

RESUMEN

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

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

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

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

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

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

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