

	PÁG.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Plaguicidas: medio ambiente y seguridad alimentaria	1
1.1.1. Determinación de residuos de plaguicidas.....	4
1.2. Plaguicidas organofosforados	6
1.2.1. Usos y toxicidad.....	9
1.2.2. Métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados.....	11
1.3. Técnicas inmunoquímicas	13
1.3.1. Principios generales de las técnicas inmunoquímicas.....	14
1.3.2. Obtención y características de los anticuerpos.....	15
1.3.3. Tipos de inmunoensayos.....	22
1.3.4. Métodos de barrido (<i>Screening</i>).....	26
1.3.4.1. <i>Inmunofiltración-Ensayos en membrana</i>	27
1.4. El aceite de oliva	32
1.4.1. Tipos, obtención y producción del aceite de oliva.....	37
1.4.2. El aceite de oliva y los plaguicidas.....	38
1.4.3. Determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva.....	40
1.4.4. Plaguicidas organofosforados objeto de estudio.....	48
1.4.4.1. <i>Diazinón</i>	48
1.4.4.2. <i>Fentión</i>	49
1.4.4.3. <i>Malatión</i>	50
1.4.4.4. <i>Clorpirifos</i>	50
2. OBJETIVOS.....	52
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1. Productos y reactivos	53
3.1.1. Plaguicidas.....	53
3.1.2. Reactivos.....	53
3.1.3. Tampones.....	54
3.1.4. Haptenos.....	54
3.1.5. Otros materiales.....	54
3.2. Equipos instrumentales	54
3.3. Técnicas generales	56
3.3.1. Conjugación de haptenos a proteínas.....	56

3.3.2.	Purificación de conjugados mediante cromatografía de exclusión molecular.....	59
3.3.3.	Cuantificación de proteína.....	59
3.3.4.	Obtención de anticuerpos policlonales.....	60
3.4.	Ensayos de titulación y competición. Enzimoimmunoanálisis en fase sólida (ELISA).....	60
3.4.1.	Optimización de los ensayos ELISA.....	62
3.4.2.	Estudios de selectividad.....	63
3.4.3.	Efecto de los disolventes orgánicos.....	63
3.5.	Enzimoimmunoanálisis en fase sólida por filtración en membrana (ELIFA).....	63
4.	RESULTADOS.....	66
4.1.	Diseño de haptenos.....	66
4.1.1.	Haptenos para diazinón.....	67
4.1.2.	Haptenos para fentión.....	67
4.1.3.	Haptenos para malatión.....	67
4.1.4.	Haptenos para clorpirifos.....	71
4.2.	Selección de sueros.....	72
4.2.1.	Selección de sueros para diazinón.....	72
4.2.2.	Selección de sueros para fentión.....	74
4.2.3.	Selección de sueros para malatión.....	75
4.2.4.	Selección de sueros para clorpirifos.....	77
4.3.	Desarrollo de inmunoensayos competitivos.....	79
4.3.1.	Inmunoensayos competitivos en formato directo.....	79
4.3.2.	Inmunoensayos competitivos en formato indirecto.....	80
4.3.2.1.	<i>Desarrollo de inmunoensayos competitivos para diazinón.....</i>	<i>80</i>
4.3.2.2.	<i>Desarrollo de inmunoensayos competitivos para fentión.....</i>	<i>81</i>
4.3.2.3.	<i>Desarrollo de inmunoensayos competitivos para malatión.....</i>	<i>81</i>
4.3.2.4.	<i>Desarrollo de inmunoensayos competitivos para clorpirifos</i>	<i>82</i>

4.4. Optimización y características de los inmunoensayos	83
4.4.1. Efecto del pH	83
4.4.2. Efecto de la fuerza iónica	84
4.4.3. Efecto de la concentración de surfactante	86
4.4.4. Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva	88
4.4.5. Prestaciones analíticas de los inmunoensayos optimizados	89
4.4.6. Recapitulación de resultados	92
4.5. Ensayos de selectividad	93
4.5.1. Selectividad del ensayo para diazinón	93
4.5.2. Selectividad del ensayo para fentión	95
4.5.3. Selectividad del ensayo para malatión	95
4.5.4. Selectividad del ensayo para clorpirifos	95
4.6. Tolerancia de los inmunoensayos a disolventes orgánicos	99
4.6.1. Tolerancia del inmunoensayo para diazinón	101
4.6.2. Tolerancia del inmunoensayo para fentión	103
4.6.3. Tolerancia del inmunoensayo para malatión	104
4.6.4. Tolerancia del inmunoensayo para clorpirifos	104
4.7. Aplicación de los inmunoensayos desarrollados	108
4.7.1. Determinación de residuos de diazinón en agua	108
4.7.2. Determinación de residuos de fentión en vino	109
4.7.3. Determinación de residuos de malatión en agua	111
4.8. Desarrollo de un método rápido de extracción de residuos de plaguicidas en aceite de oliva virgen extra y determinación mediante inmunoensayo	116
4.8.1. Puesta a punto del protocolo de extracción	116
4.8.2. Aplicación a la deteminación de atrazina en aceite de oliva virgen extra mediante inmunoensayo	119
4.8.3. Optimización del proceso de extracción de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva virgen extra	125
4.8.4. Aplicación de la metodología desarrollada a la determinación de organofosforados en aceite de oliva virgen extra	128
4.8.5. Cuantificación simultánea de residuos de organofosforados en aceite de oliva virgen extra	130

4.8.6.	Análisis de aceites de oliva. Comparación con los métodos de referencia.....	133
4.8.7.	Determinación inmunoquímica de residuos de plaguicidas organofosforados en otros aceites vegetales comestibles.....	135
4.9.	Desarrollo de inmunoensayos rápidos en membrana para la determinación de residuos de organofosforados en aceite de oliva virgen extra.....	137
4.	CONCLUSIONES.....	146
5.	ANEXO.....	148
	Desarrollo y aplicación de marcadores fluorescentes particulados.....	148
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	153
7.	PUBLICACIONES.....	179