

INDICE

1. Introducción

1.1. PRODUCTOS FITOSANITARIOS. PERSPECTIVA HISTÓRICA Y 1 PROBLEMÁTICA

1.2. ANÁLISIS DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS 5

1.2.1. Métodos oficiales de análisis de productos fitosanitarios 5

1.2.2. Métodos inmunoquímicos de análisis 11

1.2.2.1. Producción de anticuerpos 12

1.2.2.2. Clasificación de los inmunoensayos 15

1.2.2.3. Características analíticas de los formatos de ensayo 18 competitivos

1.2.2.4. Aplicación de las técnicas inmunoquímicas al análisis

de
20
residuos
de
productos
fitosanitarios
en
aguas
y
alimentos

1.3. INMUNOENSAYOS Y MEDIOS ORGÁNICOS
24

1.4. DISOLVENTES ORGÁNICOS
34

1.4.1. Elección de disolventes para bioensayos en medios orgánicos 36

1.5. INMUNOSENSORES. TIPOS
39

1.5.1. Inmunosensores en flujo
45

1.5.1.1.
Soportes
de
inmovilización
de
inmunorreactivos
46

1.5.1.2.
Modos
de
inmovilización
47

1.5.1.3.
Reversibilidad
y
reusabilidad
48

1.6. PRODUCTOS FITOSANITARIOS OBJETO DE ESTUDIO
49

1.6.1. Carbaril

49

1.6.2. 1-Naftol

51

1.6.3. Irgarol 1051

52

1.7. OBJETIVOS

54

2. Materiales y métodos

56

2.1. REACTIVOS

56

2.2. INMUNORREACTIVOS

57

2.3. INSTRUMENTACIÓN

59

2.4. MÉTODOS DE CONJUGACIÓN

60

2.4.1. Método del anhídrido mixto

60

2.4.2. Método del éster activo

62

2.5. SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN DE INMUNORREACTIVOS 64

2.6. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

65

2.6.1. Inmovilización de anticuerpos sobre CPG alquilaminado

65

2.6.2. Inmovilización de anticuerpos sobre gel de agarosa (GAHz)

67

2.6.3. Inmovilización de haptenos

67

2.6.3.1.

Inmovilización

sobre

CPG

68

2.6.3.2. Inmovilización

sobre

gel

de

agarosa

derivatizado

(GASc)

68

2.7. PRUEBAS PRELIMINARES. SELECCIÓN DE VARIABLES

69

2.8. DESCRIPCIÓN DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO

72

DE LOS SISTEMAS SENSORES

2.8.1. Formato directo

74

2.8.2. Formato indirecto

76

2.8.3. Formato de captura

78

2.9. SISTEMAS DE DETECCIÓN EMPLEADOS EN EL DESARROLLO DE LOS INMUNOSENSORES 81

2.9.1. Inmunosensores con detección fluorescente 81

2.9.1.1. Inmunosensores

con

detección

fluorescente

con

resolución

81

temporal

2.9.1.2. Conjugación

complejo

de

Tb-hapteno.

Formato

directo

84

2.9.1.3. Conjugación

del

complejo

de

Tb-anticuerpo

secundario.

84

Formato

indirecto

2.9.2. Inmunosensores con detección luminiscente

87

2.10. DISOLVENTES ORGÁNICOS

89

2.11. TRATAMIENTO DE MUESTRAS

90

2.11.1. Muestras vegetales

90

2.11.2. Muestras de agua

91

3. Resultados y discusión

93

3.1. SISTEMA MODELO. CONDICIONES DE PARTIDA

93

3.2. ESTUDIO DE DISOLVENTES ORGÁNICOS

93

3.3. ESTUDIOS PRELIMINARES: SELECCIÓN DE VARIABLES

95

3.3.1. Ensayos de actividad

96

3.3.2. Ensayos de competición

98

3.3.3. Reversibilidad de las reacciones anticuerpo-antígeno y regeneración de 100

inmunosoportes

3.4. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES PARA EL SISTEMA MODELO 102

3.4.1. Optimización del inmunosensor. Formato directo

103

3.4.1.1.

Ensayos
de
competición
en
formato
directo
107

3.4.2. Optimización del inmunosensor. Formato indirecto

110

3.4.3. Optimización del inmunosensor. Formato de captura

113

3.4.4. Recapitulación

116

3.5. ESTUDIO DE REACTIVIDAD CRUZADA

117

3.5.1. Formato directo

118

3.5.2. Formato indirecto

118

3.5.3. Formato de captura

119

3.6. COMPARACIÓN CON LOS SISTEMAS EN MEDIO ACUOSO 120

3.7. ANALISIS DE MUESTRAS REFORZADAS

121

3.7.1. Inmunosensor en formato de captura

122

3.7.1.1.

Análisis
de
vegetales

frescos
y
procesados
122

3.7.1.2.
Análisis
de
muestras
líquidas
127

3.7.2. Inmunosensor en formato directo
129

3.7.2.1.
Análisis
de
muestras
vegetales
129

3.7.2.2.
Análisis
de
aguas
130

3.7.3. Inmunosensor en formato indirecto
131

3.8 DESARROLLO DE INMUNOSENSORES PARA CARBARIL BASADOS
133
EN ANTICUERPOS POLICLONALES

3.8.1. Desarrollo de inmunosensores en formato directo
133

3.8.2. Desarrollo de inmunosensores en formato indirecto
138

3.8.3. Desarrollo de inmunosensores en formato de captura
139

3.8.4. Recapitulación
141

3.9. ESTUDIO DE REACTIVIDAD CRUZADA
142

3.9.1. Formato directo
142

3.9.2. Formato indirecto
143

3.9.3. Formato de captura
143

3.10. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES
144

3.10.1. Vegetales frescos y procesados
144

3.10.2. Aguas
145

3.10.2.1.
Análisis
de
agua
procedente
de
la
Albufera
146

3.10.2.2.
Agua
procedente
del
Río
Llobregat
146

3.11. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES PARA 1-NAFTOL
148

3.11.1. Desarrollo de inmunosensores en formato directo
148

3.11.2. Desarrollo de inmunosensores en formato indirecto
149

3.11.3. Desarrollo de inmunosensores en formato de captura
149

3.11.4. Recapitulación
153

3.12. ESTUDIO DE REACTIVIDAD CRUZADA
154

3.13. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUAS NATURALES. ESTUDIOS DE
155
PRECONCENTRACIÓN

3.14. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES PARA IRGAROL 1051 157

3.14.1. Desarrollo de inmunosensores en formato de captura
157

3.14.2. Desarrollo de inmunosensores en formato directo
160

3.14.3. Desarrollo de inmunosensores en formato indirecto
162

3.14.4. Recapitulación
163

3.15. ESTUDIO DE REACTIVIDAD CRUZADA
164

3.16. ANÁLISIS DE IRGAROL 1051 EN MUESTRAS DE AGUA
165

3.17. RECAPITULACIÓN

167

3.18. SISTEMAS DE DETECCIÓN ALTERNATIVOS

168

3.18.1. Detección basada en fluorescencia con resolución temporal

168

3.18.1.1. Inmunosensores

para

la

determinación

de

carbaril

169

3.18.1.2.

Inmunosensores

para

la

determinación

de

1-naftol

171

3.18.1.3.

Inmunosensores

para

la

determinación

de

Irgarol

1051

171

3.18.1.4.

Estudio

de

estabilidad

del

conjugado

Ab2-complejo

Tb

173

3.18.2. Inmunosensores basados en detección luminiscente

175

3.18.2.1.

Estudio
de
sustancias
potenciadoras
de
la
reacción
de
179
detección
quimioluminiscente

3.18.2.2.
Estudio
de
la
estabilidad
del
substrato
enzimático
183

3.18.2.3.
Efecto
de
los
medios
orgánicos
sobre
la
actividad
de
la
184
fosfatasa
alcalina
(AP)

3.18.2.4.
Análisis
de
muestras
reales
186
189

4. Conclusiones
BIBLIOGRAFÍA 193

F
FFFFi
iiiig
ggggu
uuuur
rrrra
aaaas
ssss

- Figura 1.1. Etapas de tratamiento de muestra previas al análisis cromatográfico
- Figura 1.2. Estructura básica de un anticuerpo
- Figura 1.3. Esquema de la obtención de anticuerpos para haptenos
- Figura 1.4. Representación de la curva de calibrado
- Figura 1.5. Esquema genérico de un biosensor
- Figura 1.6. Esquema básico de un inmunosensor
- Figura 1.7. Estructura de Carbaril
- Figura 1.8. Estructura de 1-Naftol
- Figura 1.9. Estructura de Irgarol 1051
- Figura 2.1. Estructura de los haptenos para carbaril. Anticuerpos Monoclonales
- Figura 2.2. Estructura de los haptenos para carbaril. Anticuerpo policlonal
- Figura 2.3. Estructura de los haptenos utilizados en el sistema 1-naftol
- Figura 2.4. Estructura de los haptenos utilizados en el sistema Irgarol 1051
- Figura 2.5. Método del anhídrido mixto para el acoplamiento de haptenos a proteínas
- Figura 2.6. Método del éster activo para el acoplamiento de haptenos a proteínas
- Figura 2.7. Etapas del proceso de inmovilización de anticuerpos sobre CPG
- Figura 2.8. Etapas del proceso de inmovilización de anticuerpos sobre gel de agarosa derivatizado con grupos hidrazina
- Figura 2.9. Inmovilización de conjugados hapteno-proteína sobre gel de agarosa derivatizado con grupos N-hidroxisuccinimida
- Figura 2.10. Esquema del sistema de inmunofiltración
- Figura 2.11. Esquema del inmunosensor
- Figura 2.12. Representación de las etapas seguidas en los ensayos en formato directo

Figura 2.13.
Formato directo. Conexión módulos-disoluciones

Figura 2.14.
Representación de las etapas seguidas en los ensayos en formato indirecto

Figura 2.15.
Formato indirecto. Conexión módulos-disoluciones

Figura 2.16.
Representación de las etapas seguidas en los ensayos en formato de captura. Protocolos de ensayo simultáneo y secuencial

Figura 2.17.
Formato de captura. Conexión módulos-disoluciones

Figura 2.18.
Estructura del complejo de Tb

Figura 2.19.
Espectro de emisión del complejo de Tb

Figura 2.20.
Espectro de excitación del complejo de Tb

Figura 2.21.
Descripción de las etapas seguidas para la funcionalización de haptenos con cadaverina

Figura 2.22.
Espectro de emisión del conjugado complejo de Tb-anticuerpo secundario

Figura 2.23.
Espectro de excitación del conjugado complejo de Tb-anticuerpo secundario

Figura 2.24.
Inmunosensores con detección fluorescente con resolución temporal.
Conexión módulos-disoluciones

Figura 3.1.
Porcentajes de señal obtenidos mediante inmunofiltración utilizando los anticuerpos monoclonales anti-carbaril inmovilizados en GAHz. Trazador CNH-HRP y todos los medios orgánicos estudiados

Figura 3.2.1
Señales de fluorescencia obtenidas en los ensayos de regeneración con el

anticuerpo CNH 36 inmovilizado en GAHz (a) y CPG (b)

Figura 3.2.2

Señales de fluorescencia obtenidas en los ensayos de regeneración con el anticuerpo CNH 45 inmovilizado en GAHz (a) y CPG (b)

Figura 3.2.3

Señales de fluorescencia obtenidas en los ensayos de regeneración con el anticuerpo CNA 36 inmovilizado en GAHz (a) y CPG (b)

Figura 3.3.

Curvas de competición obtenidas para todas las combinaciones inmunosoporte-trazador: a) anticuerpo CNA 36 inmovilizado en GAHz y CNH-HRP como trazador; b) idénticas condiciones, excepto trazador CPNU-HRP; c) CNA 36 inmovilizado en CPG y CNH-HRP como trazador; d) idénticas condiciones, excepto trazador CPNU-HRP. Medios orgánicos: (n) M1; (°) M10; (g) LM7; (s) LM19; (t) LM20

Figura 3.4.
Influencia de la concentración de metanol en la sensibilidad del método ELISA empleado en la determinación de carbaril

Figura 3.5.
Curvas de competición normalizadas obtenidas mediante los dos métodos inmunológicos: (s) Sensor utilizando 50% MeOH-50 PBT como medio orgánico. (l) ELISA utilizando PBS-T con 5% MeOH (v/v)

Figura 3.6.
Correlación entre los resultados obtenidos en los análisis de carbaril mediante el inmunosensor, ELISA y HPLC en muestras vegetales

Figura 3.7.
Curvas de calibrado obtenidas con el anticuerpo policlonal R2114: a) inmovilizado en GAHz con los trazadores CNH-HRP y CPNU-HRP en el medio 50%MeOH-50% PBST; b) inmovilizado en CPG con el trazador H4-HRP y los medios orgánicos seleccionados

Figura 3.8.
Curvas de calibrado obtenidas con el anticuerpo policlonal R2114 inmovilizado en CPG con los trazadores CPNU-HRP (a); CNH-HRP (b); H4-HRP (c) y los medios orgánicos seleccionados

Figura 3.9.
Comparación de las curvas de calibrado obtenidas en el medio M1 utilizando las condiciones más sensibles

Figura 3.10.
Curvas de calibrado obtenidas con el anticuerpo R2114 en formato indirecto. Soporte: GASc

Figura 3.11.
Curvas de competición obtenidas con el anticuerpo 3907 en formato de captura en los medios de ensayo estudiados: a) acuosos; b) orgánicos

Figura 3.12.
Comparación de las curvas de calibrado obtenidas en medio acuoso y orgánico en las condiciones de máxima sensibilidad

Figura 3.13.
Curva de preconcentración para 1-naftol

Figura 3.14.
Curvas de competición normalizadas para Irgarol 1051 obtenidas en formato de captura (R-15/4d-HRP)

Figura 3.15.
Evolución de la señal obtenida con el conjugado Ab2-Tb en función del

tiempo (sin estabilizante)

Figura 3.16.

Evolución de la señal obtenida con el conjugado Ab2-Tb en presencia de proteínas inertes; a) BSA (1%); b) OVA (0,5%)

Figura 3.17.

Evolución temporal de la señal obtenida con el substrato CDP Star

Figura 3.18.

Valores de señal obtenidos con el substrato CDP Star en presencia de potenciadores

Figura 3.19.

Señales blanco debidas a los potenciadores

Figura 3.20.

Estabilidad del sustrato enzimático con el tiempo. Influencia de la adición de estabilizante

Figura 3.21.

Efecto del medio orgánico ensayado en la actividad de la fosfatasa alcalina

T
TTTTa
aaaab
bbbl
llla
aaaas
ssss

Tabla 1.1.
Valores de solubilidad (mg/l) de algunos productos fitosanitarios en disolventes orgánicos

Tabla 1.2.
Etapas previas y técnica empleada para la determinación de algunos productos fitosanitarios utilizando los métodos de la AOAC

Tabla 1.3.
Comparación de las principales características de los anticuerpos policlonales y monoclonales

Tabla 1.4.
Aplicación de técnicas inmunoquímicas al análisis de residuos de productos fitosanitarios

Tabla 1.5.
Métodos inmunoquímicos validados por la EPA para el análisis de residuos en aguas y suelos

Tabla 1.6.
Valores de I50 (Pg/l) para triazinas obtenidos en distintos disolventes orgánicos

Tabla 1.7.
Parámetros solvatocrómicos de algunos disolventes orgánicos

Tabla 1.8.
Efectos de los disolventes orgánicos sobre la actividad enzimática en función de log P

Tabla 1.9.
Valores de log P para algunos disolventes orgánicos

Tabla 1.10.
Clasificación de inmunosensores en función del transductor

Tabla 1.11.
Comparación de los sistemas de transducción

Tabla 1.12.

Principales sistemas de detección empleados en inmunosensores

Tabla 1.13.

Modos de inmovilización de anticuerpos y haptenos

Tabla 2.1.

Protocolo de ensayo correspondiente al formato directo

Tabla 2.2.

Protocolo de ensayo correspondiente al formato indirecto

Tabla 2.3.

Protocolos de ensayo correspondientes al formato de captura

Tabla 2.4.

Protocolo de ensayo correspondiente al sistema con detección fluorescente con resolución temporal

Tabla 2.5.

Relación de las sustancias empleadas como potenciadores

Tabla 2.6.

Propiedades físico-químicas de los disolventes orgánicos empleados

Tabla 3.1.
Mezclas binarias y ternarias compatibles. Resultados expresados como porcentajes de disolvente orgánico en PBST (v/v)

Tabla 3.2.
Señales obtenidas en los ensayos de competición mediante inmunofiltración (%)

Tabla 3.3.
Señales obtenidas tras varios ciclos de desorción

Tabla 3.4.
Número mínimo de ciclos de regeneración efectuados con cada inmunosoprote y mezcla orgánica ensayada

Tabla 3.5.
Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en formato directo con el anticuerpo monoclonal CNA 36 inmovilizado en los dos soportes. Ensayos realizados con los trazadores y medios orgánicos seleccionados

Tabla 3.6.
Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en formato indirecto con los dos conjugados hapteno-proteína inmovilizados en GASc. Ensayos realizados con los anticuerpos y medios orgánicos seleccionados

Tabla 3.7.
Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en formato de captura con los anticuerpos monoclonales estudiados. Ensayos realizados con los trazadores y medios orgánicos seleccionados

Tabla 3.8.
Resumen de las características de los inmunosensores para carbaril con anticuerpos monoclonales

Tabla 3.9.
Valores de reactividad cruzada (%RC) obtenidos utilizando formato directo en las condiciones seleccionadas

Tabla 3.10.
Valores de reactividad cruzada (%RC) obtenidos utilizando formato indirecto en las condiciones seleccionadas

Tabla 3.11.
Valores de reactividad cruzada (%RC) obtenidos utilizando formato de captura en las condiciones seleccionadas

Tabla 3.12.
Valores de I50 (Pg/l) de los inmunosensores en medio acuoso y medio orgánico para todos los formatos y soportes

Tabla 3.13.

Valores comparados de reactividad cruzada (%RC) obtenidos con los inmunosensores en medio orgánico y acuoso (condiciones de máxima sensibilidad)

Tabla 3.14.

Determinación de carbaril en muestras vegetales mediante el inmunosensor con formato de captura. Comparación entre el método de extracción multiresiduo (MRS) y la extracción directa con metanol (EDM)

Tabla 3.15.

Determinación de carbaril en muestras vegetales reforzadas utilizando el inmunosensor en formato de captura. Comparación con los resultados obtenidos en ELISA y HPLC

Tabla 3.16.
Análisis de carbaril en muestras de zumo de manzana reforzado

Tabla 3.17.
Análisis de carbaril en muestras vegetales utilizando el inmunosensor en formato directo

Tabla 3.18.
Análisis de carbaril en agua mineral utilizando el inmunosensor en formato directo

Tabla 3.19.
Análisis de carbaril en agua mineral utilizando el inmunosensor en formato indirecto

Tabla 3.20.
Análisis de carbaril en muestras de tomate utilizando el inmunosensor en formato indirecto

Tabla 3.21.
Valores óptimos de concentración de trazador H4-HRP (mg/l) obtenidos en los ensayos de actividad realizados en el medio 50%MeOH-50% PBST

Tabla 3.22.
Valores de I50 (Pg/l) obtenidos con el anticuerpo policlonal R2114 inmovilizado en GAHz y CPG, trazadores y medios orgánicos seleccionados

Tabla 3.23.
Valores de I50 (Pg/l) obtenidos con el anticuerpo policlonal R2114 en formato de captura

Tabla 3.24.
Resumen de las características de los inmunosensores desarrollados para carbaril con el anticuerpo policlonal R2114

Tabla 3.25.
Valores de reactividad cruzada (%RC) obtenidos con el anticuerpo R2114 inmovilizando en GAHz y CPG. Comparación con ELISA

Tabla 3.26.
Valores de reactividad cruzada (%RC) obtenidos en formato de captura

Tabla 3.27.
Determinación de carbaril en muestras vegetales utilizando el inmunosensor en formato de captura

Tabla 3.28.
Análisis de carbaril en muestras de agua de la albufera

Tabla 3.29.
Análisis de carbaril en muestras de agua del Río Llobregat reforzadas a
100 ng/l

Tabla 3.30.
Porcentaje de señal normalizada obtenida tras cada ciclo de regeneración

Tabla 3.31.
Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en medio acuoso con el inmunosensor para
1-Naftol en formato de captura

Tabla 3.32.
Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en medio orgánico con el inmunosensor
para 1-Naftol en formato de captura

Tabla 3.33.

Resumen de las características de los inmunosensores desarrollados para 1-naftol

Tabla 3.34.

Valores de reactividad cruzada (%RC) obtenidos en medio acuoso y orgánico con el inmunosensor en formato de captura

Tabla 3.35.

Análisis de 1-naftol en muestras de agua reforzadas (40 Pg/l)

Tabla 3.36.

Rango óptimo de concentración de los trazadores en formato de captura

Tabla 3.37.

Valores de I50 (Pg/l) obtenidos con el inmunosensor para Irgarol 1051 en formato de captura

Tabla 3.38.

Rango óptimo de concentración de los trazadores en formato directo

Tabla 3.39.

Valores de I50 (Pg/l) obtenidos con el inmunosensor para Irgarol 1051 en formato directo. Anticuerpos inmovilizados en CPG

Tabla 3.40.

Valores de I50 (Pg/l) obtenidos con el inmunosensor para Irgarol 1051 en formato indirecto

Tabla 3.41.

Resumen de las características de los inmunosensores desarrollados para Irgarol 1051

Tabla 3.42.

Valores de reactividad cruzada (%RC) obtenidos con los inmunosensores para Irgarol 1051

Tabla 3.43.

Análisis de Irgarol 1051 en muestras de agua dulce

Tabla 3.44.

Análisis de Irgarol 1051 en muestras de agua marina

Tabla 3.45.

Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en formato indirecto con el conjugado Ab2-

Tb y con el conjugado enzimático Ab2-HRP. Sistema Carbaril

Tabla 3.46.

Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en formato indirecto con el conjugado Ab2-Tb y con el conjugado enzimático Ab2-HRP. Sistema 1-Naftol

Tabla 3.47.

Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en formato indirecto con el conjugado Ab2-Tb y con el conjugado enzimático Ab2-HRP. Sistema Irgarol 1051

Tabla 3.48.

Valores de I50 (Pg/l) obtenidos en formato de captura con detección luminiscente

Tabla 3.49.

Intensidad de luminiscencia para distintas concentraciones del potenciador Emerald II

Tabla 3.50.

Valores de I50 (Pg/l) obtenidos con el anticuerpo monoclonal CNH-45. Detección luminiscente

Tabla 3.51. Análisis de muestras de agua reforzadas con carbaril (100 ng/l) con el sistema de detección luminiscente