecto del pH utilizando disoluciones de tampón PBS 20 mM con 0,1% de Tween 20 a diferentes pH (4-9). La fuerza iónica se optimizó con disoluciones de tampón PBS de diferente molaridad (de 5 a 80 mM), 0,1% de Tween 20 y pH óptimo, y el porcentaje de tensoactivo con disoluciones de tampón PBS -al pH y fuerza iónica óptimas- conteniendo Tween 20 (0 a 0,5%). Finalmente, utilizando las condiciones óptimas previamente seleccionadas, se estudió la influencia del tiempo de incubación en la etapa competitiva.

3.4.2. Estudios de selectividad

Se prepararon curvas patrón con diferentes compuestos organofosforados y otros plaguicidas estructuralmente relacionados con los analitos objeto de estudio, utilizando los sueros específicos obtenidos. Se determinó la IC₅₀ para cada uno de ellos y se calculó la selectividad, expresada como reactividad cruzada, aplicando la siguiente ecuación:

$$RC (\%) = [IC_{50} (\text{analito}) / IC_{50} (\text{interferente})] \times 100$$

3.4.3. Efecto de los disolventes orgánicos

La competición se llevó a cabo utilizando disoluciones de tampón fosfato conteniendo diferentes porcentajes (0%-20%) de los disolventes orgánicos (acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, lactato de etilo, metanol y 2-propanol) generalmente utilizados para la extracción de los plaguicidas objeto de estudio en materias agroalimentarias.

3.5. Enzimoimmunoanálisis en fase sólida por filtración en membrana (ELIFA)

Para la puesta a punto del formato de ensayo basado en membranas, se estudiaron y optimizaron las variables y condiciones de trabajo críticas, entre las que cabe destacar: selección de la membrana, modo de inmovilización de reactivos, sistema de aplicación de inmunorreactivos, selección del tipo de formato y modo de detección. Para ello, se utilizó un sistema de inmunofiltración que permite efectuar 96 determinaciones simultáneamente. Investigaciones previas (271) indicaron que las membranas con mejores prestaciones son las de difluoruro de polivinilideno (PVDF); de ellas, la Immobilon-P es la más recomendable, al tiempo que presenta una adsorción inespecífica menor, una vez bloqueados los centros activos.

Los inmunorreactivos, tanto antígenos como anticuerpos, pueden ser inmovilizados en soportes sólidos por una de las siguientes vías:

- Adsorción: para superficies predominantemente hidrofóbicas
- Unión covalente a los grupos activados de la superficie
- Enlace no covalente: electrostático e hidrofílico a los centros activos de la superficie

A pesar de que la unión covalente puede permitir una mayor concentración de reactivos que la simple adsorción (10-40% más proteína) y que ofrece algunas ventajas (la unión de proteína es más segura, posibilidad de enlace direccional, permite altas concentraciones de tensoactivos y probablemente un mejor comportamiento en almacenamiento), se optó por la adsorción, ya que el procedimiento es más rápido y sencillo. Además, la densidad de inmovilización es satisfactoria y prácticamente no influye en las prestaciones analíticas, especialmente en la sensibilidad.

Previamente a los ensayos de competición se realizaron ensayos de titulación con el fin de elegir las concentraciones de inmunorreactivos apropiadas, seguido de un estudio para seleccionar el agente bloqueante (BSA, OVA, caseína, gelatina) más adecuado.

Una vez activada la membrana con etanol, existen dos alternativas para efectuar los ensayos: formato directo e indirecto. La primera propuesta es más sencilla y práctica que la segunda, pero ésta presenta la ventaja de reconocer a cualquier anticuerpo utilizando un solo reactivo marcado, por lo que es el formato más idóneo para ensayos de determinación de varios analitos simultáneamente.

Se ensayaron los dos formatos siguiendo los protocolos siguientes:

Protocolo del ensayo de competición en formato directo

- 1- Filtrar a través de la membrana 100 μL /pocillo de suero diluido en tampón carbonato a la concentración seleccionada.
- 2- Bloquear los sitios activos de la membrana con 100 μL /pocillo de la proteína seleccionada, a una concentración apropiada en PBS-T.
- 3- Lavar la membrana con 200 μL /pocillo de PBS-T.
- 4- Añadir el analito (50 μL /pocillo) y el trazador hapteno-HRP (50 μL /pocillo a la concentración seleccionada).
- 5- Lavar la membrana con PBS-T (500 μL /pocillo).
- 6- Añadir 30 μL /pocillo de TMB y dejar reaccionar durante 5 minutos.
- 7- Lavar con agua desionizada (200 μL /pocillo).

Protocolo del ensayo de competición en formato indirecto

- 1- Filtrar a través de la membrana 100 μL /pocillo del conjugado proteína-hapteno en tampón carbonato a la concentración seleccionada.

- 2- Bloquear los sitios activos de la membrana con 100 μL /pocillo de la proteína seleccionada, a una concentración apropiada en PBS-T.
- 3- Lavar la membrana con PBS-T (200 μL /pocillo).
- 4- Añadir el analito (50 μL /pocillo) y el suero (50 μL /pocillo a la concentración seleccionada.
- 5- Lavar la membrana con PBS-T (200 μL /pocillo).
- 6- Añadir anticuerpo cabra-anticonejo-HRP (100 μL /pocillo, dilución 1:4.000 en PBS-T)
- 7- Lavar la membrana con PBS-T (500 μL /pocillo).
- 8- Añadir TMB (30 μL /pocillo) y dejar reaccionar durante 5 minutos.
- 9- Lavar con agua desionizada (200 μL /pocillo).

La velocidad de la bomba peristáltica se ajusta de modo que 100 μL /pocillo se filtren en 5 minutos.

En el caso de utilizar la enzima fosfatasa alcalina como marcador, el tampón PBS-T se sustituye por tampón TBS-T y el substrato TMB por BCIP.

4. Resultados

4.1. Diseño de haptenos

Una de las etapas más importantes en el desarrollo de técnicas inmunoquímicas para compuestos de pequeña masa molecular es el diseño de los haptenos. Tanto la especificidad del inmunoensayo como su sensibilidad vendrán determinadas por las características del anticuerpo (afinidad, especificidad, etc.) y la estructura química de la molécula empleada como competidor.

Como se ha discutido en la Introducción (ver sección 1.3.2.), el hapteno debe preservar en la medida de lo posible las características estéricas y electrónicas del analito, así como su estructura química. El brazo espaciador óptimo debe contener entre 3 y 6 eslabones -átomos de carbono, generalmente- (272, 273), aunque los estudios realizados hasta el momento no han sido exhaustivos y se han descrito inmunoensayos con anticuerpos obtenidos utilizando brazos espaciadores más cortos (274, 275). No es aconsejable que posea grupos funcionales o heteroátomos, ya que podrían inducir la producción de anticuerpos contra el propio espaciador, lo que no es deseable (276, 277).

La heterología en los inmunoensayos supone que el hapteno de inmunización es diferente del hapteno de tapizado o del trazador. Se usa comúnmente para eliminar problemas asociados con la fuerte afinidad de los anticuerpos hacia el brazo espaciador y normalmente implica un reconocimiento más débil de los haptenos utilizados en los conjugados de tapizado o en el trazador, en comparación con el analito. De esta manera se produce una mejor competición entre el analito y el trazador o el conjugado de tapizado, dando lugar, en ocasiones, a ensayos con mayor sensibilidad.

En el caso de ELISAs competitivos indirectos, la heterología del sitio de unión del brazo espaciador es muy utilizada para evitar el reconocimiento del brazo espaciador por el propio antisuero. La heterología puede incrementarse utilizando brazos espaciadores con diferentes longitudes y estructuras.

Dado que no es fácil predecir la estructura química que dará lugar al mejor competidor, es importante disponer de un conjunto de haptenos con diferentes estructuras y brazos espaciadores, con el fin de ensayarlos experimentalmente. Así pues, para llevar a cabo esta investigación se partió de un conjunto de haptenos sintetizados utilizando distintas aproximaciones.

4.1.1. Haptenos para diazinón

Se partió de un conjunto de ocho haptenos para diazinón (Figura 24), que diferían tanto en el sitio de unión del brazo espaciador como en la longitud de éste. En los haptenos D1, D2 y D3 (tipo I) el brazo espaciador se introdujo por el grupo tiofosfato, por lo que al carecer de éste, su utilización como antígenos de tapizado dará lugar a una mayor heterología.

Tanto los haptenos tipo II (D4, D5 y D6) como tipo III (D7 y D8) mantienen el grupo tiofosfato. Los haptenos tipo II tienen el brazo espaciador unido al anillo aromático y un átomo de azufre. Los haptenos tipo III mantienen en mayor grado la estructura del diazinón y, a pesar de que el brazo espaciador está unido al grupo tiofosfato, conserva este posible grupo antigénico.

4.1.2. Haptenos para fentión

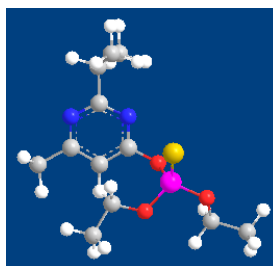
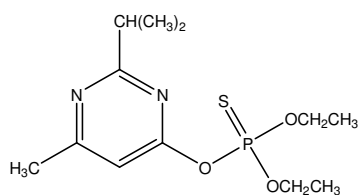
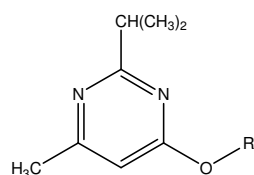
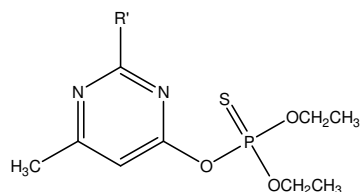
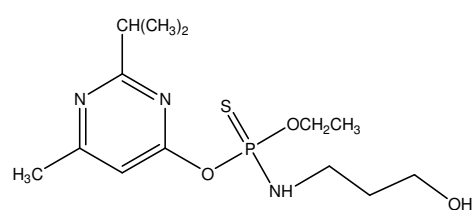
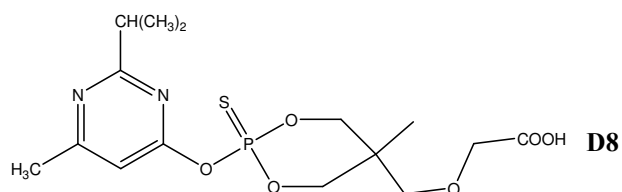
Se utilizaron nueve haptenos para fentión, clasificados en tres tipos dependiendo del lugar de unión del brazo espaciador (Figura 25).

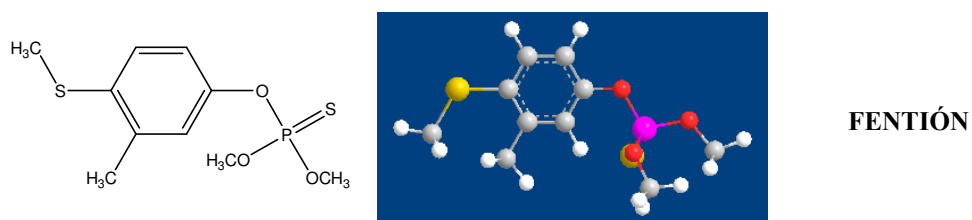
En los haptenos tipo A (F1 a F6) el brazo espaciador está unido por el átomo de oxígeno, de modo que se dispone de haptenos fragmentarios que contienen el anillo aromático del fentión, con un brazo espaciador de diferente longitud -aromático o alifático- unido al átomo de oxígeno. Otra aproximación es la utilizada para los haptenos tipo B (F7 y F8), con el brazo espaciador unido al grupo tiofosfato. Por último, se preparó un hapteno (F9) con el brazo espaciador unido al átomo de azufre, manteniendo así el éster *O,O*-dimetilfosforotioato (tipo C).

4.1.3. Haptenos para malatión

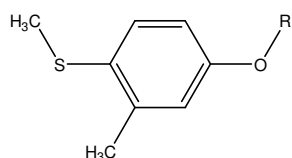
Este compuesto organofosforado no presenta grupos funcionales adecuados para su unión covalente a una proteína transportadora, pero posee un hidrógeno activo que permite su unión directa. Además, esta molécula presenta pocos puntos de funcionalización, por lo que obtener haptenos para este organofosforado (Figura 26) resultó relativamente difícil. Inicialmente se seleccionaron como haptenos dos metabolitos del malatión (M1 y M3), y se sintetizó un hapteno fragmentario que carece del éster fosfórico (M4). Posteriormente, teniendo en cuenta que el grupo éster es el más

idóneo para llevar a cabo la derivatización, se sintetizaron los haptenos M2 y M5, intentando mantener la estructura del malatión.

**DIAZINÓN****HAPTENOS****TIPO I****D1** R = -CH₂-COOH**D2** R = -(CH₂)₃-COOH**D3** R = -(CH₂)₅-COOH**TIPO II****D4** R' = -S-CH₂-COOH**D5** R' = -S-(CH₂)₃-COOH**D6** R' = -S-(CH₂)₅-COOH**TIPO III****D7****D8****Figura 24.** Estructura del diazinón y de los haptenos sintetizados

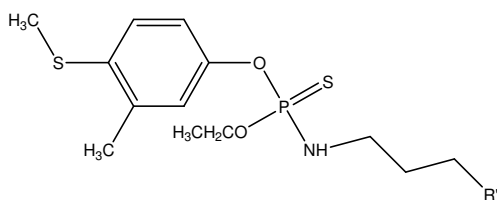


HAPTENOS



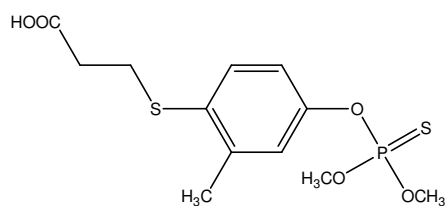
TIPO A

- F1** R = -CH₂-COOH
- F2** R = -(CH₂)₃-COOH
- F3** R = -(CH₂)₄-COOH
- F4** R = -(CH₂)₅-COOH
- F5** R = -CH₂-(C₆H₄)-COOH
- F6** R = -CO-(CH₂)₂-COOH



TIPO B

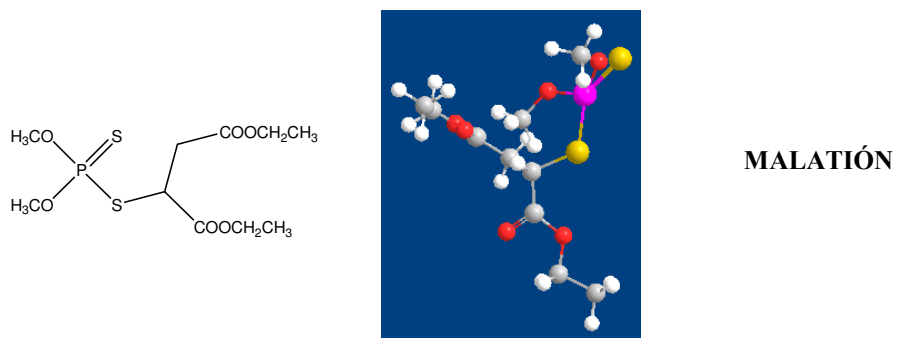
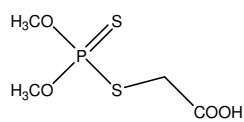
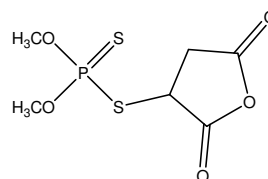
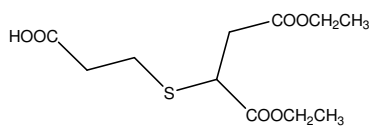
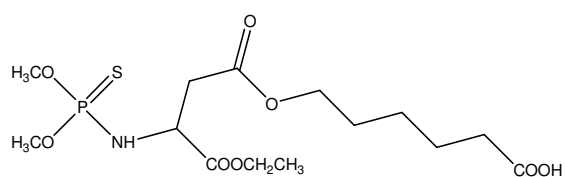
- F7** R' = -OH
- F8** R' = -COOH



TIPO C

- F9**

Figura 25. Estructura del fenti3n y de los haptenos sintetizados

**HAPTENOS****M1****M2****M3****M4****M5****Figura 26.** Estructura del malatión y de los haptenos sintetizados

4.1.4. Haptenos para clorpirifos

Para este plaguicida se seleccionaron dos tipos de haptenos (Figura 27) dependiendo del lugar de unión del brazo espaciador, en el anillo piridil (hapteno C1) o en el grupo tiosulfato (haptenos C2, C3 y C4). El hapteno C5 es un compuesto comercial (Triclopir) que se seleccionó para ser utilizado como antígeno de tapizado por su mayor heterología.

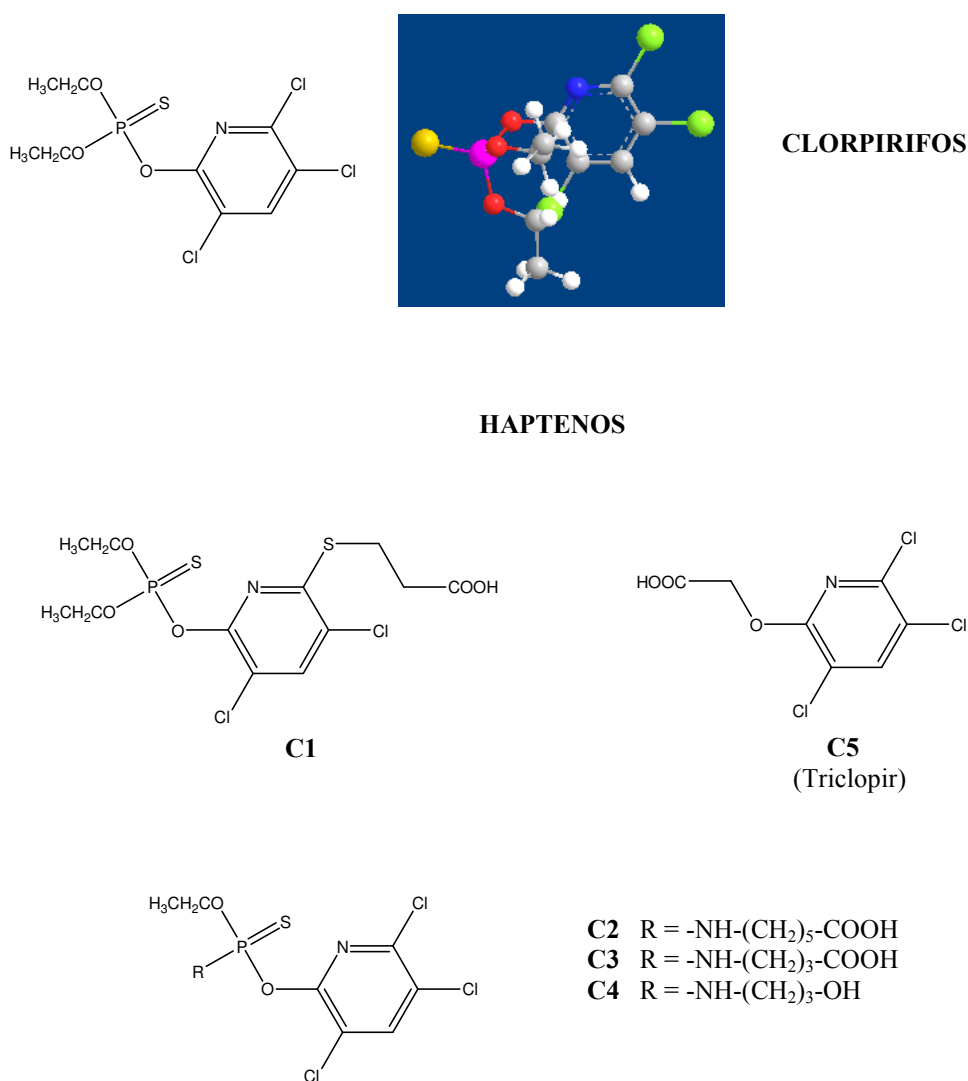


Figura 27. Estructura del clorpirifos y de los haptenos utilizados

Todos los haptenos seleccionados se conjugaron a BSA o KLH, y se utilizaron como inmunógenos en conejos para la producción de anticuerpos (ver sección 3.3.1.). La denominación de los sueros obtenidos se realizó en función de la proteína

transportadora y del hapteno. Los números romanos (I, II) hacen referencia a sueros obtenidos con el mismo inmunógeno en animales diferentes.

En total se obtuvieron 72 sueros -16 para diazinón, 18 para fentión, 18 para malatión y 20 para clorpirifos-.

4.2. Selección de sueros

Los sueros obtenidos para cada uno de los organofosforados se titularon y ensayaron en formato directo e indirecto (ver sección 3.4.), con todos los trazadores y conjugados de tapizado, tanto en modo homólogo como heterólogo, con el fin de seleccionar el formato y las concentraciones de reactivos más adecuadas para desarrollar un inmunoensayo en placa.

4.2.1. Selección de sueros para diazinón

a) Formato directo

Ninguno de los sueros obtenidos proporcionó suficiente señal con los diferentes trazadores, lo que impidió continuar con el desarrollo de un inmunoensayo para diazinón en formato directo.

b) Formato indirecto

Los resultados obtenidos en los ensayos de titulación indirecta se muestran en la Tabla 14, donde se observa que hay diferencias significativas de título de un mismo conjugado de tapizado según el suero ensayado. Con el fin de facilitar la lectura de las Tablas, los valores de absorbancia leídos para cada par suero/conjugado de tapizado se han asociado a un color.

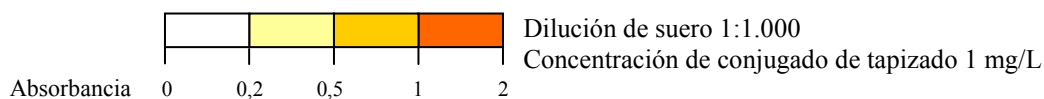
En primer lugar, hay que indicar que con este tipo de ensayos es difícil establecer conclusiones claras, ya que la diferente respuesta inmunitaria entre individuos es una variable incontrolable. Sin embargo, los resultados muestran que los anticuerpos obtenidos a partir de haptenos de un tipo dado presentan un título alto o medio cuando se utiliza ese mismo tipo de haptenos en el conjugado de tapizado y que, en todos los casos, fue mayor en condiciones homólogas. También se observa, que la avidéz de algunos sueros disminuye al aumentar la longitud del brazo espaciador en el conjugado

4. Resultados

de tapizado. Así, de los 16 sueros, 13 presentan menor título cuando se usan haptenos con el brazo espaciador más largo (haptenos D3, D6 y D8) como conjugados de tapizado. Esto podría atribuirse al enmascaramiento de los grupos funcionales del hapteno en el conjugado de tapizado, debido al plegamiento de la molécula.

Tabla 14. Resultados de los ensayos de titulación para diazinón en formato indirecto

Suero	Conjugado de tapizado							
	OVA-D1	OVA-D2	OVA-D3	OVA-D4	OVA-D5	OVA-D6	OVA-D7	OVA-D8
BSA-D1-I	Red	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	White	Yellow	White
BSA-D1-II	Red	Red	Yellow	Yellow	White	White	Yellow	White
BSA-D2-I	Yellow	Red	Orange	White	White	White	Yellow	White
BSA-D2-II	Orange	Red	Orange	White	White	White	Yellow	White
BSA-D3-I	White	White	Yellow	Orange	White	Yellow	Yellow	White
BSA-D3-II	White	Yellow	Yellow	White	White	White	Yellow	White
BSA-D4-I	White	Yellow	White	Red	Orange	Yellow	Yellow	White
BSA-D4-II	White	Yellow	Yellow	Yellow	White	White	Yellow	White
BSA-D5-I	White	Orange	Yellow	Orange	Red	Yellow	Yellow	White
BSA-D5-II	White	Red	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Yellow	White
BSA-D6-I	Red	Red	Red	Orange	Yellow	Yellow	Orange	White
BSA-D6-II	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	White
BSA-D7-I	Yellow	Yellow	Yellow	White	White	White	Orange	White
BSA-D7-II	White	Yellow	White	White	White	White	Orange	White
BSA-D8-I	White	White	White	White	White	White	White	White
BSA-D8-II	White	White	White	White	White	White	White	White



Ninguno de los sueros mostró reconocimiento cuando el hapteno D8 se utilizó como tapizado, mientras que los demás haptenos fueron reconocidos, tanto en condiciones homólogas como heterólogas, por alguno de los sueros. Los anticuerpos obtenidos con el hapteno D8 tampoco titularon con ninguno de los tapizados ensayados.

4.2.2. Selección de sueros para fenti3n

a) Formato directo

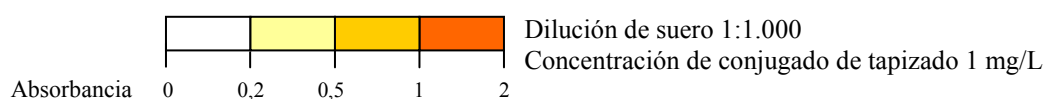
Los sueros obtenidos para fenti3n s3lo mostraron cierto grado de reconocimiento en formato directo cuando se utiliz3 el hapteno F7 como trazador (respuesta muy d3bil, se3ales de absorbancia <0,5).

b) Formato indirecto

La Tabla 15 muestra los resultados de los ensayos de titulaci3n indirecta para fenti3n. Puede observarse que los sueros obtenidos al inmunizar con el hapteno F1 - menor brazo espaciador- no presentaron t3tulo con ninguno de los tapizados, mientras que los producidos con los haptenos F2 a F6, que s3lo difieren en la longitud del brazo espaciador, mostraron t3tulos altos.

Tabla 15. Resultados de los ensayos de titulaci3n para fenti3n en formato indirecto

Suero	Conjugado de tapizado								
	OVA-F1	OVA-F2	OVA-F3	OVA-F4	OVA-F5	OVA-F6	OVA-F7	OVA-F8	OVA-F9
BSA-F1-I									
BSA-F1-II									
BSA-F2-I	0,2	1	1	1	0,2	0,2			
BSA-F2-II	1	1	1	1	1	1			
BSA-F3-I	0,2	1	1	1	1	1	0,2	0,2	0,2
BSA-F3-II	0,2	1	1	1	0,2	0,2			
BSA-F4-I	0,2	1	1	1	1	0,2			
BSA-F4-II	1	1	1	1	1	1	0,2	0,2	
BSA-F5-I	1	1	1	1	1	1		0,2	
BSA-F5-II	1	1	1	1	1	1	0,2	0,2	0,2
BSA-F6-I						1			
BSA-F6-II			0,2			1			
BSA-F7-I	1	1	1	1	1	1	1	1	0,2
BSA-F7-II	1	1	1	1	0,2	1	1	1	
BSA-F8-I									
BSA-F8-II		0,2	0,2	0,2	0,2		0,2	1	
BSA-F9-I								0,2	1
BSA-F9-II								0,2	1



Los sueros obtenidos con el hapteno F5 dieron títulos altos frente a todos los conjugados preparados con haptenos que conservan el grupo tiofosfato, probablemente debido a la mayor densidad electrónica de su brazo espaciador aromático.

Los sueros desarrollados a partir de F6 sólo proporcionaron títulos altos en condiciones homólogas, en contraste con otros haptenos del mismo tipo (F2 a F5) cuyo brazo espaciador fue unido al átomo de oxígeno, quizás debido a la introducción de un grupo carbonilo.

El hapteno F7 (brazo espaciador unido al grupo tiofosfato) dio lugar a sueros con mayor título que los producidos con haptenos cuyo brazo espaciador está unido al átomo de oxígeno (F1 a F6).

El hapteno F9, que carece de grupo metilo en el anillo aromático, dio sueros con títulos elevados únicamente en condiciones homólogas.

4.2.3. Selección de sueros para malatión

Para este organofosforado, se obtuvieron 10 sueros a partir de cinco haptenos conjugados a BSA. Además, los haptenos más prometedores para obtener inmunógenos (M2 y M5) se conjugaron también a cBSA (4 sueros) y KLH (2 sueros). La obtención del inmunógeno KLH-M2 no fue posible debido a la precipitación de la proteína durante el proceso de conjugación. Por otro lado, también se realizaron inmunizaciones con BSA cationizada unida covalentemente al propio malatión (2 sueros).

a) Formato directo

Los sueros obtenidos sólo mostraron reconocimiento en formato directo al utilizar el hapteno M5 como trazador en condiciones homólogas, siendo el suero KLH-M5-II el único que proporcionó un título elevado. En contraste, con los sueros BSA-M5-I y KLH-M5-I las señales obtenidas fueron bajas.

b) Formato indirecto

Los resultados mostrados en la Tabla 16 indican que los sueros obtenidos con los haptenos M1, M2 y M3 dieron títulos más bajos que los obtenidos con los haptenos M4 y M5, a pesar de que no contienen el enlace P-S.

Tabla 16. Resultados de los ensayos de titulación para malati3n en formato indirecto

Suero	Conjugado de tapizado				
	OVA-M1	OVA-M2	OVA-M3	OVA-M4	OVA-M5
BSA-M1-I	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange
BSA-M1-II	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
BSA-M2-I	Orange	Orange	Orange	Orange	Yellow
BSA-M2-II	Red	Orange	Orange	Orange	Yellow
BSA-M3-I	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange
BSA-M3-II	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange
BSA-M4-I	Orange	Yellow	Yellow	Red	Yellow
BSA-M4-II	Orange	Yellow	Yellow	Red	Yellow
BSA-M5-I	Yellow	White	Yellow	Red	Red
BSA-M5-II	Yellow	White	Yellow	Red	Red
cBSA-M2-I	Yellow	White	Yellow	White	White
cBSA-M2-II	Yellow	White	Yellow	White	White
cBSA-M5-I	Yellow	White	Yellow	White	White
cBSA-M5-II	Yellow	White	Yellow	White	White
cBSA-Ma-I	Yellow	White	Yellow	White	White
cBSA-Ma-II	Yellow	White	Yellow	White	White
KLH-M5-I	Orange	White	Yellow	Red	Red
KLH-M5-II	Yellow	Yellow	Orange	Red	Red
Suero	Conjugado de tapizado				
	BSA-M1	BSA-M2	BSA-M3	BSA-M4	BSA-M5
KLH-M5-I	Red	Red	Red	Red	Red
KLH-M5-II	Red	Red	Orange	Red	Red



Los conjugados de tapizado preparados con los haptenos M2 y M3 -que carecen de los dos 3steres et3licos- fueron reconocidos en menor medida por los sueros, mientras que el conjugado M4, que carece del grupo tiofosfato, fue reconocido por la mayor3a de los sueros.

Los sueros obtenidos utilizando como prote3na transportadora BSA cationizada dieron lugar a t3tulos bajos y, adem3s, s3lo cuando se utilizaron los haptenos M1 y M3 como ant3genos de tapizado.

Finalmente, hay que indicar que los inmun3genos preparados con KLH dieron lugar a sueros con mayor t3tulo que los obtenidos con BSA. Esta diferencia de respuestas est3

ampliamente recogida en la bibliografía (278), aunque también presenta muchas excepciones.

4.2.4. Selección de sueros para clorpirifos

Para la inmunización con antígenos de clorpirifos, los haptenos C1 a C4 fueron conjugados a BSA, y C2 a C4 a KLH (el hapteno C1 no se conjugó a KLH debido al bajo título de los sueros obtenidos con BSA). El hapteno C4 -a pesar de que ninguno de los sueros obtenidos con BSA proporcionó buenos resultados- se conjugó también a KLH por presentar una estructura similar (brazo espaciador introducido en el grupo tiofosfato y terminado en grupo hidroxilo) a la de los haptenos que mejores resultados dieron para los organofosforados anteriormente estudiados.

El hapteno C5 se utilizó únicamente como conjugado de tapizado, ya que este compuesto tiene una estructura similar a la de los mejores haptenos usados en los conjugados de tapizado para los otros organofosforados. Otro motivo para no utilizarlo como inmunógeno es que los sueros obtenidos con este tipo de haptenos presentan títulos bajos debido a que poseen un brazo espaciador corto y carecen del grupo tiofosfato.

a) Formato directo

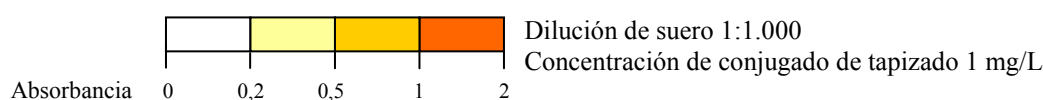
Los sueros obtenidos para clorpirifos no mostraron título en formato directo con ninguno de los trazadores ensayados (HRP-C1, HRP-C2, HRP-C3, HRP-C4 y HRP-C5).

b) Formato indirecto

La Tabla 17 muestra los resultados de los ensayos llevados a cabo en formato indirecto con los sueros obtenidos con BSA y KLH, utilizando como conjugados de tapizado tanto los OVA-hapteno como los BSA-hapteno. Los sueros obtenidos con el hapteno C1 -que posee el brazo espaciador unido al anillo aromático- presentan títulos bajos cuando se utilizan los conjugados de tapizado obtenidos con los haptenos C2, C3 o C4.

Tabla 17. Resultados de los ensayos de titulación para clorpirifos en formato indirecto

Suero	Conjugado de tapizado				
	OVA-C1	OVA-C2	OVA-C3	OVA-C4	OVA-C5
BSA-C1-I	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5
BSA-C1-II	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5
BSA-C2-I	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5
BSA-C2-II	0,2	1,0	1,0	1,0	1,0
BSA-C3-I	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5
BSA-C3-II	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5
BSA-C4-I	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
BSA-C4-II	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KLH-C2-I	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5
KLH-C2-II	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
KLH-C3-I	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
KLH-C3-II	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5
KLH-C4-I	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KLH-C4-II	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Suero	Conjugado de tapizado				
	BSA-C1	BSA-C2	BSA-C3	BSA-C4	BSA-C5
KLH-C2-I	0,2	1,0	1,0	0,5	0,5
KLH-C2-II	0,2	1,0	1,0	0,5	1,0
KLH-C3-I	0,2	1,0	1,0	0,5	1,0
KLH-C3-II	0,2	1,0	1,0	0,5	0,5
KLH-C4-I	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KLH-C4-II	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5



Los haptenos C2 y C3, que sólo difieren en la longitud del brazo espaciador, dieron sueros con mayor título, especialmente C2 que posee el brazo espaciador más largo. Sin embargo, C4 -cuya estructura es similar a C3, pero en el que la unión a proteína se produce a través de un grupo hidroxilo en lugar de carboxilo, produjo sueros con títulos más bajos.

Los haptenos que mejor reconocimiento mostraron como conjugados de tapizado fueron aquellos que carecen de grupo tiofosfato y poseen el brazo espaciador unido por *O*-alquilación. Para introducir mayor grado de heterología, el hapteno C5 se utilizó también como conjugado de tapizado, siendo altamente reconocido por los sueros obtenidos con los haptenos C2 y C3.

4.3. Desarrollo de inmunoensayos competitivos

La estrategia general de los inmunoensayos para moléculas orgánicas pequeñas está basada en la competición entre el analito libre y un hapteno conjugado a un marcador (trazador, formato directo) o a una proteína (conjugado de tapizado, formato indirecto), por los sitios de unión del anticuerpo.

Aunque, en general, la estructura del hapteno usado para inmunizar es el principal factor a tener en cuenta para lograr una buena selectividad y sensibilidad, la estructura del hapteno competidor también influye. Dado que la introducción de cierto grado de heterología en la estructura del competidor aumenta la sensibilidad de los inmunoensayos (279, 280), la constante de formación del inmunocomplejo Ab-competidor debe de ser inferior a la del Ab-analito. Sin embargo, la aplicación de este principio de heterología no es general (281, 282); se han descrito Abs con gran afinidad que dan lugar a ensayos sensibles en condiciones homólogas, mientras que la sensibilidad de inmunoensayos basados en Abs con baja afinidad puede aumentarse usando competidores heterólogos (283, 284).

En el desarrollo de inmunoensayos competitivos para los insecticidas organofosforados objeto de estudio, se ensayaron todas aquellas combinaciones suero/competidor que en los ensayos de titulación proporcionaron señales de absorbancia entre 0,6 y 1,4 unidades, tanto en formato directo como indirecto. Posteriormente, se realizaron ensayos de competición para seleccionar los inmunoreactivos y las concentraciones que proporcionaron mayor sensibilidad. Finalmente, establecidas las condiciones del inmunoensayo, se procedió a su optimización.

4.3.1. Inmunoensayos competitivos en formato directo

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de titulación, solo se estudió el fenitión, ya que resultó ser el único organofosforado para el que algunas de las combinaciones ensayadas en formato directo dieron respuestas aceptables, con valores de absorbancia mayores que la unidad.

La Tabla 18 muestra los resultados de los ensayos de competición obtenidos para fenitión en formato directo. Estos resultados fueron claramente peores que los obtenidos

en formato indirecto, como se verá más adelante. En consecuencia, no se consideró oportuno proseguir el estudio de este formato dada la baja sensibilidad alcanzada.

Tabla 18. Valores de IC_{50} de los ensayos competitivos para fentión en formato directo

<i>Suero</i>	<i>Trazador</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>
BSA-F7-I	HRP-F7	500
BSA-F7-II	HRP-F7	285

4.3.2. Inmunoensayos competitivos en formato indirecto

En formato indirecto, el conjugado de tapizado es inmovilizado en la placa y el analito presente en la muestra compite por el Ab específico en disolución. Posteriormente, la concentración de analito se mide de forma indirecta mediante la adición de un Ab secundario (anti-IgG) unido covalentemente a la enzima marcadora.

En el conjugado de tapizado se utiliza una proteína diferente a la usada para inmunizar, con el fin de evitar que el anticuerpo reconozca tanto al analito como a la proteína de tapizado. Por ello, los sueros obtenidos al inmunizar con BSA se ensayaron frente a conjugados OVA, y los obtenidos al inmunizar con KLH frente a conjugados OVA y BSA.

4.3.2.1. Desarrollo de inmunoensayos competitivos para diazinón

Los ensayos de competición se llevaron a cabo con todas las combinaciones suero/conjugado de tapizado seleccionadas en los ensayos de titulación. La Tabla 19 muestra los resultados obtenidos con los pares que dieron lugar a ensayos competitivos, todos en formato indirecto. Se observa que los sueros obtenidos a partir de haptenos que mantienen el grupo tiofosfato dan lugar a ensayos con menor IC_{50} (mayor sensibilidad) que los obtenidos con haptenos que carecen de este grupo, o que poseen cadenas alifáticas más cortas.

De todas la combinaciones ensayadas, las que dieron lugar a los ensayos más sensibles fueron BSA-D6-I/OVA-D7 (1:1.000 / 1 mg/L) y BSA-D7-I/OVA-D7 (1:2.000 / 1 mg/L), con valores de IC_{50} de 7,5 ng/mL en ambos casos (denominados ensayo A y B, respectivamente). Por tanto, la optimización se realizó únicamente para estos dos inmunoensayos.

Tabla 19. Valores de IC₅₀ de los ensayos competitivos para diazinón en formato indirecto

<i>Suero</i>	<i>Conjugado de tapizado</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>	
BSA-D1-I	OVA-D4	2010	
BSA-D2-II	OVA-D1	69	
BSA-D3-I	OVA-D7	30	
BSA-D4-I	OVA-D4	27	
BSA-D5-I	OVA-D2	627	
BSA-D6-I	OVA-D7	7,5	ENSAYO A
BSA-D7-I	OVA-D7	7,5	ENSAYO B

4.3.2.2. Desarrollo de inmunoensayos competitivos para fentiión

Los resultados de los ensayos de competición que presentaron mejor sensibilidad se muestran en la Tabla 20. Se observa que los haptenos que contienen el grupo tiofosfato proporcionaron los sueros más sensibles, siendo F7 el mejor hapteno. La combinación seleccionada para llevar a cabo los ensayos de optimización fue BSA-F7-I/OVA-F1 (1:6.000 / 0,5 mg/L), con un valor de IC₅₀ de 0,45 ng/mL.

Tabla 20. Valores de IC₅₀ de los ensayos competitivos para fentiión en formato indirecto

<i>Suero</i>	<i>Conjugado de tapizado</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>
BSA-F2-II	OVA-F6	5300
BSA-F3-I	OVA-F7	550
BSA-F3-II	OVA-F3	2300
BSA-F4-II	OVA-F6	14200
BSA-F5-II	OVA-F8	1200
BSA-F7-I	OVA-F1	0,45
BSA-F7-II	OVA-F1	96
BSA-F8-II	OVA-F2	544

4.3.2.3. Desarrollo de inmunoensayos competitivos para malatiión

Los valores de IC₅₀ obtenidos con las mejores combinaciones suero/conjugado de tapizado, indican (Tabla 21) que el inmunógeno KLH-M5 proporcionó el suero más sensible, seleccionando la combinación KLH-M5-I/BSA-M2 (1:1.000 / 30 ng/mL) para realizar los ensayos de optimización.

Tabla 21. Valores de IC₅₀ de los ensayos competitivos para malatión en formato indirecto

<i>Suero</i>	<i>Conjugado de tapizado</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>
BSA-M1-I	OVA-M4	2.400
BSA-M2-II	OVA-M1	1.900
BSA-M4-II	OVA-M4	4.100
BSA-M5-I	OVA-M4	600
BSA-M5-I	OVA-M5	4.800
KLH-M5-II	OVA-M4	1.800
KLH-M5-I	OVA-M5	50
KLH-M5-I	BSA-M1	20
KLH-M5-I	BSA-M2	2
KLH-M5-I	BSA-M3	200
KLH-M5-I	BSA-M4	>5.000
KLH-M5-I	BSA-M5	>5.000

4.3.2.4. Desarrollo de inmunoensayos competitivos para clorpirifos

La Tabla 22 muestra la sensibilidad (IC₅₀) obtenida para las combinaciones suero/conjugado de tapizado seleccionadas previamente en los ensayos de titulación. A la vista de los resultados, y para llevar a cabo los ensayos de optimización, se escogieron las combinaciones KLH-C3-I/OVA-C5 (1:6.000 / 1 mg/L) -por su amplio intervalo de trabajo (ver sección 4.4.5.)- y BSA-C2-II/OVA-C5 (1:4.000 / 10 ng/mL) -por su menor valor de IC₅₀- (ensayos C y D, respectivamente). En todos los casos, el hapteno C5 resultó ser el más adecuado como conjugado de tapizado.

Tabla 22. Valores de IC₅₀ de los ensayos competitivos para clorpirifos en formato indirecto

<i>Suero</i>	<i>Conjugado de tapizado</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>	
BSA-C1-II	OVA-C4	1.600	
BSA-C2-I	OVA-C5	32	
BSA-C2-II	OVA-C5	0,04	ENSAYO D
BSA-C3-II	OVA-C5	3	
KLH-C2-I	OVA-C5	10	
KLH-C2-II	OVA-C5	7	
KLH-C3-I	OVA-C5	2	ENSAYO C
KLH-C3-II	OVA-C5	7	
KLH-C2-I	BSA-C5	7	
KLH-C2-II	BSA-C5	4	
KLH-C3-II	BSA-C5	3	

4.4. Optimización y características de los inmunoensayos

Es conocido que las características de un inmunoensayo pueden verse afectadas al variar las condiciones fisicoquímicas del medio o las condiciones experimentales. Por ello, y con todas las combinaciones seleccionadas en los ensayos competitivos (ver sección 4.3.), se llevaron a cabo diferentes ensayos de optimización para establecer las condiciones de pH, fuerza iónica, concentración de surfactante y tiempo de incubación en la etapa competitiva, que dieran lugar a los inmunoensayos con mejores prestaciones para los diferentes organofosforados.

4.4.1 Efecto del pH

La influencia del pH en dos de los principales parámetros de los inmunoensayos, señal máxima (A_0) y sensibilidad (IC_{50}), se muestran en la Figura 28.

Dado que el diazinón se hidroliza tanto a pH ácido como básico, la influencia del pH del medio se ensayó en un intervalo entre 6,5 y 8. En los dos inmunoensayos desarrollados para diazinón, la mayor sensibilidad se observa a pH 7,5-8. Sin embargo, debido a que la señal disminuye a pH superiores a 7,5, especialmente para el ensayo B ($<0,5$ unidades de absorbancia), se eligió 7,5 como pH óptimo en ambos casos.

El inmunoensayo para fentión se estudió en un intervalo de pH entre 4 y 9. Los valores de IC_{50} y A_0 variaron aproximadamente entre 0,45-0,53 ng/mL y 0,68-0,80, respectivamente. La mejor relación A_0 / IC_{50} (0,778 / 0,45 ng/mL) se obtuvo a pH 7,5, seleccionándose éste como óptimo.

En el ELISA para malatión se estudió el efecto del pH entre 5 y 7, ya que fuera de este intervalo el analito se hidroliza. Se observa que aunque la señal aumenta con el pH, a pH 7 el inmunoensayo es menos sensible (mayor IC_{50}) que a pH 5. Sin embargo, dado que este valor está muy próximo al pH de degradación del analito, y que la sensibilidad del ensayo era buena para condiciones de pH entre 5,5 y 6,5, se seleccionó 6,5 como pH más apropiado.

En el caso del clorpirifos, los ensayos de optimización se efectuaron entre pH 4 y 9. Los valores de IC_{50} y A_0 no variaron significativamente en este intervalo en el caso del ensayo C, mientras que para el ensayo D ambos parámetros aumentaron a medida que lo hacía el pH. Para ambos ensayos las mejores relaciones A_0 / IC_{50} se obtuvieron a pH 6.

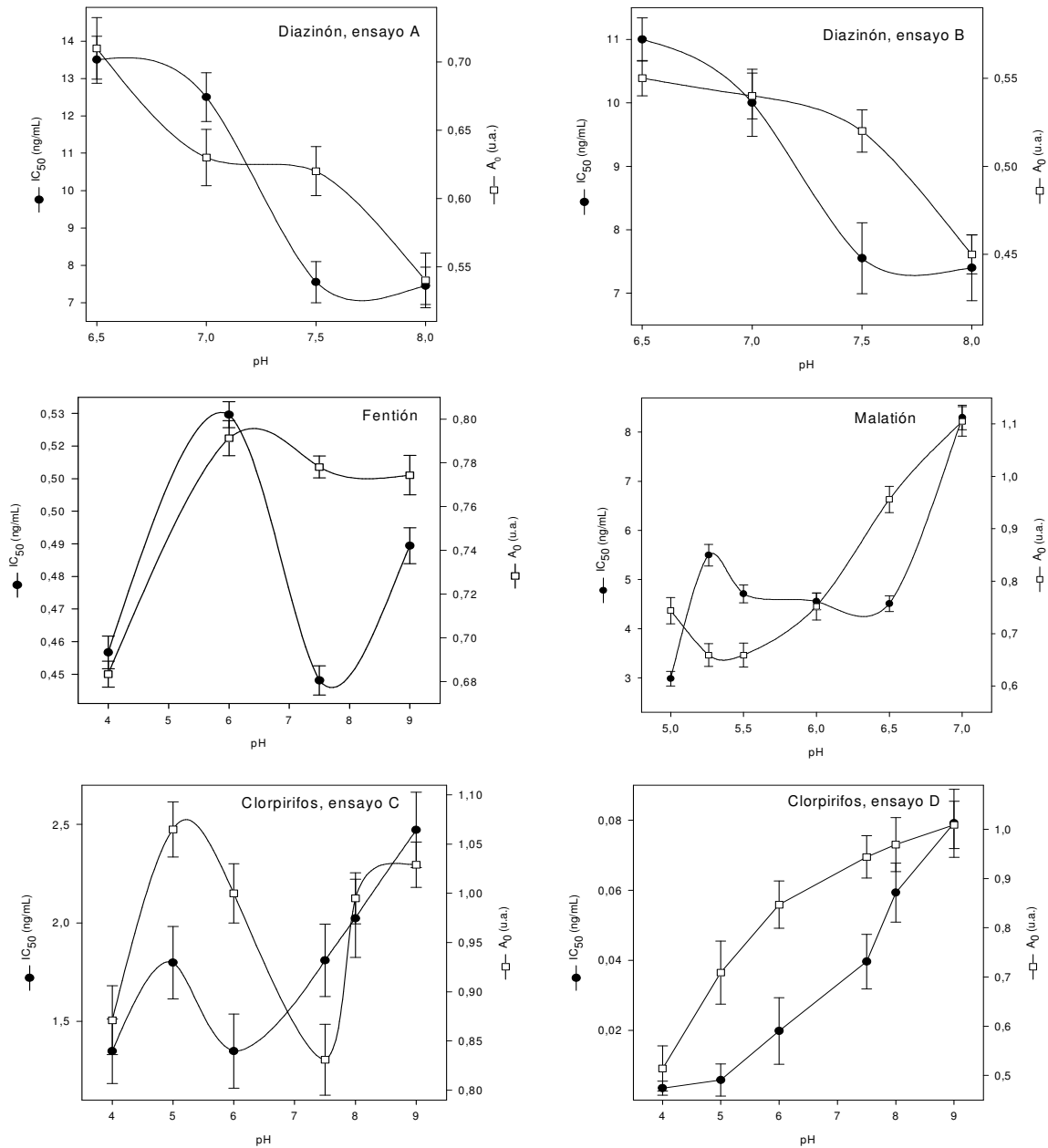


Figura 28. Efecto del pH en las características de los inmunoensayos

4.4.2. Efecto de la fuerza iónica

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica se ensayaron diferentes concentraciones de PBS, entre 5 mM y 80 mM de ión fosfato (Figura 29).

4. Resultados

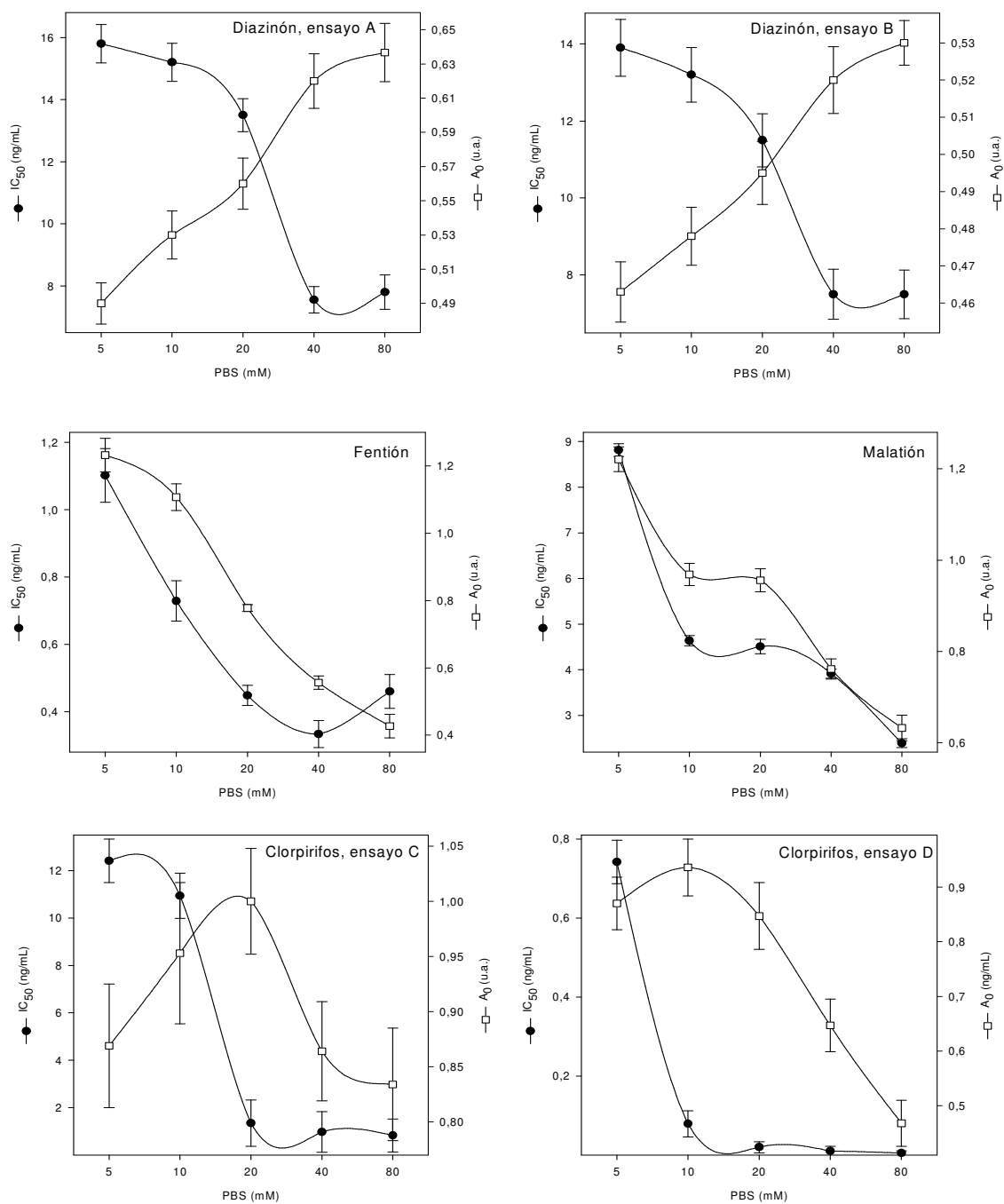


Figura 29. Efecto de la fuerza iónica en las características de los inmunoensayos

En el caso de los inmunoensayos para diazinón y fentión, los valores de IC₅₀ disminuyeron a medida que aumentaba la concentración de sales, lo que indica que las interacciones que tienen lugar entre el analito y el anticuerpo deben ser principalmente hidrofóbicas. Estas interacciones se favorecen, generalmente, al aumentar la fuerza iónica del medio de reacción, mientras que en las interacciones principalmente iónicas se produce el efecto contrario. En este ensayo, la concentración de tampón fosfato 20

mM fue la que proporcionó las mejores relaciones A_0 / IC_{50} , seleccionándose ésta para futuros desarrollos.

En el caso del malatión, los resultados indicaron que la máxima señal se producía con PBS 5 mM, valor a partir del cual la señal disminuía gradualmente al aumentar la concentración salina. Sin embargo, la sensibilidad mejoraba (menor valor de IC_{50}) al crecer la fuerza iónica, seleccionando 20 mM como concentración de compromiso entre señal y sensibilidad.

Para clorpirifos, la sensibilidad aumentó a medida que lo hizo la fuerza iónica, mientras que la señal sólo se incrementó a concentraciones superiores a 20 mM. Nuevamente, se seleccionó 20 mM para mantener una buena relación señal/sensibilidad.

Como puede observarse en la Figura 29, las desviaciones obtenidas en los ensayos para clorpirifos fueron más elevadas que para los otros organofosforados estudiados. Este hecho puede ser debido a la dificultad que presenta llevar a cabo inmunoensayos para clorpirifos dada su hidrofobicidad. La bibliografía recoge esta problemática, y son varios los autores (285, 286) que indican que el clorpirifos se adsorbe en los materiales plásticos, lo que provoca bajas recuperaciones y elevadas desviaciones en los resultados. Así pues, es necesario que los ensayos se realicen cuidadosamente, especialmente al manipular el material (pipetas, puntas, placas ELISA, etc.), con el fin de minimizar los posibles errores.

4.4.3. Efecto de la concentración de surfactante

El Tween 20 es un surfactante no iónico, comúnmente usado en inmunoensayo para evitar interacciones inespecíficas o ruido de fondo, siendo 0,05% (en placa) la concentración más ampliamente utilizada en inmunoensayos para plaguicidas. Sin embargo, dependiendo del analito, la concentración de detergente influye en las características del ELISA. Se ha demostrado que concentraciones de Tween 20 menores del 0,05% mejoran la sensibilidad del ensayo para analitos orgánicos de baja masa molecular y no polares, como endosulfán (287) y clorpirifos (288). En contraste, para analitos altamente polares como clorofenoles (289, 290), nitrofenoles (291) y 3,5,6-tricloro-2-piridinol (286) esta influencia es menor, debido a que no pueden establecerse interacciones hidrofóbicas con el detergente.

Por ello, se ensayó la adición de diferentes porcentajes de Tween 20 -entre 0% y 0,5% (v/v)- al tampón fosfato usado para diluir el anticuerpo específico. En la Figura 30

4. Resultados

se observa que para diazinón tanto los valores de señal como de IC_{50} disminuían al aumentar el porcentaje de surfactante (hasta 0,1% para el ensayo B), por lo que se seleccionó una concentración de Tween 20 del 0,1% como compromiso entre sensibilidad y ausencia de interacciones no específicas.

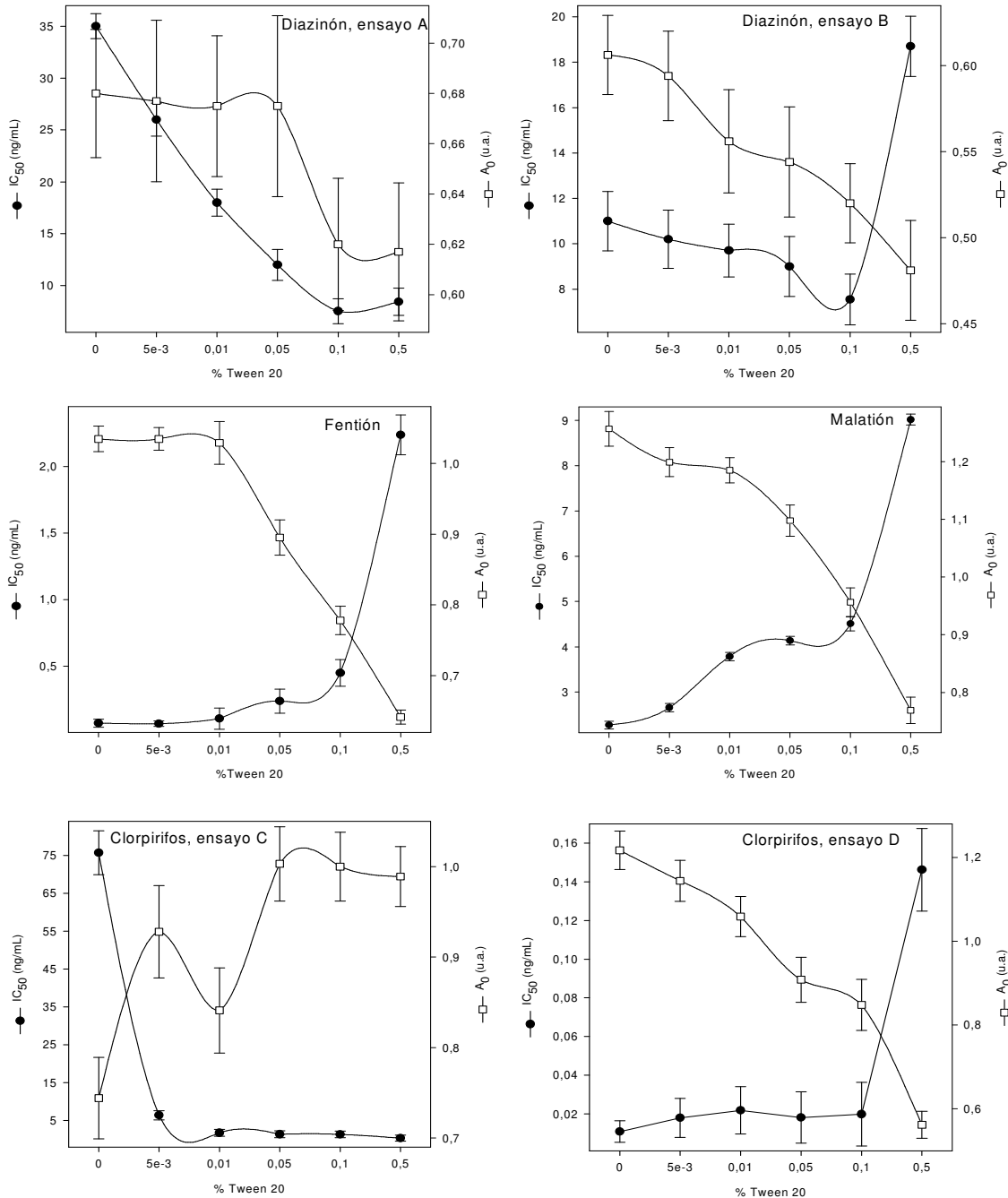


Figura 30. Efecto de la concentración de surfactante en las características de los inmunoensayos

Para fentión y malatión, las señales eran menores y los valores de IC_{50} mayores, a medida que aumentaba la concentración de Tween 20 en el medio de ensayo, obteniéndose los valores de IC_{50} más bajos con porcentajes de Tween 20 de 0,005% y 0% para fentión y malatión, respectivamente.

En el caso de clorpirifos se seleccionó un 0,5% de Tween 20 para el inmunoensayo C, ya que los valores de IC_{50} fueron menores al aumentar el porcentaje de surfactante. Para el ensayo D se decidió trabajar sin surfactante, dado que la presencia de éste no proporcionó ninguna mejora en la respuesta.

4.4.4. Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva

Utilizando las condiciones óptimas previamente establecidas, se estudió la influencia del tiempo de incubación (15, 30, 45 y 60 minutos) sobre las características de los inmunoensayos (Figura 31). En el caso del diazinón las señales obtenidas fueron bajas incluso para 60 min, por lo que no se ensayaron tiempos inferiores.

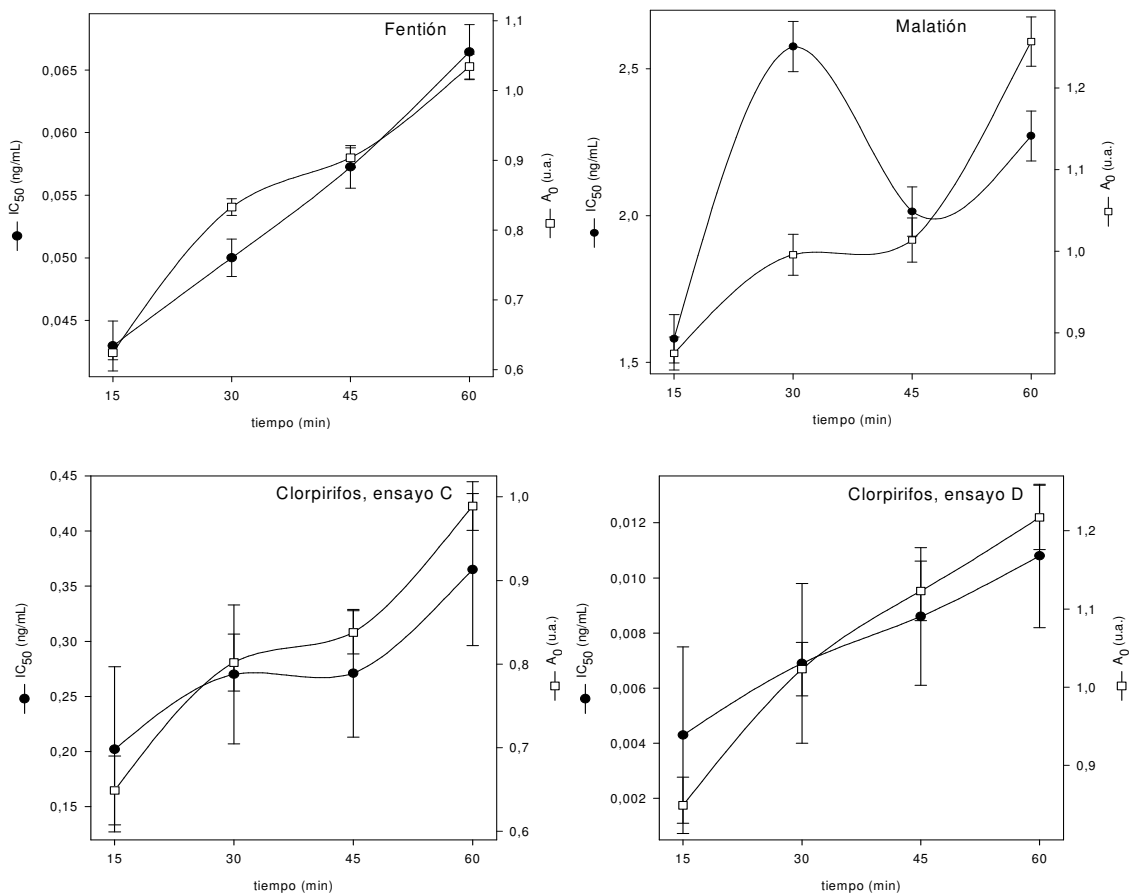


Figura 31. Efecto del tiempo de competición en las características de los inmunoensayos

4. Resultados

Para el resto de organofosforados, tanto el valor de IC_{50} como la señal aumentaban a medida que lo hacía el tiempo de incubación.

Con el fin de obtener ensayos sensibles, con una señal adecuada y en un tiempo reducido, se seleccionó como tiempo de incubación óptimo 30 min para fentión y 15 min para malatión. En el caso de clorpirifos, éste fue de 30 min para el ensayo C y de 45 min para el D.

Hay que indicar que, en todos los casos, es posible utilizar tiempos más cortos, pero la reproducibilidad disminuye considerablemente, especialmente en el caso del clorpirifos.

4.4.5. Prestaciones analíticas de los inmunoensayos optimizados

De los ensayos de optimización se deduce que, en general, la concentración de surfactante y el tiempo de incubación en la etapa competitiva son los parámetros que más influyen en la mejora de la sensibilidad de los ELISAs.

Las condiciones de trabajo seleccionadas como óptimas en los ensayos desarrollados para los cuatro organofosforados estudiados se resumen en la Tabla 23. Estos resultados indican que el pH óptimo varía entre 6,0 y 7,5, y que para todos los inmunoensayos el tampón óptimo es PBS 20 mM, mientras que el porcentaje de Tween 20 y el tiempo de competición son las variables más discrepantes.

Tabla 23. Condiciones de trabajo óptimas de los ELISAs

<i>Analito</i>		<i>pH</i>	<i>PBS</i> <i>(mM)</i>	<i>Tween 20</i> <i>(%, v/v)</i>	<i>t*</i> <i>(min)</i>
Diazinón	Ensayo A	7,5	20	0,1	60
	Ensayo B	7,5	20	0,1	60
Fentión		7,5	20	0,005	30
Malatión		6,5	20	0	15
Clorpirifos	Ensayo C	6,0	20	0,5	45
	Ensayo D	6,0	20	0	30

*tiempo de incubación en la etapa competitiva

La sensibilidad de los ensayos optimizados se obtuvo a partir de los correspondientes calibrados. Se observa (Figura 32) que es posible cuantificar desde niveles inferiores a pg/mL (clorpirifos) hasta pocos ng/mL (diazinón) -o intermedios (fentión y malatión)- de estos compuestos. La Tabla 24 resume las características analíticas de los ensayos optimizados para los cuatro organofosforados. A la vista de

estos resultados se observa que, aunque en los ensayos de diazinón el proceso de optimización no proporcionó una mejora en la sensibilidad, el ensayo se puede considerar lo suficientemente sensible para determinar residuos de este insecticida a niveles de ng/mL. Es de destacar que la sensibilidad es superior a la obtenida por ten Hoeve *et al.* (292), que utiliza el hapteno D8. Por otro lado, los ensayos desarrollados a partir de haptenos obtenidos utilizando la ruta sintética propuesta por Beasley *et al.* (135) presentan una sensibilidad ligeramente inferior a la obtenida por estos autores, probablemente debido a la diferente respuesta de los animales inmunizados.

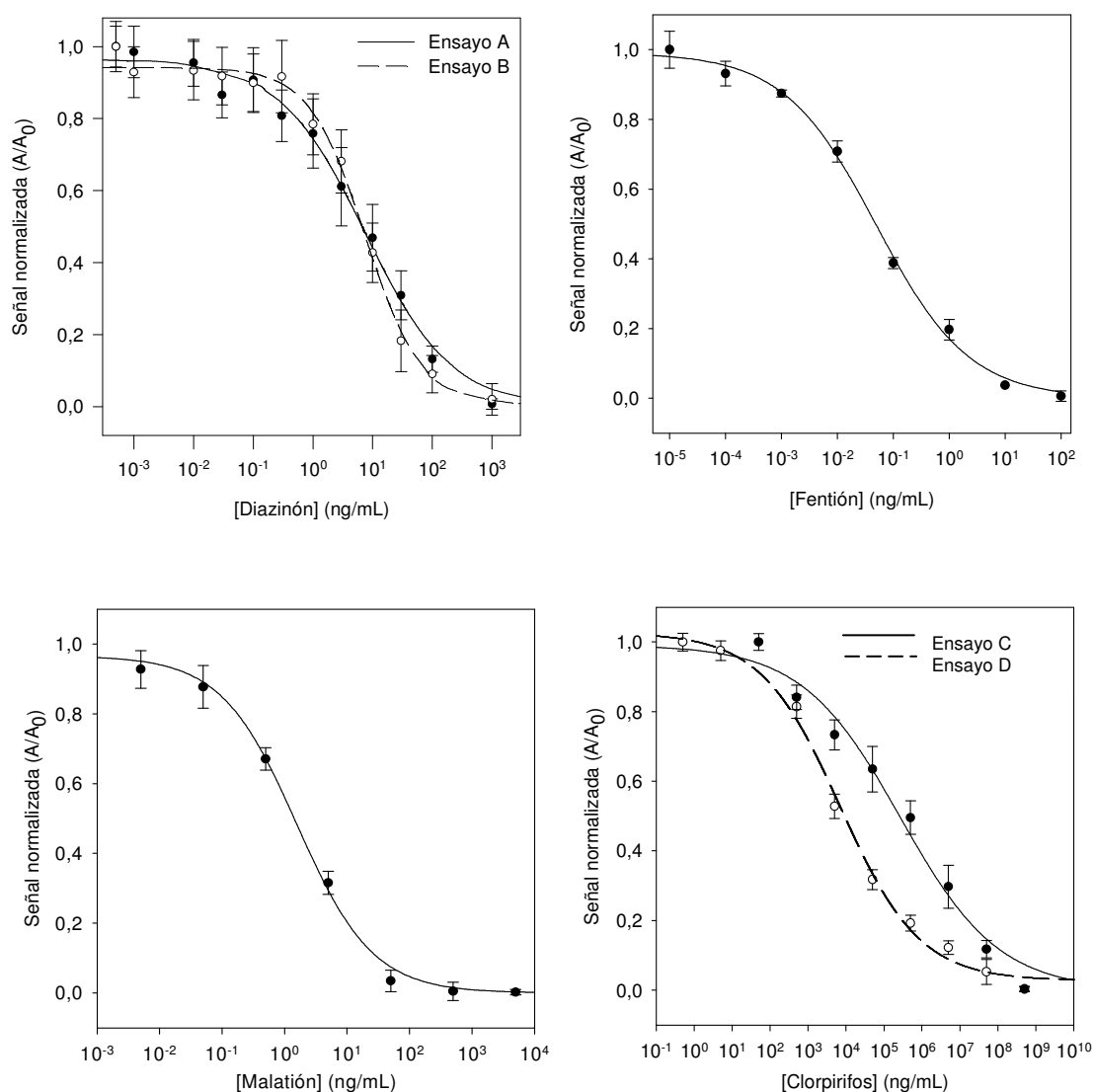


Figura 32. Curvas patrón obtenidas para los cuatro organofosforados (media de tres réplicas)

Tabla 24. Parámetros analíticos de los ELISAs desarrollados para organofosforados

<i>Analito</i>		<i>LD (ng/mL)</i>	<i>RD (ng/mL)</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>
Diazinón	Ensayo A	0,4	1,3-71,3	7,5
	Ensayo B	0,85	1,2-32,0	7,5
Fentión		0,0006	0,03,-1,0	0,05
Malatión		0,1	0,2-10,9	1,6
Clorpirifos	Ensayo C	0,0003	0,004-16,5	0,3
	Ensayo D	0,00007	0,0004-0,3	0,007

LD (límite de detección): concentración que inhibe un 10% de la señal máxima

RD (intervalo de trabajo o rango dinámico): concentraciones que inhiben la señal máxima entre un 20% y un 80%

IC₅₀: concentración de analito que inhibe la señal máxima un 50%

Los inmunoensayos desarrollados para diazinón fueron menos sensibles que los kits comerciales (InSite Diazinon Plate Kit -LD 0,03 ng/mL- y EnviroGard Diazinon Plate Kit -LD 0,022 ng/mL-) a pesar de que se utilizaron nuevas rutas sintéticas para la obtención de haptenos. Hay que señalar que no se dispone de información sobre los inmunorreactivos utilizados en estos kits.

Con posterioridad a la obtención de estos resultados, Lee *et al.* (293) han puesto a punto un ELISA indirecto para diazinón basado en anticuerpos monoclonales -IC₅₀ de 4 ng/mL y LD de 0,7 ng/mL- con prestaciones similares a las de nuestro ensayo A desarrollado para este plaguicida.

El ELISA desarrollado para la determinación de residuos de fentión presenta mayor sensibilidad que los ensayos en placa descritos a la vez en la bibliografía por Kim *et al.* (294, 295). Esta mejora podría deberse a la diferencia entre los haptenos utilizados -conjugación a proteína via grupo alcohol para obtener el inmunógeno y mayor heterología con el hapteno de tapizado que carece del grupo tiofosfato-.

Recientemente, Zhang *et al.* (296) han descrito otro ELISA para fentión ligeramente menos sensible (IC₅₀ de 0,08 ng/mL) inmunizando con un hapteno que posee el brazo espaciador unido al anillo aromático por la posición del átomo de azufre (careciendo de este elemento); como hapteno de tapizado usan uno de los descritos previamente por Kim *et al.* (294). Meses después, estos mismos autores han mejorado las prestaciones del inmunoensayo (297) utilizando una nueva combinación de haptenos de inmunización -con el brazo espaciador unido al anillo aromático- y de tapizado -con el brazo espaciador en el grupo tiofosfato-, obteniendo una IC₅₀ de 0,01 ng/mL.

En el caso del ensayo para malatión, es de destacar la mejor sensibilidad alcanzada en comparación con los inmunoensayos descritos por Nishi *et al.* (298) utilizando

anticuerpos monoclonales. Este hecho puede deberse, probablemente, a la heterología introducida con el hapteno de tapizado, ya que estos autores utilizaron el mismo hapteno de inmunización pero llevaron a cabo los ensayos en condiciones homólogas.

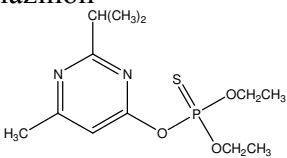
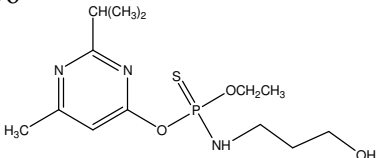
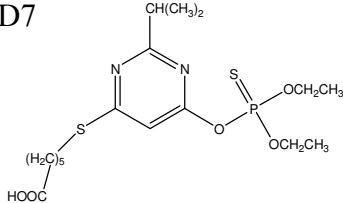
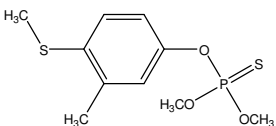
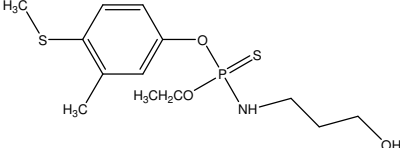
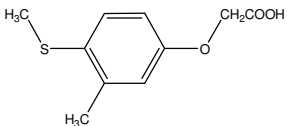
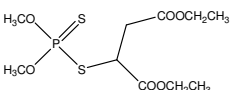
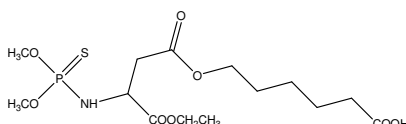
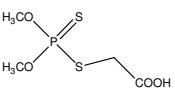
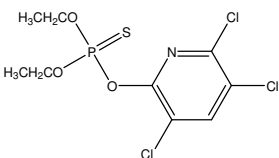
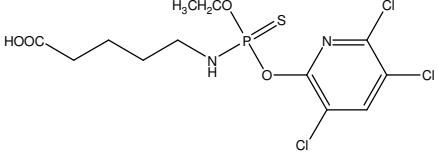
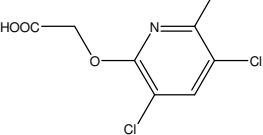
Para clorpirifos, el ensayo C presenta una IC_{50} similar a la de los mejores inmunoensayos descritos en la bibliografía (134, 286); sin embargo, el límite de detección es considerablemente más bajo y el intervalo de trabajo más amplio. Por otro lado, el ensayo D es, según la información recogida, el inmunoensayo más sensible descrito hasta este momento para clorpirifos. Las curvas patrón para ambos ensayos presentan buena reproducibilidad, con valores medios de desviación estándar relativa del 4% (ensayo C) y 3% (ensayo D).

4.4.6. Recapitulación de resultados

Los inmunoensayos que han proporcionado las mejores prestaciones utilizan haptenos de inmunización y tapizado con características comunes; este hecho puede ser de ayuda a la hora de diseñar haptenos para organofosforados. Como se puede apreciar en la Tabla 25, los haptenos de inmunización mantienen el grupo tiofosfato y el brazo espaciador está unido a través de éste.

En relación con los haptenos de tapizado, los mejores resultados se han obtenido en heterología. Estos haptenos carecen incluso del grupo tiofosfato en los ensayos más sensibles (fentión y clorpirifos) y tienen brazos espaciadores cortos.

Tabla 25. Estructuras de los mejores haptenos de inmunización y tapizado

<i>Analito</i>	<i>Hapteno de inmunización</i>	<i>Hapteno de tapizado</i>
Diazinón 	D6 	D7 
Fentión 	F7 	F1 
Malatión 	M5 	M2 
Clorpirifos 	C2 	C5 

4.5. Ensayos de selectividad

La selectividad de los ELISAs desarrollados para los plaguicidas objeto de estudio se evaluó mediante ensayos de reconocimiento de diferentes compuestos de la familia de los organofosforados, algunos metabolitos y otros plaguicidas de uso común. Los resultados se muestran en las Tablas 26 a 28.

4.5.1. Selectividad del ensayo para diazinón

En el caso de los ELISAs para diazinón, se observó que el ensayo B es ligeramente más selectivo que el A (Tabla 26). Se obtuvieron valores de selectividad -reactividad cruzada- inferiores al 1% en el caso del ensayo B para todos los compuestos organofosforados ensayados, e inferior al 2% para su metabolito principal. El ensayo A presentó reactividades cruzadas inferiores al 5% para todos los compuestos ensayados.

Tabla 26. Reactividad cruzada del inmunoensayo para diazinón

Compuesto		Ensayo A		Ensayo B	
		IC ₅₀ (ng/mL)	RC (%)	IC ₅₀ (ng/mL)	RC (%)
Diazinón		7,5	100	7,5	100
Diazinón hidroxi-metabolito		157	4,8	434	1,7
AMPA		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Atrazina		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Azinfos-metil		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Clorpirifos		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Diclorvos		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Fenitrotión		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Fentión		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Glifosato		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Paratión-metil		6.166	0,12	>10.000	<0,075
Pirimifos-etil		662	1,1	1.923	0,39
Pirimifos-metil		268	2,8	785	0,96
Tetraclorvinfos		>10.000	<0,075	>10.000	<0,075
Simazina		>10.000	<0,075	3.084	0,24

RC-Reactividad cruzada

$$RC (\%) = [IC_{50} (\text{analito}) / IC_{50} (\text{interferente})] \times 100$$

Estos valores pueden considerarse prácticamente despreciables teniendo en cuenta la sensibilidad del inmunoensayo, siendo, por tanto, específico para diazinón.

Al comparar estos resultados con los recogidos en la bibliografía para diazinón (135, 258, 299-301), es de destacar que los inmunoensayos desarrollados son, hasta el momento, los más específicos (RC<5%). Sólo el ensayo descrito por Lee *et al.* (293)

utilizando anticuerpos monoclonales, presenta una reactividad cruzada frente a pirimifos-etil ligeramente inferior (1,1% frente a 1,7%). En ambos casos se utilizó un hapteno similar para la inmunización; la mayor diferencia reside en la longitud del brazo espaciador (dos átomos de C más) y en la conjugación mediante un grupo carboxilo en lugar de un hidroxilo, como en nuestro caso.

4.5.2. Selectividad del ensayo para fenitión

Los valores de reactividad cruzada (Tabla 27) obtenidos con el ensayo para fenitión fueron despreciables ($RC < 3,5\%$). La mayor interferencia la presentó el fenitrotión, con un valor de reactividad cruzada del 3,1%, muy inferior al 14% obtenido en el inmunoensayo descrito por Kim *et al.* (294) y al 406% del ELISA desarrollado por Zhang *et al.* (296). El único inmunoensayo que tiene una RC para fenitrotión (4,5%) similar a la del ELISA aquí descrito, es el publicado recientemente por Zhang *et al.* (297).

4.5.3. Selectividad del ensayo para malatión

El ensayo para malatión resultó ser prácticamente específico (Tabla 28), con valores de reactividad cruzada inferiores al 1%. Sólo el malaoxon, principal metabolito del malatión, mostró una reactividad cruzada ligeramente superior (1,3%). Estos resultados son de difícil comparación, ya que el único trabajo (298) que hasta el momento describe inmunoensayos para este analito utilizando anticuerpos monoclonales, no recoge datos de selectividad.

4.5.4. Selectividad del ensayo para clorpirifos

En los dos ensayos desarrollados para clorpirifos (ensayos C y D), los valores de reactividad cruzada (Tabla 29) más elevados se obtuvieron para clorpirifos-metil (140% y 50%, respectivamente). Estos resultados son similares (67%, 300%, 114%, 125%) a los encontrados por otros autores (136, 285, 286). Únicamente el inmunoensayo descrito por Lawruk *et al.* (302) mostró una reactividad cruzada inferior al 26% para el mismo compuesto (clorpirifos-metil), probablemente debido a que el hapteno utilizado para la inmunización posee los dos grupos etoxi en el éster fosfórico. Sin embargo, la determinación de clorpirifos-metil puede ser interesante, ya que muchas formulaciones

comerciales de clorpirifos (96), como Dursban, Ridder, Loxiran o Reldan (303), lo contienen.

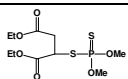
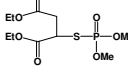

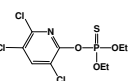
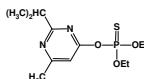
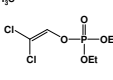
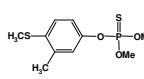
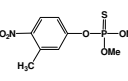
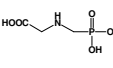

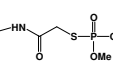
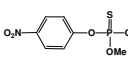
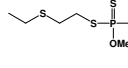

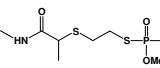
Tabla 27. Reactividad cruzada del inmunoensayo para fentión

<i>Compuesto</i>		<i>IC₅₀(ng/mL)</i>	<i>RC (%)</i>
Fentión		0,05	100
Fentión-sulfóxido		13,7	0,4
4-(Metiltio)- <i>m</i> -cresol		818,9	6·10 ⁻³
Atrazina		>10.000	<5·10 ⁻⁴
Azinfos-metil		>10.000	<5·10 ⁻⁴
Clorpirifos		5.000	10 ⁻³
Diazinón		>10.000	<5·10 ⁻⁴
Fenitrotión		1,6	3,1
Glifosato		>10.000	<5·10 ⁻⁴
Paratión-metil		5.297	9·10 ⁻³
Pirimifos-metil		>10.000	<5·10 ⁻⁴
Pirimifos-etil		>10.000	<5·10 ⁻⁴

RC-Reactividad cruzada

$$RC (\%) = [IC_{50} (\text{analito}) / IC_{50} (\text{interferente})] \times 100$$

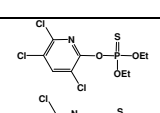
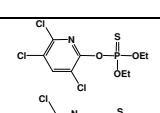
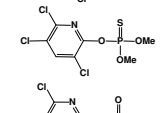
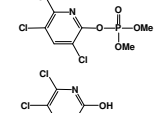
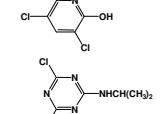
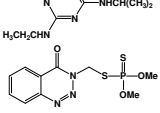
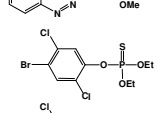
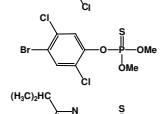
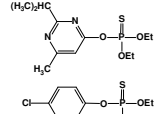
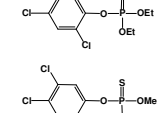
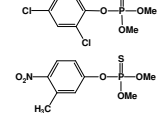
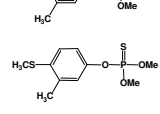
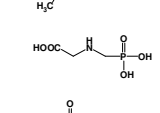
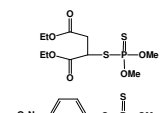
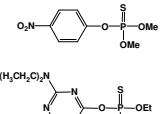
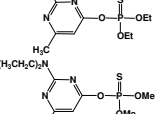
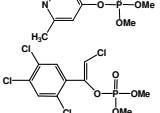
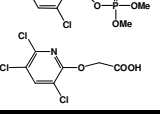
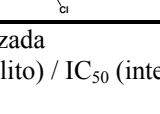


Tabla 28. Reactividad cruzada del inmunoensayo para malatión

<i>Compuesto</i>		<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>	<i>RC (%)</i>
Malatión		1,58	100
Malaoxon		118	1,3
Acefato		$>5 \cdot 10^4$	$<3,2 \cdot 10^{-3}$
Clorpirifos		$>5 \cdot 10^3$	$<3,2 \cdot 10^{-2}$
Diazinón		$>2,5 \cdot 10^4$	$<6,3 \cdot 10^{-3}$
Diclorvos		$>5 \cdot 10^4$	$<3,2 \cdot 10^{-3}$
Fentión		200	0,8
Fenitrotión		$2 \cdot 10^3$	$7,9 \cdot 10^{-2}$
Glifosato		$>5 \cdot 10^4$	$<3,2 \cdot 10^{-3}$
Metamidofos		$>5 \cdot 10^4$	$<3,2 \cdot 10^{-3}$
Ometoato		$>5 \cdot 10^3$	$<3,2 \cdot 10^{-2}$
Paratión-metil		$4 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^{-2}$
Tiometón		199	0,8
Triclorfón		$>5 \cdot 10^4$	$<3,2 \cdot 10^{-3}$
Vamidotión		$>5 \cdot 10^4$	$<3,2 \cdot 10^{-3}$

RC-Reactividad cruzada

$$RC (\%) = [IC_{50} (\text{analito}) / IC_{50} (\text{interferente})] \times 100$$

Tabla 29. Reactividad cruzada del inmunoensayo para clorpirifos

Compuesto		Ensayo C		Ensayo D	
		IC ₅₀ (ng/L)	RC (%)	IC ₅₀ (ng/L)	RC (%)
Clorpirifos		271	100	7	100
Clorpirifos-metil		194	140	14	50
Clorpirifos-oxon		661	41	15	46
TCP		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	>5·10 ⁶	<2·10 ⁻⁴
Atrazina		>5·10 ⁶	<6·10 ⁻³	>5·10 ⁶	<2·10 ⁻⁴
Azinfos-metil		2·10 ⁶	0,014	2·10 ⁶	3,5·10 ⁻⁴
Bromofos-etil		2,5·10 ⁶	0,011	1.700	0,4
Bromofos-metil		319	85	28	25
Diazinón		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	>5·10 ⁶	<2·10 ⁻⁴
Diclofentión		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	53.000	0,01
Fenclorfos		2·10 ⁶	0,014	47	15
Fenitrotión		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	1,3·10 ⁶	5·10 ⁻⁴
Fentiión		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	>5·10 ⁶	<2·10 ⁻⁴
Glifosato		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	>5·10 ⁶	<2·10 ⁻⁴
Malatión		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	>5·10 ⁶	<2·10 ⁻⁴
Paratión-metil		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	1,5·10 ⁶	5·10 ⁻⁴
Pirimifos-etil		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	>5·10 ⁶	<2·10 ⁻⁴
Pirimifos-metil		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	>5·10 ⁶	<2·10 ⁻⁴
Tetraclorvinfos		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	5·10 ⁵	1,4·10 ⁻³
Triclopír		>5·10 ⁶	< 6·10 ⁻³	5,6·10 ⁵	1,3·10 ⁻³

RC-Reactividad cruzada

$$RC (\%) = [IC_{50} (\text{analito}) / IC_{50} (\text{interferente})] \times 100$$

Para clorpirifos-oxon, los valores de reactividad cruzada obtenidos (41% ensayo C y 46% ensayo D) son superiores a los encontrados por otros autores (136, 286), pero similares (30%) a los observados por Hill *et al.* (285).

Por otro lado, el reconocimiento de TCP es prácticamente nulo ($<2 \cdot 10^{-4}\%$); dado que éste es el principal metabolito del clorpirifos en medio acuoso, podemos afirmar que es posible analizar clorpirifos sin interferencia de este compuesto.

Los ELISAs desarrollados presentaron interferencias apreciables con bromofos-metil (85% para el ensayo C y 25% para el D). Sin embargo, los valores de reactividad cruzada encontrados para bromofos-etil fueron muy bajos (0,011% y 0,4% para ensayo C y D, respectivamente) e inferiores a los del ensayo descrito por Cho *et al.* (4,58%) (136). El mayor reconocimiento del bromofos-metil respecto al bromofos-etil es sorprendente y difícil de justificar, ya que el bromofos-etil es un compuesto estructuralmente muy similar al clorpirifos (se diferencian en la ausencia de N heterocíclico y por presentar un Br en lugar de un Cl en uno de los sustituyentes del anillo) mientras que el bromofos-metil posee, además, grupos metilo en lugar de etilo en el tiofosfato.

El ensayo D mostró una reactividad cruzada del 15% para fenclorfos, siendo despreciable en el ensayo C. Los inmunoensayos para clorpirifos previamente descritos en la bibliografía muestran valores de reactividad cruzada variables (6%-75%) para este compuesto (285, 304).

Finalmente, hay que destacar que 15 de los 19 compuestos ensayados apenas fueron reconocidos -RC<0,5% en todos los casos- en ninguno de los inmunoensayos desarrollados para clorpirifos.

4.6. Tolerancia de los inmunoensayos a disolventes orgánicos

La capacidad de los disolventes orgánicos de interferir en las propiedades físico-químicas de las proteínas es bien conocida (305-307). Los efectos de estos disolventes son generalmente atribuidos a los cambios en las interacciones no covalentes de las proteínas, incluyendo enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y la solvatación de grupos iónicos y dipolos. Estas alteraciones pueden modificar la estructura terciaria de las proteínas provocando, en mayor o menor grado, su desnaturalización.

La conformación que una proteína mantiene en un disolvente depende de la proporción de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas que ésta posee en su superficie. Para

estabilizar la estructura nativa de la proteína, esta proporción debe tener un cierto valor. Cambios en esta proporción provocan un reordenamiento de los puentes de hidrógeno, lo que resulta en cambios conformacionales de la molécula (308, 309).

Sin embargo, es ampliamente aceptado que la eficiencia de las reacciones enzimáticas en medio orgánico es comparable, o incluso mayor en algunos casos, a la que tiene lugar en medio acuoso, siempre que las enzimas estén rodeadas de una capa de agua, la cual es necesaria para la retención de su actividad (310).

Por analogía con las enzimas, es presumible que la hidrofobicidad de los disolventes no cause un desplazamiento de la película de agua que rodea a las moléculas de anticuerpo, manteniendo su inmunorreactividad. Sin embargo, y en contraste con las enzimas, no son muchas las investigaciones realizadas sobre el comportamiento de los anticuerpos o de los conjugados de tapizado proteína-hapteno en medios orgánicos.

Los efectos de los disolventes orgánicos descritos para sistemas inmunoanalíticos incluyen cambios en la especificidad y algunos ejemplos de incremento de la afinidad (127). La afinidad del anticuerpo está relacionada con la polaridad del disolvente y la solubilidad del hapteno en el mismo (311). Sin embargo, en un estudio sobre el efecto del tipo de disolvente en la interacción antígeno-anticuerpo utilizando inmunoglobulinas anti-testosterona (312), no se encontró correlación entre la afinidad aparente y algunas propiedades de los disolventes tales como constante dieléctrica, polaridad y momento dipolar, pero fue inversamente correlacionada con la masa molecular del disolvente. Esto sugiere que la inhibición del enlace puede relacionarse con la capacidad del disolvente de desplazar la capa de agua que rodea al hapteno. En dicho estudio se observó un aumento en la capacidad de reconocimiento del anticuerpo a medida que disminuía la concentración de algunos disolventes.

La mayor parte de los estudios de compatibilidad de los anticuerpos en medios orgánicos han sido desarrollados utilizando la técnica ELISA, usando disolventes miscibles en agua, generalmente a bajas concentraciones. En este sentido, son escasas las publicaciones que describen ensayos en relación con efectos matriz (313), efectos en la enzima marcadora (314), la afinidad del anticuerpo (315) o la cinética de la unión (316) en medios orgánicos.

En general, en los formatos en placa, en raras ocasiones se pueden utilizar concentraciones de disolventes orgánicos miscibles con agua superiores al 10% (v/v). Comúnmente, la sensibilidad alcanzada en medio orgánico es menor, pero se ha demostrado que la unión antígeno-anticuerpo es efectiva en estos medios. Por otro lado,

no es práctico el uso de disolventes inmiscibles en agua debido a la separación de fases producida y a la partición del analito en dichas fases, si bien es posible realizar la reacción inmunoquímica en la interfase acu-orgánica, aunque el tiempo de incubación es mucho mayor (10-20 horas) comparado con el requerido en medio acuoso. Por otro lado, las placas de poliestireno pueden ser atacadas por disolventes orgánicos como tolueno, diclorometano, octanol, ciclohexano, dimetilformamida y tetrahidrofurano, aspecto a tener en cuenta a la hora de realizar los ensayos.

Así pues, el uso de disolventes orgánicos en los inmunoensayos en placa debe ser estudiado, por un lado, para conocer la respuesta de los inmunorreactivos en dichos medios y, por otro, porque son usados en la extracción de plaguicidas de muestras agroalimentarias o medioambientales según los métodos de referencia (75).

Por todo ello, y utilizando las condiciones de ensayo óptimas, se estudió la influencia de diferentes disolventes orgánicos en los inmunoensayos desarrollados. Los disolventes ensayados fueron: metanol, acetona, acetonitrilo, 2-propanol, lactato de etilo y dimetilsulfóxido, en diferentes porcentajes hasta un máximo del 20% (10% en placa). El lactato de etilo se eligió por ser un extractante alternativo, menos contaminante que los utilizados tradicionalmente.

Hay que indicar, que en las figuras que muestran la tolerancia de los inmunoensayos a los distintos disolventes (Figuras 33-37), únicamente se ha representado el intervalo de porcentajes de disolvente que proporciona señales apreciables.

4.6.1. Tolerancia del inmunoensayo para diazinón

En el caso del diazinón, el estudio de la tolerancia a disolventes orgánicos se realizó con el ensayo A -menor límite de detección e intervalo de trabajo más amplio que el ensayo B-, que será el aplicado posteriormente a la determinación de este analito en muestras reales.

Aunque el diclorometano también es usado en la extracción de diazinón previamente al análisis por GC-MS, este disolvente no es miscible en agua y, por tanto, no es adecuado para su utilización en placa ELISA. La influencia de los disolventes estudiados en el inmunoensayo para diazinón se muestra en la Figura 33. Se observa que el metanol es el disolvente mejor tolerado; aunque con un 10% de metanol la señal obtenida es ligeramente inferior a la alcanzada en medio acuoso, la sensibilidad del

ensayo no se ve afectada ($IC_{50} = 7,1$ ng/mL). Con metanol al 4% se consigue incluso una mejor IC_{50} (4,3 ng/mL) que en tampón acuoso.

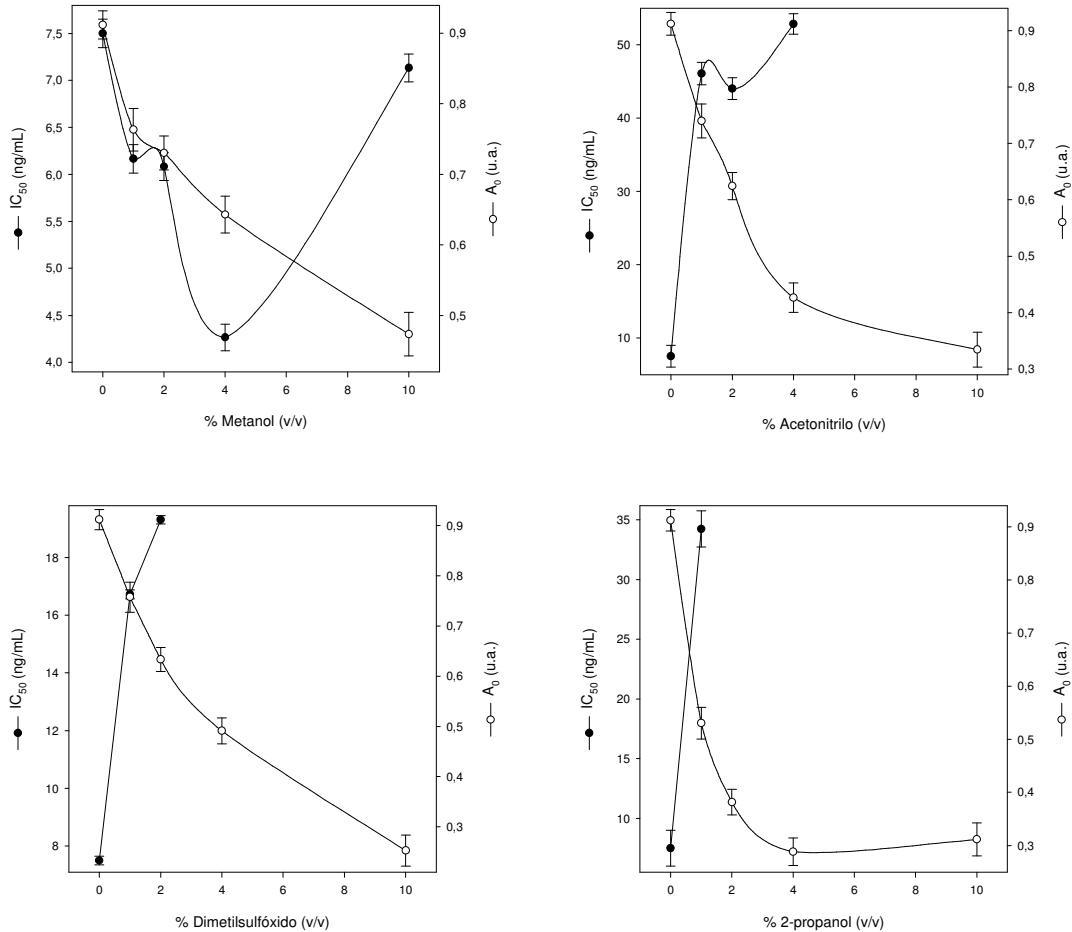


Figura 33. Tolerancia a disolventes orgánicos del inmunoensayo para diazinón

Cuando se utiliza acetonitrilo, 2-propanol o dimetilsulfóxido, tanto la señal como la sensibilidad disminuyen al aumentar el porcentaje de disolvente. Niveles de estos disolventes superiores al 2% reducen un tercio la sensibilidad del ensayo. También se ensayaron acetona y lactato de etilo, pero estos disolventes no fueron compatibles con el ELISA para este analito.

Estos resultados son muy interesantes, ya que para la determinación de diazinón en matrices complejas como alimentos, suelos, etc., puede ser necesario el uso de metanol para su extracción de la matriz.

4. Resultados

4.6.2. Tolerancia del inmunoensayo para fenti3n

El inmunoensayo para fenti3n soporta porcentajes de metanol de hasta el 10% manteniendo buenas propiedades analíticas (Figura 34). En general, un aumento en el porcentaje de metanol provoca un incremento en el valor de la se1al y una ligera disminuci3n de la sensibilidad. Porcentajes de metanol superiores al 10% no son recomendables debido al descenso de la se1al y el aumento de la IC_{50} .

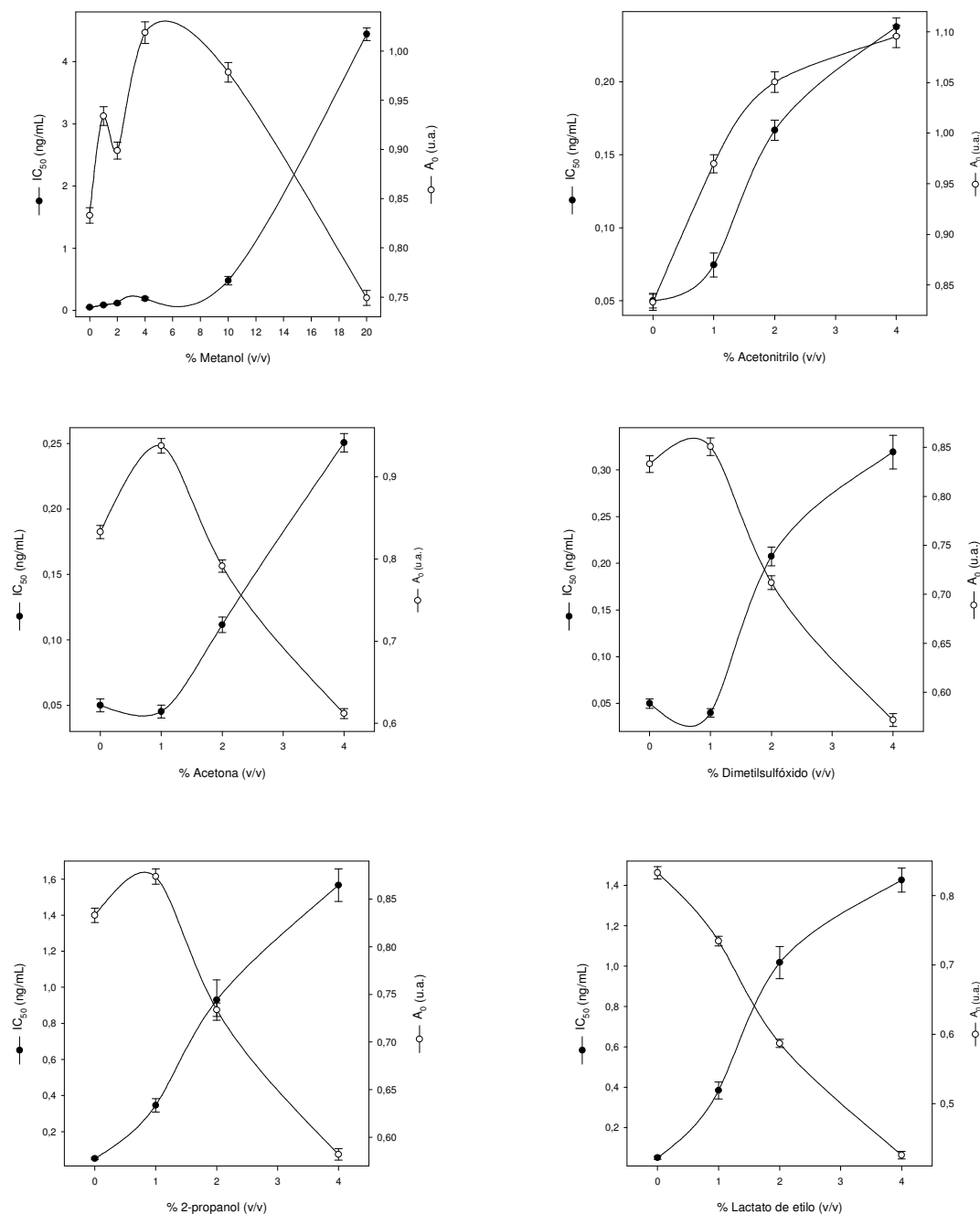


Figura 34. Tolerancia a disolventes org1nicos del inmunoensayo para fenti3n

Un comportamiento similar se observa al utilizar hasta un 1% de acetona, dimetilsulfóxido y 2-propanol. Porcentajes superiores provocan un descenso de la señal y un aumento de la IC_{50} , aunque se mantienen buenos parámetros analíticos para el ELISA.

El acetonitrilo provocó un efecto diferente, ya que la señal y la IC_{50} aumentan a medida que lo hace la proporción de disolvente, probablemente debido a que la unión del anticuerpo al conjugado de tapizado se ve favorecida en este medio. El 2-propanol fue el disolvente que provocó en el ELISA las peores prestaciones.

En conclusión, el metanol fue el disolvente orgánico mejor tolerado en el inmunoensayo para fentión, al igual que observan otros autores (294); acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido se pueden utilizar como máximo hasta un 4%, manteniendo valores aceptables de IC_{50} y de señal.

4.6.3. Tolerancia del inmunoensayo para malatión

El inmunoensayo para malatión (Figura 35) toleró porcentajes de hasta el 10% de metanol y 2-propanol, con valores de IC_{50} del orden de 6 ng/mL y 2,4 ng/mL, respectivamente. El resto de los disolventes -acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido- fueron tolerados sólo hasta el 4%, siendo el acetonitrilo el que dio lugar a una mayor pérdida de sensibilidad. El lactato de etilo no fue tolerado en ninguna proporción.

Trabajando en un medio con 1% de metanol, tanto la sensibilidad como la señal fueron superiores a las alcanzadas en tampón, siendo este disolvente el más recomendado cuando la determinación de malatión deba realizarse en medio orgánico.

4.6.4. Tolerancia del inmunoensayo para clorpirifos

Los estudios de tolerancia a disolventes realizados con los dos inmunoensayos desarrollados para clorpirifos, indican que el ensayo C (Figura 36) soporta peor la presencia de disolventes que el ensayo D (Figura 37).

4. Resultados

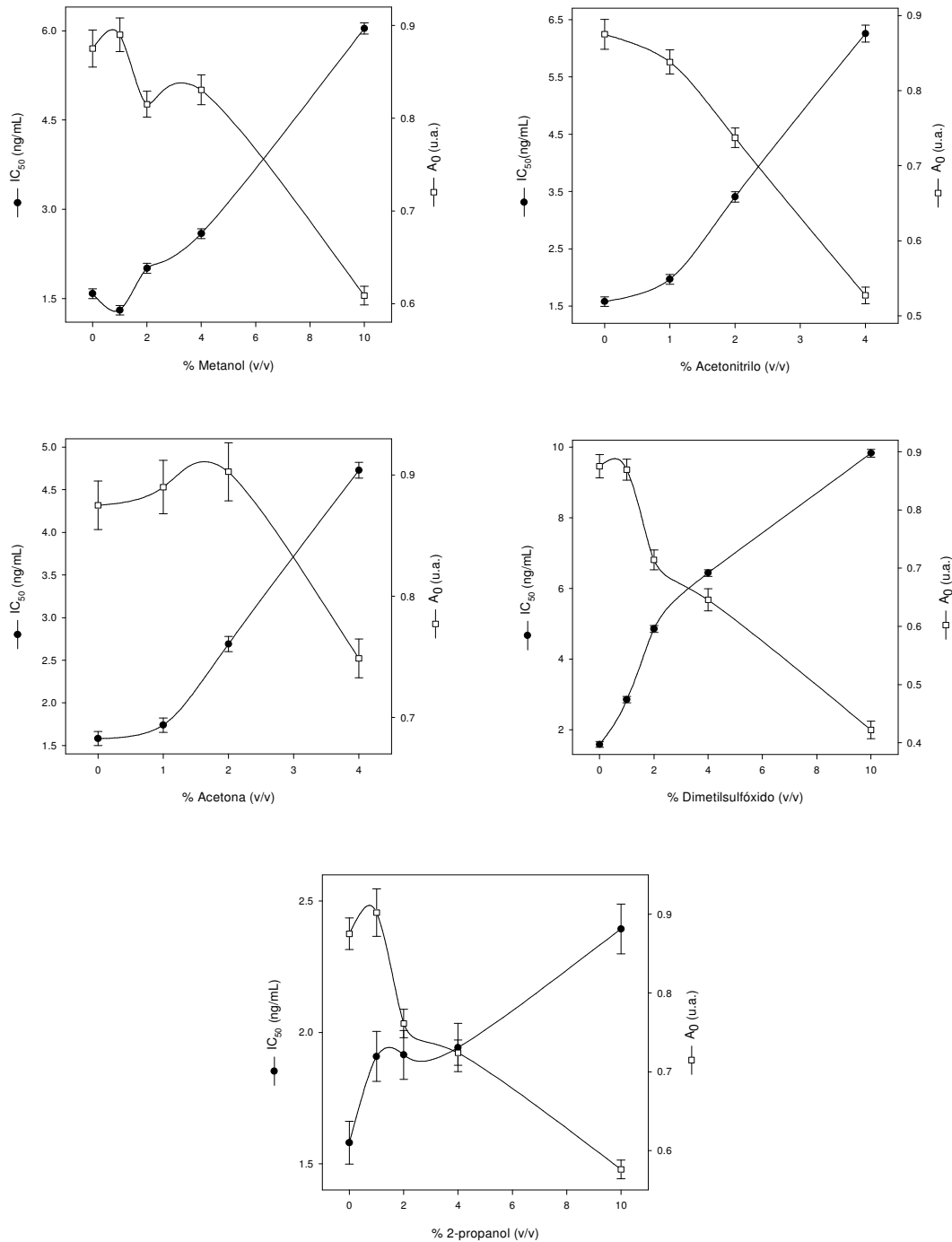


Figura 35. Tolerancia a disolventes orgánicos del inmunoensayo para malatión

Los máximos porcentajes de disolvente que pueden ser utilizados en el ensayo C -manteniendo sus prestaciones- fueron: 20% de metanol y acetona, 10% de acetonitrilo y dimetilsulfóxido, 4% de 2-propanol, y 2% de lactato de etilo. La utilización de 2-propanol entre el 1% y 2% proporciona mejores valores de IC_{50} que el tampón puro.

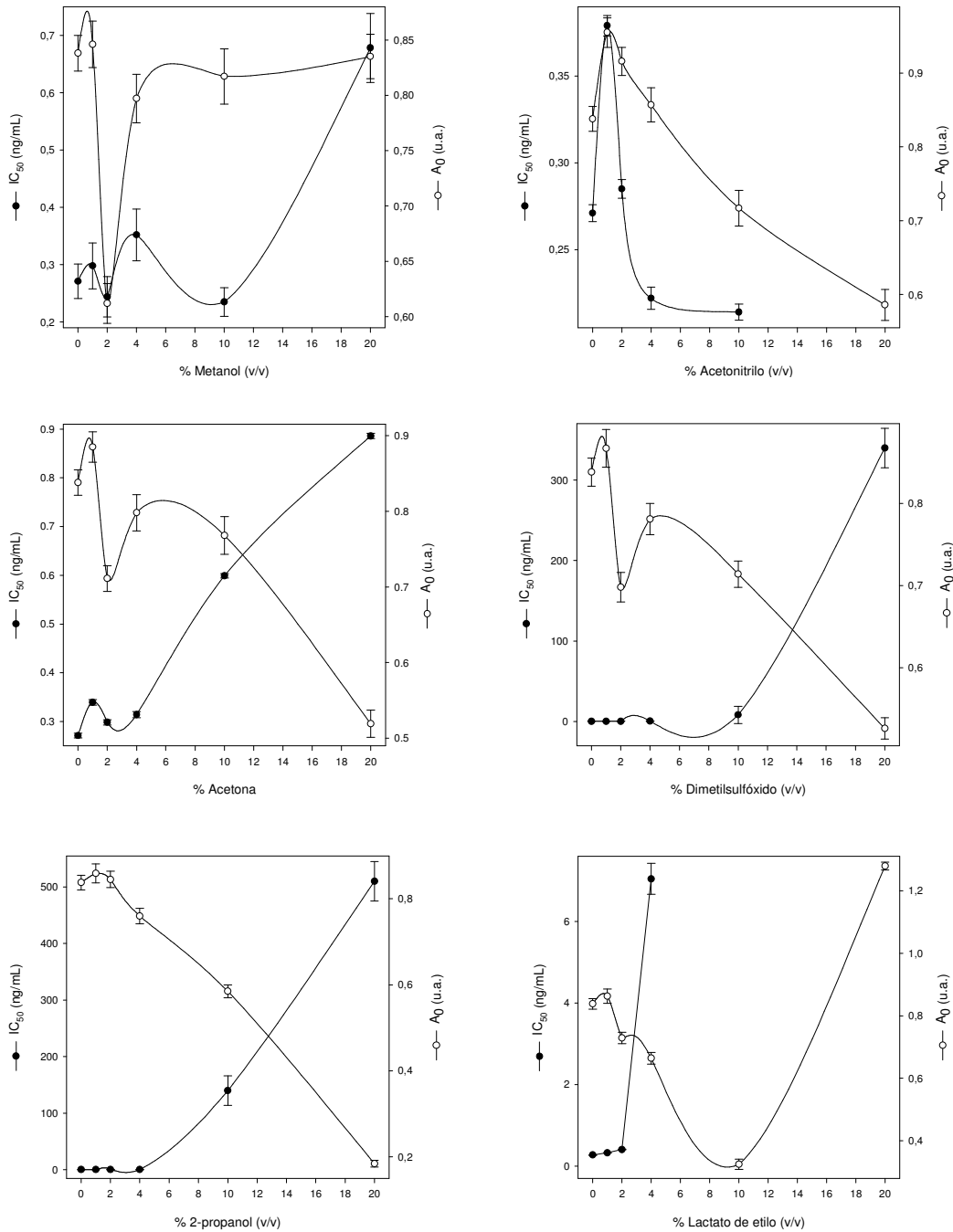


Figura 36. Tolerancia a disolventes orgánicos del inmunoensayo C para clorpirifos

La tolerancia a disolventes del inmunoensayo D presenta una pauta diferente. Acetonitrilo y acetona pueden utilizarse hasta el 4% como máximo, metanol y dimetilsulfóxido hasta el 10% y lactato de etilo hasta un 2% manteniendo, en todos los casos, las mismas prestaciones del inmunoensayo.

4. Resultados

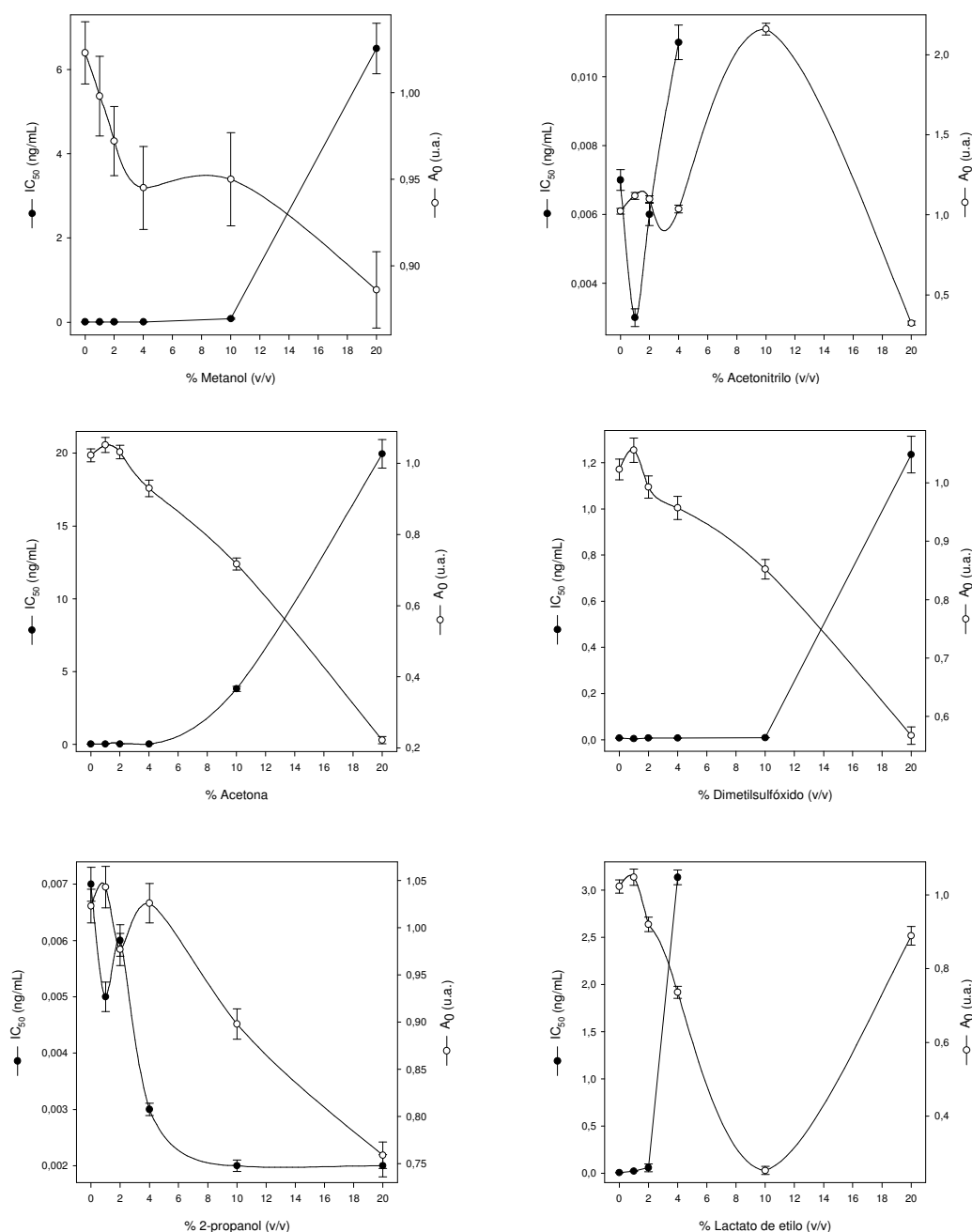


Figura 37. Tolerancia a disolventes orgánicos del inmunoensayo D para clorpirifos

Respecto al 2-propanol, el ensayo D tolera todos los porcentajes ensayados (0-20%). De hecho, este ensayo es más sensible en presencia de 2-propanol que en tampón fosfato, aunque la señal disminuye al usar porcentajes superiores al 4%.

Finalmente, hay que indicar que todos los disolventes estudiados y en las condiciones menos favorables, mantienen valores de IC_{50} inferiores a 60 ng/mL (en la mayoría de los casos <10 ng/mL).

Los resultados de tolerancia a disolventes orgánicos obtenidos para los inmunoensayos desarrollados son muy interesantes, ya que su uso es inevitable durante la elución en procesos de extracción sólido-líquido, o para la extracción de muestras grasas y complejas como el aceite de oliva.

4.7. Aplicación de los inmunoensayos desarrollados

4.7.1. Determinación de residuos de diazinón en agua

En primer lugar, dada la solubilidad y amplio uso del diazinón (317), se efectuó la determinación de residuos de este analito en muestras de agua. El análisis se llevó a cabo utilizando el inmunoensayo A, por presentar un mayor intervalo de trabajo. Para ello, se seleccionaron ocho aguas embotelladas de baja mineralización (conductividad eléctrica ente 25 y 874 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20 °C) y se doparon con diazinón a diferentes concentraciones, cubriendo el intervalo de trabajo del método. Las determinaciones se efectuaron directamente, sin ningún tratamiento de muestra previo. Paralelamente, las muestras fueron analizadas por GC-MS con el fin de poder realizar comparaciones.

Las muestras fueron previamente analizadas para comprobar la ausencia de residuos de diazinón (<LD), observando, además, que no existía efecto matriz.

La Figura 38 muestra la correlación entre los resultados obtenidos por GC-MS y ELISA.

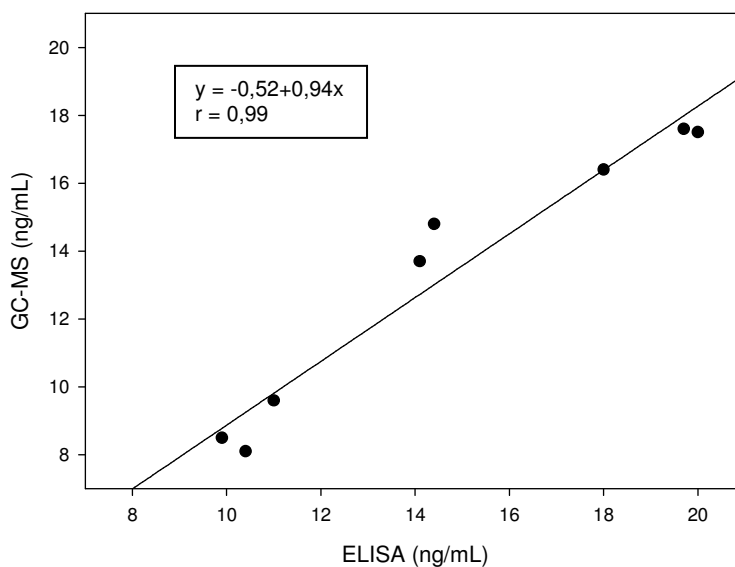


Figura 38. Correlación entre los resultados obtenidos mediante GC-MS y ELISA

4. Resultados

Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre el 90% y 110% en ELISA, y el 81% y 99% por GC-MS (Tabla 30). Los resultados obtenidos demuestran la utilidad del método inmunoquímico desarrollado para la determinación de diazinón en aguas, a niveles de ng/mL (aunque el límite de cuantificación es inferior a los niveles legislados - 0,1 ng/mL-).

Tabla 30. Determinación de diazinón en agua mineral dopada. ELISA vs GC-MS

Muestra	[Diazinón] adicionada	[Diazinón] determinada			
		ELISA		GC-MS	
		Media ± DS	R (%)	Media ± DS	R (%)
1	15	14,1 ± 1,0	93	13,7 ± 1,1	91
2	10	11,0 ± 2,0	110	9,6 ± 0,4	96
3	20	18,0 ± 2,0	90	16,4 ± 2,5	82
4	15	14,4 ± 1,6	96	14,8 ± 1,0	99
5	10	10,4 ± 1,1	104	8,1 ± 1,5	81
6	20	19,7 ± 1,3	98	17,6 ± 2,0	88
7	20	20,0 ± 2,0	100	17,5 ± 2,0	87,5
8	10	9,9 ± 1,5	99	8,5 ± 1,0	85
Media	-	-	99	-	89

Concentraciones de diazinón en ng/mL, DS: desviación estándar relativa (n=3), R: recuperación

Posteriormente, y para comprobar la aplicabilidad de la metodología, se analizaron muestras de agua del Río Turia ($DBO_5 < 3 \text{ mgO}_2/\text{L}$), tomadas en diferentes puntos de su cuenca (de aproximadamente 7000 km^2) por personal del Ministerio de Medioambiente -Red Integral del Plan de Calidad del Agua (RED ICA)-. Tras comprobar que estaban libres de diazinón, las muestras se doparon a cinco niveles y se analizaron mediante inmunoensayo. La metodología desarrollada proporcionó de nuevo muy buenos resultados (Tabla 31), con valores de recuperación media del 105%, demostrando su gran potencial cuando se aplica al análisis de aguas.

4.7.2. Determinación de residuos de fentiión en vino

El fentiión se utiliza ampliamente en viñedos -especialmente para producción de uva de mesa- como tratamiento anti-polilla en épocas muy próximas a la de vendimia. Además, hasta un 13% del residuo inicial de este insecticida presente en la uva puede llegar al vino (318). Por todo ello, se estudió la aplicabilidad del inmunoensayo para fentiión en vinos.

Tabla 31. Determinación de diazinón mediante ELISA en agua del río Turia dopada

<i>Muestra</i>	<i>[Diazinón] adicionada</i>	<i>[Diazinón] determinada (Media ± DS)</i>	<i>R (%)</i>
C301	50	52,8 ± 0,4	106
C302	50	43,4 ± 0,6	87
C403	50	48,6 ± 1,5	97
C303	50	43,0 ± 3,0	86
C305	50	50,0 ± 4,0	100
B402	20	22,3 ± 0,8	112
C306	20	21,0 ± 2,0	105
F401	20	21,5 ± 1,8	108
F301	20	19,0 ± 2,0	95
C402	20	19,0 ± 6,0	95
H601	20	20,0 ± 6,0	100
H403	20	18,0 ± 4,0	90
F302	15	16,8 ± 1,7	112
E304	15	15,5 ± 0,5	103
E303	15	16,6 ± 1,6	111
E307	15	14,4 ± 3,7	96
G303	10	11,3 ± 1,9	113
E403	10	11,0 ± 3,0	110
D402	10	11,3 ± 1,1	113
H401	10	8,4 ± 1,6	84
G401	10	12,0 ± 0,8	120
G403	5	6,6 ± 0,1	132
H407	5	6,2 ± 0,8	124
G405	5	5,6 ± 1,0	112
Media	-	-	105

Concentración de diazinón en ng/mL, DS: desviación estándar relativa (n=3),
R: recuperación

Se seleccionaron diez vinos blancos comerciales, comprobando mediante ELISA que el contenido en fentión era inferior al LD del método (0,6 pg/mL). Posteriormente, las muestras se doparon con fentión a diferentes niveles y se diluyeron en agua desionizada (1/10) con el fin de reducir el posible efecto matriz.

El análisis se realizó directamente en todas las muestras, excepto en la denominada V9, que tuvo que ser extraída utilizando cartuchos Oasis HLB (6 mL, 200 mg) para eliminar interferencias. Para ello, los cartuchos se lavaron por gravedad con 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de agua desionizada; a continuación, se cargaron 15 mL de muestra (vino) y se eluyó con 5 mL de metanol. El extracto fue diluido (1/50 v/v) con agua desionizada antes de realizar el inmunoensayo.

4. Resultados

Las recuperaciones obtenidas en la cuantificación de residuos de fentión mediante ELISA, en las diferentes muestras de vino blanco, se muestran en la Tabla 32. Los resultados (recuperaciones entre 81% y 113%) demuestran la aplicabilidad del ensayo a este tipo de matrices, bien directamente o tras un proceso de extracción.

Tabla 32. Determinación de fentión mediante ELISA en vino blanco dopado

<i>Muestra</i>	<i>[Fentión] adicionada</i>	<i>[Fentión] determinada (Media ± DS)</i>	<i>R (%)</i>
V1	100	91,0±9,0	91
V2	5	4,6±0,3	92
V3	10	9,3±0,1	93
V4	5	4,6±0,2	92
V5	50	48,0±2,0	96
V6	10	11,3±0,8	113
V7	50	56,0±4,0	112
V8	50	42,0±5,0	84
V9	100	88,0±6,0	88
V10	10	8,1±1,1	81
Media	-	-	94

Concentraciones de fentión en ng/mL, DS: desviación estándar relativa (n=3), R: recuperación

Finalmente, el ELISA se aplicó a vinos tintos, no observando interferencias debidas a la materia colorante presente en este tipo de muestras. Las recuperaciones oscilaron entre 74% y 91% para niveles de adición de 100 ng/mL, y entre 84% y 92% para adiciones de 50 ng/mL.

4.7.3. Determinación de residuos de malatión en agua

Para demostrar la aplicabilidad del inmunoensayo desarrollado para malatión se analizaron diferentes aguas minerales embotelladas, comparando los resultados con los obtenidos por el método de referencia (GC-MS) con el fin de conocer su exactitud y precisión.

Las muestras, libres de malatión, se doparon a diferentes niveles y se analizaron directamente (sin pretratamiento) mediante ELISA. Los resultados (Tabla 33) mostraron buena correlación con los obtenidos por GC-MS, con recuperaciones medias GC-MS/ELISA del 101% / 97%, 97% / 97% y 92%/100%, para niveles de dopaje de 2, 5 y 10 ng/mL, respectivamente. Los valores de recuperación media obtenidos (98%)

demuestran que este inmunoensayo puede ser aplicado como método de control y cuantificación de residuos de malatión en aguas de bebida a concentraciones de ng/mL.

Tabla 33. Determinación de malatión mediante ELISA en agua mineral dopada

<i>Muestra</i>	<i>[Malatión] adicionada</i>	<i>[Malatión] determinada (Media ± DS)</i>	<i>R (%)</i>
W1	100	94,6 ± 4,9	95
W2	100	93,8 ± 7,8	94
W3	100	83,9 ± 12,6	84
W4	100	94,5 ± 2,5	95
W5	100	105,3 ± 16,6	105
W6	50	52,4 ± 7,7	105
W7	50	49,7 ± 6,0	100
W8	50	49,1 ± 7,0	98
W9	50	51,5 ± 4,0	103
W10	50	48,5 ± 5,3	97
W11	20	20,8 ± 1,9	104
W12	20	19,5 ± 0,8	98
W13	20	23,0 ± 4,4	115
W14	20	20,3 ± 2,0	102
W15	20	19,9 ± 1,4	100
W16	10	10,0 ± 0,7	100
W17	10	10,0 ± 0,8	100
W18	10	10,1 ± 0,4	101
W19	5	5,0 ± 0,1	100
W20	5	5,0 ± 0,6	100
W21	5	4,5 ± 1,2	90
W22	2	2,0 ± 0,1	100
W23	2	2,2 ± 0,7	111
W24	2	1,6 ± 0,2	81
Media	-	-	98

Concentración de fentión en ng/mL, DS: desviación estándar relativa (n=3), R: recuperación

Finalmente, el ELISA se aplicó a la determinación de residuos de malatión en aguas superficiales, estudiando el efecto del contenido de materia orgánica. Para ello, se tomaron muestras de agua del río Júcar en diez puntos diferentes de su cuenca, localizados en la Comunidad Valenciana. Esta sección del río (Figura 39), de 80 km de

largo desde su desembocadura, se caracteriza por recibir aguas procedentes de diferentes plantas de tratamiento municipales; además, las actividades industriales y agrícolas en este tramo del río influyen significativamente en la calidad del agua.



Figura 39. Puntos de muestreo en el río Júcar

En todas las muestras se midió la conductividad eléctrica y el nivel de materia orgánica, observando que éstas presentaban diferentes características químicas en función de la zona de muestreo. Así, la conductividad eléctrica varió entre 815 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en el punto más alejado de la desembocadura, hasta 18.190 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (608 mg Cl^-/L) en la desembocadura, debido a la intrusión del mar. En los puntos intermedios este parámetro se mantuvo en 1200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. El contenido en materia orgánica fue de 1,3 mg O_2/L al inicio del tramo muestreado, se mantuvo en 2,5 mg O_2/L en casi todos los puntos a lo largo de la cuenca, hasta llegar a las zonas próximas al mar donde alcanzaron niveles de 4,3 mg O_2/L .

Las muestras, nativas y dopadas a dos niveles (5 y 10 ng/mL) con malatión, se analizaron por ELISA -tras filtrarlas (20 μm) y acondicionar el pH a 6,5-, comparando los resultados con los obtenidos por GC-MS. En todas las muestras analizadas, los niveles de malatión fueron inferiores a los límites de detección en ambos métodos.

En la Tabla 34 se muestran las concentraciones de malatión obtenidas mediante ELISA y GC-MS. Las recuperaciones medias fueron del 101% y 103% en ELISA y GC-MS, respectivamente, lo que demuestra el potencial del método para el análisis de

aguas medioambientales. La determinación mediante inmunoensayo se llevó a cabo en menos de dos horas, y los niveles de materia orgánica y conductividad eléctrica de las muestras no presentaron ninguna influencia en los resultados.

Tabla 34. Determinación de malatión en agua del río Júcar dopada. ELISA vs GC-MS

Muestra	<i>[Malatión] = 10 ng/mL</i>		<i>[Malatión] = 5 ng/mL</i>	
	<i>[Malatión] ELISA (Media ± DS)</i>	<i>[Malatión] GC-MS (Media ± DS)</i>	<i>[Malatión] ELISA (Media ± DS)</i>	<i>[Malatión] GC-MS (Media ± DS)</i>
1	10,1 ± 0,1	11,5 ± 0,4	5,0 ± 0,1	5,2 ± 0,2
2	10,5 ± 0,4	9,9 ± 0,5	4,5 ± 0,5	5,0 ± 0,4
3	10,3 ± 0,9	9,3 ± 0,7	4,3 ± 0,4	4,6 ± 0,3
4	11,5 ± 1,9	9,8 ± 1,0	6,1 ± 0,4	5,3 ± 0,4
5	9,8 ± 0,7	10,8 ± 0,6	5,1 ± 0,8	4,6 ± 0,5
6	9,3 ± 0,7	10,9 ± 0,5	5,7 ± 0,2	5,4 ± 0,3
7	9,6 ± 0,3	9,6 ± 0,4	4,4 ± 0,3	5,5 ± 0,2
8	10,0 ± 0,6	11,6 ± 0,6	4,9 ± 0,3	4,8 ± 0,4
9	9,6 ± 0,4	10,9 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,2 ± 0,2
10	11,9 ± 0,6	10,5 ± 0,5	5,1 ± 0,7	5,3 ± 0,3

Concentración de malatión en ng/mL, DS: desviación estándar relativa (n=3)

Por otro lado, para estudiar el efecto de la materia orgánica -es conocido que su contenido en aguas superficiales afecta negativamente a la determinación tanto inmunoquímica como cromatográfica de plaguicidas (319), dado que adsorbe los analitos con gran facilidad -, se preparó una nueva muestra (mezcla de 100 mL de cada una de las aguas previamente analizadas) cuyas características fueron: conductividad eléctrica 1.280 $\mu\text{S}/\text{cm}$; pH 7,9; materia orgánica disuelta 3,4 mg O_2/L ; materia orgánica suspendida 110,6 mg O_2/L ; sólidos totales 1299 mg/L; dureza 46,0 grados franceses; proporción de adsorción de sodio 2,1; 84,0 mg Ca^{2+}/L ; 44,0 mg Mg^{2+}/L ; 100,2 mg Na^+/L ; 11,0 mg K^+/L ; 108,7 mg Cl^-/L ; 273,3 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$; 218,2 mg HCO_3^-/L . Tras adicionar 5 ng/mL de malatión y diferentes niveles de ácidos húmicos (entre 1 y 50 mg/L), la determinación mediante ELISA proporcionó recuperaciones próximas al 100% para las submuestras que contenían hasta 10 mg/L de ácidos húmicos. Sin embargo, para niveles superiores, los valores de recuperación fueron anormalmente

elevados, alcanzando valores de hasta el 900% a concentraciones de ácidos húmicos de 50 mg/L, como se observa en la Figura 40.

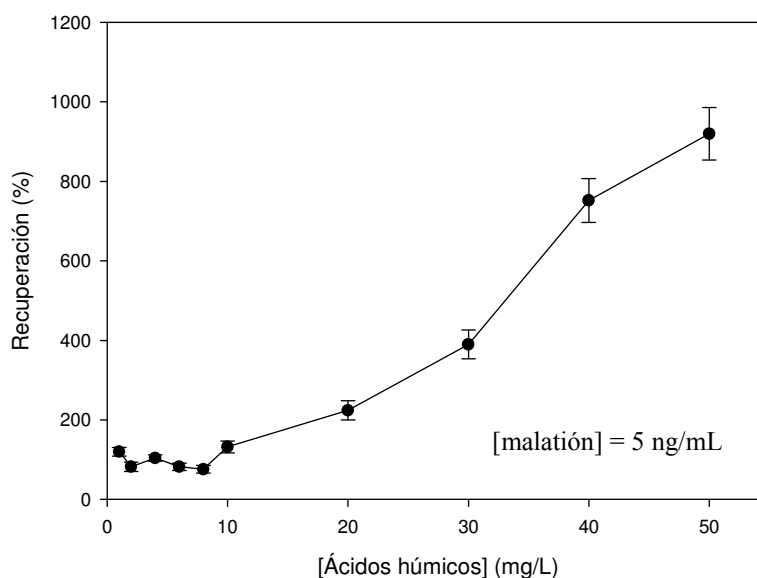


Figura 40. Influencia del contenido en ácidos húmicos en la recuperación de malatión mediante ELISA

Con el fin de eliminar la interferencia debida a la materia orgánica y evaluar la aplicabilidad del inmunoensayo en aguas superficiales con elevados contenidos de la misma, se siguió el método descrito por Johnson *et al.* (320), basado en una extracción en fase sólida usando cartuchos Strata C₁₈E (Phenomenex, Torrance, CA). Para ello, una vez acondicionado el cartucho, se cargaron 50 mL de agua, se lavó con metanol al 5% en agua desionizada y, finalmente, se eluyó con 4 mL de disolvente orgánico. Se ensayaron cinco disolventes: acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, 2-propanol y metanol. Los extractos, tras ser diluidos 1/25 en agua desionizada, se analizaron por ELISA. Los valores de recuperación obtenidos fueron del 90% para acetona y acetonitrilo, mientras que el porcentaje de recuperación fue muy bajo para dimetilsulfóxido, 2-propanol y metanol (23%, 46% y 43%, respectivamente).

En resumen, los extractos obtenidos en acetona o acetonitrilo dieron buenas recuperaciones, sin interferencias de ácidos húmicos y manteniendo buena sensibilidad (límites de detección de 0,17 y 0,20 ng/mL, respectivamente). Estos resultados muestran el potencial del inmunoensayo de malatión como método de monitoreo, incluyendo el uso de disolventes orgánicos, para aguas con niveles de ácidos húmicos de hasta 20 mg/L. Hay que indicar que niveles de ácidos húmicos del orden de 20 mg/L o

superiores proporcionan al agua un intenso color marrón y no son frecuentes en aguas naturales.

4.8. Desarrollo de un método rápido de extracción de residuos de plaguicidas en aceite de oliva virgen extra y determinación mediante inmunoensayo

La determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva requiere etapas previas de preparación de muestra, extracción de analitos y limpieza de los extractos. Como se ha comentado en la introducción (sección 1.4.3.), la presencia de lípidos y otros componentes provocan un marcado efecto matriz que hay que eliminar. Los métodos desarrollados hasta el momento utilizan diferentes técnicas de extracción (líquido-líquido, fase sólida, microondas, fluido supercrítico), limpieza del extracto (cromatografía de permeación en gel, bajas temperaturas), preconcentración de los analitos y determinación cromatográfica. Estas metodologías consumen grandes volúmenes de disolvente y requieren múltiples etapas, equipos no disponibles en las almazaras y personal entrenado. Por ello, uno de los objetivos propuestos era desarrollar un método de extracción sencillo y rápido con el fin de aprovechar las ventajas que proporcionan los métodos inmunoquímicos.

Inicialmente, para la puesta a punto del método de extracción de plaguicidas en aceite de oliva se seleccionó la atrazina como sistema modelo, por dos motivos. El primero y principal, porque paralelamente a la obtención de inmunorreactivos y puesta a punto de los ensayos para organofosforados, se podía desarrollar una metodología de preparación de muestra para aceite. El segundo motivo para escoger atrazina fue que, para este analito, se disponía de amplia experiencia y de los inmunorreactivos necesarios (321); además, se da la circunstancia de que este herbicida también es aplicado en el cultivo del olivar. Posteriormente, tanto el método de extracción como los métodos inmunoquímicos desarrollados se aplicaron a los organofosforados objeto de estudio.

4.8.1. Puesta a punto del protocolo de extracción

Los disolventes orgánicos a ensayar para llevar a cabo el proceso de extracción debían cumplir las siguientes condiciones: inmiscibilidad con el aceite, coeficiente de

partición aceite/disolvente favorable, co-extracción del menor número de compuestos interferentes, y compatibilidad con los inmunorreactivos.

Como extractantes se ensayaron agua y los disolventes orgánicos: acetonitrilo, 2-propanol, dimetilsulfóxido, lactato de etilo y metanol; paralelamente, se realizó la puesta a punto de un ELISA en formato directo para atrazina en medio acuoso (266) y se ensayó la tolerancia del mismo a estos disolventes (322). Se observó una apreciable disminución de la sensibilidad (del orden de tres o cuatro veces) al usar dimetilsulfóxido o acetonitrilo a porcentajes de tan solo el 2% en placa. Al utilizar 2-propanol se observó la disolución de parte del aceite, y con lactato de etilo se obtuvo un extracto en el que alguno de los componentes (probablemente polifenoles o ácidos grasos) precipitaba al diluir el mismo en agua desionizada. Al utilizar metanol, no se apreció disminución de la sensibilidad trabajando a un 2% en placa.

La optimización del procedimiento de extracción se llevó a cabo comparando los resultados obtenidos utilizando: agitación en vórtex o ultrasonidos, separación de fases a temperatura ambiente o en frío (4, -20 y -80 °C), y distintos volúmenes de extractante. Para ello, se dopó un aceite de oliva virgen extra con 100 ng/mL de atrazina y 1 mL de la muestra se mezcló con 1 mL del extractante a temperatura ambiente, durante diferentes tiempos de contacto. Antes de proceder al análisis mediante ELISA, los extractos se diluyeron 1/25 con agua desionizada (resultando un 2% de disolvente en placa).

Inicialmente, se ensayó la agitación en vórtex durante 15 minutos, tiempo mínimo que previamente había dado buenos resultados de recuperación para otros herbicidas en alimentos (322). Se obtuvieron recuperaciones próximas al 20% con acetonitrilo y dimetilsulfóxido, inferiores y poco reproducibles con 2-propanol (este disolvente es parcialmente miscible con el aceite, por lo que no es adecuado como extractante para este tipo de matriz) y ligeramente superiores con metanol (23%). En consecuencia, se seleccionó metanol como extractante ya que, aunque la recuperación fue similar a la obtenida con acetonitrilo o dimetilsulfóxido, su influencia en la sensibilidad del inmunoensayo era menor. Además, se ensayaron mezclas de metanol y agua, obteniendo peores resultados que con metanol puro.

Por otro lado, se ensayó la eficacia del agua como extractante de atrazina en aceite de oliva mezclando 1 mL de agua a diferentes temperaturas (25, 50 y 80 °C), con 1 mL de la muestra de aceite de oliva durante 1, 5, 10, 30 y 60 minutos. Posteriormente, se recogió la fase acuosa y se analizó por ELISA sin ningún tipo de pretratamiento, no

observándose efecto matriz con los extractos acuosos. Las temperaturas más elevadas y los tiempos más largos de agitación proporcionaron las mejores recuperaciones, aunque estas fueron muy bajas (1,6% con agua a 80 °C, 5 minutos). La sensibilidad alcanzada fue de 2,3 ng/mL.

Sin embargo, en la práctica, la determinación de atrazina en muestras de aceite de oliva queda limitada a concentraciones superiores a 15 ng/mL, debido a las bajas recuperaciones obtenidas en la extracción. Además, la extracción de atrazina con agua a altas temperaturas (80 °C) puede conducir a la formación de hidroxiatrazina (323), lo que sería problemático, ya que se producirían pérdidas de analito.

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó metanol como disolvente más adecuado para la extracción directa de atrazina de aceite de oliva, y se procedió a mejorar el proceso de limpieza de los extractos y el rendimiento de la extracción, llevando a cabo el proceso a bajas temperaturas. Para ello, se mezcló 1 mL de aceite de oliva con 1 mL de metanol y se homogeneizó en vórtex durante 15 minutos; la mezcla se mantuvo durante 1 hora a -20 °C y a -80 °C. Posteriormente, se recogieron los extractos metanólicos y se acondicionaron por dilución 1/25 en tampón fosfato antes de su análisis mediante ELISA.

A -20 °C la congelación del aceite no era completa y fue necesario emplear tiempos mayores para la separación. Por otro lado, los resultados del ELISA obtenidos con los extractos realizados a -80 °C fueron más reproducibles, probablemente debido a que se consigue una mejor limpieza a esta temperatura. Utilizando este pretratamiento de muestra se obtuvo una recuperación media del 32%.

Los resultados obtenidos al ensayar diferentes tiempos de agitación (5, 10 y 15 min) -manteniendo constante la cantidad de metanol, el tiempo y la temperatura de congelación (1 mL, 1h, -80 °C)- fueron similares, seleccionándose 5 minutos como tiempo óptimo de agitación en vórtex.

También se probaron diferentes proporciones aceite/extractante; por ejemplo, con un volumen de aceite y cinco de metanol, se obtuvieron recuperaciones del 30%. Sin embargo, esta vía requiere utilizar el rotavapor para concentrar el extracto metanólico, por lo que el proceso se vuelve más lento y costoso.

Los resultados de recuperación obtenidos fueron similares, con independencia de la cantidad de muestra (0,5, 1 ó 2 mL) utilizada en la extracción, siempre que la proporción muestra/disolvente sea 1/1 (v/v).

Posteriormente, dado que la aplicación de ultrasonidos produce, en algunos casos, una notable mejora tanto en los tiempos de extracción como en la recuperación (324), se ensayó este sistema de extracción a diferentes tiempos. En todos los casos, las recuperaciones obtenidas fueron inferiores a las alcanzadas con agitación en vórtex.

Para realizar la determinación inmunoquímica de los extractos se ensayaron diferentes diluciones del mismo (desde 1/50 hasta 1/5). Se seleccionó una dilución 1/25 del extracto metanólico (1/50 en placa), puesto que se obtuvo una buena sensibilidad y un menor efecto matriz.

En resumen, los mejores resultados se obtienen por mezcla de volúmenes iguales de aceite y metanol (se eligió 0,5 mL por ser una cantidad pequeña que permite trabajar cómodamente), agitación en vórtex durante 5 min, separación de fases a -80°C durante una hora y dilución 1/25 del extracto, previamente a la determinación mediante ELISA.

4.8.2. Aplicación a la determinación de atrazina en aceite de oliva virgen extra mediante inmunoensayo

El efecto matriz es un aspecto a tener en cuenta, especialmente cuando se analizan muestras medioambientales por un método inmunoquímico, ya que se desconocen las posibles sustancias interferentes. Existen diferentes acercamientos para estudiar estos efectos, como utilizar una muestra exenta de analito (blanco), realizar una curva patrón en la matriz de interés y compararla con una curva patrón en tampón. Si no existe efecto matriz, no se observarán diferencias entre los parámetros de las dos curvas. Así pues, para evaluar el efecto matriz en muestras de aceite de oliva, se compararon diferentes calibraciones obtenidas con: patrones conteniendo un 2% de metanol en placa (*A*), patrones de extractos de aceite de oliva virgen extra (*B*, extractos dopados de aceite de oliva) y patrones de aceite de oliva virgen extra (*C*, aceites dopados con anterioridad a la extracción). La Figura 41 muestra las tres curvas patrón realizadas, apreciándose la existencia de efecto matriz a pesar de la dilución (1/25) del extracto. En consecuencia, para obtener valores de recuperación adecuados será necesario utilizar la curva patrón en aceite de oliva. El método presenta una IC_{50} de 3,5 ng/mL, un intervalo de trabajo entre 1,0 y 10,4 ng/mL, y un límite de detección de 0,7 ng/mL (concentraciones en placa, teniendo en cuenta una dilución 1/25 de los extractos y 1/2 en la placa). Esto supone una disminución de la sensibilidad de 1,8 veces con respecto a la curva obtenida con los extractos dopados (IC_{50} de 1,5 ng/mL, intervalo de trabajo entre 0,4 y 6,0 ng/mL

y LD de 0,2 ng/mL) y de 4,2 veces respecto a la curva patrón en metanol al 2% (IC_{50} de 0,8 ng/mL).

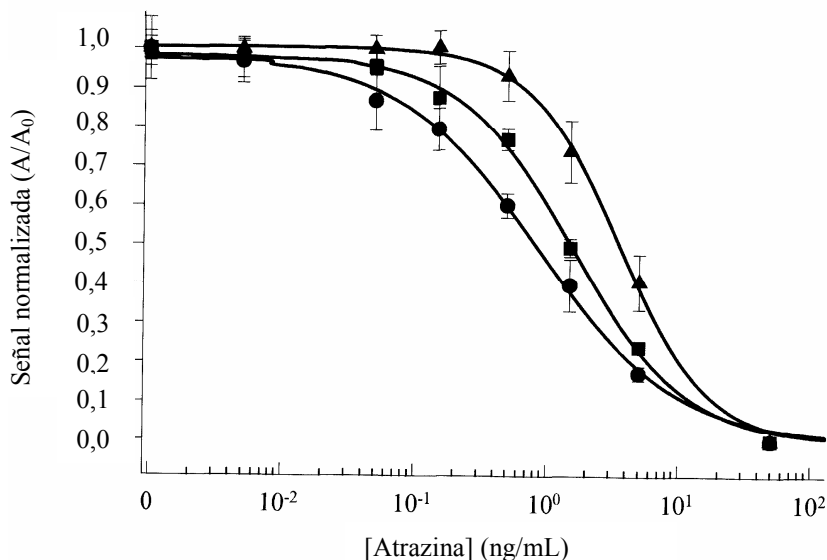


Figura 41. Curvas de calibrado de atrazina en metanol (2%) (A, ●), extracto dopado (B, ■) y aceite de oliva virgen extra (C, ▲). Cada punto representa la media y la desviación estándar de doce placas y tres réplicas de cada muestra

La Tabla 35 muestra los resultados de recuperación obtenidos al analizar una serie de muestras de aceite de oliva dopadas a diferentes niveles. Los resultados se obtuvieron extrapolando los valores en las tres curvas patrón comentadas anteriormente (A, B y C).

Hay que indicar que, pese al buen porcentaje de recuperación (92%) obtenido con la curva realizada en aceite (curva C), el procedimiento de extracción propuesto recupera aproximadamente un 52% de la atrazina contenida en la muestra. Este porcentaje se obtiene comparando los valores de IC_{50} de la curva en aceite de oliva y de la curva de los extractos dopados.

Las características analíticas de este método son comparables o ligeramente mejores a las descritas por Lentza-Rizos *et al.* (255), que detectan atrazina y organofosforados en aceite de oliva usando un paso de limpieza a baja temperatura (-20 °C) y análisis por cromatografía gaseosa (GC-NPD), con valores de recuperación del 83% y un límite de cuantificación de 50 ng/mL. Barrek *et al.* (217) determinaron 20 plaguicidas diferentes en aceite de oliva mediante GC-MS; tras extracción por cromatografía de exclusión molecular, el límite de detección para atrazina fue de 300 ng/mL. En comparación, el

4. Resultados

método aquí propuesto muestra un límite de detección inferior (33 ng/mL en aceite) y, además, es más simple que los anteriores.

Tabla 35. Determinación de atrazina mediante ELISA en aceite de oliva virgen extra dopado

<i>Muestra</i>	<i>Tipo de calibrado</i>	<i>R (%)</i>	
		<i>50 ng/mL</i>	<i>250 ng/mL</i>
A1	<i>A</i>	23	28
	<i>B</i>	42	46
	<i>C</i>	88	98
A2	<i>A</i>	10	13
	<i>B</i>	21	25
	<i>C</i>	75	60
A3	<i>A</i>	30	30
	<i>B</i>	68	49
	<i>C</i>	93	102
A4	<i>A</i>	22	27
	<i>B</i>	53	57
	<i>C</i>	92	98
A5	<i>A</i>	54	35
	<i>B</i>	88	77
	<i>C</i>	100	115
A6	<i>A</i>	41	28
	<i>B</i>	87	48
	<i>C</i>	112	98
A7	<i>A</i>	29	33
	<i>B</i>	41	48
	<i>C</i>	96	83
A8	<i>A</i>	8	12
	<i>B</i>	17	26
	<i>C</i>	72	64
A9	<i>A</i>	20	25
	<i>B</i>	44	43
	<i>C</i>	90	92
A10	<i>A</i>	31	32
	<i>B</i>	69	52
	<i>C</i>	109	107
A11	<i>A</i>	19	30
	<i>B</i>	36	50
	<i>C</i>	78	101

Recuperación media para cada tipo de calibrado
A: 26,4 B: 49,4 C: 92,0

A: curva en tampón con 2% metanol; B: curva en extracto dopado, C: curva en aceite de oliva

Al no existir un material de referencia, uno de los problemas encontrados fue disponer de un aceite de oliva virgen extra que fuera representativo. Se decidió utilizar

un aceite de oliva virgen extra comercial con un suministro regular y fiable, comprobando que cualquier aceite de oliva virgen proporcionaba una curva de calibrado similar. Para ello, aceites de oliva virgen de diferentes zonas productoras españolas fueron dopados, extraídos y analizados por ELISA -utilizando el protocolo previamente optimizado-, obteniendo las curvas mostradas en la Figura 42. Como puede apreciarse, no existen diferencias significativas entre las distintas curvas, pudiendo utilizar cualquier aceite de oliva virgen extra como matriz en el inmunoensayo.

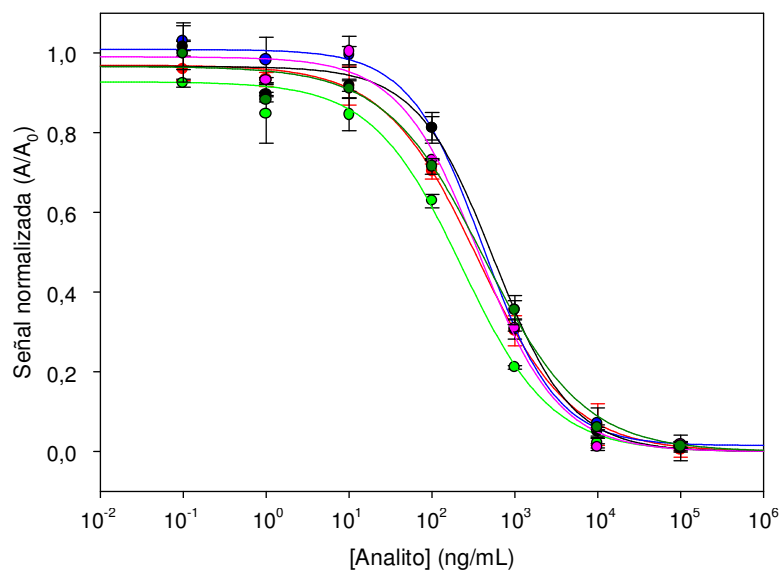


Figura 42. Curvas patrón de atrazina en diferentes aceites de oliva virgen extra

Para ensayar la selectividad del método, se prepararon curvas patrón en aceite de oliva para las triazinas más utilizadas. Los resultados obtenidos (Tabla 36) indican que sólo la propazina es un interferente a considerar -como recoge la bibliografía (325) para otras matrices-, pudiendo ser detectada a niveles de pocos ng/mL. Dado que la propazina se utiliza raramente en olivos, el ensayo puede considerarse específico para atrazina.

A continuación, dado que la reproducibilidad es uno de los parámetros analíticos más importantes, se efectuó un estudio dopando once submuestras de un mismo aceite de oliva, a dos niveles de atrazina (75 y 250 ng/mL). Las muestras se analizaron siguiendo la metodología propuesta, utilizando la curva patrón en aceite de oliva para la cuantificación. Como se aprecia en la Tabla 37, la reproducibilidad fue excelente, con valores medios de $85\% \pm 17\%$ y $87\% \pm 15\%$ para niveles de adición de 75 y 250 ng/mL, respectivamente. Estos resultados muestran la utilidad de la metodología para la detección rápida de residuos de atrazina en aceite de oliva.

Tabla 36. Selectividad del ELISA para algunas s-triazinas en aceite de oliva virgen extra

<i>Compuesto</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>	<i>RC (%)</i>
Atrazina	175	100
Ametrina	5.865	3,0
Cianazina	>176.000	<0,1
Dietilatrazina	4.268	4,1
Diisopropilatrazina	>176.000	<0,1
Irgarol 1051	>176.000	<0,1
Prometrina	3.143	5,6
Propazina	162	108
Simazina	11.000	1,6
Terbumetón	>176.000	<0,1
Terbutilazina	1.720	10,2
Terbutrina	>176.000	<0,1

Tabla 37. Estudio de la reproducibilidad del método de extracción y análisis

<i>Muestra</i>	<i>Nivel de dopaje (ng/mL)</i>				
	<i>0</i>	<i>75</i>		<i>250</i>	
	<i>Media</i>	<i>Media ± DS</i>	<i>R (%)</i>	<i>Media ± DS</i>	<i>R (%)</i>
S1	<LD	59 ± 8	79	252 ± 16	101
S2	<LD	66 ± 9	88	220 ± 17	88
S3	<LD	54 ± 7	72	195 ± 14	78
S4	<LD	76 ± 7	101	230 ± 18	92
S5	<LD	88 ± 8	117	280 ± 19	112
S6	<LD	63 ± 7	84	248 ± 16	99
S7	<LD	73 ± 5	97	220 ± 18	88
S8	<LD	56 ± 7	75	180 ± 19	72
S9	<LD	53 ± 8	71	192 ± 17	77
S10	<LD	59 ± 9	79	185 ± 19	74
S11	<LD	57 ± 5	76	193 ± 15	77
Media ± SD			85 ± 17		87 ± 15

Concentraciones en ng/mL, DS: desviación estándar relativa, R: recuperación, LD: límite de detección

Por último, se analizaron -en diferentes laboratorios y como muestras ciegas-, aceites de oliva de distintas zonas productoras españolas dopadas a diez niveles, tanto mediante ELISA como por el método de referencia (GC-MS). Las muestras se analizaron previamente al dopaje para comprobar la presencia de residuos de atrazina en estos aceites, encontrando que, en todos los casos, los niveles fueron inferiores al límite de detección de ambos métodos.

Como puede observarse en la Tabla 38, las recuperaciones medias obtenidas fueron elevadas (91,3% y 94,4% para ELISA y GC-MS, respectivamente), con desviaciones

bajas. Además, el procedimiento de extracción y análisis propuesto mostró buena correlación ($r=0,97$) con el método de referencia (Figura 43).

Tabla 38. Determinación de atrazina en aceite de oliva virgen extra dopado. ELISA vs GC-MS

Muestra	[Atrazina] adicionada (ng/mL)	[Atrazina] determinada (ng/mL)			
		ELISA		GC-MS	
		Media \pm DS	R (%)	Media \pm DS	R (%)
A1	0	<LD	-	<LD	-
A2	10	<LD	-	n.d.	-
A3	40	32 \pm 8	80	n.d.	-
A4	60	45 \pm 10	75	66 \pm 7	110
A5	80	71 \pm 16	89	73 \pm 8	91
A6	100	100 \pm 4	100	103 \pm 10	103
A7	120	100 \pm 13	83	92 \pm 8	77
A8	150	120 \pm 30	80	119 \pm 11	79
A9	200	210 \pm 20	105	166 \pm 13	83
A10	400	470 \pm 30	118	453 \pm 9	113
A11	500	460 \pm 40	92	498 \pm 12	99
Media			91,3		94,4

DS: desviación estándar relativa, LD: límite de detección, n.d: no detectada. R: recuperación

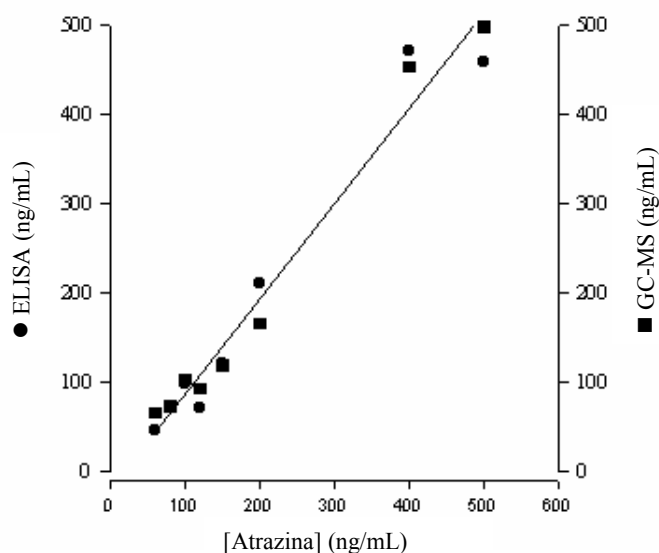


Figura 43. Comparación de los resultados obtenidos mediante ELISA y GC-MS

Así pues, la metodología desarrollada se ha aplicado satisfactoriamente a la determinación cuantitativa de residuos de atrazina en aceite de oliva virgen, sin necesidad de utilizar procedimientos de extracción y limpieza tediosos. Este método

emplea pequeñas cantidades de metanol y, dado que la mayoría de plaguicidas utilizados en el cultivo del olivar son muy solubles en este disolvente, el método propuesto podría ser aplicado a la determinación de un amplio abanico de residuos de plaguicidas.

La metodología desarrollada presenta un límite de detección de 33 ng/mL en aceite de oliva (equivalente a 40 ng/g), siendo adecuada para el cribado (*screening*) de muestras, dado que el LMR establecido para atrazina en aceite de oliva es de 100 ng/g. En consecuencia, dado que los métodos inmunoquímicos en formato ELISA presentan como ventajas su gran capacidad de trabajo y bajos costes de análisis, esta metodología podría ser de aplicación como método complementario en los programas de monitoreo de plaguicidas en aceites de oliva.

4.8.3. Optimización del proceso de extracción de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva virgen extra

Una vez desarrollada la metodología inmunoanalítica para aceite de oliva y estudiada la tolerancia a disolventes orgánicos de los inmunoensayos para diazinón, fentión, malatión y clorpirifos, se procedió a la optimización de un método de extracción rápido, efectivo y sencillo para estos analitos en aceite de oliva virgen, siguiendo el protocolo puesto a punto para atrazina.

Se ensayaron cinco disolventes orgánicos, con el fin de estudiar su comportamiento como extractantes genéricos de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva -acetonitrilo, dietilsulfóxido, 2-propanol, lactato de etilo y metanol-, así como diferentes mezclas acetona/acetonitrilo y hexano/acetonitrilo -previamente utilizadas en la bibliografía (255) para la extracción de residuos de plaguicidas en este tipo de matrices-.

En el proceso de extracción se evaluó la influencia de los siguientes parámetros: proporción muestra/disolvente, tiempo y método de homogeneización (ultrasonidos o vórtex), temperatura en la etapa de separación y limpieza de fases, y dilución del extracto (proporción disolvente/tampón).

Los pares conjugado de tapizado/suero utilizados para la determinación de los residuos de organofosforados fueron los usados en los ELISAs previamente desarrollados (ensayo A para diazinón y ensayo D para clorpirifos) para muestras acuosas.

Inicialmente, la evaluación del protocolo de extracción se realizó dopando alícuotas de un aceite de oliva a una concentración de 500 ng/mL de cada uno de los plaguicidas. Para ello, se mezclaron 0,5 mL de la muestra con 0,5 mL del disolvente, y se agitó durante 5 min en vórtex. Tras la separación de fases a temperatura ambiente, los extractos se diluyeron 1/6,25, 1/12,5, 1/25 y 1/50 (porcentaje de disolvente orgánico del 8%, 4%, 2% y 1%, respectivamente) con agua desionizada, previamente a su análisis mediante ELISA.

Los resultados indicaron que porcentajes de disolvente orgánico superiores al 8% afectaban notable y negativamente a las prestaciones de los inmunoensayos (sensibilidad, señal, etc.). Las peores recuperaciones (Tabla 39) se obtuvieron con 2-propanol. Como se ha comentado anteriormente, al diluir el extracto obtenido con lactato de etilo aparecía un precipitado que hacía prácticamente inviable el análisis; por otro lado, el 2-propanol disolvía parcialmente el aceite de oliva, por lo que estos disolventes, no pudieron ser utilizados.

Tabla 39. Recuperaciones de insecticidas organofosforados obtenidas en diferentes condiciones de extracción

<i>Condiciones de extracción^a</i>	<i>Recuperación (%)</i>			
	<i>Diazinón</i>	<i>Fentión</i>	<i>Malatión</i>	<i>Clorpirifos</i>
Metanol 1/1, 5 min vórtex, 20 °C	26	15	23	8
Acetonitrilo 1/1, 5 min vórtex, 20 °C	6	6	8	4
2-propanol 1/1, 5 min vórtex, 20 °C	9	10	19	6
Dimetilsulfóxido 1/1, 5 min vórtex, 20 °C	9	10	14	7
Metanol 2/1, 5 min vórtex, 20 °C	27	16	26	9
Metanol 1/2, 5 min vórtex, 20 °C	26	14	21	10
Metanol 1/1, 5 min vórtex, -80 °C	41	16	44	14
Hexano/acetonitrilo 1/5, 5 min vórtex, -80 °C	3	1	32	2
Acetona/acetonitrilo 1/5, 5 min vórtex, -80 °C	40	3	24	3
Metanol 1/1, 1 min vórtex, -80 °C	45	15	44	14
Metanol 1/1, 1 min baño de ultrasonidos, -80 °C	25	9	12	5

^aExtractante y proporción muestra/extractante (v/v), tiempo y procedimiento de agitación, temperatura de separación de fases

Las recuperaciones obtenidas con acetonitrilo y dimetilsulfóxido fueron aproximadamente del 6% y 10%, respectivamente, para una dilución 1/50 del extracto. Diluciones menores provocaron pérdidas de sensibilidad, por lo que estos disolventes no son apropiados para el análisis de los extractos mediante ELISA.

Los mejores valores de recuperación (18%) se obtuvieron al utilizar metanol a diferentes porcentajes, dependiendo del plaguicida a extraer -4% para diazinón, 8% para fentión y malatión, y 2% para clorpirifos-. Se seleccionó como óptimo 2% de metanol

para todos los ensayos, ya que en estas condiciones ninguno de los inmunoensayos mostraba pérdidas de señal ni de sensibilidad, y una misma dilución del extracto podía ser utilizada para la determinación simultánea de residuos de los cuatro organofosforados. Hay que comentar que estos valores de recuperación obtenidos son bajos debido al efecto matriz como se verá más adelante.

Cuando se ensayaron diferentes volúmenes de muestra (0,5, 1 y 2 mL) se obtuvieron recuperaciones similares en todos los casos, siempre que se mantuviera la proporción muestra/disolvente (v/v). No obstante, las recuperaciones fueron ligeramente superiores con proporciones 2/1 que 1/1, aunque fue necesario efectuar la extracción en dos etapas, lo que alarga el proceso. Esta mejoría no se observó al utilizar mayores cantidades de muestra (3/1 y 5/1).

Por otro lado, cantidades más elevadas de disolvente (proporciones muestra/disolvente 1/2, 1/3 y 1/5) hacían necesaria la eliminación del exceso del mismo en rotavapor y posterior reconstitución en tampón -conteniendo un 2% de metanol- para mantener la sensibilidad del ensayo. Dado que esta alternativa no resulta adecuada para análisis de rutina, se seleccionó la proporción 1/1 como óptima.

Con el fin de mejorar los rendimientos de la extracción, se ensayaron diferentes temperaturas (20, 4, -20, -30, -60 y -80 °C) en la etapa de separación de fases. Los rendimientos mejoraron para los cuatro analitos (recuperaciones medias del 41% para diazinón, 16% para fentión, 44% para malatión y 14% para clorpirifos) al realizar la separación de fases a -80 °C. Aunque los mayores rendimientos se obtuvieron a esta temperatura, las recuperaciones obtenidas a -20, -30 y -60 °C fueron también adecuadas. Sin embargo, a -20 °C, la fracción grasa del extracto no se congela completamente en una hora, por lo que se requiere un tiempo de separación más prolongado, aproximadamente 2 h.

Establecida la temperatura de trabajo, se ensayaron mezclas de acetona o hexano con acetonitrilo para ver si mejoraba el rendimiento de la extracción. Para ello, se adicionaron 5 mL de aceite de oliva a 25 mL de mezcla extractante (10 mL acetona o hexano y 15 mL acetonitrilo); tras agitar en vórtex y mantener una hora a -80 °C, se tomaron 10 mL de la fracción líquida, se concentró en rotavapor, y el residuo se redisolvió en 2 mL de metanol. En todos los casos, las recuperaciones (entre 1 y 40%) fueron inferiores a las obtenidas (entre 14 y 45%) utilizando como extractante metanol en proporción 1/1.

Posteriormente, se ensayaron diferentes tiempos de agitación (15 s, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min y 10 min) utilizando metanol como extractante, observando que tiempos superiores a 2 min proporcionaban las peores recuperaciones para los cuatro plaguicidas estudiados. Los tiempos de agitación más eficientes fueron 15 s para fentión, 30 s para diazinón y malatión, y 1 min para clorpirifos, seleccionando 1 min como tiempo único de agitación para los cuatro analitos.

Finalmente, al comparar la eficacia del sistema de extracción -agitación en vórtex frente a baño de ultrasonidos- se comprobó que las recuperaciones obtenidas al realizar la extracción en baño de ultrasonidos, durante 1, 2 y 3 min, fueron inferiores (25% para diazinón, 9% para fentión, 12% para malatión y 5% para clorpirifos) a las alcanzadas al utilizar vórtex.

Así pues, el protocolo de extracción finalmente optimizado consiste en mezclar 0,5 mL de aceite de oliva con un volumen igual de metanol y agitar en vórtex durante 1 min. Tras enfriar la mezcla durante una hora a -80 °C, se recoge el extracto metanólico y se diluye 1/25 (v/v) en tampón fosfato previamente al análisis inmunoquímico. Utilizando este procedimiento, se logra la extracción simultánea de los cuatro organofosforados con recuperaciones medias de 45% para diazinón, 15% para fentión, 44% para malatión y 14% para clorpirifos).

4.8.4. Aplicación de la metodología desarrollada a la determinación de organofosforados en aceite de oliva virgen extra

Durante el desarrollo del proceso de extracción, se observó la co-extracción de diferentes compuestos, principalmente ácidos grasos, que dificultaban la determinación de los organofosforados mediante inmunoensayo, debido al efecto matriz.

Para evaluar este efecto, se obtuvieron diferentes curvas de calibrado: con patrones del plaguicida disuelto en metanol al 2% (*A*), con extractos de aceite libre de organofosforados dopados con estos insecticidas (*B*), y con los extractos obtenidos tras dopar el aceite (*C*).

Como se aprecia en la Figura 44, los valores de IC_{50} obtenidos de las curvas *B* y *C* son superiores a los de las curvas preparadas con el plaguicida disuelto en metanol al 2% (*A*) (recuperaciones del 106%, 31% y 25% utilizando las curvas patrón *C*, *B* y *A*, respectivamente.). Esto demuestra la existencia de efecto matriz y supone una reducción en la sensibilidad del ensayo. A pesar de ello, al realizar la curva patrón en matriz (*C*) se

4. Resultados

obtienen buenas recuperaciones, y con sensibilidad suficiente para determinar residuos de los analitos objeto de estudio por debajo de los límites máximos establecidos.

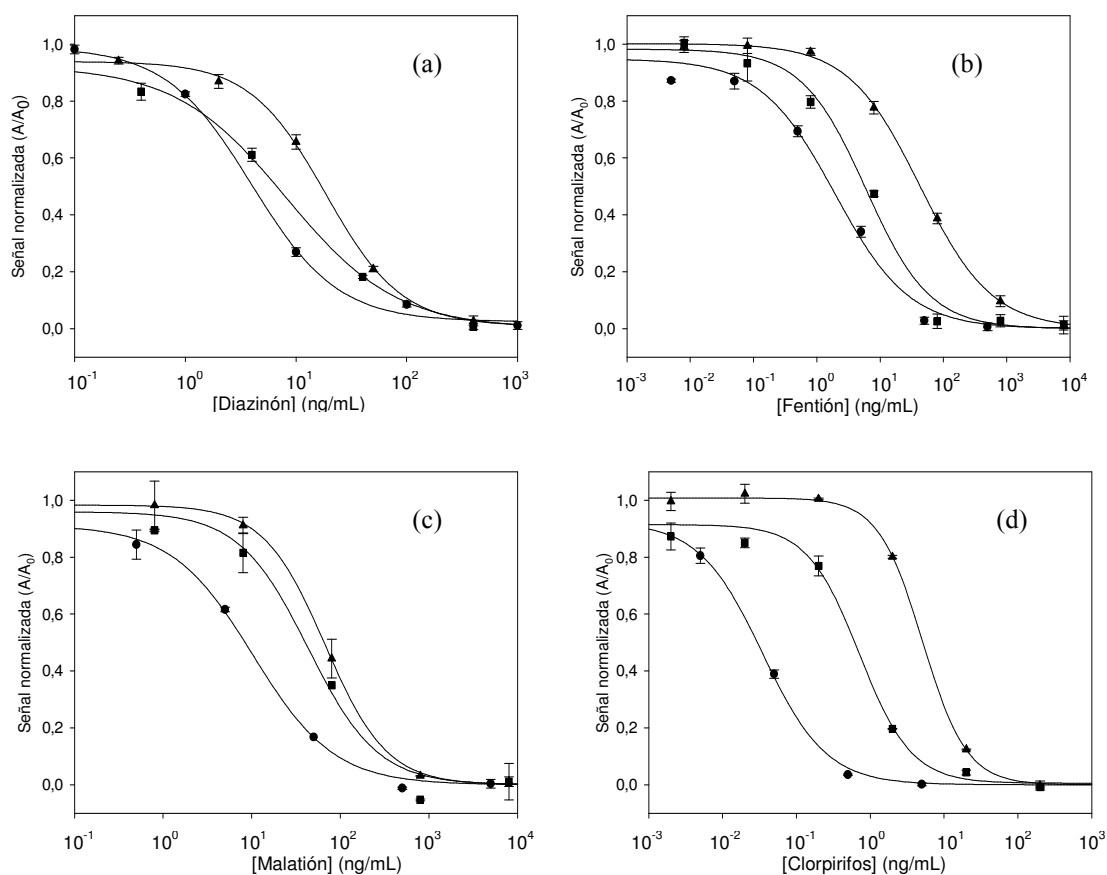


Figura 44. Curvas de calibrado en diferentes medios -A (●), B (■) y C (▲)- para diazinón (a), fentión (b), malatión (c) y clorpirifos (d)

En la Tabla 40 se muestran los parámetros analíticos de los inmunoensayos desarrollados para los cuatro organofosforados en aceite de oliva utilizando curvas patrón C (Figura 45). Tanto la sensibilidad como el intervalo de trabajo son similares, permitiendo detectar fentión, malatión y clorpirifos a niveles inferiores a 20 ng/mL, y diazinón a 46 ng/mL. Esta metodología es menos sensible que la descrita por Lentz-Rizos *et al.* (255) que, mediante cromatografía (GC-NPD), determina estos compuestos organofosforados a concentraciones del orden de 5 µg/kg. Tsoutsi y Albanis (233) alcanzan un límite de detección de 5 ng/mL para diazinón y fentión, usando microextracción en fase sólida seguida de cromatografía gaseosa. Es de destacar que los dos métodos cromatográficos utilizan etapas de preconcentración (de hasta 20 veces), que no son necesarias cuando la determinación se realiza mediante inmunoensayo. Recientemente, Tsoutsi *et al.* (249) han usado microextracción en fase sólida en espacio

de cabeza (HS-SPME, *headspace solid-phase microextraction*) para el análisis de aceite de oliva mediante GC-FTD. Este método permite la extracción y concentración simultánea de los organofosforados, con límites de detección de 6 µg/kg para diazinón y fentión, y 8 µg/kg para malatión.

Tabla 40. Parámetros analíticos de los ELISAs para residuos de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva virgen extra

<i>Compuesto</i>	<i>LD (ng/mL)</i>	<i>RD (ng/mL)</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>
Diazinón	46	137-3398	740
Fentión	10	32-1242	205
Malatión	16	67-1596	419
Clorpirifos	17	52-1953	297

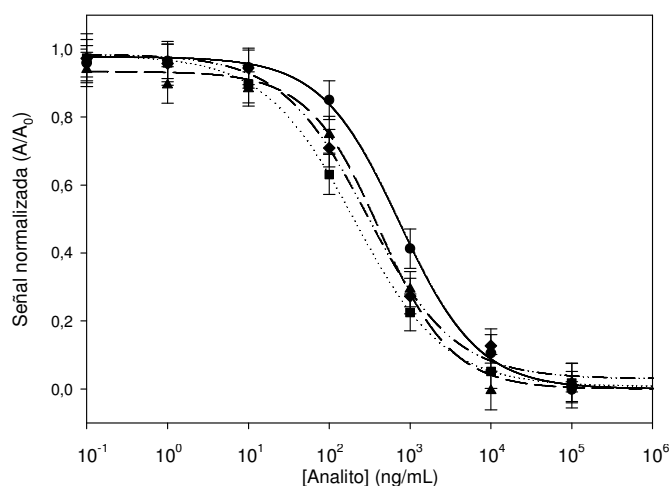


Figura 45. Curvas de calibrado para diazinón (●), fentión (■), malatión (▲) y clorpirifos (◆) en aceite de oliva virgen extra

4.8.5. Cuantificación simultánea de residuos de organofosforados en aceite de oliva virgen extra

Para comprobar si pueden analizarse simultáneamente residuos de diferentes organofosforados en aceite de oliva se estudió la selectividad de cada uno de los ELISAs desarrollados en esta matriz frente a un conjunto de estos compuestos - especialmente insecticidas, aunque se han incluido herbicidas como glifosato cuya aplicación está permitida en la época de recolección-.

4. Resultados

Como se observa en la Tabla 41, no existen interferencias entre los cuatro organofosforados objeto de estudio -diazinón, fentión, malatión y clorpirifos-, lo que indica que es posible determinar estos compuestos en una misma muestra y extracto. Este hecho es de gran valor para análisis de rutina, especialmente cuando se requiere analizar un gran número de muestras.

Tabla 41. Selectividad (reactividad cruzada, %) para diferentes organofosforados contenidos en aceite de oliva virgen extra

<i>Compuesto</i>	<i>Suero</i>	<i>Diazinón</i>	<i>Fentión</i>	<i>Malatión</i>	<i>Clorpirifos</i>
Diazinón	100	2	<0,2	0,2	
Fentión	<0,2	100	<0,2	<0,2	
Malatión	<0,2	4	100	<0,2	
Clorpirifos	<0,2	1	<0,2	100	
Acefato	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Azinfos-metil	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Bromofos-etil	<0,2	<0,2	<0,2	6	
Bromofos-metil	<0,2	1	<0,2	19	
Clorpirifos-metil	<0,2	<0,2	<0,2	12	
Clorpirifos-oxon	<0,2	<0,2	<0,2	99	
Diazinón hidroximetabolito	30	<0,2	<0,2	0,4	
Diclofentión	<0,2	<0,2	<0,2	1	
Diclorvos	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Fenclorfos	<0,2	<0,2	<0,2	25	
Fenitrotión	<0,2	3	<0,2	0,2	
Fentión-sulfóxido	<0,2	1	<0,2	<0,2	
Glifosato	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Malaoxon	<0,2	<0,2	5	<0,2	
Metamidofos	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
4-(Metiltio)- <i>m</i> -cresol	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Ometoato	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Paratión-metil	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Pirimifos-etil	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Pirimifos-metil	6	<0,2	<0,2	<0,2	
TCP	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Tetraclorvinfos	<0,2	<0,2	<0,2	0,2	
Tiometón	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Triclorfón	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	
Triclopir	<0,2	<0,2	<0,2	0,4	
Vamidotión	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	

Por otro lado, ninguno de los 29 compuestos ensayados fueron interferentes para fentión y malatión, ya que la mayoría de los valores de reactividad cruzada fueron <0,2%. En general, el mayor grado de interferencia se encontró para metabolitos de

diazinón (30% para diazinón hidroximetabolito) y clorpirifos (99% para clorpirifos-oxon), los cuales también son tóxicos.

Estos resultados son similares a los encontrados anteriormente para muestras de agua, excepto los obtenidos para 2-isopropil-6-metil-4-pirimidinol (diazinón hidroximetabolito) (6 veces mayor), clorpirifos-oxon (2 veces mayor) y clorpirifos-metil (4 veces menor) -presente este último en muchas formulaciones comerciales junto a clorpirifos-. Esto puede ser debido a las diferentes recuperaciones alcanzadas en el proceso de extracción del aceite de oliva.

La bibliografía recoge la presencia de algunos metabolitos de organofosforados como malaoxon y fentión sulfóxido (222) en muestras de aceite de oliva, pero no se han encontrado datos sobre la presencia de diazinón hidroximetabolito y clorpirifos-oxon.

Para comprobar el potencial analítico de la metodología desarrollada, se extrajeron y analizaron mediante inmunensayo diferentes muestras de aceite de oliva virgen extra (libres de organofosforados) dopadas con los cuatro analitos a distintos niveles. La curva patrón se obtuvo usando un aceite de oliva libre de organofosforados, que se dopó y extrajo siguiendo la metodología puesta a punto para los ensayos de un solo analito (sección 4.8.3.). La obtención de un único extracto por muestra y la aplicación del ELISA para cada organofosforado, proporcionó valores de recuperación que oscilaron entre 88% y 120%, como se muestra en la Tabla 42.

Tabla 42. Extracción simultánea de organofosforados en aceite de oliva virgen extra. Resultados de recuperación

[Adicionada]	Diazinón		Fentión		Malatión		Clorpirifos	
	[Determinada]	R	[Determinada]	R	[Determinada]	R	[Determinada]	R
100	120 ± 13	120	112 ± 16	112	119 ± 7	119	98 ± 4	98
200	202 ± 20	101	211 ± 13	106	231 ± 21	115	208 ± 19	104
500	451 ± 20	90	599 ± 36	120	485 ± 12	97	485 ± 32	97
800	850 ± 10	106	780 ± 63	96	854 ± 117	107	704 ± 16	88
1000	1184 ± 170	118	1074 ± 67	107	1162 ± 57	116	1027 ± 38	103
R Media		107		108		111		98

Concentración expresada en ng/mL ± desviación estándar relativa (n=3), R: Recuperación, expresada en %

Para comprobar la reproducibilidad de la metodología *inter-día*, se utilizó un mismo aceite de oliva, dopado con los cuatro analitos, que fue analizado en cuatro días diferentes. La Tabla 43 muestra que los resultados son aceptables, con coeficientes de variación *inter-día* inferiores al 15%.

4. Resultados

Tabla 43. Determinación simultánea de organofosforados en aceite de oliva virgen extra mediante ELISA. Ensayos *inter-día*

	[Diazinón]	R	[Fentión]	R	[Malatión]	R	[Clorpirifos]	R
Día 1	215 ± 33	108	207 ± 19	103	186 ± 11	93	208 ± 9	104
Día 2	172 ± 23	86	238 ± 5	119	226 ± 31	113	225 ± 20	113
Día 3	182 ± 22	91	239 ± 35	119	213 ± 22	106	176 ± 5	88
Día 4	181 ± 25	90	195 ± 28	97	209 ± 11	105	232 ± 25	116
R Media		94		110		104		105

Nivel de dopaje: 200 ng de organofosforado/mL, concentración expresada en ng/mL ± desviación estándar relativa (n=3), R: Recuperación, expresada en %

Por otro lado, se realizaron calibrados, para cada organofosforado, utilizando como matriz seis aceites de oliva virgen extra comerciales producidos en diferentes zonas de España. Como se muestra en la Figura 46, al igual que ocurría para atrazina, las diferencias entre las distintas curvas son mínimas, lo que indica que el calibrado puede realizarse independientemente del aceite utilizado para ello, sin que se observe influencia debida a la matriz. Este interesante resultado podría justificarse debido a que el aceite de oliva virgen extra es un producto mínimamente manipulado, con pequeñísimas variaciones de sus componentes mayoritarios, que podrían ser los determinantes en el comportamiento de esta matriz. Por otro lado, a la vista de los resultados, el procedimiento de extracción se muestra muy efectivo, proporcionando extractos libres de interferencias.

4.8.6. Análisis de aceites de oliva. Comparación con los métodos de referencia

Una vez puesta a punto la metodología de extracción y determinación de residuos de organofosforados en aceite de oliva virgen extra, se procedió a su aplicación en muestras representativas. En primer lugar, se compararon los resultados obtenidos mediante inmunoensayo con los dados por GC-MS. Para ello, se analizaron un conjunto de aceites de oliva virgen extra dopados con los cuatro organofosforados a distintos niveles; cada técnica utilizó su propio método de extracción. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 44. Los porcentajes de recuperación medios oscilan entre 103% y 122% para ELISA, y entre 88% y 101% para GC-MS. Además, las recuperaciones alcanzadas en inmunoensayo son similares a las recogidas en la bibliografía para los métodos cromatográficos (entre 71% al 115%) (208, 215, 225). La buena correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos demuestra que la metodología inmunoquímica desarrollada es una herramienta muy útil para la determinación rápida e *in situ* de residuos de organofosforados en aceite de oliva.

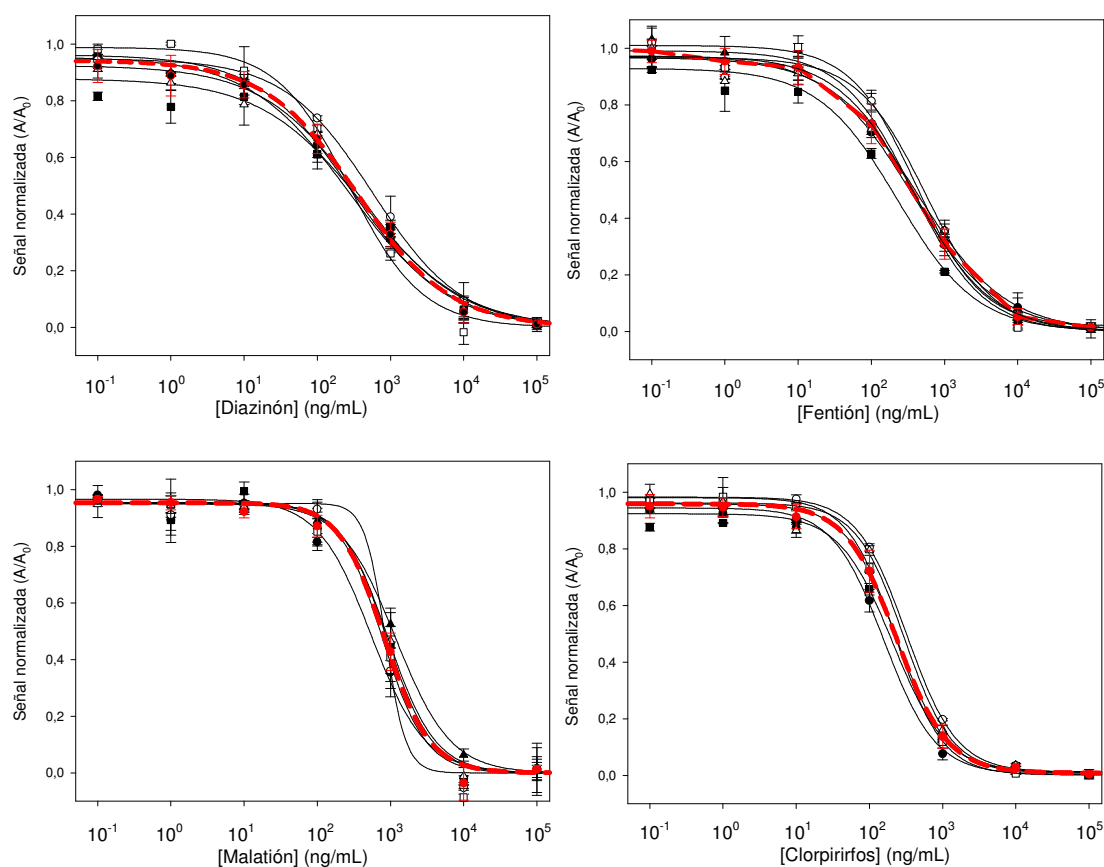


Figura 46. Curvas de calibrado para diazinón, fentión, malatión y clorpirifos obtenidas en muestras de aceites de oliva comerciales. En rojo se muestra la curva media de los diferentes aceites de oliva.

Tabla 44. Comparación de resultados de recuperación obtenidos en la determinación de organofosforados en aceite de oliva virgen extra dopado a diferentes niveles. ELISA vs GC-MS

	<i>ELISA</i>				<i>GC-MS</i>			
	D	F	M	C	D	F	M	C
S1	105	118	112	112	105	77	107	105
S2	101	130	110	98	86	87	78	95
S3	104	121	108	114	96	77	80	104
S4	118	113	110	106	83	114	86	102
S5	94	129	112	114	101	88	92	92
S6	96	118	110	99	113	87	121	106
Media	103	122	110	108	97	88	94	101

Recuperaciones en porcentaje. D: diazinón; F: fentión; M: malatión; C: clorpirifos. S1: 200 ng/mL de A, B, C y D; S2: 500 ng/mL de A, B, C y D; S3: 1000 ng/mL de A, B, C y D; S4: 200 ng/mL de B y D, 500 ng/mL de C y 1000 ng/mL de A; S5: 200 ng/mL de C, 500 ng/mL de A y B y 1000 ng/mL de D; S6: 200 ng/mL de A, 500 ng/mL de D y 1000 ng/mL de B y C

Por último, se llevó a cabo un estudio sobre la presencia de los cuatro organofosforados en cuarenta y cinco muestras de aceite de oliva virgen extra (ver Tabla 45), extraídas y analizadas utilizando el protocolo desarrollado en la presente Tesis. Paralelamente, las mismas muestras -adquiridas en el comercio, procedentes directamente de almazaras o cedidas por el Laboratorio Agroalimentario de la Generalitat Valenciana, Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación- fueron extraídas en fase dispersa según el método desarrollado en el Laboratorio Agroalimentario de la Generalitat Valenciana y analizadas por cromatografía, siguiendo un método multiresiduo GC-MS/MS, validado por el Dr. M. Gamón (datos no publicados).

Hay que destacar que, en ningún caso se detectaron residuos de los cuatro organofosforados estudiados, ya que los resultados fueron inferiores al límite de detección de ambos métodos.

4.8.7. Determinación inmunoquímica de residuos de plaguicidas organofosforados en otros aceites vegetales comestibles

Con el fin de estimar si la metodología de extracción y análisis de residuos de organofosforados desarrollada para aceite de oliva podía aplicarse a otros aceites vegetales, se seleccionaron muestras representativas de los aceites comestibles de mayor consumo: girasol, maíz, soja, y orujo de oliva.

Dado que todos estos aceites se obtienen mediante extracción con disolventes, cabe suponer que tengan un comportamiento diferente al de oliva virgen extra. Sin embargo, los resultados indican que la metodología presenta buenos resultados siempre y cuando se utilice como matriz de calibración un aceite del mismo tipo que la muestra a analizar. La Figura 47 muestra las curvas patrón medias obtenidas para cada uno de los plaguicidas y aceites vegetales. Se observa que el análisis de aceite de girasol requiere una curva de calibrado obtenida en aceite de girasol, y así para cada tipo de aceite vegetal.

Los resultados conseguidos permiten ver que los aceites vegetales refinados proporcionan curvas de calibrado con valores de IC_{50} inferiores a los del mismo tipo de aceite obtenido mediante prensado (virgen extra). Además, se ha comprobado que muestras de aceite procedentes del mismo vegetal presentan un comportamiento similar, obteniéndose curvas patrón solapadas.

Tabla 45. Procedencia de las muestras de aceite de oliva virgen extra y refinado

<i>Muestra</i>	<i>Aceite/Procedencia</i>
1	Mar de Olivas. Jaén
2	Carbonell. Córdoba
3	La Masía Sumun. Sevilla
4	Sagres. Portugal
5	Oli d'Or. Viver (Castellón)
6	Borges variedad picual. Jaén
7	Hacendado. España
8	Cooperativa de Jaén
9	Cooperativa de Córdoba
10	Carbonell hojiblanca. Córdoba
11	Aceites Borges "El coupage de Ferrán Adriá". Reus (Tarragona)
12	Cooperativa agrícola de Cheste (Valencia)
13	Cooperativa Agrícola Sant Bertomeu. La Torre d'En Besora (Castellón)
14	Olisone. España.
15	Monte Olivos. Cooperativa La Purísima Puentegeñil. Córdoba
16	El Corte Inglés selección. Sevilla
17	Capricho andaluz. Cabra (Córdoba)
18	Maeva de Torres Morente (Granada)
19	Ybarra. Dos Hermanas (Sevilla)
20*	La Colmena. Jaén
21*	Las Cuarenta. España
22*	Auchan. España
23	Cooperativa de Altura (Castellón)
24*	Consum. España
25	Carrefour. España
26	Sierra Negrete. Cooperativa agrícola de Utiel (Valencia)
27	Cooperativa de La Torre de l'Espanyol (Tarragona)
28	Cooperativa de Camuñas (Toledo)
29	La laguna de Fuentepiedra. Málaga
30	Carrioliva. Quintanar de la Orden (Toledo)
31	La Española. Sevilla
32*	La Masía. Sevilla
33*	Koipe. España
34-45	Muestras del Laboratorio Agroalimentario de la Generalitat Valenciana. Almazaras de cooperativas valencianas.

*Mezcla comercial de aceite de oliva virgen extra con aceite de oliva refinado.

4. Resultados

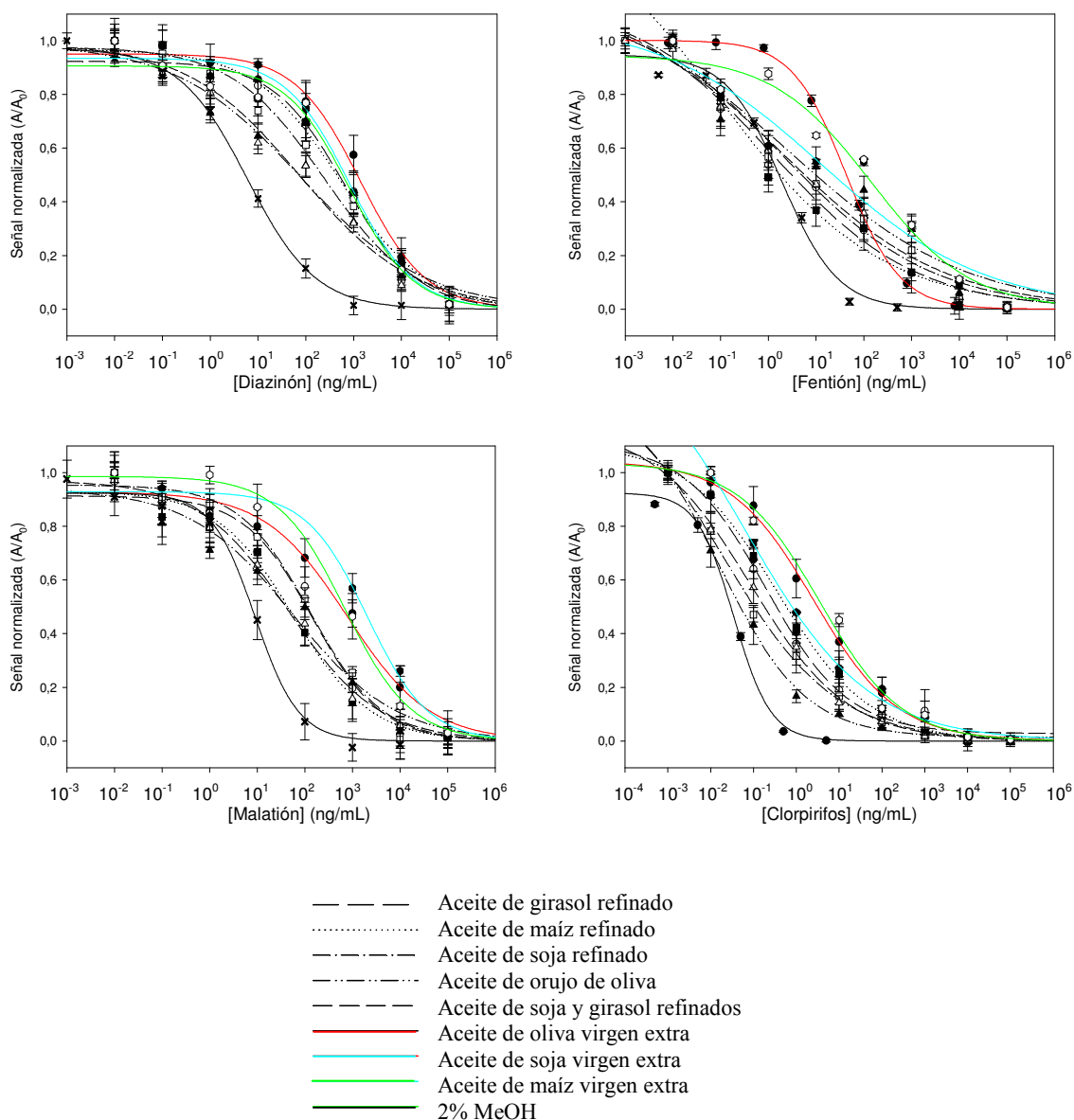


Figura 47. Curvas patrón para los organofosforados estudiados en diferentes tipos de aceite comestible

4.9. Desarrollo de inmunoensayos rápidos en formato ELIFA para la determinación de residuos de organofosforados en aceite de oliva virgen extra

Como se ha comentado en la introducción (sección 1.3.4.1.), entre los ensayos denominados de barrido se encuentran los inmunoensayos en membrana. En este apartado, la inmunofiltración es un formato de ensayo atractivo -más simple y rápido que el efectuado en placa ELISA- y una buena alternativa para la realización de inmunoensayos.

La técnica ELIFA (*Enzyme-linked Immunoflow Assay*) (Figura 48) permite la determinación de plaguicidas por filtración en membrana de grandes volúmenes de muestra, de modo que el analito es concentrado en una pequeña superficie (equivalente a un pocillo de placa ELISA). Además, esta técnica permite disminuir el tiempo de análisis al reducir a cinco minutos (duración del proceso de filtración) la etapa de incubación (1 h, en placa).

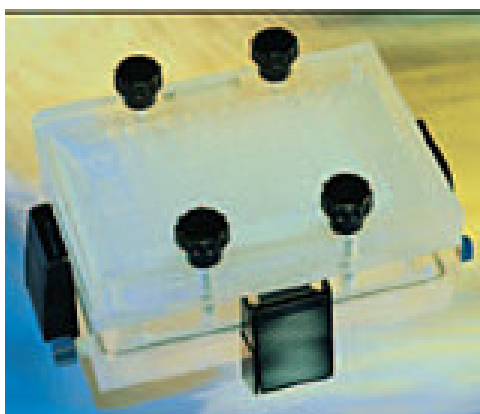


Figura 48. Imagen de un sistema ELIFA

Partiendo de la experiencia previa del grupo de investigación (326), se puso a punto un método ELIFA de determinación de residuos de diazinón, fentiión, malatión y clorpirifos en aceite de oliva, compatible con la metodología de extracción previamente desarrollada.

Con el fin de establecer el formato más favorable se compararon los resultados de los ensayos directos (tapizado con el anticuerpo específico) e indirectos (tapizado con un conjugado proteína-hapteno) como se hizo en los ensayos ELISA. Los resultados obtenidos para los cuatro sistemas mostraron que, en ningún caso, había competición en formato directo, mientras que sí la había en indirecto. Por ello, se procedió a la puesta a punto de este formato para todos los analitos.

Para ello, y con el objetivo de seleccionar las concentraciones óptimas de tapizado, agente bloqueante y suero para cada uno de los cuatro sistemas, se utilizó una membrana comercial Immobilon-P (fluoruro de polivinilideno), HRP como enzima marcadora y TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) como sustrato enzimático.

Dado que el área superficial de adsorción de las membranas es entre 100 y 1.000 veces superior a la del poliestireno (327), las uniones inespecíficas son mucho más intensas en inmunoensayos en formato en membrana que en placa.

Así pues, el primer problema a resolver fue el bloqueo de la membrana para cada uno de los inmunoensayos, ya que el ensayo para malatión utiliza un suero obtenido con un inmunógeno preparado con KLH, mientras que el resto de los sueros (diazinón, fentión y clorpirifos) se obtuvieron con inmunógenos preparados con BSA. El intento de bloquear la membrana con OVA disuelta en tampón PBS-T, presentó problemas derivados de la mala filtración de esta proteína en el sistema ELIFA a concentraciones iguales o superiores al 1% (p/v). A concentraciones inferiores (0,5%, 0,3% y 0,1%), el bloqueo de la membrana no fue satisfactorio y las proteínas del suero eran retenidas inespecíficamente en la membrana. Los resultados obtenidos al bloquear la membrana con otras proteínas fueron:

-BSA al 1%. Proporcionó buenos resultados para el sistema malatión, seleccionándose como agente bloqueante para este analito.

-Caseína. Presentó un comportamiento similar a la OVA (problemas de filtración a concentraciones iguales o superiores al 1%, y bloqueo ineficiente de la membrana a concentraciones inferiores).

-Gelatina de pescado. Permitió la filtración hasta concentraciones de un 3%; el bloqueo de la membrana fue adecuado, sin observarse señales inespecíficas de las proteínas del suero ni del anticuerpo secundario a concentraciones del orden de 0,1%. En consecuencia, se seleccionó esta última proteína como agente bloqueante para los sistemas diazinón, fentión y clorpirifos. Sin embargo, el bloqueo con gelatina no fue efectivo para el sistema malatión, ya que daba fondos más altos que cuando se utilizaba BSA.

Aunque existen otros agentes bloqueantes de amplio uso como las albúminas del suero de otras especies no bovinas -suero humano, caballo, etc.-, estas proteínas son caras, no justificándose su uso cuando hay que utilizarlas en cantidades importantes. Por todo ello, se optó por usar gelatina como agente bloqueante, excepto para malatión, para el que la BSA era más efectiva.

La Tabla 46 muestra las condiciones de tapizado, bloqueo y suero seleccionadas para llevar a cabo los ensayos de inmunofiltración.

En todos los casos (ver protocolo en sección 3.5.) el tapizado se realizó en tampón carbonato 50 mM (100 μ L/pocillo) y el bloqueo con tampón PBS-T 10 mM (100 μ L/pocillo); el suero fue adicionado junto con la muestra en tampón PBS-T (100 μ L/pocillo; 50 μ L de suero y 50 μ L de muestra) y se utilizó Ab cabra anticonejo-HRP a una dilución 1/4.000 como anticuerpo secundario.

Tabla 46. Condiciones de los ensayos para organofosforados mediante inmunofiltración

<i>Analito</i>	<i>Tapizado</i>	<i>Bloqueo</i>	<i>Suero</i>
Diazinón	OVA-D6 5 mg/L	0,1% gelatina	BSA-D6-I (1/8.000)
Fentión	OVA-F1 5 mg/L	0,1% gelatina	BSA-F7-I (1/18.000)
Malatión	BSA-M2 0,5 mg/L	1% BSA	KLH-M5-I (1/4.000)
Clorpirifos	OVA-C5 0,5 mg/L	0,1% gelatina	BSA-C2-II (1/12.000)

Utilizando estas condiciones de trabajo, que proporcionaban señales a simple vista, se ensayó la dilución óptima del extracto metanólico de aceite de oliva, tal y como se realizó en los inmunoensayos en placa. Los mejores resultados se obtuvieron con un 2% de metanol en la mezcla suero/muestra, con valores de IC₅₀ de 2.431, 1.225, 1.973 y 932 ng/mL para diazinón, fentión, malatión y clorpirifos, respectivamente. Para obtener estos valores, las membranas fueron leídas con un escáner documental y las imágenes procesadas para transformarlas en valores de intensidad de señal.

Con objeto de mejorar la sensibilidad, se estudió la posibilidad de llevar a cabo la preconcentración del analito en la propia membrana. Para ello, utilizando el mismo protocolo de ensayo, se probaron diferentes volúmenes de muestra, aumentando la cantidad de analito añadida sin modificar la de suero. Se ensayaron volúmenes de 100, 200, 500, 1.000, 3.000 y 5.000 µL de mezcla extracto diluido-suero, lo que supone 50, 150, 450, 950, 1.950 y 4.950 µL de extracto diluido mezclado con 50 µL de suero (a la dilución establecida para cada analito). La Tabla 47 muestra los valores de IC₅₀ obtenidos para cada compuesto extraído de aceite de oliva. Como puede apreciarse, no se observó competición al usar volúmenes superiores a 1 mL en ningún caso. Así pues, se seleccionó como óptimo un volumen de mezcla suero/muestra de 500 µL; es de destacar que la inmunofiltración en membrana hizo posible la preconcentración de los analitos, mejorando la sensibilidad de los ensayos (IC₅₀ de 22, 4, 10 y 0,4 ng/mL para diazinón, fentión, malatión y clorpirifos, respectivamente).

Tabla 47. IC₅₀ obtenidas mediante inmunofiltración para diferentes volúmenes de muestra

<i>Analito</i>	<i>Volumen (µL)</i>			
	<i>100</i>	<i>200</i>	<i>500</i>	<i>1.000</i>
Diazinón	2.431	356	22	242
Fentión	1.225	193	4	48
Malatión	1.973	298	10	136
Clorpirifos	932	271	0,4	2,2

Valores de IC₅₀ en ng/mL

Para estudiar la influencia del sistema de marcaje sobre la sensibilidad del ensayo, se utilizaron distintos marcadores (HRP, AP y oro coloidal) conjugados a anticuerpo secundario cabra anticonejo, y como sustratos TMB, BCIP, CDP-Star y nitrato de plata/hidroquinona.

La utilización de partículas de oro como marcador ha tenido un gran desarrollo en los últimos años. Las partículas de oro pueden fabricarse con diferentes tamaños, se adsorben sobre todo tipo de proteínas formando complejos muy estables, y permiten la amplificación de la señal -haciéndola visible sin tener que recurrir a microscopía electrónica- utilizando plata (I) como disolución de revelado. Sin embargo, al utilizar un Ab secundario marcado con oro y nitrato de plata/hidroquinona como revelador, no se obtuvieron curvas de competición; el precipitado de plata se producía en todas las zonas, incluso a concentraciones muy altas de analito, probablemente debido a la presencia de materia orgánica dispuesta en una membrana inerte con una gran superficie activa.

Dado que las ventajas de la quimioluminiscencia en los inmunoensayos incluyen una mayor sensibilidad y velocidad (señal generada en pocos segundos y, en algunos casos, estable por varias horas), se utilizó un anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina (AP) y como revelador el sustrato quimiluminiscente CDP-Star. En este caso, las señales eran muy intensas pero la reproducibilidad de las mismas era muy baja, por lo que se prescindió de este revelador.

Los mejores resultados se consiguieron al utilizar un anticuerpo secundario secundario marcado con peroxidasa o con fosfatasa alcalina, utilizando como sustratos TMB y BCIP, respectivamente. Como se aprecia en la Figura 49, la sensibilidad fue similar en ambos casos, seleccionando HRP como enzima marcadora con el fin de mantener el mismo trazador que en los inmunoensayos en placa.

En la Figura 50 se muestran las curvas patrón obtenidas mediante ELIFA, para los cuatro organofosforados estudiados en aceite de oliva.

Los parámetros analíticos de estos ensayos, resumidos en la Tabla 48, indican que la metodología basada en inmunofiltración es apta para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva por debajo de los límites máximos legislados, y más sensible que los ensayos en placa ELISA (ver Tabla 40).

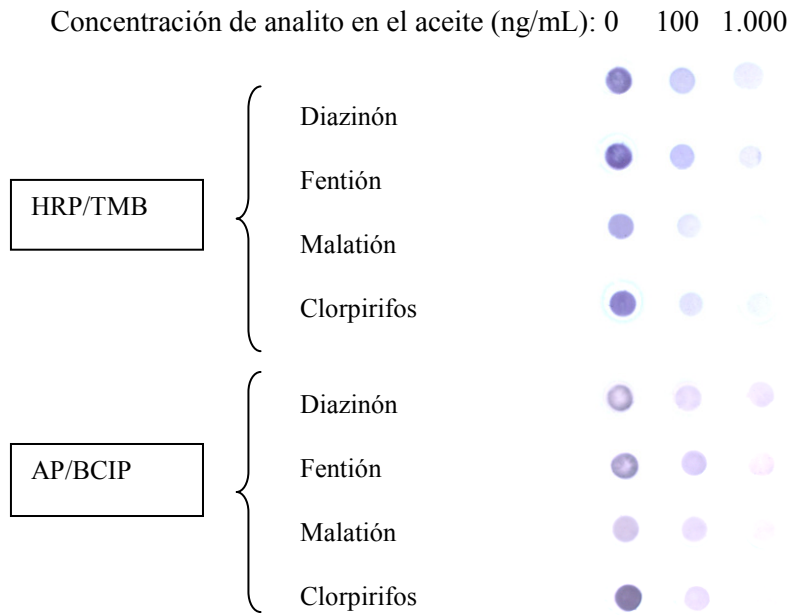


Figura 49. Imagen de la determinación de organofosforados mediante inmunofiltración utilizando dos sistemas enzima/substrato

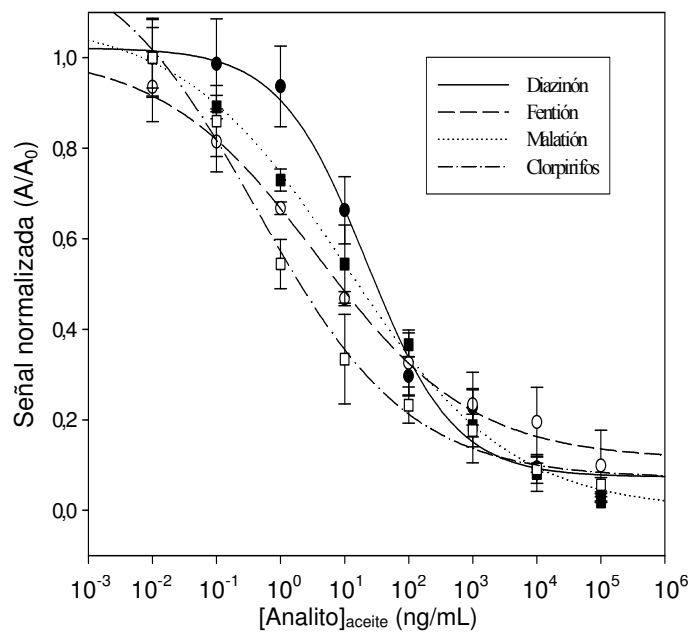


Figura 50. Curvas patrón obtenidas mediante ELISA para los cuatro organofosforados extraídos de aceite de oliva virgen extra

Tabla 48. Parámetros analíticos de los inmunoensayos en membrana para los cuatro organofosforados*

<i>Compuesto</i>	<i>LD (ng/mL)</i>	<i>RD (ng/mL)</i>	<i>IC₅₀ (ng/mL)</i>
Diazinón	1	3-422	22
Fentión	0,02	0,14-1850	4
Malatión	0,09	0,5-800	10
Clorpirifos	0,04	0,12-130	0,4

*Valores en ng/mL. RD: intervalo de trabajo, LD: límite de detección

La Figura 51 muestra una imagen de la membrana obtenida en el ELIFA al analizar los cuatro organofosforados en la misma muestra de aceite de oliva dopada a diferentes niveles.

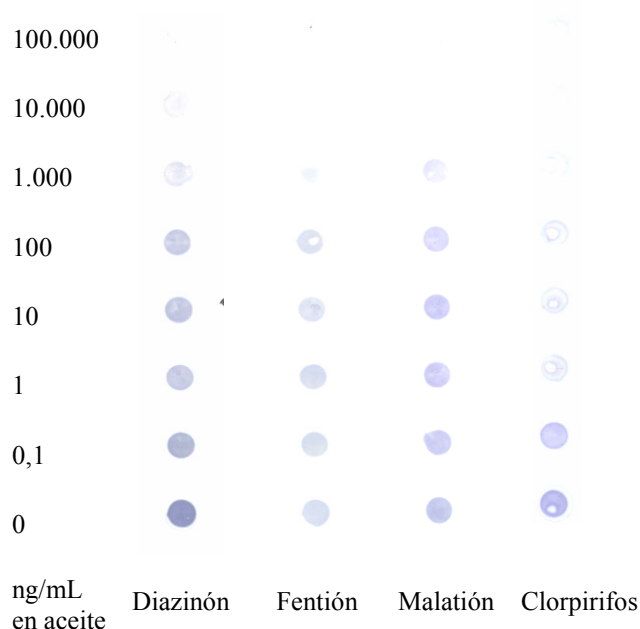


Figura 51. Imagen de la membrana obtenida para los cuatro compuestos organofosforados en aceite de oliva virgen extra a diferentes niveles mediante ELIFA

Para comprobar el potencial de la metodología de inmunofiltración aplicada a aceite, se tomaron diez muestras de diferentes procedencias, que se doparon a dos niveles significativos para cada uno de los cuatro organofosforados -uno próximo al límite máximo de residuos (1.000 ng/mL) y otro inferior (10 ng/mL)-. La Figura 52 muestra el resultado obtenido en la determinación de residuos de los cuatro organofosforados en un mismo aceite (a) y de malatión en diez aceites diferentes (b), observándose una discriminación visual entre los tres niveles de dopaje. Además, se aprecia una buena reproducibilidad entre los distintos aceites (Figura 52b).

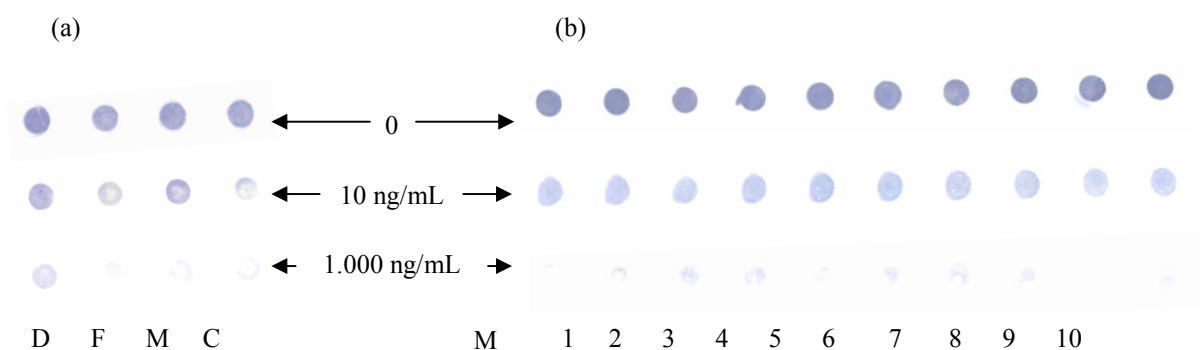


Figura 52. Resultados de la determinación de organofosforados (D: diazinón, F: fentiión, M: malatión, C: clorpirifos) mediante inmunofiltración
 (a) Aceite de oliva virgen extra dopado con los cuatro insecticidas
 (b) Muestras de aceite de oliva virgen extra dopadas con malatión

Con el fin de hacer más sencillo el procedimiento de trabajo, prescindiendo del “escaneado” de las membranas, se procedió a establecer la sensibilidad visual de la técnica. Para ello, se comparó la señal obtenida con muestras dopadas a 1.000 ng/mL con la ofrecida por la muestra de referencia sin dopar (control negativo). Se efectuaron ensayos con diez tiras que fueron evaluadas por un panel de 15 personas con el fin de obtener resultados representativos en las apreciaciones visuales. Los observadores señalaron el punto (concentración) donde se producía el cambio de una coloración apreciable a no aparición de color. El límite de detección visual se estimó como el punto que dio lugar al 95% de respuestas positivas. Este valor se encuentra entre 100 y 1.000 ng/mL en el caso de fentiión, malatión y clorpirifos; sin embargo, para diazinón se obtuvieron un 70% de respuestas positivas en este punto. Así pues, la detección visual sólo nos permite efectuar un cribado de la presencia de estos residuos en el aceite de oliva por encima de los límites máximos permitidos.

Paralelamente se efectuó una cuantificación instrumental mediante tratamiento de imagen de los resultados obtenidos con muestras de aceite dopadas a 10 ng/mL para ver la utilidad de la técnica. Los valores para los cuatro organofosforados se muestran en la Tabla 49. Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre 72%-121% para los cuatro analitos, siendo el diazinón el que presentó una mayor variabilidad. Esto puede ser debido a la leve coloración residual que se aprecia en la membrana incluso a concentraciones de analito de 10.000 y 100.000 ng/mL.

4. Resultados

Tabla 49. Determinación de residuos de organofosforados en aceite de oliva mediante inmunofiltración *

<i>Muestra</i>	<i>[Diazinón]</i>	<i>R</i>	<i>[Fentión]</i>	<i>R</i>	<i>[Malatión]</i>	<i>R</i>	<i>[Clorpirifos]</i>	<i>R</i>
1	11,2 ± 3,5	112	7,8 ± 1,5	78	8,8 ± 3,1	88	9,8 ± 2,9	98
2	12,1 ± 2,8	121	8,7 ± 2,4	87	10,2 ± 2,3	102	10,5 ± 2,0	105
3	11,8 ± 2,1	118	9,8 ± 3,1	98	10,7 ± 2,4	107	8,6 ± 2,5	86
4	9,8 ± 1,9	98	9,4 ± 2,3	94	9,7 ± 2,6	97	10,4 ± 3,2	104
5	8,7 ± 3,2	87	10,4 ± 1,9	104	11,2 ± 2,8	112	9,3 ± 2,2	93
6	10,7 ± 2,6	107	11,0 ± 2,6	110	9,5 ± 1,9	95	8,9 ± 3,0	89
7	10,4 ± 1,7	104	9,6 ± 3,4	96	10,8 ± 2,8	108	11,3 ± 2,2	113
8	9,3 ± 2,4	93	10,8 ± 2,7	108	11,2 ± 3,0	112	8,6 ± 2,1	86
9	7,2 ± 1,8	72	9,9 ± 1,8	99	9,4 ± 2,4	94	10,1 ± 2,7	101
10	8,9 ± 2,4	89	10,7 ± 2,1	107	10,8 ± 2,9	108	9,2 ± 1,8	92
R Media		100		98		102		97

*Nivel de dopaje: 10 ng de organofosforado/mL, concentración expresada en ng/mL ± desviación estándar relativa (n=3), R: Recuperación, expresada en %

Los valores de recuperación obtenidos indican la efectividad de esta metodología como método de análisis rápido y sencillo de residuos de organofosforados en aceite de oliva, con sensibilidad inferior -IC₅₀ entre 0,4 y 22 ng/mL (ver Tabla 48) con inmunocentración en la membrana- a los límites máximos de residuos permitidos (diazinón: 2 mg/kg según el Codex; fentión: 1 mg/kg según la FAO; malatión: 3 mg/kg en aceituna y clorpirifos: 0,05 mg/kg en aceituna, ambos, según la orden del 1 de abril del 2002 de la legislación española). Además, los límites detectables visualmente permiten realizar un barrido tipo sí/no de los niveles de residuos iguales a los límites señalados para los compuestos organofosforados aplicados en el cultivo del olivar. Este procedimiento permite conocer de forma rápida qué residuos, de los aplicados rutinariamente, pueden estar presentes en el aceite, lo que es de gran interés para el control de plaguicidas dentro del marco de una Agricultura Integrada y competitiva.

5. Conclusiones

✓ Se han desarrollado nuevos reactivos para la puesta a punto de métodos inmunoquímicos sencillos, selectivos y sensibles para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados.

El diseño de haptenos es una de las etapas más importantes, pudiendo concluir que:

→ Los mejores haptenos de inmunización han resultado ser aquellos que mantienen el grupo tiofosfato y el brazo espaciador unido por este grupo.

→ Para algunos analitos, el hapteno de inmunización con brazo espaciador terminado en grupo hidroxilo -en lugar de carboxilo- ha proporcionado los mejores sueros.

→ La sensibilidad de los ensayos aumenta considerablemente al introducir una mayor heterología en el inmunoensayo. Son preferibles los haptenos de tapizado que carecen de grupo tiofosfato y con brazos espaciadores cortos.

✓ Los ELISAs desarrollados presentan valores de sensibilidad adecuados: IC_{50} de 7,5, 0,05, 1,6 y 0,007 ng/mL para diazinón, fentión, malatión y clorpirifos, respectivamente, en medio acuoso.

✓ El desarrollo de un método de extracción efectivo y simple para la determinación de residuos en aceite de oliva, como método de *screening*, ha permitido llevar a cabo la extracción simultánea de cuatro compuestos organofosforados de forma general, también aplicable a residuos de atrazina, que incluye limpieza del extracto mediante tratamiento en frío. El procedimiento es rápido, sencillo, y utiliza pequeñas cantidades de metanol como disolvente orgánico, que además de ser más económico, presenta buena biocompatibilidad.

✓ La metodología (extracción, determinación) puesta a punto se ha aplicado con éxito a la cuantificación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva con resultados comparables a los obtenidos utilizando métodos cromatográficos.

✓ El método desarrollado permite determinar los cuatro organofosforados estudiados por debajo de los límites máximos de residuos establecidos para aceite de oliva.

- ✓ Además, un aceite que contenga los cuatro compuestos organofosforados puede ser analizado realizando una única extracción y determinando inmunoquímicamente los residuos en el mismo extracto con una elevada selectividad y capacidad de trabajo. Así, utilizando una microplaca de 96 pocillos se pueden determinar los cuatro residuos en 32 muestras, efectuando tres réplicas por muestra, en sólo 150 minutos.

- ✓ El procedimiento desarrollado para el análisis de residuos de plaguicidas en aceite de oliva virgen extra es igualmente aplicable a otros aceites vegetales de amplio consumo como girasol, maíz y soja.

- ✓ La inmunoconcentración en membrana (ELIFA) ha permitido mejorar la sensibilidad de los ensayos en placa. Esto refuerza la utilidad de la metodología desarrollada para aceite de oliva, siendo una herramienta muy interesante para la mejora de la calidad y seguridad alimentaria de este producto en origen.

- ✓ Dada la necesidad de realizar determinaciones -especialmente de cribado- en origen (campo y almazaras), se ha desarrollado un método de barrido en formato de membrana que permite discriminar visualmente entre muestras de aceite de oliva con contenidos superiores a los límites máximos de residuos.

6. Anexo

Este anexo recoge parte del trabajo experimental realizado durante la Tesis Doctoral con el objetivo de mejorar y explorar nuevas alternativas en el ámbito de los métodos inmunoquímicos. A pesar de que las investigaciones no dieron resultados de utilidad práctica o no mejoraron las prestaciones obtenidas por otras vías, se considera interesante exponer el trabajo realizado, que ocupó ocho meses de investigación resumido en tres páginas.

Desarrollo y aplicación de marcadores fluorescentes particulados

Una de las vías potencialmente más efectivas para aumentar la sensibilidad de los inmunoensayos enzimáticos es utilizar marcadores fluorescentes particulados. Las enzimas pueden ser reemplazadas por partículas de latex, oro coloidal o sílice, de modo que pueden incorporarse un gran número de unidades marcadoras por unidad de anticuerpo o de antígeno. Así, utilizando estos marcadores, la señal se visualiza cuando existe una densidad suficiente de partículas acumuladas en un área. Además, los marcadores particulados son más estables químicamente, y su conjugación y purificación es más sencilla que la de las enzimas.

Por otro lado, al no requerir sustrato ni etapa de incubación, la detección fluorescente permite acelerar el proceso de revelado propio de los marcadores enzimáticos, reduciendo entre 10 y 60 minutos la duración de los inmunoensayos. Entre las ventajas que ofrece este tipo de detección caben destacar: seguridad, rapidez, sensibilidad, elevada resolución espacial, durabilidad, disponibilidad de diferentes colorantes y facilidad de uso.

Sin embargo, los marcadores fluorescentes orgánicos presentan ciertos problemas relacionados con los cortos tiempos de vida media, solapamiento espectral, desplazamientos de Stokes mínimos y fotodegradación.

Por todo ello, se decidió estudiar la aplicabilidad en inmunoensayo de marcadores particulados fluorescentes de naturaleza inorgánica. Hay que señalar que, aunque la bibliografía consultada referente a este tipo de marcadores alternativos es amplia, tan sólo se han descrito algunos resultados de utilidad práctica en inmunoensayo (328).

Entre este tipo de partículas fluorescentes se encuentran los puntos cuánticos - *quantum dots*- (329, 330), óxidos de europio y otros lantánidos (331), y nanopartículas

de sílice o poliestireno, conteniendo quelatos de lantánidos o moléculas fluorescentes (332-333).

En este trabajo se decidió utilizar nanopartículas de óxido de europio, debido al bajo coste del material y a sus excelentes propiedades luminiscentes -gran desplazamiento de Stokes, elevado rendimiento cuántico, espectro de emisión estrecho y de alta intensidad, tiempo de vida media largo y buena fotoestabilidad (331)-.

Desafortunadamente, las partículas de óxido de europio no pueden conjugarse directamente a inmunorreactivos (anticuerpos o haptenos). Por ello, es necesario que dispongan de un recubrimiento que las proteja y les proporcione grupos funcionales para su conjugación a anticuerpos. El recubrimiento con organosilanos permite mantener sus propiedades ópticas y aportar un grupo funcional para su conjugación (331).

Para obtener partículas de óxido de europio de tamaño apropiado se siguió el procedimiento de síntesis descrito por Wakefield *et al.* (335); para ello, se mezclaron 250 mL de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,005 M en metanol con 250 mL de óxido de trioctilfosfina (TOPO) 0,005 M en metanol, manteniendo la mezcla en agitación durante 15 min. A continuación, se añadieron 50 mL de NaOH 0,05 M en metanol, lentamente para precipitar el óxido de europio, y se concentró en rotavapor. El óxido obtenido se lavó dos veces con metanol y se secó en estufa a 102 ± 3 °C.

La derivatización de las partículas se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Feng *et al.* (331) con algunas modificaciones, empleando como agente de recubrimiento 3-(aminopropil)trimetoxisilano, que aporta grupos amino a las nanopartículas. Para ello, se hicieron reaccionar 80 mg de nanopartículas con 8 mL de 3-aminopropiltrimetoxisilano, bajo atmósfera inerte. La mezcla se mantuvo 10 min en baño de ultrasonidos, 4 h en agitación a temperatura ambiente y, finalmente, toda la noche a 100 °C. Las nanopartículas de óxido de europio aminadas se separaron por centrifugación a 12.000 rpm (10 min), se lavaron -una vez con metanol y diez veces con agua desionizada-, y se secaron en estufa. Para comprobar el grado de aminación de las nanopartículas se utilizó el test de ninhidrina (336).

Una vez derivatizadas las partículas, se comprobó que éstas mantenían sus propiedades fluorescentes -como se aprecia en la Figura 53 -, y se midió su distribución de tamaños (50-200 nm) mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 54). Finalmente, se conjugaron a anticuerpos (el proceso se realizó con los anticuerpos específicos desarrollados frente a fentión) utilizando diferentes protocolos: conjugación

directa con EDC y sulfo-NHS, glutaraldehído, y oxidación de los azúcares del anticuerpo con periodato.

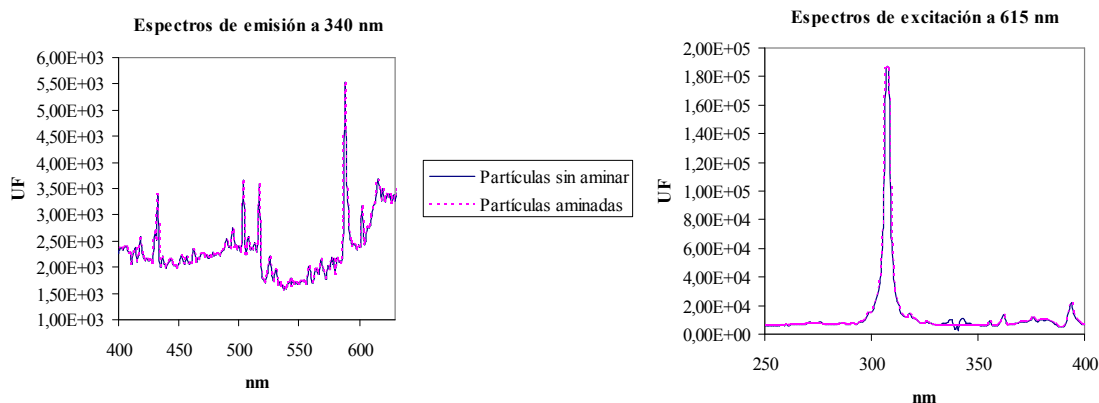
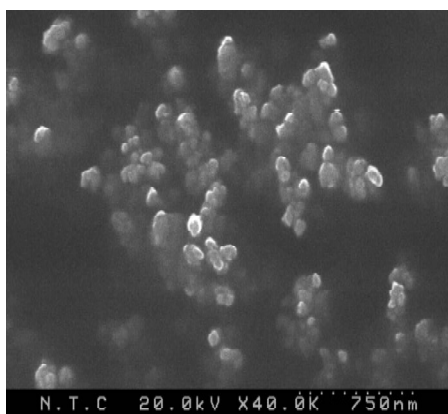


Figura 53. Espectros de excitación y emisión de las partículas de Eu_2O_3 sintetizadas y derivatizadas

(a)



(b)

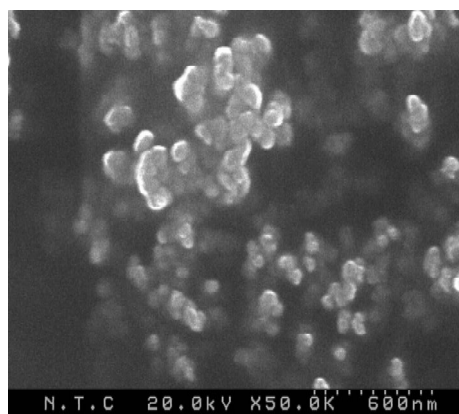


Figura 54. Imágenes obtenidas mediante SEM

(a) Partículas de Eu_2O_3

(b) Partículas de Eu_2O_3 derivatizadas

Para la conjugación con EDC y sulfo-NHS, los anticuerpos (1 mg/mL en tampón MES 0,1 M, pH 4,5-5) se mezclaron con 2 mg de EDC, 5,5 mg de sulfo-NHS y 5 mg de nanopartículas derivatizadas, dejando reaccionar la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente.

Para la conjugación utilizando glutaraldehído, los anticuerpos (1 mg/mL en tampón Na_2CO_3 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 8,5) se mezclaron con 2 mg de óxido aminado y 20

μL de glutaraldehído al 50%, durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente, se adicionaron 10 mg de NaBH_4 y la mezcla se dejó reaccionar 1 h a 4 °C.

Para la oxidación de las inmunoglobulinas con periodato, se mezcló 1 mL de anticuerpo a una concentración aproximada de 5 mg/mL en tampón PBS, con 100 μL de NaIO_4 0,1M en tampón acetato sódico 0,001M, pH 4,2, dejando la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante una hora en oscuridad. Los anticuerpos oxidados se purificaron por cromatografía de exclusión molecular. A continuación, se resuspendieron 5 mg de óxido de europio derivatizado en 1 mL de tampón carbonato y se mezclaron con 1 mL de anticuerpo oxidado a una concentración aproximada de 2 mg/mL. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y, tras añadir 20 mg de NaBH_4 0,1 M, se mantuvo en agitación 30 min.

Los anticuerpos conjugados a nanopartículas se separaron mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min y finalmente, se lavaron tres veces con tampón fosfato. Una de las mayores ventajas de este tipo de marcadores particulados es que pueden separarse fácilmente por centrifugación durante los procesos de preparación y purificación de conjugados.

Los ensayos de Bradford, realizados al sólido (resuspendido en tampón fosfato) y a los sobrenadantes de las conjugaciones, indicaron que se unió una mayor cantidad de proteína (mayor coloración azul de las partículas y menor cantidad de proteína en el sobrenadante) al utilizar el protocolo de conjugación directa -EDC y sulfo-NHS- que los otros métodos de conjugación ensayados.

Los ensayos realizados tapizando placas ELISA especiales para lecturas de fluorescencia (negras) con diferentes cantidades de OVA-F1 y añadiendo distintas concentraciones del conjugado anticuerpo específico contra fentión- Eu_2O_3 , indicaron que sólo se obtenían señales de fluorescencia específicas superiores al ruido de fondo en el caso de la conjugación con EDC y sulfo-NHS. Además, también se observó señal en los pocillos de la placa al efectuar lecturas mediante microscopía de fluorescencia. Sin embargo, no se obtuvieron curvas de calibrado y la adición de grandes cantidades de analito no provocaba disminución de la señal.

Por otro lado, se llevó a cabo el marcaje de un anticuerpo secundario, lo que permitiría su utilización para los cuatro inmunoensayos desarrollados. Para ello, las nanopartículas de óxido de europio derivatizadas se conjugaron a inmunoglobulinas de cabra anticonejo. Ninguno de los ensayos realizados en placa proporcionaron resultados aceptables.

Se estableció la hipótesis de que los problemas que aparecen al utilizar este tipo de marcadores se deben al sistema de detección utilizado (no es el apropiado), ya que son necesarias grandes cantidades de conjugado para obtener señales apreciables. La utilización de microscopía de fluorescencia confocal podría mejorar la detección, pero no se disponía de equipos con láseres de longitud de onda apropiada. Además, otra posible mejora para la aplicación de estos marcadores en inmunoensayo consistiría en purificar las nanopartículas conjugadas a proteína de las libres.

No hay que olvidar que la aplicación de este tipo de nanopartículas, así como de los puntos cuánticos, parece tener limitaciones en los inmunoensayos en placa utilizando un lector convencional, no encontrándose -hasta el momento- ninguna referencia en la bibliografía. Por otro lado, la necesidad de usar como detectores equipos caros y sofisticados reduce las ventajas de estos marcadores para su aplicación en inmunoensayo. Sin embargo, este tipo de nanopartículas podrían ser utilizadas para el marcaje de antígenos en células y tejidos, o la obtención de imágenes *in vivo*. Además, la sencilla química que aquí se describe (derivatización y conjugación) para óxido de europio puede ser aplicada a cualquier otro lantánido, obteniéndose marcadores con diferentes longitudes de onda de excitación y emisión.

7. Bibliografía

1. Primo, E., Carrasco, J.M. Química Agrícola II. Plaguicidas y Fitorreguladores. Editorial Alhambra, S.A., Madrid, 1986.
2. Perfil ambiental de España, Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas (AEPLA). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), Madrid, 2005.
3. Hajslova, J. En: Environmental Contaminants in Food, C.F. Moffat, K.J. Whittle (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, p. 215.
4. Ballesteros, E. En: Handbook of Food Analysis, L.M.L. Nollet (Ed.), Marcel Dekker, New York, 2004, p. 1177.
5. Codex Alimentarius Commission. Codex Alimentarius Pesticide Residues in Food. Maximum Residues Limits, 2nd ed., Vol. 2B, FAO/WHO, Rome, 1996.
6. Pesticide Residues. European Commission, Brussels, 2001.
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph ps/pest/index en.htm>.
7. Barceló, D. *J. Chromatogr.* 643 (1993) 117.
8. 2000/60/EC, Directiva 2000/60/EC del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de Octubre del 2000 estableciendo un marco comunitario de acción en el campo de política de aguas, Off. J. Eur. Commun. L327 (2000) 1–72.
9. Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C.M., Miguel, M., Flores, P. *Food Chem.* 105 (2007) 711.
10. Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 177.
11. Zrostliková, J., Lehotay, S.J., Hajslova, J. *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 527.
12. Ahmed, F.E. *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 649.
13. Santos, F.J., Galcerán, M.T. *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 672.

14. Zenkevich, I.G., Ostroukhova, O.K., Dolzhenko, V.I. *Zh. Anal. Khim.* 57 (2002) 43 [*J. Anal. Chem.* (Engl. Transl.) 57 (2002) 35].
15. Zambonin, C.G., Quinto, M., De Vietro, N., Palmesano, F. *Food Chem.* 86 (2004) 269.
16. Sandra, P., Tienpot, B., David, F. *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 299.
17. Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A. *J. Chromatogr. A* 993 (2003) 197.
18. Columé, A., Cárdenas, S., Gallego, M., Valcárcel, M. *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 153.
19. Arrebola, F.J., Martínez Vidal, J.L., González Rodríguez, M.J., Garrido Frenich, A., Sánchez Morito, N. *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 131.
20. Arrebola, F.J., Martínez Vidal, J.L., Mateu-Sánchez, M., Álvarez-Castellón, F. *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 167.
21. Gamón, M., Lleó, C., Ten, A., Mocholí, F. *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1209.
22. Ferrer, I., Thurman, E.M. *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 24.
23. Jansson, C., Pihlström, T., Österdahl, B-G., Markides, K.E. *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 93.
24. Sherma, J. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 602.
25. Ponomarev, A.S., Shtykov, S.N. *Zh. Anal. Khim.* 55 (2000) 54 [*J. Anal. Chem.* (Engl. Transl.) 55 (2000) 47].
26. Picó, Y., Rodríguez, R., Mañes, J. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 133.
27. Pogacnik, L., Franko, M. *Talanta* 54 (2001) 631.

-
28. Marco, M.P., Gee, S., Hammock, B.D. *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 312A.
29. Van Emmon, J.M., Gerlach, C. *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 341.
30. Rubach, R. En: *Analysis of Pesticides in Ground and Surface Waters*, H.J. Stan (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1995, p. 185.
31. Sherry, J.P. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 23 (1992) 217.
32. Hennion, M.C., Barceló, D. *Anal. Chim. Acta* 362 (1998) 3.
33. Marco, M.P., Gee, S., Hammock, B.D. *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 415.
34. Goodrow, M.H., Sanborn, J.R., Soutamire, D.W., Gee, S.J., Hammock, B.D. En: *Immunoanalysis of Agrochemicals, Emerging Technologies*. Vol. 586, J.O. Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong (Eds.), American Chemical Society, Washington, 1995, p. 119.
35. Marco, M.P., Hammock, B.D., Kurth, M.J. *J. Org. Chem.* 8 (1993) 284.
36. Harrison, R.O., Goodrow, M.H., Hammock, B.D. *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 122.
37. Muñoz-Olivas, R. *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 203.
38. UNEP. *Assessment of the State of Pollution of the Mediterranean Sea by Organophosphorous Compounds*. M.A.P., Technical Reports Series, 58, UNEP, Athens, 1991.
39. Gisbert, J.A., Villanueva, E., en: *Intoxicaciones por plaguicidas*. Medicina Legal y Toxicología. 4ª ed., J.A. Gisbert Calabuig (Ed.), Masson-Salvat Medicina, Barcelona, 1992, p. 696.
40. Klimmer, O.R. *Plaguicidas: toxicología, sintomatología y terapia*, Ediciones Oikos-Tau, S.A., Barcelona, 1967.

41. Bavcon, M., Trebse, P., Zupancic-Kralj, L. *Chemosphere* 50 (2003) 595.
42. Pehkonen, S.O., Zhang, Q. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 32 (2002) 17.
43. Casida, J.E., Quistad, G.B. *Annu. Rev. Entomol.* 43 (1998) 1.
44. Instituto Nacional de Toxicología y Asociación de fabricantes de detergentes, tensoactivos y productos afines. Productos de limpieza y mantenimiento de uso doméstico. Medidas de actuación en caso de accidente. ALVI, Madrid, 1996.
45. Patel, S.V. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 8 (1995) 81.
46. Polis, M.A., Masur, H. *JAMA* 273 (1995) 1457.
47. Khayat, D., Giroux, B., Berille, J., Cour, V., Gerard, B., Sarkany, M., Bertrand, P., Bizzari, J.P. *Cancer Invest.* 12 (1994) 414.
48. Gunderson, C.H., Lehmann, C.R., Sidell F.R., Jabbari B. *Neurology* 42 (1992) 946.
49. Satoh, T., Hosokawa, M. *Neurotoxicology* 21 (2000) 223.
50. Racke, K.D. En: Organophosphates, Chemistry, Fate, and Effects. J.E. Chambers, P.E. Levi (Eds.), Academic Press, San Diego, 1992, p. 47.
51. Amitai, G., Moorad, D., Adani, R., Doctor, B.P. *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998) 293.
52. Brzak, K.A., Harms, D.W., Bartels, M.J., Nolan, R.J. *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 203.
53. Pogacnik, L., Franko, M. *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 569.

-
54. Huckle, K.R., Millburn, P. En: Progress in Pesticides, Biochemistry and Toxicology. Vol. 7, Environmental Fate of Pesticides, D.H. Hutson, T.R. Roberts (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 1990, p. 176.
55. Dreisbach, R.H., Robertson, W.O. Handbook of poisoning, 12th ed., Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, 1987.
56. Millburn, P. En: Progress in Pesticides, Biochemistry and Toxicology. Vol. 8, The Mammalian Metabolism of Agrochemicals, D.H. Hutson, T.R. Roberts (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 1995, p 1.
57. Hutson, D.H., Paulson, G.D., Progress in Pesticides, Biochemistry and Toxicology. Vol. 8, D.H. Hutson, T.R. Roberts (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 1995, p. 358.
58. Lee, H.B., Weng, L.D., Chau, A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (1984) 789.
59. Navarro-Villoslada, F., Pérez-Arribas, L.V., León-González, M.E., Polo-Díez, L.M. *Anal. Chim. Acta* 381 (1999) 93.
60. Hernández, F., Beltrán, J., López, F.J., Gaspar, J.V. *Anal. Chem.* 72 (2000) 2313.
61. Sarrión, M.N., Santos, F.J., Galcerán, M.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 2271.
62. Pawliszyn, J. En: Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. John Wiley & Sons, Ltd., New York, 1997, p. 247.
63. Su, P.G., Huang, S.D. *Talanta* 49 (1999) 393.
64. Zuin, V.G., Lopes, A.L., Yariwake, J.H., Augusto, F. *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 21.
65. Doong, R.A., Liao, P.L. *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 177.

66. Bouaid, A., Ramos, L., González, M.J., Fernández, P., Cámara, C. *J. Chromatogr. A* 939 (2001) 13.
67. Beltrán, J., López, F., Hernández, F. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 389.
68. Zhang, Z., Poerschmann, J., Pawliszyn, J. *Anal. Commun.* 33 (1996) 219.
69. Blasco, C., Fernández, M., Picó, Y., Font, G. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 77.
70. Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C. *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
71. Chen, P.-S., Huang, S.-D. *Talanta* 69 (2006) 669.
72. Yao, Z., Jiang, G., Liu, J., Cheng, W. *Talanta* 55 (2001) 807.
73. Dalluge, J., Rijn, M., Beens, J., Vreuls, R., Brinkman, U.A. *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 207.
74. Ballesteros, E., Parrado, M.J. *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 267.
75. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis, 16th ed., AOAC Int, Arlington, VA, 1995.
76. Balinova, A. *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 11.
77. Valenzuela, A.I., Lorenzini, R., Redondo, M.J., Font, G. *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 101.
78. Tuovinen, K., Paakkanen, H., Hanninen, O. *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 7.
79. Karpas, Z., Pollevoy, Y. *Anal. Chim. Acta* 259 (1992) 333.
80. Preston, J.M., Karasek, F.W., Kim, S.H. *Anal. Chem.* 49 (1977) 1746.

-
81. Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J., Rogers, K.R. *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 225.
82. Rodrigues, T.C., Tubino, M., Godinho, O.E.S., de Olivera Neto, G. *Anal. Sci.* 13 (1997) 423.
83. Andres, R.T., Narayanaswamy, R. *Talanta* 44 (1997) 1335.
84. Mulchandi, P., Mulchandi, A., Kaneva, I., Chen, W. *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 77.
85. Singh, A.K., Flounders, A.W., Volponi, J.V., Ashley, C.S., Wally, K., Schoeniger, J.S. *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 703.
86. Nguyen, V.K., Ehret-Sabatier, L., Goeldner, M., Boudier, C., Jamet, G., Warter, J.M., Poindron, P. *Enzyme Microb. Technol.* 20 (1997) 18.
87. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres V.Jr., Featherstone, R.M. *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88.
88. Hart, A.L., Collier, W.A., Janssen, D. *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 645.
89. Palchetti, I., Cagnini, A., Del Carlo, M., Coppi, C., Mascini, M., Turner, A.P.F. *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 315.
90. Rippeth, J.J., Gibson, T.D., Hart, J.P., Hartley, I.C., Nelson, G. *Analyst* 122 (1997) 1425.
91. Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M., Palleschi, G. *Anal. Lett.* 24 (1991) 1317.
92. Palleschi, G., Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M. *Sens. Actuators B* 7 (1992) 513.

93. Campanella, L., de Luca, S., Sanmartino, M.P., Tomassetti, M. *Anal. Chim. Acta* 385 (1999) 59.
94. Ghindilis, A.L., Morzunova, T.G., Barmin, A.V., Kurochkin, I.N. *Biosens. Bioelectron.* 9 (1996) 873.
95. Delgado-Reyes, F., Fernández-Romero, J.M., Luque de Castro, M.D. *Anal. Chim. Acta* 408 (2000) 209.
96. Jeanty, G., Ghommidh, Ch., Marty, J.L. *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 119.
97. Jung, F., Gee, S.J., Harrison, R.O., Goodrow, M.H., Karu, A.E., Braun, A.L., Li, Q.X., Hammock, B.D. *Pestic. Sci.* 26 (1989) 303.
98. Zulin, Z., Huasheng, H., Xinhong, W., Jianqing, L., Weiqui, C., Li, X. *Mar. Pollut. Bull.* 45 (2002) 397.
99. Viñas, P., Campillo, N., López-García, I., Aguinaga, N., Hernández-Córdoba, M. *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 249.
100. Torres, C.M., Picó, Y., Mañes, J. *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 301.
101. Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Pérez, R.A., Fernández, M.D. *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 175.
102. Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Paniagua-Marcos, P.H., Hernández-Méndez, J. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 427.
103. Caballo-López, A., Luque de Castro, M.D. *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 51.
104. Goto, T., Ito, Y., Oka, H., Saito, I., Matsumoto, H., Nakazawa, H. *Anal. Chim. Acta* 487 (2003) 201.
105. Hernández, F., Pitarch, E., Beltrán, J., López, F.J. *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 65.

-
106. Luppá, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. *Clin. Chim. Acta* 314 (2001) 1.
107. Liu, Y., García, C.D., Henry, C.S. *Analyst* 128 (2003) 1002.
108. Guzmán, N.A. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 37.
109. Mauriz, E., Calle, A., Lechuga, L.M., Quintana, J., Montoya, A., Manclús, J.J. *Anal. Chim. Acta* 561 (2006) 40.
110. Gabaldón, J.A., Maquieira, A., Puchades, R. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39 (1999) 519.
111. Deng, A.P., Himmelsbach, M., Zhu, Q.Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R., Knopp, D. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3422.
112. Rubio, F., Veldhuis, L.J., Clegg, B.S., Fleeker, J.R., Hall, J.C. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 691.
113. Dalvie, M.A., Sinanovic, E., London, L., Cairncross, E., Solomon, A., Adam, H. *Environ. Res.* 98 (2004) 143.
114. Adams, C., Jiang, H., McGuire, M., Graziano, N., Roberson, A., Frey, M. *J. Am. Water Works Assoc.* 96 (2004) 126.
115. Sanvicens, N., Pichon, V., Hennion, M.C., Marco, M.P. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 156.
116. Nistor, C., Christensen, J., Ocio, N., Norgaard, L., Emmeus, J. *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 898.
117. Rastrelli, L., Totaro, K., De Simone, F. *Food Chem.* 79 (2002) 303.
118. Namera, A., Yashiki, M., Liu, J., Okajima, K., Hara, K., Imamura, T., Kojima, T. *Forensic Sci. Int.* 109 (2000) 215.

119. Russo, M.V., Campanella, L., Avino, P. *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 431.
120. Liu, Y.H., Jin, M.J., Gui, W.J., Cheng, J.L., Guo, Y.R., Zhu, G.N. *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 173.
121. Harrison, R.O., Goodrow, M.H., Gee, S.J., Hammock, B.D. En: *Immunoassays for Trace Chemical Analysis*. ACS Symposium Series No. 451, M. Vanderlaan, L.H. Stanker, B.E. Watkins, D.W. Roberts (Eds), American Chemical Society, Washington, DC, 1991, p. 14.
122. Szurdoki, F., Bekheit, H.K.M., Marco, M.P., Goodrow, M.H., Hammock, B.D. En: *New Frontiers in Agricultural Immunoassays*. D.A. Kurtz, J.H. Skerritt, L. Stanker (Eds), AOAC, Arlington, VA, 1995, p. 39.
123. Guefuen, F., Boisdé, F., Queffelec, A.L., Haelters, J.P., Thouvenot, D., Corbel, B., Nodet, P. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4492.
124. Abad, A., Primo, J., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1486.
125. Karu, A.E., Goodrow, M.H., Schmidt, D.J., Hammock, B.D., Bigelow, M.W. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 301.
126. Manclús, J.J., Primo, J., Montoya, A.J. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1996) 4052.
127. Gee, S.J., Miyamoto, T., Goodrow, M.H., Buster, D., Hammock, B.D. *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 863.
128. Moreno, M.J., Abad, A., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 72.
129. McAdam, D.P., Skerritt, J.H. *Aust. J. Chem.* 46 (1993) 959.
130. Skerritt, J.H., Lee, N.J. En: *Residue Analysis in Food Safety: Applications of Immunoassay Methods*. ACS Symposium Series No. 621, R.C. Beier, L.H. Stanker (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC, 1996, p. 124.

-
131. McAdam, D.P., Hill, A.S., Beasley, H.L., Skerritt, J.H. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1466.
132. Skerritt, J.H., Hill, A.S., Thwaites, H.L., Edward, S.L., McAdam, D.P. *J. AOAC Int.* 73 (1992) 519.
133. Edward, S.L., Skerritt, J.H., Hill, A.S., McAdam, D.P. *Food Agric. Immunol.* 5 (1993) 129.
134. Hill, A.S., Skerritt, J.H., Larkin, K.A., Perfusion, B.S., Bushway, R.J., Perkins, L.B., Thomas, M., Korth, W., Bowmer, K.H. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2051.
135. Beasley, H.L., McAdam, D.P., Larkin, K.A., Ferguson, B.S., Bushway, R.J., Skerritt, J.H. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59 (1997) 375.
136. Cho, Y.A., Lee, H.-S., Park, E.Y., Lee, Y.T., Hammock, B.D., Ahn, K.C., Lee, J.K. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002) 481.
137. Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego, CA, 1996.
138. Moreno, M.J., Abad, A., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 72.
139. Köhler, G., Milstein, C. *Nature* 256 (1975) 495.
140. Kim, Y.J., Kim, Y.A., Lee Y.T., Lee, H.S. *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 183.
141. Kolosova, A.Y., Park, J.H., Eremin, S.A., Park, S.J., Kang, S.J., Shim, W.B., Lee, H.S., Lee, Y.T., Chung, D.H. *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 323.
142. Danielson, B., Surugiu, I., Dzgoev, A., Mecklenburg, M., Ramanathan, K. *Anal. Chim. Acta* 426 (2001) 227.

143. Rufo, C., Hammock, B.D., Gee, S.J., Last, J.A., González-Sapienza, G. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 182.
144. Hoogenboom, H.R. *Nature Biotechnol.* 23 (2005) 1105.
145. Nishi, K., Takai, M., Morimune, K., Ohkawa, H. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 67 (2003) 1358.
146. Kramer K., Fiedler M., Skerra A., Hock B. *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 305.
147. Alcocer, M.J., Doyen, C., Lee, H.A., Morgan, M.R. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4053.
148. Brichta, J., Vesela, H., Franek, M. *Vet. Med.* 48 (2003) 237.
149. Li, T., Zhang, Q., Liu, Y, Chen, D., Hu, B., Blake, D., Liu, F. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9085.
150. Ye, L. Haupt, K. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1887.
151. Hillberg, A.L., Brain, K.R., Allender, C.J. *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (2005) 1875.
152. Surugiu, I., Danielsson, B., Ye, L., Mosbach, K., Haupt, K. *Anal. Chem.* 73 (2001) 487.
153. Mosbach, K. *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 3.
154. Gosling, J.P. *Clin. Chem.* 36 (1990) 1408.
155. Stead, D.A. *J. Chromatogr. B* 747 (2000) 69.
156. Ballesteros, B., Barceló, D., Dankwardt, A., Schneider, P., Marco, M.P. *Anal. Chim. Acta* 475 (2003) 105.

-
157. Little, J.A. *Chromatographia* 59 (2004) S177
158. Bacigalupo, M.A., Moroni, G., Mirasoli, M., Parisi, D., Longhi, R. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 216.
159. Meulenberg, E.P. *Anal. Chim. Acta* 399 (1999) 143.
160. Koester, C.J., Simonich, S.L., Esser, B.K. *Anal. Chem.* 75 (2003) 2813.
161. Richardson, S.D. *Anal. Chem.* 75 (2003) 2831.
162. Nistor, C., Emneus, J. *Waste Manage.* 19 (1999) 147.
163. Valcárcel, M., Cárdenas, S., Gallego, M. *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.
164. Ballesteros, B., Barceló D., Dankwardt, A., Schneider, P., Marco, M.P. *J. Chromatogr. A* 475 (2003) 105.
165. Mallat, E., Barzen, C., Klotz, A., Brecht, A., Gauglitz, G., Barceló, D. *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 965.
166. Meulenberg, E.P., Stocks, P.G. *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 407.
167. Lee, J.K., Ahn, K.C., Stoutamire, D.W., Gee, S.J., Hammock, B.D. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3695.
168. Queffelec, A.L., Boisdé, F., Laure, J.P., Haelters, J.P., Corbel, B., Thouvenot, D., Nodet, P. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1675.
169. Kolosova, A.Y., Park, J.H., Eremin, S.A., Kang, S.J., Chung, D.H. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1107.
170. Valkirs, G.E., Barton, R.S. *Clin. Chem.* 31 (1985) 1427.

171. Jain, A.V., Ross, P.F., Carlson, M.P. *J. AOAC Int.* 82 (1999) 9.
172. Ijsselmuiden, O.E., Herbrink, P., Meddens, M.J.M., Tank, B., Stolz, E., Van Eijk, R.V.W. *J. Immunol. Methods* 119 (1989) 35.
173. Shields, J.M., Siegel, J.N., Clark, C.R., Hines, K.K., Potempa, L.A., Gewurz, H., Anderson, B. *J. Immunol. Methods* 141 (1991) 53.
174. Morais, S., González-Martínez, M.A., Abad, A., Montoya, A., Maquieira, A., Puchades, R. *J. Immunol. Methods* 208 (1997) 75.
175. Szewczuk, A., Kuropatwa, M., Rapak, A. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 40 (1992) 325.
176. Schnappinger, P., Schneider, E., Martlbauer, E., Terplan, G. *Food Agric. Immunol.* 8 (1996) 269.
177. Schneider, E., Usleber, E., Martlbauer, E. *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2548.
178. Keuchel, C., Niessner, R. *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 538.
179. Ostemaier, S., Schneider, E., Usleber, E., Martlbauer, E., Terplan, G. *Food Agric. Immunol.* 7 (1995) 253.
180. Crabbe, P., Van Peteghem, C. *J. Food Protection* 65 (2002) 820.
181. Dankwardt, A., Hock, B. *Biosens. Bioelectron.* 8 (1993) 20.
182. Schneider, E., Dietrich, R., Martlbauer, E., Usleber, E., Terplan, G. *Food Agric. Immunol.* 3 (1991) 185.
183. Aeppli, R.E., Bargetzi, M., Binz, H. *J. Immunol. Methods* 120 (1989) 93.
184. Giersch, T. *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 2220.

-
185. Wittmann, C., Bilitewski, U., Giersch, T., Kettling, U., Schmid, R.D. *Analyst* 121 (1996) 863.
186. Mosiello, L., Cremisini, C., Segre, L., Chiavarini, S., Spano, M., Kimmel, T., Bummer, A.J., Schmid, R.D. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3847.
187. Cuong, N.V., Bachmann, T.T., Schmid, R.D. *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 584.
188. Rubtsova, M.Y., Samsonova, J.V., Egorov, A.M., Schmid, R.D. *Food Agric. Immunol.* 10 (1998) 223.
189. Wittmann, C., Schreiter, P.-Y. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2733.
190. Gabaldón, J.A., Maquieira, A., Puchades, R. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82 (2002) 133.
191. Gabaldón, J.A., Maquieira, A., Puchades, R. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82 (2002) 145.
192. Verheijen, R., Stouten, P., Cazemier, G., Haasnoot, W. *Analyst* 123 (1998) 2437.
193. Vanoosthuyze, K.E.I., Arts, C.J.M., Van Peteghem, C.H. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3129.
194. De Saeger, S., Van Peteghem, C.H. *Apl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1880.
195. Verheijen, R., Osswald, I.K., Dietrich, R., Haasnoot, W. *Food Agric. Immunol.* 12 (2000) 31.
196. Morber, C., Weil, L., Niessner, R. *Fresenius Environ. Bull.* 2 (1993) 151.
197. Wang, S., Zhang, C., Zhang, Y. *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 219.

198. Kim, M.J., Shim, J.Y., Lee, Y.T., Lee, H.S. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41 (2006) 927.
199. Cho, Y.A., Kim, Y.J., Hammock, B.D., Lee, Y.T., Lee, H.S. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7854.
200. Morelló, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J., Romero, M.P. *Food Chem.* 85 (2004) 357.
201. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Agencia para el aceite de oliva. http://intereweb.mapa.es/pwAgenciaAO/InfMercadosAceite.aao?dato_de=PRODUCCION&opcion_seleccionada=4120&control_acceso=S&idioma=EUS.
202. Lentza-Rizos, Ch. *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1096.
203. Sannino, A., Mambriani, P., Bandini, M., Bolzoni, L. *J. AOAC Int.* 79 (1996) 1434.
204. Hiskia, A.E., Atmajidou, M.E., Tsipi, D.F. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 570.
205. Cavanna, S., Molinari, G.P. *Food Addit. Contam.* 15 (1998) 518.
206. Lentza-Rizos, Ch., Avramides, E.J. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 141 (1995) 111.
207. Propuesta para la Regulación del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los límites máximos de residuos de plaguicidas en productos de origen vegetal y animal, COM/2003/0117/final – COD 2003/0052*/; www.europa.eu.int/pol/food/index_es.htm.
208. Sánchez, R., Vázquez, A., Andini, J.C., Villén, J. *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 167.
209. Walters, S.M. *Anal. Chim. Acta* 236 (1990) 77.
210. Cabras, P., Angioni, A., Melis, M., Minelli, E.V., Pirissi, F.M. *J. Chromatogr. A* 761 (1997) 327.

211. Lentza-Rizos, Ch. En: Book of Abstracts of the 1st International Symposium on Pesticides in Food in Mediterranean Countries. Cagliari, 1999, p. 125.
212. Jongenotter, G.A., Kerkhoff, M.A.T., Van der Knaap, H.C.M., Vandeginster, B.G.M. *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 17.
213. Vreuls, J.J., Swen, R.J.J., Goudriaan, V.P., Kerkhoff, M.A.T., Jongenotter, G.A., Brinkman, U.A.Th. *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 275.
214. Ramesh, A., Balasubramanian, M. *Analyst* 123 (1998) 1799.
215. Ferrer, C., Gómez, M.J., García-Reyes, J.F., Ferrer, I., Thurman, E.M., Fernández-Alba, A.R. *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 183.
216. Gelsomino, A., Petrovicová, B., Tiburtini, S., Magnani, E., Felici, M. *J. Chromatogr. A* 782 (1997) 105.
217. Barrek, S., Paise, O., Grenier-Loustalot, M.F. *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 355.
218. Johnson, P.D., Rimmer, D.A., Brown, R.H. *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 3.
219. Hayward, D.G., Hooper, K., Andrzejewski, D. *Anal. Chem.* 71 (1999) 212.
220. Serrano, R., Barreda, M., Pitarch, E., Hernández, E. *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 75.
221. Patel, K., Fussell, R.J., Hetmanski, M., Goodall, D.M., Keely, B.J. *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 289.
222. Botitsi, E., Kormali, P., Kontou, S., Mourkojanni, A., Stavrakaki, E., Tsiipi, D. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 231.
223. Di Muccio, A., Generali, T., Barbini, D.A., Pelosi, P., Ausili, A., Vergori, F., Girolimetti, S. *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 61.

224. Yagüe, C., Bayarri, S., Conchello, P., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Herrera, A., Ariño, A. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5105.
225. Niessner, G., Buchberger, W., Eckerstorfer, R. *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 341.
226. Lentza-Rizos, Ch., Avramides, E.J., Visi, E. *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 297.
227. Tsatsakis, A.M., Tsakiris, I.N., Tzatzarakis, M.N. *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 553.
228. Lambropoulou, D.A., Sakellarides, T., Albanis, T.A. *Anal. Bioanal. Chem.* 368 (2000) 616.
229. Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A. *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 243.
230. Lambropoulou, D.A., Sakkas, D.V., Albanis, T.A., *J. Anal. Bioanal. Chem.* 324 (2002) 932.
231. Khodadoust, A.P., Suidan, M.T., Acheson, C.M., Brenner, R.C. *Chemosphere* 18 (1999) 2681.
232. Vichi, S., Castellote, A.I., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S., López-Tamames, E. *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 19.
233. Tsoutsi, C.S., Albanis, T.A. *J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 3.
234. Barker, S.A., Long, A.R., Short, C.R. *J. Chromatogr. A* 475 (1989) 353.
235. Barker, S.A. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115.
236. Barker, S.A. *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 63.
237. Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5026.

238. Concha-Grana, E., Barriada-Pereira, M., Turnes-Carou, M.I. *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 1225.
239. Kluyuev, N.A., Shelepchikov, A.A., Feshin, D.B., Soifer, V.S., Brodskii, E.S. *Labor. Zh.* 2 (2002) 12.
240. Hopper, M.L. *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 93.
241. Hennion, M.C., Scribe, P. En: *Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance*. D. Barceló (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1993, p. 23.
242. Martínez, D., Cugat, M.J., Borrull, F., Calull, M. *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 65.
243. Prado, A.G.S., Airoidi, C. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 1028.
244. Poole, C.F. *Trends. Anal. Chem.* 22 (2003) 362.
245. He, F. *Toxicol. Lett.* 108 (1999) 277.
246. Dugo, G., Di Bella, G., La Torre, L., Saitta, M. *Food Control* 16 (2005) 435.
247. Guardia-Rubio, M., Fernández-De Córdoba, M.L., Ayora-Cañada, M.J., Ruiz-Medina, A. *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 231.
248. García Sánchez, A., Ramos Martos, N., Ballesteros, E. *Anal. Chim. Acta* 558 (2006) 53.
249. Tsoutsi, C., Konstantinou, I., Hela, D., Albanis, T. *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 216.
250. Cunha, S.C., Fernández, J.O., Oliveira, B.P.P. *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 156.
251. Sánchez, R., Vázquez, A., Riquelme, D., Villén, J. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2003) 6098.

252. Sánchez, R., Vázquez, A., Villén-Altamirano, J., Villén, J. *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006) 129.
253. Sánchez, R., Cortés, J.M., Villén, J., Vázquez, A. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 1255.
254. Gillespie, A.M., Daly, S.L., Gilvydis, D.M., Schneider, F., Walters, S.M. *J. AOAC Int.* 78 (1995) 431.
255. Lentza-Rizos, Ch., Avramides, E.J., Cherasco, F. *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 135.
256. Noble, A. *J. Chromatogr. A* 642 (1993) 3.
257. Tomlin C.D.S. *The Pesticide Manual*, 11th ed., British Crop Protection Council, Surrey, England, 1997.
258. Sullivan, J.J., Goh, K.S. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4071.
259. Sine, C. (Ed.). *Farm Chemicals Handbook*. Meister, Willoughby, OH, 1992.
260. USEPA. *Diazinon Revised Risk Assessment and Agreement with Registrants*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC, 2001.
261. "Fenthion Kills Birds," Keycode Bayer, No. 58, 12 Marzo 2004
<http://www.cbgnetwork.org/home/Newsletter_KCB/KCB__58/kcb__58.html>
262. "Fenthion Voluntary Cancellation Requested", 12 Marzo 2004
<http://www.epa.gov/oppfead1/cb/csb_page/updates/fenthion-volcnl.htm>
263. United States National Water Quality Assessment, Pesticide National Synthesis Project. <http://www.ca.water.usgs.gov/pnsp>.
264. Larson, S.J., Capel, P.D., Majewski, M.S. *Pesticides in Surface Waters: Distributions, Trends, and Governing Factors*, Chelsea, Ann Arbor, MI, 1997.

265. Bushway, R.J., Fan, Z. *J. Food Prot.* 61 (1998) 708.
266. Gascón, J., Oubiña, A., Ballesteros, B., Barceló, D., Camps, F., Marco, M.P., González-Martínez, M.A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 149.
267. Langone, J.J., Van Vunakis, H. *Methods Enzymol.* 84 (1982) 628.
268. Bradford, M. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 245.
269. Erlanger, B.F. *Methods Enzymol.* 70 (1980) 85.
270. Tijssen, P. En: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 15, R.H. Burdon, P.H. Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1987, p. 221.
271. Morais, S., Maquieira, A., Puchades, R. *J. Immunol. Methods* 224 (1999) 101.
272. Lee, N., McAdam, D.P., Skerritt, J.H. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 520.
273. Goodrow, M.H., Harrison, R.O., Hammock, B.D. *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 990.
274. Kramer, P.M., Marco, M.P., Hammock, B.D. *J. Agric. Food Chem* 42 (1994) 934.
275. Marco, M.P., Hammock, B.D., Kurth, M.J. *J. Org. Chem.* 58 (1993) 7548.
276. Jung, F., Szekacs, A., Li, Q., Hammock, B.D. *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 129.
277. Hill, A.S., McAdam, D.P., Edward, S.L., Skerritt, J.H. *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 2011.
278. Pekas, J.C. *J. Anim. Sci.* 74 (1996) 1953.

279. Ballesteros, B., Barceló, D., Sánchez-Baeza, F., Camps, F., Marco, M.P. *Anal. Chem.* 70 (1998) 4004.
280. Galve, R., Sánchez-Baeza, F., Camps, F., Marco, M.P. *Anal. Chim. Acta* 452 (2002) 191.
281. Abad, A., Manclús, J.J., Mojarrad, F., Mercader, J.V., Miranda, M.A., Primo, J., Guardiola, V., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3694.
282. Galve, R., Camps, F., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.P. *Anal. Chem.* 72 (2000) 2237.
283. Oubiña, A., Ballesteros, B., Carrasco, P.B., Galve, R., Gascón, J., Iglesias, F., Sanvicens, N., Marco, M.P. En: *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants. Techniques, Applications and Quality Assurance*. D. Barceló (Ed.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2000, p. 289.
284. Liu, Y.H., Jin, M.J., Gui, W.J., Cheng, J.L., Guo, Y.R., Zhu, G.N. *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 173.
285. Hill, A.S., Skerritt, J.H., John, H., Bushway, R.J., Pask, W., Larkin, K.A., Thomas, M., Korth, W., Bowmer, K. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2051.
286. Manclús, J.J., Primo, J., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 4063.
287. Lee, N.J., Skerritt, J.H., McAdam, D.P. *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1730.
288. Manclús, J.J., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 662.
289. Galve, R., Sánchez-Baeza, F., Camps, F., Marco, M.P. *Anal. Chim. Acta* 452 (2002) 191.
290. Galve, R., Nichkova, M., Camps, F., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.P. *Anal. Chem.* 74 (2002) 468.







291. Oubiña, A., Barceló, D., Marco, M.P. *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 267.
292. ten Hoeve, W., Wynberg, H., Williams, T.J., Harvey, D., Gordon, G.B., Reynolds, P.H.S. *Bioconjugate Chem.* 8 (1997) 257.
293. Lee, E.K., Kim, Y.J., Park, W.Ch., Chung, T., Lee, Y.T. *Anal. Chim. Acta* 530 (2005) 143.
294. Kim, Y.K., Cho, Y.A., Lee, H.S., Lee, Y.T., Gee, S.J., Hammock, B.D. *Anal. Chim. Acta* 475 (2003) 85.
295. Kim, Y.K., Cho, Y.A., Lee, H.S., Lee, Y.T. *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 29.
296. Zhang, Q., Wang, L., Ahn, K.C., Sun, Q., Hu, B., Wang, J., Liu, F. *Anal. Chim. Acta* 596 (2007) 303.
297. Zhang, Q., Sun, Q., Hu, B., Shen, Q., Yang, G., Liang, X., Sun, X., Liu, F. *Food Chem.* 106 (2008) 1278.
298. Nishi, K., Imajuku, Y., Nakata, M., Ohde, K., Miyake, S., Morimune, K., Kawata, M., Okawa, H. *J. Pestic. Sci. (Int. Ed.)* 28 (2003) 301.
299. Johnson, J.C., Van Emon, J.M., Pullman, D.R., Keeper, K.R. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3116.
300. Alcocer, M.J.C., Dillon, P.P., Manning, B.M., Doyen, C., Lee, H.A., Daly, S.J., O'Kennedy, R., Morgan, M.R.A. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2228.
301. Jang, M.S., Lee, S.J., Xue, X., Kwon, H.M., Ra, C.S., Lee, Y.T., Chung, T. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002) 1116.
302. Lawruk, T.S., Gueco, A.M., Mihaliak, C.A., Dolder, S.C., Dial, G.E., Herzog, D.P., Rubio, F.M. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2913.

303. Koch, H.M., Hardt, J., Angerer, J. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204 (2001) 175.
304. Manclús, J.J., Primo, J., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1257.
305. Dordick, J.S. *Enz. Microbiol. Technol.* 11 (1989) 194.
306. Khmelnitsky, Y.L., Rich, J.O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 47.
307. Magner, E., Klibanov, A.M. *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 175.
308. Avbelj, F., Moulton, J. *Biochemistry* 34 (1995) 755.
309. Carra, J.H., Privalov, P.L. *FASEB J.* 10 (1996) 67.
310. Wang, J., Lin, Y. *Anal. Chim. Acta* 271 (1993) 53.
311. Stocklein, W., Gebbert, A., Schmid, R.D. *Anal. Lett.* 23 (1990) 1465.
312. Giraudi, G., Baggiani, C. *Biochim. Biophys. Acta* 1157 (1993) 211.
313. Jourdan, S.W., Scutellaro, A.M., Hayes, M.C., Herzog, D.P. En: *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety*. ACS Symp. Ser., Vol. 621, R.C. Beier, L.H. Stanker (Eds.), ACS, Washington, 1996, p. 17.
314. Skerritt, J.H., Rani, B.E.A. En: *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety*. ACS Symp. Ser., Vol. 621, R.C. Beier, L.H. Stanker, (Eds.), ACS, Washington, 1996, p. 29.
315. Lu, B., Iwuoha, I., Smyth, M.R., O'Kennedy, R. *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 619.
316. De Lauzon, S., Rajkowski, K.M., Cittanova, N. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 48 (1994) 225.

317. Fushiwaki, Y., Hamamura, T., Hasegawa, A., Urano, K. *Japan J. Toxicol. Environ. Hlth.* 39 (1993) 543.
318. Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Minelli, E.V., Melis, M., Pirisi, F.M. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2248.
319. Senesi, N. En: Nature of Interactions between Organic Chemicals and Dissolved Humic Substances and the Influence of Environmental Factors. Organic Substances in Soil and Water. Special publication No.135, A.J. Beck, K.C. Jones, M.H.B. Hayes, U. Mingelgrin (Eds.), Royal Society of Chemistry, UK, 1993, p. 73.
320. Johnson, W.E., Fendinger, N.J., Plimmer, J.R. *Anal. Chem.* 63 (1991) 1510.
321. González-Martínez, M.A., Puchades, R., Maquieira, A., Ballesteros, B., Marco, M.P., Barceló, D. *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 179.
322. Gabaldón, J.A., Cascales, J.M., Maquieira, A., Puchades, R. *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 125.
323. Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Linhart, S.M. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 (1998) 385.
324. Dean, J. R. *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 553.
325. González-Martínez, M.A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., Ferrer, I., Marco, M.P., Barceló, D. *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 201.
326. Morais, S. Inmunofiltración: una metodología básica para el desarrollo de biosensores y para la preconcentración y determinación de plaguicidas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, 1999.
327. Butler, J.E., en: Solid Phase in Immunoassay, Immunoassay. E.P. Diamandis, T.K. Christopoulos (Eds.), Academic Press, San Diego, CA, 1996, p. 215.

328. Härmä, H., Soukka, T., Lövgren, T. *Clin. Chem.* 47 (2001) 561.
329. Chan, W.C.W., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., Nie, S. *Curr. Opin. Biotech.* 13 (2002) 40.
330. Goldman, E.R., Anderson, G.P., Tran, P.T., Mattoussi, H., Charles, P.T., Mauro, J.M. *Anal. Chem.* 74 (2002) 841.
331. Feng, J., Shan, G.M., Maquieira, A., Koivunen, M.E., Guo, B., Hammock, B.D., Kennedy, I.M. *Anal. Chem.* 75 (2003) 5282.
332. Hai, X., Tan, M., Wang, G., Ye, Z., Yuan, J., Matsumoto, K. *Anal. Sci.* 20 (2004) 245.
333. Ye, Z., Tan, M., Wang, G., Yuan, J. *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 851.
334. Ye, Z., Tan, M., Wang, G., Yuan, J. *Talanta* 65 (2005) 206.
335. Wakefield, G., Keron, H.A., Dobson, P.J., Hutchison, J.L. *J. Colloid Interface Sci.* 215 (1999) 179.
336. Sarin, V.K., Kent, S.B.H., Tam, J.P., Merrifield, R.B. *Anal. Biochem.* 117 (1981) 147.

8. Publicaciones

-  Garcés-García, Marta; Morais, Sergi; González-Martínez, Miguel Ángel; Puchades, Rosa; Maquieira, Ángel. **Rapid immunoanalytical method for the determination of atrazine residues in olive oil.** *Anal. Bioanal. Chem.* (2004), 378(2), 484-489.
-  Brun, Eva M.; Garcés-García, Marta; Escuín, Estefania; Morais, Sergi; Puchades, Rosa; Maquieira, Ángel. **Assessment of Novel Diazinon Immunoassays for Water Analysis.** *Environ. Sci. Technol.* (2004), 38(4), 1115-1123.
-  Brun, Eva M.; Garcés-García, M.; Puchades, R.; Maquieira, A. **Enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion. Influence of hapten structure.** *J. Immunol. Methods* (2005), 295, 21-35.
-  Brun, Eva M.; Garcés-García, Marta; Bañuls, M^a José; Gabaldón, José A.; Puchades, Rosa; Maquieira, Ángel. **Evaluation of a Novel Malathion Immunoassay for Groundwater and Surface Water Analysis.** *Environ. Sci. Technol.* (2005), 39, 2786-2794.
-  Brun, Eva M.; Garcés-García, Marta; Puchades, Rosa; Maquieira, Ángel. **Highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for chlorpyrifos. Application to olive oil analysis.** *J. Agric. Food Chem.* (2005), 53, 9352-9360.
-  Garcés-García, Marta; Brun, Eva M.; Puchades, Rosa; Maquieira, Ángel. **Immunochemical Determination of Four Organophosphorus Insecticide Residues in Olive Oil using a Rapid Extraction Process.** *Anal. Chim. Acta* (2006), 556(2), 347-354.